



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

OSIENNE DE SOUSA FERREIRA

**FERMENTAÇÃO DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) CONDUZIDA COM
LEVEDURAS DOS GÊNEROS *SACHAROMYCESS* E *PICHIA*: QUALIDADE
E PERFIL AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS**

BELÉM - PA

2019

OSIENNE DE SOUSA FERREIRA

**FERMENTAÇÃO DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) CONDUZIDA COM
LEVEDURAS DOS GÊNEROS *SACHAROMYCES* E *PICHIA*: QUALIDADE E
PERFIL AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos Lopes

BELÉM-PA

2019

**FERMENTAÇÃO DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) CONDUZIDA COM
LEVEDURAS DOS GÊNEROS *SACHAROMYCES* E *PICHIA*: QUALIDADE E
PERFIL AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS**

Por

OSIENNE DE SOUSA FERREIRA
Engenheira de Alimentos

Apresentada em: 11 de Outubro de 2019.

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos Lopes
(PPGCTA/ITEC/UFPA- Orientadora)

Dr^a. Márcia Gleice da Silva Souza
(PPGBIOTEC/UFPA)

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

Prof^a. Dr^a. Eloisa Helena de Aguiar Andrade
(IQ/UFPA/MPEG)

Prof. Dr. Renan Campos Chisté
(PPGCTA/ITEC/UFPA)

BELÉM-PA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

F383f Ferreira, Osienne.
FERMENTAÇÃO DE CACAU (*Theobroma cacao* L.)
CONDUZIDA COM LEVEDURAS DOS GÊNEROS
SACHAROMYCES E PICHIA: QUALIDADE E PERFIL
AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS / Osienne Ferreira. — 2019.
XVI, 58 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Alessandra Lopes
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2019.

1. AROMA, ACIDEZ, QUALIDADE, CACAU,
VOLÁTEIS. I. Título.

CDD 641.3

Dedico este trabalho primeiramente à Deus que se faz presente todos os dias da minha vida e me deu forças para estudar.

Aos meus pais, namorado, familiares e amigos pela compreensão, incentivo e amor.

E a todos aqueles que de forma direta e indireta me auxiliaram no desenvolvimento desta árdua tarefa acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Louvo e agradeço a Deus Pai que sempre esteve iluminando minha vida e direcionando meus caminhos; por me fortalecer nos momentos de desânimo e abrir meus olhos com sabedoria para encontrar soluções; por me conceder a graça de poder estudar e está diante de um sonho realizado.

Agradeço a prof^a Alessandra Santos Lopes, pelos conhecimentos compartilhados e pela confiança que depositou em meu trabalho. Além disso, agradeço pelos bons momentos de aprendizagem, não só acadêmica, mas também pelos conselhos e conversas alegres e descontraídas. Saiba que a admiro.

À minha família que é o meu suporte, a minha base, o meu TUDO! Minha mãe (Wanderléa), meu pai (Osiel), meu irmão (Wendel), por todo amor incondicional, palavras de incentivo, e pela confiança que depositaram em mim. Todo meu amor eternamente a vocês.

Ao meu namorado e companheiro de todas as horas, Brendo Araújo, por sempre me incentivar a nunca desistir, mesmo com todas as dificuldades enfrentadas. Obrigada por todo amor, carinho, companheirismo e paciência.

Á todos os membros do LABIOTEC, em especial a Gilson, Francilia, Deusa, Daniela, Letícia, Felipe, Mayumi, Luiza e Kaleb, por toda ajuda, pelo aprendizado, pelo carinho, pelas risadas e pelos momentos incríveis ao longo desses anos.

Um agradecimento mega especial ao Gilson, por toda ajuda, todo ensinamento, toda amizade e todas as brincadeiras e momentos incríveis. Obrigada por inúmeras vezes que correr desesperada com dúvidas e sem saber por onde começar... mais você estava ali sempre disposto a me ajudar.

Ao Eng^o Agrônomo Antônio, responsável pela fazenda Cataiuandeua, que cedeu o cacau e o espaço físico para realização inicial deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório Adolfo Ducke, pelo apoio na realização das análises de compostos voláteis, em especial à prof^a Eloisa Helena de Aguiar

Andrade, por suas contribuições científica, por toda dedicação, empenho e paciência.

Ao Sr^o Mário, por todo apoio, paciência e disponibilidade em me acompanhar durante a realização das análises de composição centesimal.

À prof^a Kelly Dantas e aos membros do Laboratório de Química, pelo apoio durante as análises de metais pesados e pelo grande auxílio neste trabalho.

Ao prof^o Luiz Adriano e aos membros do Laboratório de Óleos da Amazônia, pelo apoio e auxílio durante a realização das análises no HPLC.

À todos os meus amigos e colegas da UFPA, em especial ao meu melhor amigo Antônio Robson, por todos os conselhos, conversas, apoio durante as análises, por acreditar e confiar no meu potencial, por me fazer levantar a cabeça quando eu achava que tudo estava perdido e que não tinha mais solução. Você é uma pessoa maravilhosa que tenho grande admiração.

Ao corpo docente do Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPA (PPGCTA/UFPA) pelos ensinamentos repassados ao longo dos dois anos de mestrado. Ao prof^o Renan Campos Chisté pelas suas contribuições científicas na realização deste trabalho e por toda dedicação, empenho e paciência. À secretária do PPGCTA, Hadrienne Pombo por todo serviço prestado e paciência em me atender.

À 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.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e realização deste sonho.

Serei eternamente grata a todos vocês!!!

Muito Obrigada!!!

Tudo posso naquele que me fortalece.

Filipenses 4:13

RESUMO

FERREIRA, O. S. **Fermentação de cacau *Theobroma cacao* L.) conduzida com leveduras dos gêneros *Sacharomyces* e *Pichia*: qualidade e perfil aromático das amêndoas, 2019.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pará, Belém.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito das leveduras *Pichia manshurica*, *Pichia kudriavzevii* e *Saccharomyces cerevisiae* na qualidade e o perfil aromático de amêndoas fermentadas de cacau provenientes de um município paraense. Cerca de 180 Kg de sementes de cacau foram distribuídas em quatro cochos de madeira (n=3), para fermentação espontânea (sem inóculo), com inóculos de *P. manshurica*, *P. kudriavzevii* e *S. cerevisiae*. Amostras de cacau foram assepticamente coletadas ao longo da fermentação e armazenadas adequadamente para realização de análises microbiológicas e físico-químicas (composição centesimal, ácido acético, etanol, perfil de açúcares, compostos fenólicos, compostos voláteis, teste de corte e metais pesados). Observou-se que as inoculações com leveduras não influenciaram a composição físico-química das amêndoas fermentadas e secas. Entretanto, durante o processo fermentativo as amêndoas apresentaram baixa acidez, principalmente aquelas obtidas das fermentações inoculadas com *Pichia manshurica* e *Pichia kudriavzevii*. Entre os 34 compostos voláteis identificados nas amostras estudadas, 5 foram considerados majoritários (concentrações $\geq 10\%$), sendo que 2 compostos (2-heptanol e linalol) estiveram em maior concentração na fermentação inoculada com *P. manshurica* após o processo de fermentação e secagem, seguida pela fermentação inoculada com *P. kudriavzevii* com os compostos benzaldeído e fenilacetaldéido. O desempenho fermentativo da produção de etanol e ácido acético foi superior na fermentação inoculada com *Sacharomyces cerevisiae*. A aplicação de inóculos de leveduras teve influência em diversos parâmetros de qualidade para uma melhor padronização do processo de fermentação de cacau.

Palavras-chave: aroma, acidez, qualidade, *Theobroma*, voláteis.

ABSTRACT

FERREIRA, O. S. **Fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) conducted with yeasts of the genera *Sacharomyces* and *Pichia*: quality and aromatic profile of theseeds**, 2019. Dissertation (Master) – Postgraduate Program in Food Science and Technology. Federal University of Pará, Belém.

This study aimed to evaluate the effect of *Pichia manshurica*, *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts on the quality and aromatic profile of fermented cocoa seeds from a municipality in Pará state. About 180 kg of cocoa seeds were distributed in four wooden troughs (n = 3), for spontaneous fermentation (without inoculum), with inoculations of *P. manshurica*, *P. kudriavzevii* and *S. cerevisiae*. Cocoa samples were aseptically collected throughout the fermentation and stored properly for microbiological and physicochemical analyzes (centesimal composition, acetic acid, ethanol, sugar profile, phenolic compounds, volatile compounds, cut test and heavy metals). It was observed that inoculations with yeast did not influence the physicochemical composition of fermented and dried seeds. However, during the fermentation process the seeds presented low acidity, especially those obtained from the fermentations inoculated with *Pichia manshurica* and *Pichia kudriavzevii*. Among the 34 volatile compounds identified in the samples studied, 5 were considered to be the majority (concentrations $\geq 10\%$), and 2 compounds (2-heptanol and linalol) were found to be higher in the fermentation inoculated with *P. manshurica* after the fermentation and drying process. followed by fermentation inoculated with *P. kudriavzevii* with the compounds benzaldehyde and phenylacetaldehyde. The fermentative performance of ethanol and acetic acid production was superior when fermentation inoculated with *Sacharomyces cerevisiae* was superior. The application of yeast inoculum influenced several quality parameters for a better standardization of the cocoa fermentation process.

Keywords: aroma, acidity, quality, Theobroma, volatile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fruto de cacau.....	21
Figura 2 - Semente de cacau in natura com corte longitudinal e suas respectivas partes internas.....	23
Figura 3 - Cochos de fermentação com sementes de cacau cobertas com folhas de bananeira.....	26
Figura 4 - Prática de revolvimento realizada durante a fermentação do cacau	27
Figura 5 - Processo de secagem de amêndoas de cacau.....	29
Figure 1 (Artigo) – Principal Components Analysis (PCA) of fermented and dried cocoa beans; B – The Hierarchical Cluster Analysis (HCA) showing the three groups formed (1: SF, 2: FPm, 3: FSc).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diversidade de leveduras presentes na fermentação de cacau em diferentes países.....	30
Tabela 2 - Parâmetros e limites do índice de qualidade do cacau (Cocoa Quality Index).....	37
Tabela 3 - Composto aromáticos identificado em amêndoas de cacau fermentadas.....	39
Tabela 1 (Artigo) - Mean values of moisture content, pH, total titratable acidity, monomeric compounds and the energetic value in fermented and dried cocoa beans submitted to on-farm fermentation with different starters: SF – control treatment, FPm – <i>Pichia manshurica</i> inoculum, FSc – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inoculum.....	57
Tabela 2 (Artigo) - Percentage of volatile compounds identified and quantified by GC-MS in fermented and dried cocoa beans submitted to on-farm fermentation with different starters: SF – control, FPm – <i>Pichia manshurica</i> inoculum, FSc – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inoculum.....	60

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATP	Adenosina trifosfato
b.s	Base seca
CG-MS	Cromatografia gasosa-espectrômetro de massa (<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>)
CO₂	Gás carbônico
FAO	Food and Agriculture Organization
FE	Fermentação espontânea
G	Grama
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IEC	Instituto Evandro Chagas
LABIOTEC	Laboratório de Processos Biotecnológicos
LAD	Laboratório Adolpho Ducke
mEq NaOH/100 g	Miliequivalente de hidróxido de sódio por 100 gramas
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
°C	Graus Celsius
PK	<i>Pichia kudriavzevii</i>
PM	<i>Pichia manshurica</i>

pH	Potencial hidrogeniônico
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPA	Universidade Federal do Pará
YEPD	<i>Yeast extract peptone dextrose agar</i>

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA TABELAS	
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	
INTRODUÇÃO GERAL.....	17
OBJETIVOS.....	19
CAPÍTULO 1 – METABOLISMO DE LEVEDURAS NA QUALIDADE DA FERMENTAÇÃO DE CACAU.....	20
1 INTRODUÇÃO	20
2 O FRUTO CACAU (<i>Teobroma cacao</i> L.)	21
3 CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO DO FRUTO CACAU	23
4 FERMENTAÇÃO DO CACAU	25
5 SECAGEM	28
6 DIVERSIDADE MICROBIANA NA FERMENTAÇÃO DO CACAU	30
7 CARACTERÍSTICAS E METABOLISMO DAS LEVEDURAS	32
7.1 <i>Pichia manshurica</i>	33
7.2 <i>Pichia kudriavzevii</i>	34
7.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
8 PERFIL AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS FERMENTADAS E SECAS.....	37
9 REFERÊNCIAS DA LITERATURA.....	40
CAPÍTULO 2 - STARTER CULTURES OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND PICHIA MANSHURICA CAN BE AN ALTERNATIVE TO OBTAIN FERMENTED AND DRIED COCOA BEANS WITH DIFFERENT AROMATIC PROFILES.....	48
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51
1- INTRODUCTION.....	52
2- MATERIAL AND METHODS.....	52
2.1 Material.....	52
2.2 Starter Culture Preparation.....	52
2.3 Fermentation and Drying Processes.....	53

2.4 Methods of Analysis.....	54
2.4.1 Physico-chemical analysis of dried cocoa beans.....	54
2.4.2 Determination of Monomeric Compounds by HPLC-DAD.....	54
2.4.3 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) in Cocoa beans during fermentation and in the dried cocoa beans.....	53
2.5 Statistical Analysis.....	56
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	57
3.1 Characterization of Fermented and Dried Cocoa Beans.....	57
3.2 Volatile profile of the fermented and dried cocoa beans.....	60
3.3 Multivariate analysis (PCA and HCA) in the fermented and dried cocoa beans.....	66
4. CONCLUSIONS.....	68
REFERENCES.....	70
CONCLUSÃO GERAL.....	75

INTRODUÇÃO GERAL

A qualidade das amêndoas de cacau está relacionada a diversos fatores, especialmente às etapas de pré-processamento do cacau (colheita, quebra, fermentação e secagem). De acordo com estudos realizados por Schwan & Wheals (2004) a fermentação é uma etapa crucial para a obtenção de amêndoas de qualidade superior devido às complexas reações bioquímicas, especialmente a hidrólise de açúcares e proteínas que é responsável pela formação dos precursores do sabor e aroma de chocolate.

A fermentação do cacau é um conjunto de processos microbiológicos realizados por leveduras, bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético, caracterizados, principalmente, pela produção de etanol e ácido acético. A diversidade das leveduras presentes na fermentação é heterogênea, diferenciando em termos de país produtor, localização, condições climáticas, método e duração da fermentação (SCHWAN et al., 1995; ARDHANA & FLEET, 2003; JESPERSEN et al., 2005). O crescimento e a atividade das leveduras são de grande importância para o sucesso da fermentação do cacau, e conseqüentemente para o desenvolvimento do sabor e aroma de chocolate (HO et al., 2014). Esse processo ocorre sem nenhum controle da população inicial de leveduras, e quaisquer alterações ambiente, especialmente temperatura, podem dificultar o crescimento das leveduras e favorecer o desenvolvimento de outros microrganismos não característicos da fermentação natural de cacau. Tal fato é relacionado com a baixa qualidade ou até mesmo a perda total de lotes de fermentação.

É comum no Brasil que os agricultores cultivem diferentes variedades de cacau no mesmo campo, com o objetivo de evitar a destruição dos cacauzeiros por fungos, especialmente a *Moniliophthora perniciosa* Stahel Aime & Phillips-Mora. Nos processos de fermentação são coletadas sementes de diferentes variedades e fermentadas espontaneamente nas mesmas caixas, o que pode afetar a qualidade dos produtos finais, ocasionando heterogeneidade na qualidade das amêndoas fermentadas, fato este que causa desvalorização das amêndoas de cacau da Amazônia nos mercados nacional e internacional. Nesse contexto, várias tentativas têm sido adotadas para melhorar e/ou aperfeiçoar as condições de fermentação do cacau, com o intuito de se obter amêndoas com uma boa qualidade.

As leveduras dos gêneros *Pichia* e *Saccharomyces* estão entre os microrganismos isolados mais relatados da fermentação do cacau em diversas regiões produtoras de cacau. Ho et al. (2014) e Visintin et al. (2017) relataram a importância do crescimento e atividade das leveduras para o êxito da fermentação do cacau e seu envolvimento no desenvolvimento do sabor e aroma de chocolate. Estudos realizados com culturas iniciadoras (*starter cultures*) promoveram a melhoria da qualidade das amêndoas fermentadas de cacau (BATISTA et al., 2015), e estudos de Schwan et al. (1995) e Lefeber et al. (2012) constataram que a inoculação de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* e *Acetobacter pasteurianus*, produziam amêndoas de qualidade superior, quando comparadas com amêndoas fermentadas espontaneamente. Esta é a primeira vez que as leveduras *Pichia manshurica* e *Pichia kudriavzevii* são utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação das sementes de cacau amazônico.

A qualidade de um produto baseia-se nas características das unidades individuais que determinam o grau de aceitação pelo comprador. Araújo et al. (2014) com o objetivo de contribuir para a análise da qualidade das sementes de cacau, propuseram um índice de qualidade baseado em parâmetros que expressam índices mínimos e máximos de lipídios, pH, acidez total, compostos fenólicos (catequina, epicatequina, cafeína e teobromina), ácidos orgânicos (lático e acético), metais pesados (Ba, Cd, Pb, Cu), aminoácidos totais e açúcares (sacarose, frutose e glicose). Este índice de qualidade é a mais atual possibilidade de avaliar a qualidade das amêndoas de cacau fermentadas e secas, visto que o mercado de cacau enfrenta desafios sobre como avaliar, identificar e comercializar amêndoas que após a torração produzam sabor e aroma de chocolate de alta qualidade.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o índice de qualidade e perfil aromático das amêndoas de cacau fermentadas a partir da adição de culturas iniciadoras com as leveduras *Pichia manshurica*, *Pichia kudriavzevii* e *Sacharomyces cerevisiae*. A compreensão dos efeitos químicos e físicos causados pela condução fermentativa com culturas iniciadoras pode se tornar uma solução para melhoria da qualidade do cacau amazônico.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o efeito das leveduras *Pichia manshurica*, *Pichia kudriavzevii* e *Saccharomyces cerevisiae* na qualidade e o perfil aromático de amêndoas fermentadas de cacau amazônico.

ESPECÍFICOS

- Comparar a fermentação espontânea e o processo fermentativo conduzido com as leveduras *Pichia manshurica*, *Pichia kudriavzevii* e *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar o efeito dos inóculos de leveduras nos parâmetros de qualidade físicos e químicos das amêndoas de cacau fermentadas;
- Avaliar o perfil de compostos aromáticos presentes nas amêndoas de cacau fermentadas.

CAPÍTULO 1

METABOLISMO DE LEVEDURAS NA QUALIDADE DA FERMENTAÇÃO DE CACAU

1. INTRODUÇÃO

As etapas de pré-processamento de chocolates ganharam destaque como estágios que podem melhorar a qualidade do cacau produzido. Essa qualidade pode ser atribuída aos precursores de sabor e aroma do cacau, desenvolvidos durante o processo de fermentação e secagem, uma vez que sementes de cacau inadequadamente fermentadas não produzem compostos característicos de chocolate durante o processo de torração (HO et al., 2014; KRÄHMER et al., 2015; KONGOR et al., 2016).

O desenvolvimento de precursores de sabor e aroma envolve a ação de diversos microrganismos presentes na polpa de cacau, além da ação enzimática em carboidratos, proteínas e polifenóis. O crescimento e metabolismo das leveduras são essenciais para a fermentação do cacau e o desenvolvimento das características do chocolate (CAMU et al., 2008, HO et al., 2012).

Durante a fermentação ocorre a metabolização de açúcares pelas leveduras para produção de etanol (SCHWAN; WHEALS, 2004), que por sua vez é consumido pelas bactérias lácticas e acéticas e produzem especialmente os ácidos láctico e acético, respectivamente e causam elevação da temperatura da massa fermentativa (CAMU et al., 2008; HO et al., 2014; CAMU et al., 2008). A produção de etanol, ácidos orgânicos e a elevação da temperatura elevada são responsáveis pela morte do embrião, quebra da parede celular e liberação de enzimas endógenas cruciais para a formação de precursores de aroma e sabor de chocolate, que são açúcares redutores, aminoácidos livres e peptídeos.

2. O FRUTO CACAU (*Theobroma cacao* L.)

O cacau (*Theobroma cacao* L) é um fruto nativo das florestas tropicais da América do Sul e Central (THOMPSON et al., 2013). As sementes possuem características ovais, rodeadas por uma casca (testa) coberta por um endocarpo branco, denominado polpa, e com embrião composto por cotilédones que são utilizados na elaboração de chocolate e seus derivados (FORSYTH; QUESNEL, 1963).



Figura 1. Fruto de cacau.

Fonte: Autor (2019).

A espécie *Theobroma cacao* L possui três variedades: (i) Crioulo, que possuem cotilédones brancos e são oriundos da América Central e do Sul, (ii) Forasteiro, de origem Amazônica, (iii) Trinitário, um híbrido das variedades Forasteiro e Crioulo (THOMPSON et al., 2013).

A variedade de cacau Crioulo é caracterizada por apresentar sementes brancas e sabor suave, entretanto são suscetíveis a doenças e apresentam baixos rendimentos de amêndoas (FOWLER, 2009).

O cacau Forasteiro é característico da região amazônica e compreende dois subgrupos, *Amelonado* e *Amazônia*, estes últimos podem ser divididos ainda na

Amazônia Inferior e na Amazônia Superior, dependendo da sua origem (SALTINI, AKKERMAN, FROSCH, 2013). A variedade Forasteiro gera um chocolate com sabor mais ácido e adstringente, além de apresentar maior produtividade e resistência a pragas e doenças (BECKETT, 2009). Os chocolates produzidos a partir dessa variedade possuem altos níveis de procianidinas, que contribuem para o gosto de adstringência e amargura do chocolate (COUNET et al., 2004).

O terceiro tipo de cacau é denominado Trinitário, que é resultado da hibridação entre Forasteiro e Crioulo (FOWLER, 2009). Essa variedade de cacau possui características intermediárias entre Crioulo e Forasteiro (MOTAMAYOR et al., 2003). A coloração das sementes desta variedade varia de amarelo ao roxo. O chocolate obtido desta variedade é considerado de qualidade intermediária (BECKETT, 2009).

3. CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO DO FRUTO CACAU

Os frutos maduros possuem paredes grossas e contém cerca de 30-40 sementes, que são compostas por dois cotilédones e um embrião (radícula) cercado por um casca (testa) que está envolta por uma polpa doce, de coloração branca e mucilaginosa, que compreende aproximadamente 40% de peso fresco de semente (Figura 4) (SCHWAN & WHEALS, 2004).

Os cotilédones das sementes apresentam tonalidade violácea, característica conferida pelo conteúdo de antocianinas, entretanto nas fases finais da fermentação os cotilédones adquirem uma tonalidade marrom ocasionada pela oxidação dos compostos fenólicos pela ação da polifenoloxidase (WOLLGAST & ALKLAM, 2000). A polpa de cacau é rica em açúcares, com aproximadamente 15% de monossacarídeos, 84% de umidade, 0,20 % de lipídios e 0,8% de proteínas (OETTERER, 2006; PUGLIESE, 2010). A composição química das sementes de cacau varia por diversos fatores como: variedade, origem, técnicas agrícolas, clima, solo, e o grau de maturação dos frutos (EFRAIM et al., 2011).

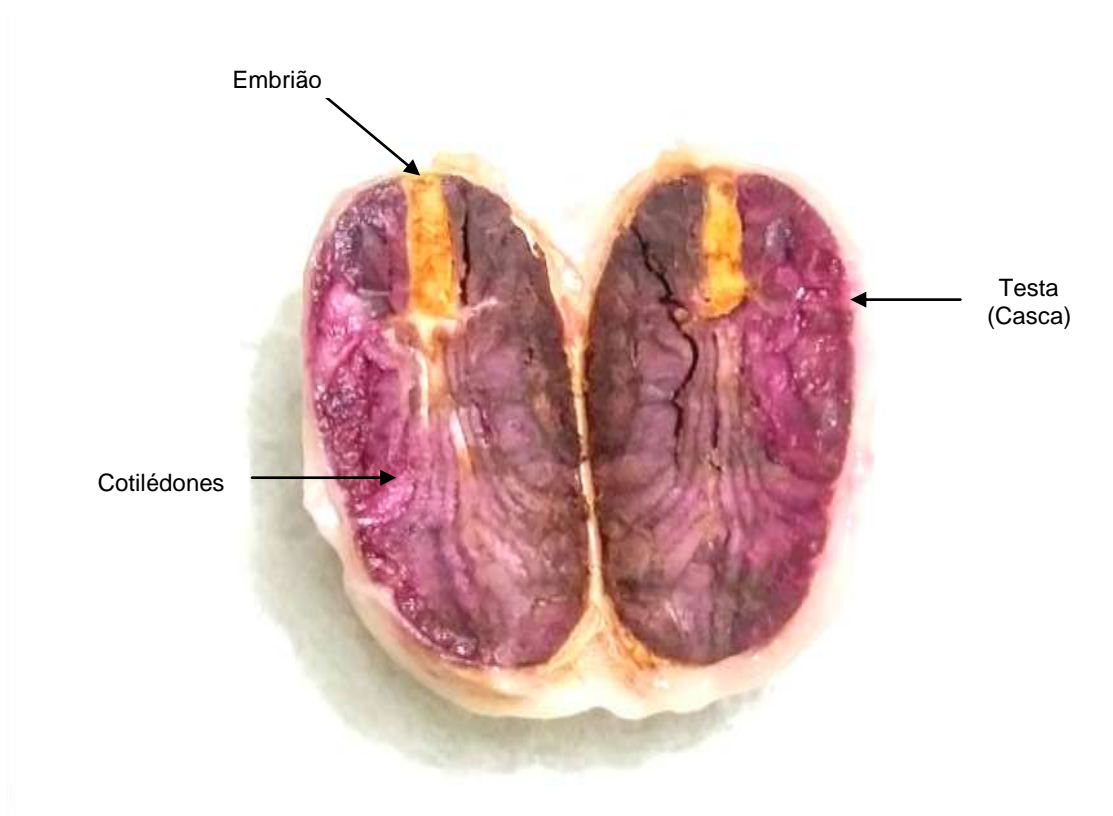


Figura 2. Semente de cacau *in natura* com corte longitudinal e suas respectivas partes internas.

Fonte: Autor (2019).

A composição da polpa é um fator que interfere diretamente no processo fermentativo, tendo em vista que a composição de glicose, sacarose e frutose varia de acordo com a maturação do fruto (ICMSF, 1998; SCHWAN & WHEALS, 2004). Embora a composição físico-química das sementes de cacau (lipídios, proteínas, minerais, fibras, açúcares, metilxantinas e compostos fenólicos) seja critério frequentemente utilizado para avaliação da qualidade das amêndoas secas, os critérios finais de qualidade são aroma e sabor após o processamento (FERRÃO, 2002).

4. FERMENTAÇÃO DO CACAU

A fermentação do cacau é um conjunto de processos microbiológicos realizados por leveduras e bactérias onde ocorre metabolização de açúcares pelas leveduras para produção de etanol e oxidação deste etanol por bactérias do ácido acético para produção de ácido acético, através de processos internos autolíticos que envolvem liberação de enzimas e substratos (SCHWAN; WHEALS, 2004).

As sementes de cacau possuem um sabor adstringente e desagradável, e por isso devem ser submetidos a processos de fermentação e secagem, que darão origem a precursores de aroma e sabor característico do chocolate (HO et al., 2014; KRÄHMER et al., 2015; KONGOR et al., 2016). Além da formação desses precursores, há um aumento no teor de compostos voláteis, como álcoois, ácidos orgânicos, aldeídos e ésteres (FRAUENDORFER, SCHIEBERLE, 2008; MAGI et al., 2012), devido à hidrólise de açúcares presentes na polpa que envolve as sementes (BONVEHÍ, 2005; KONGOR et al., 2016). A maior parte dos compostos que dão ao chocolate o seu sabor característico são desenvolvidos por reações bioquímicas e enzimáticas que ocorrem dentro do cotilédone (SCHWAN & WHEALS 2004).

A fermentação é o processo inicial para a produção de chocolate e ocorre de forma natural por ação de microrganismos (SCHWAN et al., 1995; SCHWAN & WHEALS, 2004), onde as sementes são aglomeradas em caixas plásticas, caixas de madeiras, sacos de lona, cestas ou bandejas e são cobertas e/ou forradas com folhas de bananeira (utilizada como inóculo natural de microrganismos) (Figura 3) durante 5 – 7 dias (BECKETT, 1997). Durante as primeiras 48 horas a fermentação é liderada por leveduras, seguida das bactérias do ácido láctico, que reduzem após 48 horas, e em paralelo por bactérias acéticas (ARDHANA & FLEET, 2003; SCHWAN & WHEALS, 2004). Esses microrganismos utilizam a polpa mucilaginosa das sementes como fonte de carbono e nitrogênio (LEAL et al., 2008; SÁNCHEZ et al., 2015).



Figura 3. Cochos de fermentação com sementes de cacau cobertas com folhas de bananeira.

Fonte: Autor (2019).

A polpa por sua vez, limita a propagação de oxigênio no conteúdo da massa no início da fermentação, gerando condições anaeróbicas (SCHWAN et al., 1995). No decorrer dessa primeira etapa (48 h), as leveduras e bactérias lácticas consomem açúcares e ácidos orgânicos, produzem etanol e lactato (LOPEZ, 1986). Entretanto, após essa primeira etapa, ocorre a degradação da polpa por ação das leveduras, que drenam o líquido aprisionado na polpa, promovendo a aeração e a fixação de bactérias acéticas. A produção de acetato através da oxidação do etanol origina dióxido de carbono com aumento da temperatura da massa de fermentação (SCHWAN & WHEALS, 2004). Quando todo o etanol é oxidado em ácido acético, dióxido de carbono e água, a temperatura das amêndoas diminui rapidamente (THOMPSON et al., 2013).

A combinação do calor e ácido acético ocasiona a morte do embrião da semente, e assim, enzimas (proteases, glicosidases, polifenoloxidasas) presentes nas sementes de cacau são ativadas através da difusão do conteúdo celular. As antocianinas são rapidamente hidrolisadas em antocianidinas e açúcares (galactose e arabinose) pelas glicosidases, ocasionando a perda da cor roxa dos cotilédones. Ocorre então o surgimento da amêndoa de cacau, e as reações oxidação dos

pigmentos e hidrólise, assim como a condensação dos flavonoides caracterizam a cor marrom das amêndoas (FORSYTH & QUESNEL, 1963; LEAL et al., 2008).

A temperatura é um indicador ideal para o acompanhamento da fermentação, pois influencia diretamente na qualidade final das amêndoas. Temperaturas de até 48 °C são satisfatórias para as primeiras 48 horas de fermentação (SCHWAN & WHEALS, 2004; NIELSEN et al., 2007).

A prática de revolvimentos (Figura 4) durante a fermentação é realizada com o objetivo de homogeneizar a massa fermentativa e controlar a elevação da temperatura e também o nível de ácidos, visto que estes interferem na atividade enzimática (SCHWAN et al., 1990). De acordo com Forsyth & Quesnel (1963), o primeiro revolvimento deve ser realizado 24 horas após o início da fermentação.



Figura 4. Prática de revolvimento realizada durante a fermentação do cacau.
Fonte: Autor (2018).

A origem de precursores de sabor (aminoácidos livres e açúcares redutores) é um importante consequência da qualidade do processo fermentativo. Amêndoas mal fermentadas apresentam uma coloração marrom-violeta ou de madeira acinzentada, que permanece no chocolate e desenvolve sabor aparente de chocolate (BECKETT, 2009).

5. SECAGEM

As etapas de fermentação e secagem despertaram interesse entre os produtores de cacau e chocolate, pois estas podem ser usadas para melhorar a qualidade do cacau (OWUSU, 2010). A etapa de secagem tem início logo após a fermentação e deve ser conduzida de modo que não seja muito rápida, nem muito lenta, evitando que ocorra uma secagem heterogênea das amêndoas e o crescimento de fungos, bem como para que a volatilização dos ácidos formados durante a fermentação ocorra de forma mais efetiva (CRESPO, 1985). A temperatura e o tempo de secagem são fundamentais na qualidade final das amêndoas. A faixa ideal de temperatura é 35 a 40 °C e o tempo é de 4 a 5 dias, ou até que se obtenha amêndoas com no máximo 8% de umidade (BRASIL, 2008).

Essa etapa pode ser realizada através de duas técnicas: a secagem natural (amêndoas espalhadas em plataformas e expostas ao sol) e secagem artificial (utilizando secadores). A secagem natural tem maior duração do que a secagem artificial e proporciona uma melhor volatilização do ácido acético e de outros compostos voláteis, resultando em amêndoas com menor acidez e amargor. As sementes são espalhadas em plataformas e frequentemente revolvidas para propiciar homogeneização e redução da umidade (OETTERER, 2006). A Figura 5 apresenta amêndoas em processo de secagem natural.



Figura 5. Processo de secagem de amêndoas de cacau.
Fonte: Autor (2018).

6. DIVERSIDADE MICROBIANA NA FERMENTAÇÃO DO CACAU

A população microbiana presente na fermentação do cacau é complexa e envolve várias espécies de leveduras, bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético (SCHWAN & WHEALS, 2004; THOMPSON et al., 2013; ZHAO *et al*, 2014). Essa microflora pode variar de acordo com a disponibilidade de nutrientes, condições ambientais e localização geográfica (CAMU et al., 2007; NIELSEN et al., 2007).

As leveduras são os microrganismos mais isolados da fermentação do cacau e promovem condições favoráveis para o crescimento dos microrganismos atuantes na fase posterior: bactérias lácticas e acéticas. A presença de açúcares e a acidez da polpa proporciona o crescimento de diferentes espécies de leveduras (SCHWAN & FLEET, 2014). A Tabela 1 apresenta outros microrganismos atuantes na fermentação do cacau.

Tabela 1. Diversidade de leveduras presentes na fermentação de cacau em diferentes países.

Gêneros	Localidade	Referência
<i>Candida, Pichia, Rodotorula, Hanseniaspora e Saccharomyces</i>	Brasil	Miguel et al. (2017)
<i>Hanseniaspora, Pichia, Candida, Saccharomyces, Torulaspora, Pseudozyma e Rhodosporidium</i>	Gana	Maura et al. (2016)
<i>Pichia, Hanseniaspora, Debaryomyces, Yarrowia e Candida</i>	Costa-do-Marfim	Kouame et al. (2015)
<i>Hanseniaspora, Candida, Torulaspora, Kluyveromyces, Saccharomyces e Pichia</i>	Malásia	Lefeber et al. (2012)

Durante os primeiros dias de fermentação das sementes de cacau, as leveduras constituem o grupo de microrganismo predominante (JESPERSEN et al.,

2005), a qual dura 24 a 48 h e onde a população de leveduras pode representar 90% da microflora total (THOMPSON et al., 2013). As leveduras utilizam os carboidratos presentes na polpa sob condições aeróbicas e anaeróbicas e podem compreender 40 a 65% da microflora quando a fermentação inicia.

A atividade mais importante das leveduras durante a fermentação é hidrolisar ácido cítrico na polpa, levando a um aumento do pH, produzir etanol e ácidos orgânicos, e posteriormente produzir compostos orgânicos voláteis que contribuam como precursores do sabor do chocolate (KOSTINEK et al., 2008; KONÉ et al., 2016).

Todas as espécies que contribuem para a fermentação não estão presentes simultaneamente, mas seguem uma sucessão que é influenciada pela aeração e o fato de que as massas de cacau durante a fermentação não são homogêneas. Entre 48 e 72 h de fermentação, a população de leveduras começa a reduzir, de modo que após 72 h há uma redução para 10% da população microbiana total (CARR et al., 1980). Três fatores são responsáveis por essa redução; primeiro, as leveduras metabolizam rapidamente sacarose, glicose e frutose na polpa para formar dióxido de carbono e etanol, ocasionando uma diminuição na fonte de energia. Em segundo lugar, a produção de etanol produz um ambiente desfavorável, que restringe o crescimento da levedura. E em terceiro, o ácido acético, que também é um composto que inibe o crescimento de leveduras (THOMPSON et al., 2013).

Com base no processo de fermentação e na qualidade do chocolate fabricado usando um inóculo de leveduras definido, são necessárias características específicas dos microrganismos utilizados. As espécies de leveduras devem ser altamente fermentativas (THOMPSON et al., 2013).

Ao final da fermentação, os microrganismos putrefativos começam a se desenvolver, o que é uma desvantagem, visto que esses microrganismos podem produzir sabores indesejáveis ao chocolate (*off flavors*) (SCHWAN & WHEALS, 2004).

7. CARACTERÍSTICAS E METABOLISMO DAS LEVEDURAS

As leveduras são fungos unicelulares, tipicamente esféricos ou ovais, não filamentosos (GERARD et al., 2012). O termo levedura limita-se à ordem *Saccharomycetales* (*Ascomycetes*), no qual se refere à forma unicelular de fungos (ALEXOPOULUS et al., 1996).

Sua reprodução se dá por brotamento, no qual a célula parental produz uma protuberância (broto) na sua superfície externa. À medida que o broto aumenta, o núcleo da célula parental se divide, e um dos núcleos migra para o broto, que se separa da célula parental quando o material da parede celular é sintetizado. Algumas leveduras produzem brotos que não se separam um dos outros, formando assim uma pequena cadeia de células denominada pseudo-hifa (GERARD et al., 2012).

As colônias de leveduras podem ser observadas, quando isoladas *in vitro*, com cores variadas e com aspecto céreo-brilhante (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). As leveduras são organismos vivos e exigem nutrientes para a sua reprodução e metabolismo. Estes nutrientes devem incluir fontes de carbono, nitrogênio e minerais (COOK, 1958). Entretanto, os carboidratos são a principal fonte de carbono utilizada pelas leveduras presentes na fermentação do cacau, como a *Saccharomyces cerevisiae* (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). As leveduras assimilam a glicose por difusão facilitada, utilizando carreadores específicos (proteínas transmembrana) encarregados de transportar um soluto ou classe de solutos por meio da bicamada lipídica, onde a força impulsora é o gradiente de concentração do soluto (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

O metabolismo é composto pelo catabolismo ou componente gerador de energia sob a forma de ATP, e de um componente biossintético dessa energia ou anabolismo. Para que ocorra, as macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, etc) devem ser despolimerizadas em unidades menores. A conformação de catabolismo mais eficaz que a célula possui é a respiração celular, que é a oxidação aeróbica da glicose. A hidrólise da glicose até CO₂ e H₂O ocorre em duas etapas: conversão da glicose (através da glicólise) a piruvato e oxidação do piruvato, através do Ciclo de

Krebs, a CO_2 e H_2O utilizando o oxigênio molecular como admissão final de hidrogênio. (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Além da glicólise, os fungos possuem ainda duas vias metabólicas alternativas: via de hexose monofosfato (HM), que produz glicose 6-fosfato, ribose 5-fosfato, sedoheptulose 7-fosfato, eritrose 4-fosfato, frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, CO_2 e o NADPH, e a via de Entner-Doudoroff, que produz 5 das 13 moléculas precursoras para biossíntese de constituintes celulares: glicose 6-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato, 3 fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato e piruvato em ácido pirúvico e 3-fosfogliceraldeído (VAN LAERE, 1995).

Após a glicose ter sido convertida em ácido pirúvico, esse ácido pode seguir para o Ciclo de Krebs ou para a fermentação. A fermentação pode seguir dois caminhos, o primeiro é para produção de ácido láctico e o segundo para produção de etanol e CO_2 . Na fermentação do ácido láctico as duas moléculas de ácido pirúvico são reduzidas por duas moléculas de NADH formando duas moléculas de ácido láctico, sendo este o produto final da reação. A fermentação alcoólica inicia quando as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO_2 . As duas moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH formando assim duas moléculas de etanol (GERARD *et al.*, 2012)

7.1 *Pichia manshurica*

A espécie *Pichia manshurica* está inserida no Gênero *Pichia*, domínio Eukaryota, Família Pichiaceae, Ordem Saccharomycetales, Classe Saccharomycetes, Filo Ascomycota e Reino Fungi (SAITO, 1914). As espécies desse gênero despertaram o interesse dos taxonomistas, geneticistas, biólogos moleculares e biotecnólogos nas últimas duas décadas (NAGORNAYA *et al.*, 1990; MASIH *et al.*, 2001; NAUMOV & NAUMOVA, 2009). A classificação científica e a identificação desta levedura foram definidas quando descobriu-se que elas apresentavam diferenças sexuais fisiológicas e isolamento de culturas monosporas com dois tipos de acasalamento (SLOOFF, 1964). O gênero *Pichia* é caracterizado por apresentar células ovais a longo-cilíndricas, pseudomicélio, angulares ou redondas (COOK, 1958).

A *Pichia manshurica* é constantemente associada a fermentações naturais, como no vinho, pepino, cacau e azeitonas de mesa, onde poderia provocar deterioração do produto (FRANCO et al., 2012; MAURA et al., 2016; SAEZ et al., 2011; PERPETUINI, et al., 2018). É uma espécie que possui capacidade fermentativa com produção de etanol (PAPALEXANDRATOU et al., 2011), e tem certo grau de hidrofobicidade, com relevada afinidade por hexadecano e decano (PERPETUINI et al., 2018), além de possuírem a capacidade de formar uma camada superficial de filme (DU TOIT & PRETORIUS, 2000).

De acordo com estudos realizados por Perpetuni (2018), mesmo que estas leveduras não sejam muito resistentes a compostos antimicrobianos (por exemplo, metabisulfito de potássio) e agentes de limpeza, estas foram capazes de participar da fermentação em vinhos. A resistência desta levedura pode estar relacionada à capacidade de formar biofilmes.

Saez et al. (2011) estudaram vinhos deteriorados de uma adega familiar, detectaram a presença da levedura *Pichia manshurica* e a produção de fenóis voláteis, como 4-etilguaicol em concentração superior (10,26 mg/L) ao limiar de percepção determinado para esse composto.

7.2 *Pichia kudriavzevii*

A *Pichia kudriavzevii* é uma espécie do Gênero *Pichia*, Família Pichiaceae, Ordem Saccharomycetales, Classe Saccharomycetes, Filo Ascomycota e Reino Fungi (BOIDIN, et al., 1965). Possui característica de fermentadora de glicose e que não assimila nitrato. Apresenta células ovais a alongadas. (KURTZMAN; FELL, 1998). Essa espécie possui capacidade de produzir aromas, tais como ésteres, álcoois, ácidos, e está presente constantemente em fermentações espontânea de uvas (LI et al., 2010) e de sementes de cacau, sendo considerada uma das contribuintes mais importantes para a formação de compostos de aroma específicos das amêndoas de cacau (PEREIRA et al., 2017; KONÉ et al., 2016)

Em comparação com a *Saccharomyces cerevisiae*, a espécie *Pichia kudriavzevii* possui uma boa produção de etanol, mostrando uma alta tolerância ao mesmo (CHI & ARNEBORY, 2000), além de ser mais termotolerante do que a maioria das cepas de *S. cerevisiae*, embora algumas cepas possam crescer e

produzir etanol em temperatura de 42 a 44 °C (EDGARDO et al., 2008; SREE et al., 2000; YUANGSAARD et al., 2013).

Das principais espécies de fermentação das sementes de cacau isoladas em Gana, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se apresentaram tolerantes ao etanol, mas não termotolerantes, enquanto certas cepas de *Pichia kudriavzevii* combinavam etanol, temperatura e tolerância ácida (DANIEL et al., 2009).

De acordo com estudos realizados por Hisamatsu et al. (2006) a *Pichia kudriavzevii* produz grande quantidade de etanol 2,9% (m/v) em meios ácidos (pH 2,0). O potencial da *Pichia kudriavzevii* para a produção de etanol de vários substratos foi relatado, por exemplo em xarope de cana-de-açúcar e amido de mandioca (GALLARDO et al., 2011; YUANGSAARD et al., 2013).

Pereira et al. (2017) identificaram sete leveduras caracterizadas por ser altamente produtoras de aromas, dentre elas a *Pichia kudriavzevii*. Dentre estas duas cepas apresentaram produção de aroma superior, nomeadamente *P. kudriavzevii* LPB06 e *P. kudriavzevii* LPB07. A inoculação destas leveduras em fermentação de cacau acelerou o processo fermentativo com crescimento eficiente de leveduras, consumo de açúcares e formação de etanol quando comprado ao processo espontâneo. Os resultados indicaram que as fermentações inoculadas geraram amêndoas de cacau com melhor desenvolvimento de cor e composição rica em aromas (PEREIRA et al., 2017).

Esses autores avaliariam o potencial fermentativo desta levedura, e concluíram que as mesmas apresentaram ótimos resultados quanto a produção de álcoois superiores, ficando atrás apenas de *S. cerevisiae*.

7.3 *Saccharomyces cerevisiae*

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* está inserida no domínio Eukaryota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe 24 Saccharomycetes; Ordem Saccharomycetales; Família Saccharomycetaceae e Gênero *Saccharomyces* (KURTZMAN, 1997). Este gênero inclui muitas espécies, a mais importante das quais é *Saccharomyces cerevisiae*. As células são redondas em oval com brotações multilaterais (COOK, 1958).

Essa espécie de levedura possui a capacidade de transformar rapidamente açúcares em etanol e dióxido de carbono, sob condições tanto anaeróbias (ausência de oxigênio), quanto aeróbias (presença de oxigênio). Mesmo em condições aeróbias a *S. cerevisiae* pode realizar a fermentação alcoólica, desde que o nível de glicose no meio seja elevado (DE DEKEN, 1966). Esta espécie é considerada também um microrganismo de deterioração quando associado à refermentação de vinhos engarrafados (DU et al., 2000; LOUREIRO & MALFEITO-FERREIRA, 2003; PERPETUINI et al., 2018).

A *S. cerevisiae* é definida como uma das leveduras mais importantes envolvidas em fermentações das sementes de cacau (SCHWAN & FLEET, 2014) em diversos países, incluindo Brasil, Gana, Indonésia e Malásia, sendo objeto de estudo devido seu rápido crescimento, atividade pectinolítica e tolerância ao etanol (ARDHANA & FLEET, 2003; JESPERSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2007; DANIEL et al., 2009; PAPALEXANDRATOU et al., 2013).

De acordo com Menezes et al. (2016) a população de *S. cerevisiae* pode variar de acordo com a variedade de cacau. Ramos et al. (2014) observaram que a inoculação de *S. cerevisiae* na fermentação do cacau demonstrou acelerar a fermentação, através do consumo de carboidrato e a alta produção de etanol, evitando assim o crescimento de microrganismos indesejáveis.

8. PERFIL AROMÁTICO DAS AMÊNDOAS FERMENTADAS

A qualidade de um produto baseia-se nas características das unidades individuais que determinam o grau de aceitação pelo comprador (URBANSKY, 1992). Araújo et al. (2014) propuseram um índice de qualidade (Tabela 2) para amêndoas fermentadas de cacau, que envolve vários parâmetros como: pH, teor de compostos fenólicos, lipídios, metilxantinas, ácidos orgânicos, carboidratos. Este índice de qualidade refere-se às propriedades, processos e características do condicionamento químico, análise física e biológica do produto, e é a mais recente proposta para qualificar as amêndoas de cacau fermentadas e secas.

Tabela 2. Parâmetros e limites do Índice de Qualidade do Cacau (*Cocoa Quality Index*).

Indicador (variável) (esperado)	Unidade	Comportamento	Limites críticos		
			Inferior	Médio (ótimo)	Superior
Acidez total	g 100 g ⁻¹	Ótimo	10,53	14,95	19,37
Ácido orgânico- Láctico	mg g ⁻¹	Menos	0,47		
Ácido orgânico- Acético	mg g ⁻¹	Ótimo	0,93	2,15	3,60
Aminoácidos totais	mg g ⁻¹	Ótimo	8504,35	14230,78	20033,81
Açúcar- Frutose	mg g ⁻¹	Mais	2,59		
Açúcar- Glicose	mg g ⁻¹	Mais	0,85		
Açúcar- Sacarose	mg g ⁻¹	Menos	0,76		
Cafeína	%	Menos	0,32		
Fenóis totais	mg g ⁻¹	Menos	45990,50		
Gordura total	g 100 g ⁻¹				
Ph	mg g ⁻¹	Ótimo	5,60	6,01	6,57
Substâncias fenólicas- Catequina	mg g ⁻¹	Mais	82,79		
Substâncias fenólicas- Epicatequina	mg g ⁻¹	Mais	2223,44		
Teobromina	%	Menos	2,47		

Fonte: ARAUJO et al. (2014).

De acordo com estudos realizados por Afoakwa et al. (2008), o genótipo das sementes de cacau influencia no conteúdo de lipídios, proteínas, carboidratos e

polifenóis. O valor comercial das sementes é atribuído somente após o processo de fermentação e secagem (OETTERER, 2006).

Além dos parâmetros de qualidade propostos Araújo et al. (2014), a prova de corte ainda é a principal forma de avaliar a qualidade das amêndoas fermentadas e secas. Esse teste é utilizado mundialmente como forma de classificar e caracterizar lotes quanto à sua qualidade (BRASIL, 2008).

A prova de corte é executada após o corte longitudinal da amêndoa de cacau, para a avaliação da parte interna de uma metade. Trezentas amêndoas são retiradas de uma amostra de 500 g do lote. O grau de fermentação das amêndoas é avaliado pela coloração (marrom, parcialmente marrom, violeta, ardósia) e compartimentação dos cotilédones (bem, parcialmente ou pouco compartimentada), assim como através da presença de infestações por pragas durante a estocagem, fungos, amêndoas germinadas (provenientes de frutos sobre-maduros) e achatadas, além do aroma obtido após o corte (EFRAIM et al., 2010).

A avaliação das amêndoas através da prova de corte também dá um indicativo da presença de compostos fenólicos nos ensaios (EFRAIM et al., 2010), visto que os cotilédones das sementes apresentam coloração violácea intensa (presença de compostos fenólicos) e durante a fermentação ocorre uma difusão dos conteúdos celulares, permitindo diversas reações bioquímicas, enzimáticas e de oxidação dos compostos fenólicos, as quais propiciam um escurecimento dos cotilédones para coloração marrom e a formação de sulcos (depressão linear encontrada no interior dos cotilédones) (EFRAIM et al., 2011).

A mudança de cor da amêndoa de roxo para marrom indica uma amêndoa bem fermentada, que apresenta normalmente aroma agradável de vinagre (OETTERER, 2006).

Os compostos voláteis são considerados também um dos indicadores de qualidade mais importante das sementes de cacau (MAGI et al., 2012; KRÄHMER et al., 2015). O sabor é um critério para a aceitação de amêndoas e produtos derivados do cacau, como o chocolate (AFOAKWA et al., 2008; KONÉ et al., 2016), contribuindo assim para a determinação da qualidade (OWUSU, 2010). Crafac et al. (2014) encontraram em seus estudos mais de 600 compostos de responsáveis

pele aroma e sabor identificados a partir de amêndoas e produtos de cacau. O perfil dos compostos aromáticos encontra-se ilustrado na Tabela 3.

Tabela 3. Composto aromáticos identificado em amêndoas de cacau fermentadas.

Famílias de compostos aromáticos					
Aldeídos	Éster	Alcoóis	Cetonas	Ácidos	Pirazinas
Isobutanal	Acetato de metila	Etanol	2-Pentanona	Ácido acético	2,3,5-trimetilpirazina
2-metilbutanal	Acetato de etil	Isobutanol	2-Heptanona	Ácido isobutírico	2,3,5,6-trimetilpirazina
3-metilbutanal	Acetato de isobutil	2-Pentanol	3-Hidroxi-2-Butanona	3-Metil butanóico	
Benzaldeído	Acetato de butilo	Isopentanol	2-Nonanona	Ácido butanóico	
	Acetato de metil-butilo	2-Heptanol	Acetofenona		
	Acetato de isoamila	2-Nonanol			
	Acetato de feniletilo	2,3-Butanodiona			
		Álcool Feniletílico			
4	7	10	5	3	2
Total					

Fonte: Koné et al. (2016).

Koné et al. (2016) identificaram cerca de dez espécies de leveduras envolvidas na fermentação do cacau, dentre elas seis espécies foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia galeiformis*, *Galactomyces geotrichum* e *Wickerhamomyces anomalus*. Estas leveduras produziram um total de 33 compostos aromáticos, tais como ésteres, álcoois, e ácidos. As leveduras *P. kudriavzevii*, *S. cerevisiae*, *G. geotrichum* e *W. anomalus* foram consideradas como as que mais contribuíram para a formação de compostos de aroma de chocolate, com os seguintes compostos sintetizados: benzaldeído, acetato de etil, acetato de isoamila, etanol, isobutanol, propanol, álcool fenetílico, ácido acético, etc.

9. REFERÊNCIAS DE LITERATURA

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

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 1996.

ARAUJO, Q. R.; FERNANDES, C. A.; RIBEIRO, D. O.; EFRAIM, P.; STEINMACHER, D.; LIEBEREI, R.; ARAUJO, T. G. Cocoa Quality Index—A proposal. **Food Control**, v. 46, p. 49-54, 2014.

ARDHANA M, FLEET G. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 87-99, 2003.

BATISTA, N. N., RAMOS, C. L., RIBEIRO, D. D., PINHEIRO, A. C. M., & SCHWAN, R. F. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. **LWT- Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 221-227, 2015.

BECKETT, S.T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**, Fourth Edition, p. 224-246, 2009.

BOIDIN, J.; PIGNAL, M.C.; BESSON, M. Le genre *Pichia* sensu lato. IV. **Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France**. v, **81**, n. 4, p. 566-606, 1965.

BONVEHÍ, J. S. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 1-2, p. 19-29, 2005.

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

CAMU N.; DE WINTER T.; VERBRUGGHE K.; CLEENWERCK I.; VANDAMME P.; TAKRAMA J. S.; VANCANNEYT M.; DE VUYST L. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous

heap fermentations of cocoa beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1809-1824, 2007.

CAMU, N., DE WINTER, T., ADDO, S. K., TAKRAMA, J. S., BERNAERT, H., & DE VUYST, L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 13, p. 2288-2297, 2008.

CARR, J. G.; DAVIES P. A.; DOUGAN J. Cocoa Fermentation in Gana and Malaysia, vol. II. **University of Bristol Research Station, Long Ashton, Bristol and Tropical Products Institute, London, United Kinggdom**, 1980.

COOK, A. H. **Chemistry and Biology of Yeasts**. Academic Press; New York, 1958.

COUNET, C.; OUWERX, C.; ROSOUX, D.; COLLIN, S. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6243-6249, 2004.

CRAFACK, M.; KEUL, H.; ESKILDSEN, C. E.; PETERSEN, M. A.; SAERENS, S.; BLENNOW, A.; NIELSEN, D. S. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, v. 63, p. 306-316, 2014.

CRESPO, S. Judging the quality of cocoa beans. **The Manufacturing Confectioner**, v. 4, n. 5, p. 59-64, 1985.

DANIEL, H.M.; VRANCKEN, G.; TAKRAMA, J.F.; CAMU, N.; DE VOS, P.; DE VUYST, L. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 5, p. 774-783, 2009.

DE DEKEN, R.H.,. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast.

DU TOIT, M.; PRETORIUS, I. S. Microbial spoilage and preservation of wine: Using weapons from nature's own arsenalea review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 74-96, 2000.

EDGARDO A.; CAROLINA P.; MANUEL R.; JUANITA F.; BAEZA J. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 120-123, 2008.

EFRAIM, P.; ALVES, A.B.; JARDIM, D.C.P. Review: Polyphenols in cocoa and derivatives: factors of variation and health effects. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 181-201. 2011.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 142-150, 2010.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. D. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educ, v. 11, 2004.

FERRÃO, J.E.M. **Cacau. Tecnologia pós-colheita**. Instituto de Cooperação Portuguesa, Lisboa, 2002.

FORSYTH, W.G.C.; QUESNEL, V.C. The mechanism of cacao curing. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**, n. 25, p. 457- 459, 1963.

FOWLER, M. S. Cocoa Beans: From Tree to Factory. **Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use**, p. 10-47, 2009.

FRANCO, W.; PEREZ-DÍAZ, I. M.; JOHANNINGSMEIER, S. D.; MCFEETERS, R. F. Characteristics of spoilage-associated secondary cucumber fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1273-1284, 2012.

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

GALLARDO, J. C. M.; SOUZA, C. S.; CICARELLI, R. M. B.; OLIVEIRA, K. F.; MORAIS, M. R.; LALUCE, C. Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at

increasing temperatures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 405-414, 2011.

HO, V.T.T., ZHAO, J., FLEET, G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. n. 174, p. 72–87, 2014.

ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS-ICMSF. **Microbiología de los alimentos: Características de los patógenos microbianos**. Zaragoza-España: Acrileia, 1998.

JESPERSEN, L.; NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S.; JAKOBSEN, M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 4-5, p. 441–453, 2005.

KONÉ, M. K.; GUÉHI, S. T.; DURAND, N.; BAN-KOFFI, L.; BERTHIOT, L.; TACHON, A. F.; MONTET, D. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. **Food Research International**, v. 89, p. 910-917, 2016.

KONGOR, J. E.; HINNEH, M.; VAN DE WALLE, D.; AFOAKWA, E. O.; BOECKX, P.; DEWETTINCK, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. **Food Research International**, v. 82, p. 44-52, 2016.

KOSTINEK, M.; BAN-KOFFII, L.; OTTAH-ATIKPO, M.; TENIOLA, D., SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANK, C. M. A. P. Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. **Current microbiology**, v. 56, n. 4, p. 306–314, 2008.

KURTZMAN, C. P. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. *The yeasts, a taxonomic study*. 4 ed., p. 111–121, Amsterdam, The Netherlands: **Elsevier Science**, B. V., 1997.

LEAL, G. A.; GOMES, L. H.; EFRAIM, P.; DE ALMEIDA TAVARES, F. C.; FIGUEIRA, A. Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid

Kluyveromyces marxianus strain improved product quality attributes. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 5, p. 788-798, 2008.

LEFEBER, T., GOBERT, W., VRANCKEN, G., CAMU, N., DE VUYST, L. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. **Food Microbiology**, v. 28, p. 457-464. 2011.

LEFEBER, T.; PAPALEXANDRATOU, Z.; GOBERT, W.; CAMU, N.; DE VUYST, L. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. **Food Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 379-392, 2012.

Li, S-S., CHENG, C., LI, Z., CHEN, J-Y., YAN, B., HAN, B-Z., REEVES, M. Yeast species associated with wine grapes in China. **International Journal of Food Microbiology**, 138, 85– 90. 2010.

LOPEZ, A. S. **Chemical changes occurring during the processing of cacao**. 1986.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 23-50, 2003.

MAGI, E.; BONO, L.; DI CARRO, M. Characterization of cocoa liquors by GC–MS and LC–MS/MS: Focus on alkylpyrazines and flavanols. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 9, p. 1191-1197, 2012.

MASIH, E.I.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; MARMARAS, I.; BARKA, E.A.; VERNET, G.; CHARPENTIER, C.; ADHOLEYA, A.; AND PAUL, B. Characterization of the Yeast *Pichia membranifaciens* and Its Possible Use in the Biological Control of *Botrytis cinerea*, Causing the Grey Mould Disease of Grapevine. **FEMS microbiology letters**, v. 202, n. 2, p. 227-232, 2001.

MENEZES, A. G. T.; BATISTA, N. N.; RAMOS, C. L.; E SILVA, A. R. D. A.; EFRAIM, P.; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 81, p. 83-90, 2016.

MOTAMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A. M.; HEATH, M.; LANAUD, C. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. **Heredity**, v. 91, n. 3, p. 322, 2003.

NAGORNAYA, S.S.; IGNATOVA, E.A.; AND ZHAROVA, V.P. Sexual Process in the Imperfect Yeast *Candida valida* (Leberle) van Uden et Buckley. **Mikrobiol. Zh**, v. 52, n. 5, p. 26–30, 1990.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. *Chromosomal differentiation of the sibling species Pichia membranifaciens and Pichia manshurica*. **Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 214-217, 2009.

NIELSEN, D. S.; TENIOLA, O. D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T. S.; HOLZAPFEL, W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods, Germany, **International Journal of Food Microbiology**, n. 114, p. 168-186, 2007.

OETTERER, M. Tecnologias de obtenção do cacau, produtos do cacau e do chocolate. **M. Detterer, A. Regitano d'Arce & MH F. Spoto (Drgs.), Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 1-50, 2006.

OWUSU, M. Influence of raw material and processing on aroma in chocolate. PhD **Thesis presented to Faculty of Life Science University of Copenhagen**, 1–16. 2010.

PAPALEXANDRATOU, Z.; FALONY, G.; ROMANENS, E.; JIMENEZ, J. C.; AMORES, F.; DANIEL, H. M.; DE VUYST, L. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7698-7714, 2011.

PEREIRA, G. V.; ALVAREZ, J. P.; NETO, D. P. D. C.; SOCCOL, V. T.; TANOBE, V. O.; ROGEZ, H.; SOCCOL, C. R. Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. **LWT-Food Science and Technology** , v. 84, p. 290-297, 2017.

PERPETUINI, G.; TITTARELLI, F.; SCHIRONE, M.; DI GIANVITO, P.; CORSETTI, A.; ARFELLI, G.; TOFALO, R. Adhesion properties and surface hydrophobicity of *Pichia manshurica* strains isolated from organic wines. **LWT-Food Science and Technology**, v. 87, p. 385-392, 2018.

RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; MIGUEL, M. G. C. P.; SCHWAN, R. F. Impact of different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. **Food Research International**, v. 64, p. 908-918, 2014.

SAEZ, J. S.; LOPES, C. A.; KIRS, V. E.; SANGORRÍN, M. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 503-509, 2011.

SAITO, K. Mikrobiologische Studien über die Bereitung des mandschurischen Branntweins. Report of the Central Laboratory, South Manchuria Railway Company 1: 60 pp., 1914.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCH, S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 167-187, 2013.

SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. Microbial activities during cocoa fermentation. **Cocoa and coffee fermentations**, p. 125-135, 2014.

SCHWAN, R. F.; LOPEZ, A.; SILVA, D.O.; VANETTI, M. C. D. Influência da frequência e intervalos de revolvimentos sobre a fermentação de cacau e qualidade do chocolate. **Agrotrópica (Brasil)** v. 2 (1) p. 22-31, 1990.

SCHWAN, R. F.; ROSE, A. H.; BOARD, R. G. Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. In: **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**. 1995. p. S96-S107.

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

SREE, N. K.; SRIDHAR, M.; SURESH, K.; BANAT, I. M.; VENKATESWAR RAO L. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, occulating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 1, p. 43-46, 2000. .

THOMPSON, S. S.; MILLER K. B.; LOPEZ A. S.; CAMU, N. Cocoa and coffee. In: **Food Microbiology**. American Society of Microbiology, p. 881-899, 2013.

URBANSKY, J. J. Chocolate flavor/origins and descriptions: the effects of process and bean source. **Manufacture Conference**, v. 72, p. 69-69, 1992.

VAN LAERE, A. Intermediary Metabolism. In: **The Growing Fungus**. GOW, N. A. R.; GADD, G. M. (Eds.). Chapman & Hall. London, p. 211-238. 1995.

VISINTIN, S.; RAMOS, C. L.; BATISTA, N. N.; DOLCI, P.; SCHWAN, R. F. COCOLIN, L. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 31-40, 2017.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 423-447, 2000.

YUANGSAARD, N.; YONGMANITCHAI, W.; YAMADA, M.; LIMTONG, S. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 3, p. 577-588, 2013.

CAPÍTULO 2

Artigo

Starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia manshurica* can be an alternative to obtain fermented and dried cocoa beans with different aromatic profiles

Artigo confeccionado segundo as normas do periódico indexado:

INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

Capítulo 2 – Artigo “*Starter cultures of Saccharomyces cerevisiae and Pichia manshurica can be an alternative to obtain fermented and dried cocoa beans with different aromatic profiles*”.

Osiene de S. Ferreira ^a, Gilson Celso A. Chagas Junior ^a, Eloisa Helena de A. Andrade ^b, Lidiane D. do Nascimento ^b, Alessandra S. Lopes ^{a,*}

^a LABIOTEC, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Instituto de Tecnologia (ITEC), Universidade Federal do Pará (UFPA), campus Guamá, R. Augusto Corrêa 01, 66075-110, Belém, PA, Brazil.

^b Laboratório Adolpho Ducke, Coordenação de Botânica, Museu Paraense Emílio Goeldi, Av. Perimetral, 1900, Terra Firme, 66077-830, Belém, PA, Brazil.

*Corresponding author: eng.ferreira94@gmail.com (O. de S. Ferreira); alessalopes@ufpa.br (A.S. Lopes).

Article type: Original Paper.

ORCID Numbers

M.Sc. Osiene de S. Ferreira: 0000-0002-0839-1830

Dr. Gilson Celso A. Chagas Junior: 0000-0002-0241-6662

Prof. Dr. Eloisa Helena de A. Andrade: 0000-0003-0640-7496

Dr. Lidiane D. do Nascimento: 0000-0003-1370-4472

Prof. Dr. Alessandra S. Lopes: 0000-0002-8584-5859

Summary

The use of starter cultures in cocoa fermentation is an alternative for obtaining almonds with specific characteristics to cocoa. The objective of this research was to evaluate the influence of starter cultures of yeasts (*Pichia manshurica* – FPM and *Saccharomyces cerevisiae* – FSc) previously isolated and identified in cocoa fermentations, in the aromatic profile of fermented and dried almonds in the city of Igarapé Miri, Pará state through Gas chromatography (GC-MS) analysis. Significant differences can be observed (Duncan test, $p < 0.05$) in relation to physico-chemical analyzes and aromatic compounds (e.g. formation of different amounts of ketones, alcohols and aldehydes). The cultures of *P. manshurica* and *S. cerevisiae* were able to produce cocoa beans with desirable characteristics for the raw material of good quality chocolate: low acidity, variety aromatic compounds with floral, fruity and sweet characteristics, in addition to showing a possible satisfactory antioxidant activity by the amount of catechin and epicatechin.

Keywords: fermentation, epicatechin, GC-MS, PCA, chocolate.

1 Introduction

Fermentation of cocoa is a crucial step in the development of precursor compounds for the aroma and flavor of chocolates. This process is spontaneous and occurs after harvesting the fruits, consisting of microbial successions dominated by yeasts, lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB) in sequence. Due to the ability of yeasts to efficiently and quickly convert high concentrations of sugars (glucose, fructose and some molecules of sucrose) into ethanol and CO₂, in addition to the production of precursors of chocolate flavor and aroma, these microorganisms are constantly studied so that this process is understood and controlled (Dzialo *et al.*, 2017; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019; Serra *et al.*, 2019; Chagas Junior *et al.*, 2020; De Vuyst and Leroy, 2020).

Yeasts of the *Pichia* and *Saccharomyces* genera are among the most reported microorganisms isolated from cocoa fermentation in cocoa producing regions. Among them, the species *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia manshurica* stand out, for their high fermentation capacity with the production of aromatic compounds that confer quality attributes (in relation to parameters of volatile compounds) in fermented cocoa beans (Moreira *et al.*, 2017). Some of these compounds are reported to confer desirable notes (fruity, floral, chocolate) to cocoa, as flavor is an important quality attribute (Bastos *et al.*, 2019).

The starter cultures application in the cocoa fermentation has been the subject of scientific researches in several countries (Figueroa-Hernández *et al.*, 2019), as it provides a standardization of this process. The starter cultures use with specific microorganisms can reduce the fermentation time, producing

volatile compounds and inhibiting putrefactive compounds. Thus, studies carried out with starter cultures can generate satisfactory results both for the producer and for the scientific community (Dujon and Louis, 2017; Chagas Junior *et al.*, 2021).

Therefore, the objective of this research was to evaluate the effects of *P. manshurica* and *S. cerevisiae* as a starter culture on the aromatic profile of Amazonian cocoa beans. In this work, we performed traditional fermentation processes in a city of Pará state, in the Brazilian Amazon with the inoculation of these yeasts species. We also carried out GC/MS analysis in the cocoa beans to verify the aromatic profile of these microorganisms.

2 Material and Methods

2.1 Material

Cocoa beans from Cataiuandeua Farm, in Igarapé-miri, Pará, Brazil, (Latitude 01° 58' 30" S and Longitude 48° 57' 35" W) and fermented with yeast inocula of *P. manshurica* and *S. cerevisiae*.

2.2 Starter Culture Preparation

Yeast strains of the *Pichia manshurica* and *Saccharomyces cerevisiae* species used in this study were previously isolated and identified in cocoa fermentation in the city of Medicilândia, PA, Brazil (Alves, 2017) and Tucumã (Almeida *et al.*, 2018), stored in the Microorganisms Bank of the Laboratory of Biotechnological Processes at the Federal University of Pará (LABIOTEC/UFPA).

Each strain was reactivated in Petri dishes containing Yeast Extract Peptone Dextrose Agar – YPD [2% glucose (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA); 2% bacteriological peptone (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil); 1% g/L yeast extract (Kasvi); 2% bacteriological agar g/L (Kasvi)], at 30 °C for 24 h (Ramos *et al.*, 2014).

The inocula were produced after previous fermentation of an isolated colony of each species, in 100 mL of YPD broth, in Erlenmeyer flasks incubated in an orbital shaker, 150 rpm, 30 °C for 24 h (Batista *et al.*, 2016). This content was transferred to 900 mL of YPD broth in a benchtop bioreactor (FerMac 320, Electrolab Biotech, Tewkesbury, UK) reproducing the same conditions of the previous fermentation until reaching a count of 10^8 cells/mL (Ramos *et al.*, 2014). The contents were centrifuged (1,700 $\times g$, 10 min) and the biomass was stored under refrigeration (4 °C) for up to 48 h before use.

2.3 Fermentation and Drying Processes

Three fermentation experiments were carried out: SF – Spontaneous Fermentation process (control), FSc – fermentation with an inoculum of *S. cerevisiae* (10^6 cells/g of cocoa), FPm – fermentation with an inoculum of *P. manshurica* (10^6 cells/g of cocoa). The cocoa pods, variety Forastero, were harvested in February 2018, opened manually with a stainless knife and the seeds with the pulp separated from the husk and transferred to the fermentation wooden boxes (0.084 m³). The fermentation process started about 4 h after fruit breakage and was carried out in wooden boxes, in triplicate (n=3), with approximately 45 kg of seeds in each trial.

A population of approximately 10^6 cells/g of each yeast species was diluted in 1 L of peptone water (Kasvi) and sprayed on the cocoa seeds. The boxes with the seeds remained covered with banana leaves. Fermentation lasted 168 h (seven days), with turning every 24 h after the second day, according to the protocols used by the producer.

The fermented cocoa beans were submitted to the natural drying process on wooden platforms until moisture content in the range of 6-7% (Efraim *et al.*, 2010).

2.4 Methods of Analysis

2.4.1 Physico-chemical analysis of dried cocoa beans

The fermented and dried cocoa beans were shelled and had their embryo removed and the cotyledons were ground in an analytical mill (model A11, IKA, Staufen, Germany) for analysis of pH (method 970.21), moisture content (method 931.04), ashes (method 972.15), lipids (963.15), proteins (method 970.22) and total titratable acidity (method 31.06.06). Fermented and dried almonds were used, according to the methods of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006) method (Horwitz and Latimer, 2006). The energetic values of the fermented and dried cocoa beans were obtained by the equation (Atwater conversion, FAO 2002): $\text{kcal}/100 \text{ g} = (\% \text{ protein} \times 3.36 \text{ kcal/g}) + (\% \text{ lipid} \times 8.37 \text{ kcal/g}) + (\% \text{ total carbohydrate} \times 3.60 \text{ kcal/g})$. All analyzes were performed in triplicate.

2.4.2 Determination of Monomeric Compounds by HPLC-DAD

To prepare the extracts, the samples were defatted with n-hexane (Synth, São Paulo, SP, Brazil) (do Carmo Brito *et al.*, 2017). One gram of

defatted sample was homogenized in 10 mL of an aqueous solution of ethanol:ultrapure water (1:1, v/v) and centrifuged in tubes at 1,500 × g for 10 min. The supernatant was transferred to another tube. This extraction was performed twice and the supernatants were pooled in a new tube, being filtered on a 0.22 µm membrane filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany) (Chagas Junior *et al.*, 2021b).

The extracts were analyzed by HPLC (mod. 1260 Infinity, Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) equipped with a C18 column (20 cm; 4.6 mm × 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies) at 25 °C and array detector diodes at 280 nm. The catechin and epicatechin standards used to construct the curves were obtained from Sigma-Aldrich Co. The mobile phase consisted of an aqueous solution of 0.2% acetonitrile HPLC grade (Dinâmica, SP, Brazil, 99.8:0.2, eluent 1) and methanol HPLC grade (Dinâmica, eluent 2), which were degassed in an ultrasonic bath (model Q3.0/40A, Ultronique, Indaiatuba, SP, Brazil) and filtered (0.45 µm). The flow of eluent 2 was linearly increased from 0 to 50% over the 0-12 min period and then increased from 50% to 100% over 13-20 min with gradient elution. 20 µL of the sample was injected at a flow rate of 1.2 mL/min (He *et al.*, 2010; Chagas Junior *et al.*, 2021b). Quantification was obtained by comparing the retention times of the analytical curves of catechin ($R^2 > 0.999$, LOQ=0.31 mg/g) and epicatechin ($R^2 > 0.999$, LOQ=0.11 mg/g), with the results expressed in µg/mL and converted to mg/g.

2.4.3 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) in Cocoa beans during fermentation and in the dried cocoa beans

The fermented and dried cocoa beans samples were ground in a mill (model A11B, Ika, Staufen, Germany) and 5 g of each sample (SF, FPM, and

FSc) were subjected to a simultaneous distillation/extraction process for 2 hours, using pentane as solvent (Sigma-Aldrich Chemical Co.) (Szliszka *et al.*, 2009; Chagas Junior *et al.*, 2021a; Gaspar *et al.*, 2021).

The volatile concentrate obtained was analyzed by GC/MS (model QP-2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a DB-5MS column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). The oven temperature was adjusted from 60-250 °C, using a ramp of 3 °C/min. Helium gas was used as a carrier gas, with a flow of 1.2 mL/min. An electron ionization mass spectrometer at 70 eV with the ion source temperature at 220 °C was used. The quantification of each component was performed by peak-area normalization using a flame ionization detector (GC-FID, QP 2010 system, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) under the same conditions as GC/MS, except for the carrier gas, which was hydrogen. The identification was carried out by comparing the mass spectra and Retention Indices (RI) with those of standard compounds existing in the system library and with data from the literature. Retention indices were obtained using a homologous series of n-alkanes (C8-C24, Sigma-Aldrich Chemical Co.) (Adams, 2007).

2.5 Statistical Analysis

The results of the physico-chemical analysis were evaluated with Analysis of Variance (ANOVA) and the means were compared by Duncan's Test (5% of significance) using the Statistica 7.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

For the multivariate analysis of Principal Components (PCA) the results of the physico-chemical analysis were used (moisture content, total titratable

acidity, pH, catechin, epicatechin, lipids, proteins and carbohydrates, in addition to the sum of the amounts of the classes of volatile compounds) as active variables. For the Hierarchical Cluster Analysis (HCA), all active variables were analyzed forming groups with analysis of Euclidean distances (Ward's method). The analyzes of PCA, HCA and the graphs were obtained with OriginPro 8 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

3 Results and Discussion

3.1 Characterization of Fermented and Dried Cocoa Beans

All the physico-chemical results are showed in Table 1. The moisture content of fermented and dried almonds (values from 4.36 to 4.45%), was not significantly different between them. The reduction in moisture content is essential to avoid fungi proliferation after the fermentation and drying process. For marketing purposes, cocoa beans must have a maximum moisture content of 8%, being classified as types 1 and 2 (Ferreira, 2017).

Table 1. Mean values of moisture content, pH, total titratable acidity, monomeric compounds and the energetic value in fermented and dried cocoa beans submitted to on-farm fermentation with different starters: SF – control treatment, FPm – *Pichia manshurica* inoculum, FSc – *Saccharomyces cerevisiae* inoculum.

Parameters	Mean values*/ Fermentation treatment		
	SF	FPm	FSc
Moisture content (%)	4.36 ± 0.12 a	4.45 ± 0.04 a	4.45 ± 0.02 a
Ph	3.75 ± 0.24 b	5.47 ± 0.03 a	5.24 ± 0.02 a
Total titratable acidity (meq. NaOH 0.1 N /100 g) ¹	10.23 ± 0.61 a	8.03 ± 0.78 b	9.50 ± 0.30 a
Monomeric compounds (mg/g)			

Catechin	3.95 ± 0.68 a	3.28 ± 0.79 a	2.02 ± 0.14 b
Epicatechin	4.09 ± 2.17 a	4.05 ± 0.48 a	3.75 ± 0.24 a
Macronutrients			
Proteins (%)	16.43 ± 0.12	16.17 ± 0.25 a	16.07 ± 0.15 a
	a		
Lipids (%)	48.53 ± 1.66	46.99 ± 1.16 b	51.90 ± 1.58 a
	b		
Carbohydrates (%)	27.73 ± 0.42	27.27 ± 0.42 a	26.30 ± 0.56 b
	a		
Energetic Value (kcal/100 g) ²	561.23 ± 15.19 ab	545.81 ± 11.02 b	583.08 ± 15.04 a

¹ meq. NaOH 0.1 N/100 g: milliequivalent sodium hydroxide solution 0.1N per 100 g sample

² Result of the Atwater expression (FAO, 2002): (% protein × 3.36 kcal/g) + (% lipid × 8.37 kcal/g) + (% total carbohydrate × 3.60 kcal/g).

*Means ± standard deviation with different letters in the same line (fermentation treatment) are statistically different (Duncan test, $p \leq 0.05$).

The inoculum fermentations (FPM and FSc) presented pH values (5.47 and 5.24, respectively) higher than the control SF fermentation (3.75), showing a significant difference between them. The results showed that the acetic acid volatilization during the drying process was higher in the FPM and FSc assays, showing that the starter cultures influenced this parameter.

At the beginning of fermentation, pH values can vary from 5.0 to 6.5 and decrease as the metabolic reactions of microorganisms occur and there is the absorption of acids (mainly acetic) produced by LAB and AAB into the cotyledons (Figuroa-Hernández *et al.*, 2019). In the second stage of fermentation (aerobic phase) there is an increase in pH attributed to the evaporation of produced acids (Ho *et al.*, 2014). The species *P. manshurica*,

through the consumption of lactic acid can favor an increase in pH in the fermentation matrix. In our study, it was possible to observe that the pH values obtained from the fermentation inoculated with this microorganism were relatively higher than those obtained in the other tests (SF and FSc).

The total titratable acidity (Table 1) ranged from 8.03 to 10.23 meq NaOH/100 g, with a lower value for the FPM assay, differing significantly from the other assays ($p < 0.05$, SF and FSc), showing that fermentation with *P. manshurica* was able to produce almonds with lower acid content, a desirable result for the production of higher quality chocolates (Efraim *et al.*, 2010).

Regarding the monomeric compounds, FSc treatment provided lower values (2.02 mg/g) of catechin when compared to the other samples (SF=3.95 mg/g; FPM=3.28 mg/g). However, the samples did not differ from each other for epicatechin ($p > 0.05$). Catechin and epicatechin are the major flavonoids found in cocoa. These compounds impart bitterness and astringency. Its reduction throughout the fermentation and drying process is attributed to various processing conditions, as well as to the oxidation by polyphenol oxidase (PFO) in temperatures higher than 42 °C (Camu *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2013).

There was no significant difference in protein content between fermentation assays. The carbohydrate content for the FSc assay was lower (26.30%) and showed a significant difference from the other samples, elucidating that there was a greater consumption of carbohydrates throughout fermentation. The lipid content ranged from 46.99% to 51.90%, with a maximum value for fermentation with *S. cerevisiae* treatment. The Cocoa Index established a minimum and maximum lipid limit ranging from 30.77 to 43.68 for cocoa beans (Araujo *et al.*, 2014).

3.2 Volatile profile of the fermented and dried cocoa beans

Twenty-nine volatile compounds were identified in fermented and dried cocoa beans (Table 2). Compounds have been grouped into six classes, including alcohols, aldehydes, ketones, esters, pyrazines and others. Twenty-three compounds were identified in the fermentation inoculated with *P. manshurica* (FPm), while twenty were identified in the other fermentations (SF and FSc).

For each compound, a descriptive odor based on the literature was given. Some of these compounds are reported to impart desirable notes (Fruity, floral, chocolate) to cocoa beans. Flavor is an important quality attribute in cocoa beans and their by-products (chocolate). This characteristic is obtained by the volatile fraction of a variety of compounds (Bastos *et al.*, 2019).

Table 2. Percentage of volatile compounds identified and quantified by GC-MS in fermented and dried cocoa beans submitted to on-farm fermentation with different starters: SF – control, FPm – *Pichia manshurica* inoculum, FSc – *Saccharomyces cerevisiae* inoculum.

RI	Compound	SF (%)	FPm (%)	FSc (%)	Odour description ¹
Alcohols					
900	2-Heptanol	4.06	4.90	-	Fruity, citrus, herbal
1113	Phenylethyl Alcohol	-	0.46	-	Floral, sweet
Aldehydes					
953	Benzaldehyde	8.28	10.41	12.32	Roasted almonds, candy, burnt sugar
1036	Phenylacetaldehyde	49.47	35.35	39.59	Floral, fruity, honey
1272	2-Phenyl	0.32	0.96	1.67	Poignat

	crotonaldehyde				
1492	5-Methyl-2-phenyl- 2-hexenal	0.38	-	0.45	Fruity, chocolate

Ketones

888	2-Heptanone	1.38	2.96	2.00	Fruity, banana
1061	Acetophenone	2.31	5.09	3.49	Flower, almond, pungent, sweet
1090	2-Nonanone	13.92	6.65	2.90	Fruity, sweet, waxy, green herbaceous
1293	2-Undecanone	-	0,28	-	Fruity

Esters

835	Sec-amyl acetate	0.54	1.45	2.17	Fruity, banana
879	Isoamyl acetate	1,02	-	4.99	Fruity
898	Isopentyl acetoacetate	-	-	3.80	Fruity
1165	4-Ethyl phenol	0.11	1.45	-	Smoke
1200	Ethyl octanoate	-	0.52	1.22	Floral, fruity
1246	Ethyl phenylacetate	0.24	0.47	0.49	Sweet, waxy
1257	2-Phenethyl acetate	0.58	2.15	1.66	Fruity, sweet, roses, honey, floral
1394	Isoamyl benzoate	3.16	8.88	6.83	Balsam, sweet
1469	Gamma- decalactone	-	0.14	-	Fruity
1596	Ethyl Dodecanoate	-	0.30	0.39	Floral, fruity

1680	Gamma-dodecalactone	-	0.69	-	Fruity
------	---------------------	---	------	---	--------

Pyrazines

1085	Tetramethylpyrazine	-	-	4.33	Roasted cocoa, chocolate
------	---------------------	---	---	------	--------------------------

Others

983	Myrcene	0.84	0.54	-	Off-flavor
1030	cis- β -Ocimene	0.43	-	0.38	Floral
1100	Linalool	10.90	13.26	7.05	Floral
1129	Allo-ocimene	0.32	-	0.29	Floral, sweet
1203	<i>n</i> -Dodecane	-	0.22	0.17	Off-flavour
1291	Pyrrrole	0.17	0.12	-	Floral
1400	<i>n</i> -Tetradecane	0.09	0.23	-	Off-flavour
Total (%)		98.52	97.48	96.19	

Notes:

RI: retention index.

¹: Characteristics found in the literature (Rodriguez-Campos *et al.*, 2011, 2012; Moreira *et al.*, 2017; Dzialo *et al.*, 2017; Bastos *et al.*, 2019; Tuenter *et al.*, 2020; Utrilla-Vázquez *et al.*, 2020).

Alcohols are compounds of great importance for the development of desirable and pleasant flavor and aroma in cocoa (Tuenter *et al.*, 2020). These compounds come from the metabolism of yeasts by the consumption of sugars during the anaerobic phase of fermentation (De Vuyst and Leroy, 2020). However, the alcohol content reduces with drying and roasting through chemical degradation or volatilization. In this study, only two alcoholic compounds were found: phenylethyl alcohol and 2-heptanol, the latter being highlighted.

Fermentation started with *P. manshurica* had a higher content (4.9%) of 2-heptanol compared to SF fermentation (4.06%). *Saccharomyces cerevisiae* is reported to contribute to a large production of desirable aromatic compounds in cocoa beans, such as the alcoholic compounds in this study (Batista *et al.*, 2016). Both yeasts were able to provide a fruity aroma in the almonds. It is noteworthy that the 2-Heptanol is related to fine cocoa (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018), which is used for making cocoa by-products of greater commercial value. In relation to the compound phenylethyl alcohol, the content identified was relatively low (0.46%), being found only in the fermentation inoculated with *P. manshurica*. Despite this, this compound is expected to contribute floral notes to cocoa by-products.

Four aldehydes were identified: benzaldehyde, 2-Phenyl crotonaldehyde, 5-Methyl-2-phenyl-2-Hexenal and phenylacetaldehyde, the latter being the compound with the highest percentage (49.47% for the SF assay), followed by benzaldehyde, with the highest concentrations in fermentations with starter cultures (FSc=12.32% and FPm=10.41%).

Regarding the aroma, benzaldehyde has a typical roasted almond odor and its production must be monitored to avoid bitter notes in the final product (Castro-Alayo *et al.*, 2019). The other major compound in the class, phenylacetaldehyde, is reported to present its increased concentration during the fermentation process, becoming something positive in the quality of the chocolates obtained, as it gives sweet and floral notes to almonds (Rodriguez-Campos *et al.*, 2012).

Ketones are known as odorants in foods because they have a similar aroma to nuts. These compounds are formed through decarboxylation and

oxidation of fatty acids (Rottiers *et al.*, 2019). Among the identified ketones, 2-nonanone and acetophenone, with floral and fruity characteristics, stood out among the other compounds in this class. Such compounds can be used as a quality indicator at the end of the fermentation and drying process. The culture of *P. manshurica* contributed considerably to the production of these compounds.

Esters are considered compounds of great importance in the formation of the flavor of foods, however, the aroma will depend on the molecular structure and conformation. The odor becomes more sweet or metallic as the chain increases (Bastos *et al.*, 2019). Eleven compounds were identified in this study, among them sec-amyl acetate, isoamyl acetate, 2-Phenethyl acetate and isoamyl benzoate stood out with the highest percentage (Table 2). The FPM assay showed higher concentrations (8.88%) of isoamyl benzoate, followed by the FSc assay (6.83%) and SF (3.16%), respectively. In general, it was possible to note that starter cultures positively influenced the production of these compounds. These compounds are capable of attributing sweet, fruity and balm notes (such as isoamyl benzoate) to cocoa beans (Chagas Junior *et al.*, 2021a).

Pyrazines are volatile heterocyclic compounds related to nutty, roasted, roasted and green aromas. Among them, tetramethylpyrazine and trimethylpyrazine are the most important. Most are produced from α -aminoketones formed by Strecker degradation and Maillard reactions during almond roasting (Serra *et al.*, 2019; Utrilla-Vázquez *et al.*, 2020). Parameters such as time and temperature of thermal reactions are considered critical factors that influence the concentration of these compounds (Visintin *et al.*,

2017), however, if cocoa fermentation occurs in the absence of yeast and subsequent roasting, there will be a reduction in the pyrazine content and, consequently, in the characteristic flavor of chocolates (Kongor *et al.*, 2016). Tetramethylpyrazine was the only compound from the pyrazine group detected (only in the assay inoculated with *S. cerevisiae*), with a concentration of 4.33%, and is a desirable compound in cocoa beans (coffee and chocolate notes) (Rodriguez-Campos *et al.*, 2011; Chagas Junior *et al.*, 2021a).

Other volatile compounds also play important roles in the aroma of cocoa beans. Among them, seven distinct compounds were detected (myrcene, *cis*- β -ocimene; linalool; allo-ocimene; *n*-dodecane; pyrrole and *n*-tetradecane). Linalool gained prominence and had a higher concentration in the FPM assay (13.26%) when compared to the other assays, SF (10.9%) and Fsc (7.05%). This compound has a positive contribution to the aroma of cocoa, and is reported for being found in fine cocoa, contributing with a floral aroma (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018). Regarding the compounds myrcene, *n*-dodecane and *n*-tetradecane (which have off-flavor notes), relatively low concentrations were detected, which can be negligible in the presence of the quality compounds.

3.3 Multivariate analysis (PCA and HCA) in the fermented and dried cocoa beans

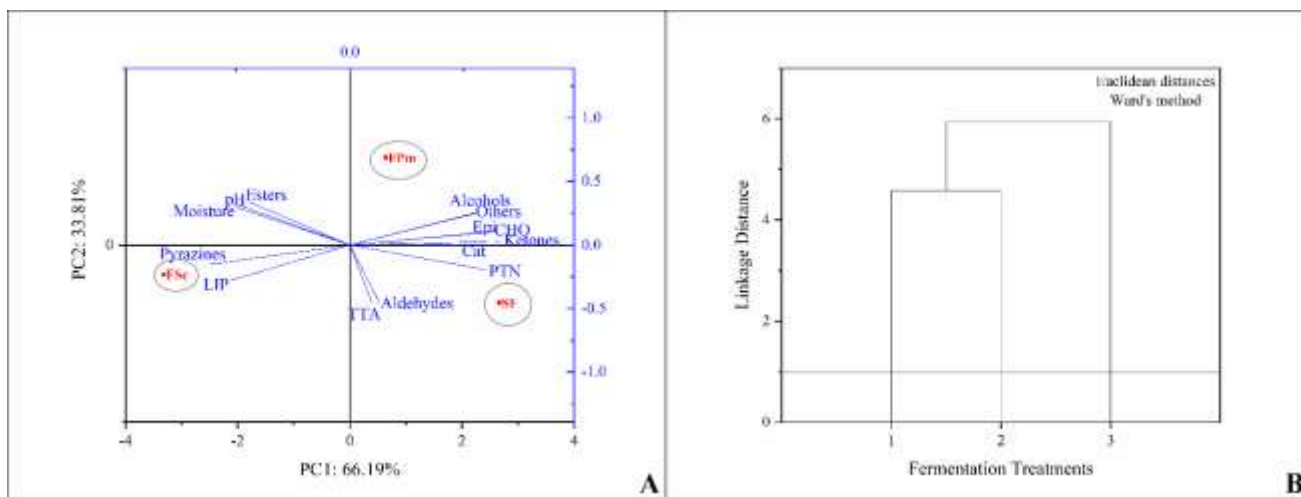


Figure 1. A – Principal Components Analysis (PCA) of fermented and dried cocoa beans; B – The Hierarchical Cluster Analysis (HCA) showing the three groups formed (1: SF, 2: FPM, 3: FSc).

The PCA and HCA analyzes were performed in order to differentiate the results of the physico-chemical and volatile analyzes of the fermentation treatments used (Control fermentation - SF, fermentation with *Pichia manshurica* inoculum - FPM, fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* inoculum - FSc). It was found that the sum of the main components (PC1+PC2) was 100%, with a good separation and differentiation of results according to the studied fermentation treatment.

The analysis of Hierarchical Components Analysis (HCA) was able to separate three distinct groups, which have the following characteristics: group 1 (Control treatment – SF): almonds with higher acidity contents, higher amounts of aldehydes and catechin; group 2 (treatment with inoculum of *P. manshurica*): almonds with greater amounts of epicatechin and varieties of aromatic compounds belonging to the classes of alcohols and ketones and other compounds such as linalool); group 3 (treatment with *S. cerevisiae* inoculum): almonds with higher levels of lipids, moisture and a wide variety of esters.

The use of yeast inocula could be beneficial to obtain almonds with different varieties of characteristics, especially concerning the aromatic compounds formed. It was observed that the presence of yeasts of the *Pichia* genus was beneficial to the variety of compounds responsible for conferring floral, sweet and fruity aromas in fermented and dried almonds in the city of Tomé-Açu, state of Pará (Chagas Junior *et al.*, 2021b) as well as in this research. The amount of monomeric phenolic compounds (catechin and epicatechin) was also higher in the beans treated with *P. manshurica*, thus suggesting that this yeast may have a positive influence on the antioxidant capacity of fermented and dried cocoa beans.

The chemical classes that were most influenced by fermentation treatments were alcohols and aldehydes, which had a strong correlation ($r = 0.87$), as well as carbohydrates and alcohols ($r = 0.94$), which is explained by the consumption of fermentable sugars such as glucose and fructose resulting in the formation of alcohols by the metabolism of yeasts and lactic bacteria in the first hours of fermentation (Figueroa-Hernández *et al.*, 2019; Chagas Junior *et al.*, 2020; De Vuyst and Leroy, 2020). There was also a strong negative correlation between total titratable acidity and pH ($r = -0.83$) evidencing the formation of lactic and acetic acids during cocoa fermentation by lactic and acetic bacteria, respectively, causing the acidification of the medium, as well as in almonds fermented in another Amazonian location (do Carmo Brito *et al.*, 2017).

The fermentations conducted with yeast inocula in this study were effective in obtaining almonds with good quality with regard to acidity levels and variety of desirable aromatic compounds to good quality almonds for obtaining

chocolate, which may be an alternative for the use on farms in the region, thus strengthening the product's prominence in the national and international market.

4 Conclusions

The starter cultures of *P. manshurica* and *S. cerevisiae* were able to produce cocoa beans with different varieties of aromatic compounds and physico-chemical characteristics in relation to the control treatment: higher amounts of ketones, aldehydes and alcohols, providing floral, fruity and aromas sweets, low acidity and higher levels of monomeric phenolic compounds, suggesting a greater antioxidant activity.

Future studies must be carried out to better understand the formation pathways of aromatic compounds observed in this study and thus obtain starter cultures for local cocoa producers, thus increasing competitiveness and national and international prominence.

Conflict of interests: None.

Ethics approval: The ethics approval was not required for this research.

Note: The data that support the findings of this research are available on request from the authors.

Author contributions: O. de S. Ferreira: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, data curation, writing – original draft preparation; G.C.A. Chagas Junior: writing – original, review and editing, statistical analysis; E.H. de A. Andrade: methodology, visualization, formal analysis, investigation, funding acquisition, writing – original, review and editing; L.D. do Nascimento:

formal analysis, investigation, writing – original, review and editing; A.S. Lopes: Conceptualization, resources, writing – original, review and editing, visualization, supervision, project administration, funding acquisition

Acknowledgments

The authors acknowledge *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES/Brazil) for providing master scholarship of the first author (O. de S. Ferreira, process number 02534429230), *Paraense Museum Emílio Goeldi* (MCTI/MPEG) for the great technological support and *Postgraduate Program of Food Science and Technology of Federal University of Pará* (PPGCTA/UFPa) for providing the infrastructure.

References

Adams, R.P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Biochemical Systematics and Ecology*. 4th edn. Allured Pub Corp.

Almeida, S. de F.O. de, Silva, L.R.C., Chagas Junior, G.C. A., Oliveira, G., Silva, S.H.M. da, Vasconcelos, S. & Lopes, A.S. (2018). Diversity of yeasts during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon. *Acta Amazonica*, **49**, 64–70.

Alves, Y.F.M. (2017) *Caracterização molecular e potencial enzimático de leveduras isoladas da fermentação de cacau na Amazônia. MSc Dissertation*. Federal University of Pará.

Araujo, Q.R., Fernandes, C.A.F., Ribeiro, D.O., Efraim, P., Steinmacher, D., Lieberei, R., Bastide, P. & Araujo, T.G. (2014). Cocoa Quality Index - A proposal. *Food Control*, **46**, 49–54.

Bastos, V.S., Uekane, T.M., Bello, N.A., Rezende, C.M. de, Flosi Paschoalin, V.M. & Aguila, E.M. Del. (2019). Dynamics of volatile compounds in TSH 565 cocoa clone fermentation and their role on chocolate flavor in Southeast Brazil. *Journal of Food Science and 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 of Food Science and Technology*, **53**, 1101–1110.

Camu, N., Winter, T. De, Addo, S.K., Takrama, J.S., Bernaert, H. & De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **8**, 2288–2297.

Carmo Brito, B. de N. do, Campos Chisté, R., Silva Pena, R. da, 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.

Castro-Alayo, E.M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R. & Cardenas-Toro, F.P. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, **5**.

Cevallos-Cevallos, J.M., Gysel, L., Maridueña-Zavala, M.G. & Molina-Miranda, M.J. (2018). Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *Journal of Food Quality*, **2018**.

Chagas Junior, G.C.A., Ferreira, N.R. & Lopes, A.S. (2020). The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, *56*, 544–552.

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

Chagas Junior, G.C.A., Ferreira, N.R., Gloria, M.B.A., Martins, L.H. da S. & Lopes, A.S. (2021b). Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. *Food Chemistry*, **338**, 127834.

De Vuyst, L. & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, **44**, 432–453.

Dujon, B.A. & Louis, E.J. (2017). Genome Diversity and Evolution in the Budding Yeasts (*Saccharomycotina*), **206**, 717–750.

Dzialo, M.C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B. & Verstrepen, K.J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, **41**, S95–S128.

Efraim, P., Pezoa-García, N.H., Jardim, D.C.P., Nishikawa, A., Haddad, R. &

Eberlin, M.N. (2010). Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **30**, 142–150.

FAO/WHO. (2002). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Food and Nutrition.

Ferreira, A.C.R. (2017). Passo a passo na produção de cacau de qualidade. In: Indicação de procedência Sul da Bahia–Beneficiamento de Cacau de Qualidade Superior. In: *Beneficiamento de Cacau de Qualidade Superior* (edited by A.C.R. Ferreira). Pp. 26–67. Ilhéus: PCTSB.

Figueroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, Z.J., González-Ríos, O., Cocolin, L. & Suárez-Quiroz, M.L. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, **301**, 41–50.

Franco, W. & Pérez-díaz, I.M. (2012). Role of selected oxidative yeasts and bacteria in cucumber secondary fermentation associated with spoilage of the fermented fruit q. *YFMIC*, **32**, 338–344.

Gaspar, D.P., Chagas Junior, G.C.A., Andrade, E.H. de A., Nascimento, L.D. do, Chisté, R.C., Ferreira, N.R., Martins, L.H. da 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*, **26**.

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**, 491–498.

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

Horwitz, W. and Latimer, G.W. (2006). Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition,. *Association of Official Analytical Chemistry International, Maryland*.

Kongor, J.E., Hinneh, M., Walle, D. Van de, 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.

Leite, P.B., Maciel, L.F., Opretzka, L.C.F., Soares, S.E. & Bispo, E. da S. (2013). Phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity in cocoa mass and chocolates produced from “witch broom disease” resistant and non resistant cocoa cultivars. *Ciência e Agrotecnologia*, **37**, 244–250.

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*, **22**.

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.

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.

Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E. & Jaramillo-Flores, M.E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, **44**, 250–258.

Rottiers, H., Tzompa Sosa, D.A., Winne, A. De, Ruales, J., Clippeleer, J. De, Leersnyder, I. De, Wever, J. De, 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 and Technology*, **245**, 1917–1937.

Serra, J.L., Moura, F.G., Pereira, G.V. d. 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 and Technology*, **106**, 229–239.
- Szliszka, E., Czuba, Z.P., Domino, M., Mazur, B., Zydowicz, G. & Krol, W. (2009). Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules*, **14**, 738–754.
- Tuenter, E., Delbaere, C., Winne, A. De, Bijttebier, S., Custers, D., Foubert, K., Durme, J. Van, Messens, K., Dewettinck, K. & Pieters, L. (2020). Non-volatile and volatile composition of West African bulk and Ecuadorian fine-flavor cocoa liquor and chocolate. *Food Research International*, **130**, 108943.
- Utrilla-Vázquez, M., Rodríguez-Campos, J., Avendaño-Arazate, C.H., Gschaedler, A. & Lugo-Cervantes, E. (2020). Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Research International*, **129**, 108834.
- Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F. & Cocolin, L. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **257**, 31–40.

CONCLUSÃO GERAL

O processo de fermentação e secagem das sementes de cacau é crucial para a obtenção de amêndoas com qualidade. Essa qualidade pode ser relacionada com parâmetros físicos e químicos presente nas amêndoas. A inoculação de culturas *starters* foi uma alternativa viável para a obtenção de amêndoas com qualidade.

Neste estudo foi possível comparar os ensaios controle e inoculados, assim como, avaliar os efeitos das inoculações com leveduras, além da produção de compostos aromáticos de aroma e sabor característicos de chocolate.

As inoculações com *P. manshurica* e *S. cerevisiae* foram capazes de produzir amêndoas com baixo teor de acidez quando comparadas com a fermentação controle. Além disso, foi possível observar capacidade antioxidante (atraves dos teores de catequina e epicatequina) e formação de compostos aromáticos pertencentes a classe dos álcoois, cetonas e ésteres em maiores concentrações.

Esta pesquisa sugere a aplicação de inóculos de leveduras para uma melhor padronização do processo e obtenção de amêndoas com qualidade.