



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

EVELYN MAYUMI HANAWA KONAGANO

**INFLUÊNCIA DO FUNGO *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* NO ÍNDICE DE
QUALIDADE E PERFIL AROMÁTICO DE SEMENTES DE CACAU (*THEOBROMA
CACAO* L.) FERMENTADAS**

BELÉM – PA

2020

EVELYN MAYUMI HANAWA KONAGANO

INFLUÊNCIA DO FUNGO *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* NO ÍNDICE DE QUALIDADE E PERFIL AROMÁTICO DE SEMENTES DE CACAU (*THEOBROMA CACAO L.*) FERMENTADAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará como requisito necessário à obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

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

Coorientador: Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira.

BELÉM - PA

2020

**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)**

K82i Konagano, Evelyn Mayumi Hanawa.
Influência do fungo *Cladosporium cladosporioides* no índice de
qualidade e perfil aromático de sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.)
fermentadas / Evelyn Mayumi Hanawa Konagano. — 2020.
102 f. : il. color.

Orientador(a): Profª. Dra. Alessandra Santos Lopes
Coorientador(a): Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira Dissertação
(Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Belém, 2020.

1. Aminas. 2. Aroma. 3. Compostos fenólicos. 4. Fungo
filamentoso. 5. *Theobroma cacao*. I. Título.

CDD 641.3

EVELYN MAYUMI HANAWA KONAGANO

INFLUÊNCIA DO FUNGO *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* NO ÍNDICE DE QUALIDADE E PERFIL AROMÁTICO DE SEMENTES DE CACAU (*THEOBROMA CACAO* L.) FERMENTADAS

DATA DA AVALIAÇÃO: 10/11/2020

CONCEITO: APROVADA

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

**Prof^a. Dr^a. Luiza Helena da Silva
Martins**
(ISPA/UFRA)
Membro Externo

Prof^a. Dr^a. Ana Vânia Carvalho
(PPGCTA/ITEC/UFPA)
Membro Suplente Interno

**Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Marques
da Silva**
(IEC/SVS/MS)
Membro Suplente Externo

BELÉM – PA

2020

À minha irmã Karina (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter permitido que eu pudesse viver todos os momentos até aqui e pelo grande aprendizado que vivo todos os dias.

Agradeço aos meus pais pelo suporte ao longo de toda minha jornada, em especial por todo apoio acadêmico. Obrigada mãe pela ajuda na coleta, pesagem e armazenamento das sementes de cacau. À minha irmã Noemy, por sempre torcer pelo meu êxito.

Um agradecimento especial ao Raphael que, como companheiro e amigo, sempre esteve ao meu lado ao longo dessa jornada me ajudando a superar momentos de adversidades. Obrigada pelas caronas pro PCT, por ter carregado bastante água destilada, por ter lavado muita vidraria, por descascar cacau, por revezar comigo no HPLC. Sem você, esse mestrado não teria sido o mesmo.

Obrigada a todos os meus amigos pelo suporte durante essa jornada. Agradeço à Jellyane que, mesmo longe, sempre esteve perto. Obrigada Biotops pelo companheirismo desde a graduação. Gostaria de agradecer em especial ao Eduardo e ao David por terem me ajudado diretamente no meu trabalho, vocês são umas das pessoas mais inteligentes e humildes que tenho na minha vida.

Gostaria de agradecer à professora Alessandra por ter me dado a oportunidade de trabalhar com a senhora, por ter aberto as portas no LABIOTEC e por ter me ensinado muito além dos aspectos acadêmicos.

Agradeço ao professor Nelson, por ter aceitado entrar neste trabalho, mesmo não nos conhecendo muito bem no começo. Sem o senhor, tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada pela sua grande generosidade, por sempre partilhar conhecimento acadêmico, e também sobre a vida.

À equipe do LABIOTEC, gostaria de agradecer à Dani, Francília e Deusa pelas boas risadas e pelo aprendizado que cada uma me passou ao longo dessa jornada. Obrigada Gilson pelos momentos que passamos juntos, por me ajudar a superar momentos de adversidades, pela ajuda em muitas análises, pelos conselhos, pelas conversas sobre a vida, agradeço por todos os dias você colocar uma música para tocar, mudando totalmente o clima do ambiente e por sempre ter uma história do Kalebe no Tapanã.

Agradeço também ao Railson por sempre se dispor a ajudar e ao Kalebe, meu muito obrigada por todo suporte ao longo do meu trabalho, aguentando até os meus momentos de estresse com muito alto astral e sempre assoviando uma canção que ficava na minha cabeça o dia inteiro. Agradeço também à Luiza Helena que, com sua generosidade, não media esforços para tentar passar o conhecimento adiante. Sempre se dispôs a me ajudar, mesmo que isso significasse esperar muito pelo circular pra ir para o PCT.

Ao professor Renan, meus sinceros agradecimentos pela sua bondade e pelo grande aprendizado acadêmico e pessoal. Aos demais membros da banca, professoras Ana Vânia e Silvia Helena, meu muito obrigada por terem aceitado fazer parte.

Gostaria também de demonstrar minha gratidão àqueles que, mesmo eu ter convivido por pouco tempo, merecem minha gratidão. Ao Nico, pela ajuda direta na fermentação do cacau. Ao Arthur e Ana Karoline pelo suporte durante o estágio curricular. Ao seu Mário, pelo apoio nas análises de proteínas. Ao professor Emmerson por ter aberto as portas do seu laboratório no PCT e ao Leandro pelo apoio durante as análises. Agradeço também à professora Eloisa e à Lidiane pelo suporte nas análises de compostos voláteis. E sou grata também à professora Maria Beatriz pelas análises de aminas bioativas.

Agradeço também aos meus colegas de turma, principalmente à Tatyane e Ellen que sempre me ajudaram nas disciplinas, fazendo até chamada por vídeo, mesmo quando ainda não era moda, para estudarmos juntas.

Às demais pessoas que estiveram comigo nessa jornada, meu muito obrigada, tenho certeza de que todos fizeram a diferença para que este trabalho pudesse acontecer.

E, por fim, não menos importante, agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

O cacau é um fruto que possui grande importância científica e econômica. No entanto, a diversidade microbiana existente entre lotes e localidades, resulta em produtos distintos, em relação aos atributos físicos, químicos e sensoriais. Com isso, Araujo et al. (2014) propuseram variáveis que podem ser utilizados com a finalidade de uniformizar os índices de qualidade dessa matéria-prima, somados ao que já é regido pela legislação. Além disso, há diversos estudos que utilizam culturas *starters* de bactérias e leveduras na fermentação de sementes de cacau, com o intuito de obter amêndoas com qualidade superior e aromas desejáveis, além de resultar em uma matéria-prima fermentada mais homogênea entre lotes e localidades distintas. Contudo, ainda não há relatos do uso de fungos filamentosos como cultura *starter*, apesar de apresentarem potencial biotecnológico, principalmente pela excreção de diversas enzimas. Uma espécie que já foi reportada na fermentação de sementes de cacau é o *Cladosporium cladosporioides*, o qual produz metabólitos antifúngicos voltados para patógenos de plantas, além de possuir atividade enzimática de pectinase, lacase, glucanase, amilase, celulase e xilanase, importantes para a melhoria do processo de fermentação de sementes de cacau. O objetivo deste estudo é, portanto, avaliar a influência desse fungo filamentoso durante o processo fermentativo, de maneira inédita, através de análises físico-químicas e microbiológicas. Para isso, realizou-se dois experimentos de fermentação: sem inóculo (controle) e com cultura *starter*. O uso do fungo filamentoso não impactou de maneira significativa na formação de compostos aromáticos nas amêndoas, em relação ao experimento controle. No entanto, a presença do *C. cladosporioides* exerceu influência significativa na porcentagem de amêndoas bem fermentadas ($p \leq 0,05$), através da prova de corte, como provável consequência do menor teor de compostos fenólicos totais, e de catequina e epicatequina. Além disso, houve menor concentração de ácido acético e apresentou maior teor de aminas bioativas ($p \leq 0,05$), quando comparado com o experimento controle. Esses aspectos observados foram confirmados através da análise multivariada. Baseado nesses resultados, pode-se afirmar que o uso do *C. cladosporioides* se mostrou promissor, podendo proporcionar melhorias nas amêndoas de cacau fermentadas e secas.

Palavras-chave: aminas, aroma, compostos fenólicos, fungo filamentoso, *Theobroma cacao*.

ABSTRACT

Cocoa is a fruit that has great scientific and economic importance. However, the existing microbial diversity between lots and locations, results in different products, in relation to physical, chemical and sensory attributes. Thus, Araujo et al. (2014) proposed variables that can be used in order to standardize the quality indices of this raw material, in addition to what is already governed by legislation. In addition, there are several studies that use starter cultures of bacteria and yeasts in the fermentation of cocoa seeds, in order to obtain beans with superior quality and desirable aromas, in addition to resulting in a more homogeneous fermented raw material between different batches and locations. However, there are still no reports of the use of filamentous fungi as a starter culture, despite having biotechnological potential, mainly due to the excretion of several enzymes. A species that has already been reported in the fermentation of cocoa seeds is *Cladosporium cladosporioides*, which produces antifungal metabolites aimed at plant pathogens, in addition to having pectinase, laccase, glucanase, amylase, cellulase and xylanase enzymatic activity, important for the improvement of the cocoa bean fermentation process. The objective of this study is, therefore, to evaluate the influence of this filamentous fungus during the fermentation process, in an unprecedented way, through physicochemical and microbiological analyses. For this, two fermentation experiments were carried out: without inoculum (control) and with starter culture. The use of filamentous fungus did not significantly impact the formation of aromatic compounds in the almonds, compared to the control experiment. However, the presence of *C. cladosporioides* had a significant influence on the percentage of well-fermented almonds ($p \leq 0.05$), through the cutting test, as a probable consequence of the lower content of total phenolic compounds, and of catechin and epicatechin. In addition, there was a lower concentration of acetic acid and a higher content of bioactive amines ($p \leq 0.05$), when compared to the control experiment. These observed aspects were confirmed through multivariate analysis. Based on these results, it can be said that the use of *C. cladosporioides* proved to be promising and could provide improvements in fermented and dried cocoa beans.

Keywords: amines, aroma, phenolic compounds, filamentous fungus, *Theobroma cacao*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tolerância de defeitos (%) e respectiva classificação de amêndoas de cacau (BRASIL, 2008).	41
Tabela 2. Valores médios da contagem de leveduras (\log_{10} UFC/g) ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo <i>C. cladosporioides</i>	50
Tabela 3. Valores médios da contagem de bactérias lácticas (\log_{10} UFC/g) ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo <i>C. cladosporioides</i>	52
Tabela 4. Valores médios da contagem de bactérias acéticas (\log_{10} UFC/g) ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo <i>C. cladosporioides</i>	53
Tabela 5. Classificação das amêndoas fermentadas e secas dos diferentes experimentos de fermentação: controle e com inóculo do fungo <i>C. cladosporioides</i> , através do teste de corte.	54
Tabela 6. Valores médios de pH e acidez total titulável (mEq NaOH/100 g) ao longo do tempo e após a secagem das amêndoas, e valores médios de umidade (%), cinzas (%), lipídios (%) e proteínas (%) em dois tempos de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo <i>C. cladosporioides</i>	56
Tabela 7. Valores médios de compostos fenólicos totais (mgEC/g) ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo <i>C. cladosporioides</i>	60
Tabela 8. Valores médios de catequina e epicatequina ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo <i>C. cladosporioides</i>	61
Tabela 9. Valores médios da concentração de açúcares (mg/g): sacarose, glicose e frutose, ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo <i>C. cladosporioides</i>	63

Tabela 10. Valores médios da concentração de aminos bioativas (mg/kg) nos tempos 0, 96 e 144 horas de fermentação de sementes de cacau e nas amêndoas fermentadas e secas de dois experimentos: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.....67

Tabela 11. Valores médios da concentração (%) de compostos voláteis nos tempos de 0, 96 e 144 horas ao longo da fermentação e de amêndoas fermentadas e secas, de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fruto do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.). Fonte: Autor (2018).....	15
Figura 2. Corte transversal do fruto do cacau. Fonte: Autor (2018).	16
Figura 3. Corte longitudinal da semente de cacau. Fonte: Autor (2018).....	17
Figura 4. Estufa de secagem utilizada pelo produtor de cacau para secagem após a fermentação.	39
Figura 5. Índice de velocidade de crescimento micelial – IVC (mm/dia) do fungo <i>C. cladosporioides</i> em diferentes meios de cultura. Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si com a variação do meio de cultura ($p > 0,05$, Teste de Tukey). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si com a variação da temperatura de acordo com o meio de cultura ($p > 0,05$, Teste de Tukey).....	47
Figura 6. Temperatura média (°C) da massa de fermentação de cacau ao longo do tempo (horas) nos experimentos controle e com inoculação do fungo <i>C. cladosporioides</i>	49
Figura 12. Análise do componente principal (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA) ao longo da fermentação de sementes e após a secagem de amêndoas de cacau do experimento controle e com cultura starter de <i>Cladosporium cladosporioides</i> . T (°C): temperatura; LEV: contagem de leveduras, BAL: bactérias lácticas e BAC: bactérias acéticas; pH; ATT: acidez total titulável; CAT: catequina; EPI: epicatequina; SAC: sacarose; GLI: glicose; FRU: frutose; EtOH: etanol; AC: ácido acético; TRM: triptamina; TIM: tiramina; EPD: espermidina; FEM: feniletilamina; CAD: cadaverina; PUT: putrescina; CFT: compostos fenólicos totais.....	76

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Por cento ou porcentagem
°C	Graus Celsius
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATT	Acidez Total Titulável
BAA	Bactérias do ácido acético
BAL	Bactérias do ácido láctico
cm	Centímetros
CG	Cromatografia gasosa
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
EC	Equivalente de catequina
EM	Espectrometria de massa
g	Gramas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>) - CLAE
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IQC	Índice de Qualidade do Cacau
IVCM	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial
IR	Índice de retenção
kg	Quilogramas
LABIOTEC	Laboratório de processos biotecnológicos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEA	Meio ágar extrato de malte (<i>Malte Extract Agar</i>)
min.	Minutos
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Micromolar
PDA	Meio ágar dextrose batata (<i>Potato Dextrose Agar</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMFT	Resíduo Mineral Fixo Total
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

V	Volume
YPD	Meio com extrato de levedura (<i>Yeast Peptone Dextrose</i>)
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
1 OBJETIVOS.....	12
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
CAPÍTULO 1 – <i>CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES</i> NA FERMENTAÇÃO DE CACAU – UMA VISÃO GERAL	13
RESUMO	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 CACAU	15
2.1.1 Aspectos gerais	15
2.1.2 Pré-processamento.....	18
2.1.3 Fermentação.....	20
2.1.4 Transformações químicas, bioquímicas e microbiológicas durante a fermentação	21
2.1.5 Índice de qualidade do cacau.....	25
2.2 FUNGOS FILAMENTOSOS	28
2.2.1 Aspectos gerais	28
2.2.2 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	29
2.3 CULTURAS <i>STARTERS</i> NA FERMENTAÇÃO DE CACAU	32
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO <i>CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES</i> NA FERMENTAÇÃO DE CACAU	35
RESUMO	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 OBTENÇÃO DO FUNGO <i>CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES</i>	37

2.2	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL	37
2.3	PRODUÇÃO DE INÓCULO	38
2.4	FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU	38
2.4.1	Coleta das amostras	40
2.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	40
2.6	PROVA DE CORTE	41
2.7	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	41
2.8	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	42
2.9	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA 42	
2.10	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES, ÁLCOOL E ÁCIDO ORGÂNICO	43
2.11	AMINAS BIOATIVAS	44
2.12	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	45
2.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL	47
3.2	TEMPERATURA DA MASSA DE FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU	48
3.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	50
3.3.1	Contagem de leveduras	50
3.3.2	Contagem de bactérias lácticas	51
3.3.3	Contagem de bactérias acéticas	53
3.4	PROVA DE CORTE	54
3.5	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	55
3.5.1	pH	57
3.5.2	Acidez total titulável	57
3.5.3	Umidade, resíduo mineral fixo total, lipídios e proteínas totais	58

3.6	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	59
3.7	CATEQUINA E EPICATEQUINA	61
3.8	AÇÚCARES, ÁLCOOL E ÁCIDO ORGÂNICO.....	62
3.8.1	Açúcares	64
3.8.2	Álcool e ácido orgânico.....	65
3.9	AMINAS BIOATIVAS	66
3.10	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	69
3.10.1	Variação de aldeídos	69
3.10.2	Variação de ésteres	73
3.10.3	Variação de hidrocarbonetos.....	74
3.10.4	Variação de demais compostos.....	74
3.11.	ANÁLISE MULTIVARIADA DOS EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO	75
4	CONCLUSÕES.....	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A	94
	ANEXO A	95

INTRODUÇÃO GERAL

O cacau (*Theobroma cacao*) é um fruto que possui vasta importância econômica em continentes como América Latina, África e Ásia, e o principal produto gerado a partir das amêndoas de cacau é o chocolate (MARSEGLIA et al., 2020). Para a obtenção da matéria-prima de valor agregado, é necessário que as sementes sejam submetidas às etapas de pré-processamento: fermentação e secagem (ALBERTINI et al., 2015).

A função da fermentação é propiciar condições para que ocorram as principais reações químicas, bioquímicas e microbiológicas nas sementes, devido, principalmente, à presença de micro-organismos (SCHWAN; WHEALS, 2004). Já a secagem, é de reduzir a umidade nas amêndoas fermentadas, havendo também a continuidade das diversas reações ocorridas ao longo do processo anterior (HERMAN et al., 2018; LUNA et al., 2002).

Na etapa da fermentação, já são elucidados os papéis das leveduras, bactérias lácticas e acéticas presentes ao longo do processo (SCHWAN; FLEET, 2014). Esses micro-organismos, inclusive, já foram utilizados em diversos estudos como culturas *starters*, a fim de obter amêndoas melhores fermentadas em relação ao experimento controle (sem adição de inóculo) e/ou para se produzir lotes padronizados, mantendo, dessa forma, a qualidade da matéria-prima (CEMPAKA et al., 2014; LEFEBER et al., 2012; SANDHYA et al., 2016).

Em contrapartida, apesar de saber que os fungos filamentosos estão presentes na fermentação de sementes de cacau (DE ARAÚJO et al., 2019; SERRA et al., 2019), ainda não há relatos da utilização dos mesmos como culturas *starters* no processo, embora possuam grande potencial biotecnológico devido à excreção de diversas enzimas que podem ser benéficas para a obtenção de amêndoas fermentadas de qualidade (ARAÚJO et al., 2017; BASTOS et al., 2013; HALABURGI et al., 2011; TORRES et al., 2017).

Dessa forma, no intuito de utilizar o fungo *Cladosporium cladosporioides* como cultura *starter* na fermentação de sementes de cacau, para investigar a influência desse micro-organismo no processo, bem como avaliar se a sua adição resulta em amêndoas com qualidade superior em comparação ao experimento controle ao final da fermentação, esta dissertação está organizada da seguinte maneira:

Capítulo I: Manuscrito “*Cladosporium cladosporioides* na fermentação de cacau – uma visão geral”, o qual apresenta o referencial teórico, que contextualiza o trabalho, pontua conceitos importantes e aborda trabalhos já publicados sobre o tema.

Capítulo II: Manuscrito “Avaliação da influência do *Cladosporium cladosporioides* na fermentação de cacau”, onde a pesquisa apresenta a investigação da influência do fungo utilizado no processo fermentativo de sementes de cacau, através da avaliação de parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e aromáticos das sementes de cacau.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

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

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar dois experimentos de fermentação de sementes de cacau: conduzido sem inóculo (controle) e com inoculação do fungo *Cladosporium cladosporioides*;
- Avaliar o efeito do inóculo fúngico nos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e no perfil aromático das sementes e amêndoas de cacau ao longo da fermentação e após a secagem;
- Avaliar a influência do fungo na fermentação de sementes de cacau.

CAPÍTULO 1 – *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* NA FERMENTAÇÃO DE CACAU – UMA VISÃO GERAL

RESUMO

O cacau é um fruto que possui grande importância científica e econômica, pois as suas sementes são matéria-prima para diversos produtos, em especial, o chocolate. No entanto, para que esse material possua valor agregado, é necessário que, haja a fermentação das sementes de cacau, um dos processos mais importantes na obtenção da matéria-prima comercial, pois é onde a polpa sofre ação de micro-organismos presentes naturalmente no meio, os quais desencadeiam, juntamente com aspectos físicos, reações químicas e bioquímicas importantes para a formação da cor e do aroma característico das amêndoas de cacau. No entanto, a diversidade microbiana existente entre lotes e localidades, resulta em produtos distintos, em relação aos atributos físicos, químicos e sensoriais. Com isso, há diversos estudos que utilizam culturas *starters* de bactérias e leveduras na fermentação de sementes de cacau, com o intuito de obter amêndoas com qualidade superior e aromas desejáveis, além de resultar em uma matéria-prima fermentada mais homogênea entre lotes e localidades distintas. Contudo, ainda não há relatos do uso de fungos filamentosos como cultura *starter*, apesar de apresentarem potencial biotecnológico, principalmente pela excreção de diversas enzimas. Uma espécie que já foi reportada na fermentação de sementes de cacau é o *Cladosporium cladosporioides*, o qual produz metabólitos antifúngicos voltados para patógenos de plantas, além de possuir atividade enzimática de pectinase, lacase, glucanase, amilase, celulase e xilanase, importantes para a melhoria do processo de fermentação de sementes de cacau, contribuindo na formação de moléculas precursoras na formação da cor e do aroma característico das amêndoas de cacau, melhorando, dessa forma, a matéria-prima obtida e, conseqüentemente, o produto final.

Palavras-chave: aroma, *Cladosporium cladosporioides*, cor, micro-organismos, *Theobroma cacao*.

1 INTRODUÇÃO

A presença de fungos filamentosos durante a fermentação do cacau normalmente é associada à perda da qualidade das sementes, devido à produção de toxinas que podem causar a degradação do aroma e sabor (SCHWAN; WHEALS, 2004) e/ou podem ser malélicas a saúde humana (MOUNJOUENPOU et al., 2008); no entanto, essas características estão atreladas à espécie presente no meio.

Existem espécies que já foram reportadas como colaboradoras na fermentação das sementes de cacau, como *Penicillium citrinum*, as quais foram associadas à reação enzimática de poligalacturonase, um grupo de enzimas que decompõem a pectina, através da hidrólise das ligações glicosídicas (ARDHANA; FLEET, 2003). Dessa maneira, esses fungos podem contribuir com as transformações bioquímicas da polpa e conseqüentemente, das sementes.

Uma espécie que possivelmente pode colaborar na fermentação do cacau é o *Cladosporium cladosporioides*, que foi detectado no cacau amazônico (DE ARAÚJO et al., 2019). Esse fungo comumente ocorre no café (*Coffea arabica*) (MOTAMAYOR et al., 2008), sendo correlacionado com a obtenção de um produto com qualidade (PASIN; ABREU; SOUZA, 2011), apresentando, portanto, potencial positivo no processo fermentativo de sementes de cacau também.

Esse micro-organismo normalmente não é associado à patogenicidade e sim como atuante na defesa de plantas por conta da liberação de metabólitos que podem oferecer proteção contra fungos toxigênicos (WANG et al., 2013). Outra característica do *C. cladosporioides* é a produção de enzimas, como por exemplo, a lacase, que catalisa a oxidação de substratos orgânicos e inorgânicos (HALABURGI et al., 2011); enzimas pectinolíticas, como metil esterase e poligalacturonase (BASTOS et al., 2013).

Trabalhos com cultura *starter* de fungos filamentosos são escassos na literatura, principalmente se tratando do cacau, no qual é possível encontrar diversos autores inoculando espécies de bactérias (DE VUYST; WECKX, 2016) e leveduras (SANDHYA et al., 2016) na fermentação dessas sementes, porém, ainda não há relatos do uso de fungos filamentosos com a finalidade de investigar a influência desses micro-organismos no processo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CACAU

2.1.1 Aspectos gerais

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore pertencente à família Malvaceae, originária da Bacia Amazônica. Seus frutos (Figura 1) contêm sementes que podem ser consumidas *in natura*, no entanto, sua importância econômica se deve ao fato de que são matéria-prima para diversos produtos, como manteiga, cosméticos, *liquor*, pó de cacau, mas principalmente chocolate (JAHURUL et al., 2013).



Figura 1. Fruto do cacau (*Theobroma cacao* L.). Fonte: Autor (2018).

Os países que mais produzem amêndoas de cacau no mundo são Togo, Indonésia, Gana, Costa do Marfim, Camarões, Nigéria, Malásia, República Dominicana, Equador e Brasil, sendo responsáveis por cerca de 90% da produção mundial (AFOAKWA, 2014;

SHUKLA, 2006). O Brasil é um dos dez maiores produtores de amêndoas de cacau no mundo, sendo que no ano de 2019, produziu mais de 250 mil toneladas, onde os estados da Bahia e do Pará foram os que mais contribuíram no cultivo dessa cultura, com produção de aproximadamente 105 mil toneladas e mais de 129 mil toneladas, respectivamente (IBGE, 2020).

As amêndoas de cacau vêm ganhando visibilidade no mercado e na pesquisa mundial, pelo fato de que a comercialização do chocolate, principalmente, tem sido elevada, uma vez que apresenta propriedades sensoriais atrativas. Somado a isso, o consumo de derivados de cacau é benéfico, pois nessa matéria-prima há a presença de compostos fenólicos, principalmente catequina, epicatequina e procianidinas (LAMBERT, 2013), compostos que possuem propriedades anti-carcinogênica, imunomoduladora, vasodilatadora, anti-inflamatória, atuando como antioxidantes (ALLGROVE; DAVISON, 2014).

O fruto do cacau é composto por casca, polpa, sementes e placenta, no qual o fruto apresenta em média 15-25 centímetros de comprimento, contém cerca de 30-50 sementes envoltas por uma polpa de cor branca e consistência mucilaginosa, que fica levemente presa à placenta (Figura 2) (AFOAKWA, 2014). As sementes constituem em torno de 13,5 a 29% da massa total do fruto, sendo que o comprimento das mesmas variam entre 21 a 29 mm, a largura, entre 10 a 17 mm e a espessura entre 8 a 12 mm (HERMAN et al., 2018).

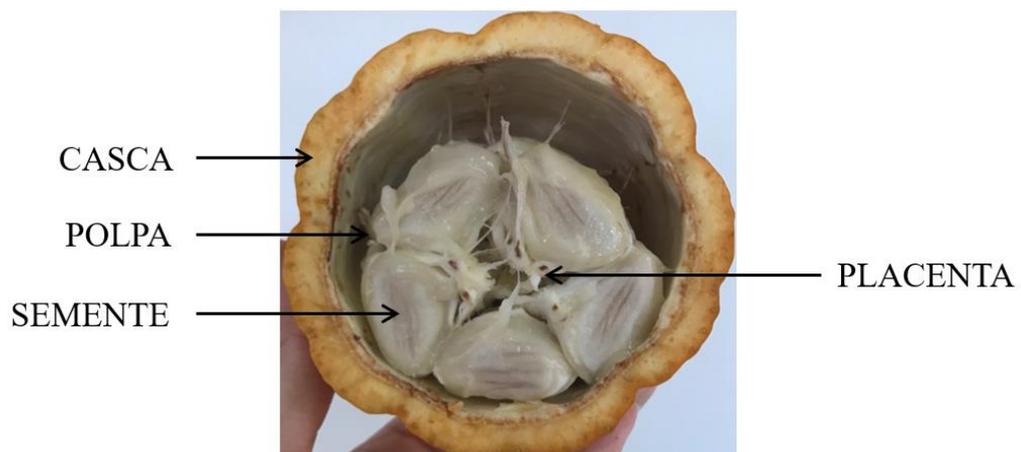


Figura 2. Corte transversal do fruto do cacau. Fonte: Autor (2018).

A semente de cacau é formada pelo mesocarpo, endocarpo, espermoderma, endosperma ou cotilédone e embrião, em que os três primeiros constituintes se referem à testa ou tegumento e o cotilédone representa a parte mais utilizada da semente para a geração de produtos (Figura 3) (APROTOSOAIIE; LUCA; MIRON, 2016).

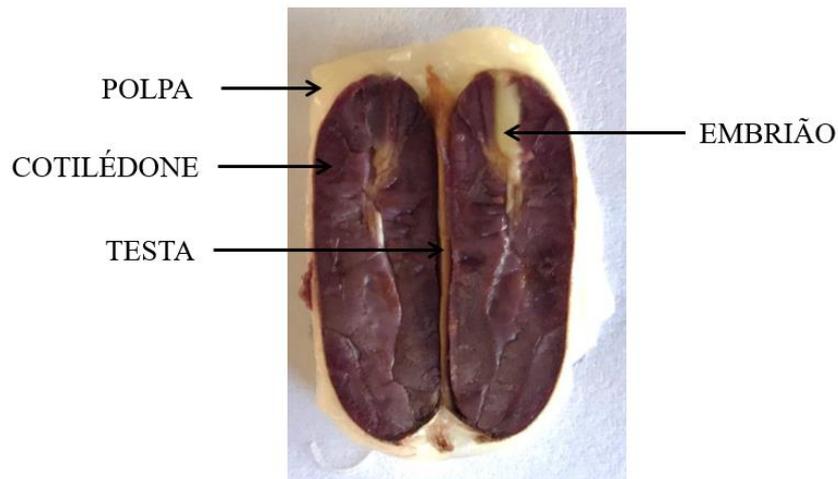


Figura 3. Corte longitudinal da semente de cacau. Fonte: Autor (2018).

O cacau possui diversas variedades, onde tradicionalmente se divide em três grupos: *Criollo*, *Trinitario* e *Forastero* (AFOAKWA, 2014). Cada uma das variedades apresenta características genéticas e fenotípicas distintas, onde a *Forastero* é caracterizada por possuir árvores maiores e mais vigorosas, além de ser produtiva e moderadamente resistente a pragas e doenças (BARTLEY, 2005). Suas sementes são menores e achatadas quando comparadas ao *Criollo*, onde os cotilédones possuem cor violácea (LIMA et al., 2011), devido à presença de antocianinas, as quais são ausentes na variedade *Criollo*. O cacau *Forastero* compreende em torno de 95% da produção mundial de cacau (SALTINI; AKKERMAN; FROSCH, 2013).

Já o cacau *Trinitário* é uma variedade que engloba os cacaueiros de hibridização natural e recombinação entre as variedades *Criollo* e *Forastero* (BECKETT, 2009), suas árvores apresentam certa susceptibilidade a pragas e doenças, quando comparadas a variedade *Forasteiro* (BARTLEY, 2005). Os cotilédones das sementes variam quanto à cor, podendo ser marfim ou violácea, sendo que esta coloração é a mais comum (KONGOR et al., 2016).

A variedade *Criollo* é conhecida como a cultivar ‘original’, ou seja, sem hibridização, uma vez que tanto o cacau *Forastero* quanto *Trinitário* são originados a partir desse fenômeno biológico. Isso faz com que a planta da variedade *Criollo* tenha maior susceptibilidade a doenças, o que torna o cultivo mais difícil (BARTLEY, 2005). As sementes apresentam coloração marfim ou cor púrpura pálida, pelo fato de possuir o gene de inibição de antocianina (BECKETT, 2009).

Um estudo sobre o mapeamento geográfico e genético do cacau amazônico apresentou uma proposta com uma nova classificação de divisão dos diferentes tipos de cacau, de acordo com a localização geográfica ou o cultivar mais representado na área estudada, em dez grandes grupos: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional e Guiana. Com isso, há uma maior precisão quanto à diversidade gênica, uma vez que a classificação tradicional em três variedades não define precisamente a diversidade genética da espécie (MOTAMAYOR et al., 2008).

2.1.2 Pré-processamento

Para que as sementes de cacau sejam comercializadas e transformadas em produtos de valor agregado, faz-se necessário o processamento pós-colheita nas propriedades dos produtores de cacau, compreendendo nas seguintes etapas: colheita dos frutos, abertura dos mesmos, coleta das sementes, fermentação, secagem e armazenamento das amêndoas para obtenção da matéria-prima comercial (WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

Na colheita dos frutos é importante verificar a maturidade dos mesmos, pois isso é um fator importante para realização de uma boa fermentação, uma vez que frutos sobremaduros podem apresentar sementes germinadas, as quais não são adequadas para a obtenção da matéria-prima comercial. Os frutos verdes também não são adequados, uma vez que nesse estágio a polpa apresenta teor de açúcares reduzido e, com isso, a fermentação é prejudicada (MARTINS et al., 2011).

Após a colheita, os frutos devem ser abertos para haver a coleta das sementes. Logo após esta etapa, deve-se dar início à fermentação, onde sementes provenientes de coletas em

dias distintos não devem ser fermentadas juntas, pois isso conduz a uma fermentação desigual (MARTINS et al., 2011).

É necessário que após a coleta das sementes, a fermentação seja iniciada no máximo em 24 horas, caso contrário, pode-se dar início ao apodrecimento das mesmas. O processo fermentativo normalmente é realizado em caixas de madeira, mas podendo ser também em cestos ou sacos (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2007). É mais comum que a fermentação seja realizada em um período de cinco a sete dias (BECKETT, 2009; MARTINS et al., 2011).

Ao longo da fermentação, os micro-organismos presentes, como as leveduras, bactérias lácticas e acéticas (SCHWAN; WHEALS, 2004) produzem álcool, ácido láctico e ácido acético, respectivamente, e, além disso, há também a presença de fungos filamentosos. E a influência desses micro-organismos e de seus metabólitos no meio fermentativo, conjuntamente aos processos bioquímicos que ocorrem, provoca a morte do embrião da semente e contribui com mudanças estruturais, como a liberação de enzimas e substratos presentes nas células do cotilédone (BECKETT, 2009).

A etapa da secagem deve ser iniciada imediatamente após a fermentação, podendo ser conduzida em lonas ou em barcaças, onde normalmente é realizada sob exposição direta a luz solar. A fim de que esse processo seja realizado adequadamente, fazem-se revolvimentos periódicos (normalmente duas a três vezes ao dia), para facilitar a secagem de forma homogênea das amêndoas (MARTINS et al., 2011).

A secagem é essencial para que haja a diminuição da umidade das sementes, de 40-50% para 6-8% (FAGUNWA; KOYA; FAVORODE, 2009), evitando, dessa maneira, o desenvolvimento de fungos toxigênicos, como *Aspergillus niger*, *A. carbonarius*, *Fusarium solani* (COPETTI et al., 2010; JAMPÍLEK; KRÁLOVÁ, 2019; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008), os quais podem impactar negativamente no desenvolvimento de atributos sensoriais, além de causarem danos à saúde (AKINFALA et al., 2020; COPETTI et al., 2011; KEDJEBO et al., 2015).

Além da eliminação de água, na secagem do cacau existe a continuidade das reações bioquímicas iniciadas na fermentação, contribuindo para o desenvolvimento do sabor, aroma e cor característicos do chocolate (LUNA et al., 2002), além da redução da acidez das

amêndoas (GARCÍA-ALAMILLA et al., 2007). A secagem, normalmente, tem duração de 8-12 dias (MARTINS et al., 2011).

Por fim, após essa etapa, as amêndoas devem ser armazenadas em embalagens que permitam a ventilação e em local seco e fresco, a fim de evitar a absorção de umidade novamente, o que seria prejudicial para a matéria-prima de valor agregado obtida (MARTINS et al., 2011).

2.1.3 Fermentação

A fermentação do cacau é um processo complexo, sendo uma das etapas mais importantes do pré-processamento, pois nesta fase há o início de importantes transformações físicas e bioquímicas que contribuem de maneira significativa para o desenvolvimento do sabor, aroma e cor característicos do chocolate, principal produto dessa matéria-prima (ALBERTINI et al., 2015; WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

No processo fermentativo, encontram-se fatores importantes a serem considerados, os quais influenciam na realização da fermentação, que são: sistema de fermentação (caixa de madeira, monte, cesto e saco); temperatura e umidade ambiente; tempo de fermentação; revolvimento da massa; temperatura da massa em fermentação; microflora presente no meio; pH e acidez do cotilédone; dentre outros (LIMA et al., 2011; ROHAN; CONNELL, 1964; SCHWAN; WHEALS, 2004).

Os sistemas mais utilizados na fermentação são montes, cestos e caixas de madeira, sendo que o uso destes são mais recomendados, conhecidos como cochos de fermentação. Normalmente, as caixas possuem divisórias removíveis, a fim de facilitar o revolvimento da massa em fermentação e as dimensões dos cochos variam de 0,90 a 1,20 metros de largura, 0,90 a 1,00 metro de altura e 2,00 a 6,00 metros de comprimento. O fundo deve conter frestas com aproximadamente 0,5 centímetros, espaçados de 15 em 15 centímetros, permitindo a drenagem de líquidos liberados durante a fermentação (MARTINS et al., 2011).

A duração recomendada para o processo fermentativo, é em torno de cinco a sete dias, onde o tempo inferior a cinco dias gera sementes mal fermentadas (ou não fermentadas) e um

período superior a sete dias resulta em um cacau de coloração muito escura, com odor desagradável de matérias em putrefação (MARTINS et al., 2011).

Durante o processo fermentativo, a massa de cacau normalmente é coberta com folhas de bananeira, no intuito de diminuir a perda de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial de sementes. A folha de bananeira é comumente utilizada, pois apresenta fácil plantio, possui grande área superficial e, além disso, atua propiciando uma inoculação dos micro-organismos existentes na superfície da folha (DE VUYST; STEFAN, 2008).

A massa de sementes deve ser revolvida ao longo dos dias de fermentação, na qual normalmente se dá a partir das 48 horas após o início do processo (SCHWAN; FLEET, 2014). Após o primeiro revolvimento, a massa é submetida a esse procedimento em intervalos de 24 horas (MARTINS et al., 2011; SCHWAN; WHEALS, 2004). Esse processo é importante para que haja a aeração das sementes, o que controla o nível de acidez, temperatura da massa e influencia na atividade enzimática, a qual é importante para o desenvolvimento do sabor e aroma das amêndoas de cacau (JINAP; NAZAMID; JAMILAH, 2002).

O término da fermentação ocorre quando há a estabilização da temperatura; externamente, as sementes apresentam coloração vermelho-castanho intenso e a massa de fermentada apresenta aroma de vinagre devido à formação do ácido acético durante o processo (MARTINS et al., 2011; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2007).

2.1.4 Transformações químicas, bioquímicas e microbiológicas durante a fermentação

Ao longo do processo fermentativo, a polpa do cacau é submetida a ação de micro-organismos existentes de maneira natural, os quais são provindos de diversas fontes como: contato direto com as mãos das pessoas que coletam as sementes, exposição ambiental, além de que normalmente há uma microflora remanescente de fermentações anteriores no sistema de fermentação, entre outras (OSTOVAR; KEENEY, 1973; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2007), resultando em um processo heterogêneo de fermentação quando se compara entre diferentes lotes e localidades (DE VUYST; WECKX, 2016).

Essa inoculação microbiológica natural contribui em uma fermentação bem-sucedida, na qual há uma sucessão de atividades microbianas: leveduras, bactérias lácticas, bactérias acéticas e fungos filamentosos (ARDHANA; FLEET, 2003; HO; ZHAO; FLEET, 2015). A atividade desses micro-organismos depende dos parâmetros físico-químicos como: sistema de fermentação, temperatura, pH, quantidade de oxigênio (SCHWAN; FLEET, 2014). Com isso, a fermentação da massa de cacau é dividida em duas fases: anaeróbica e aeróbica, respectivamente (SCHWAN; PEREIRA; FLEET, 2014).

A presença de fungos filamentosos ao longo da fermentação ainda não foi totalmente elucidada, no entanto, é conhecido que se faz presente ao longo de todo o processo (ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS, 2004). Dentre esses micro-organismos encontrados, a maioria é associada à perda de atributos sensoriais das sementes de cacau e à liberação de toxinas (COPETTI et al., 2010). Contudo, os fungos filamentosos que se desenvolvem em matérias de origem vegetal também podem atuar na hidrólise de compostos orgânicos, através de secreção de enzimas (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000), o que na fermentação das sementes de cacau pode exercer uma influência positiva.

Na fase anaeróbica (48 horas iniciais) da fermentação, as leveduras são os micro-organismos dominantes, sendo responsáveis pela liquefação da polpa das sementes de cacau através da atividade pectinolítica, causando a drenagem de líquido por conta da redução da viscosidade da polpa, o que permite a entrada de ar no sistema (DE VUYST; WECKX, 2016).

Ademais, as leveduras possuem a importante atividade de produzir etanol a partir das moléculas de carboidrato, principalmente da glicose, produzindo dióxido de carbono (CO₂) e glicerol como produtos secundários (PAPALEXANDRATOU et al., 2011). A produção de etanol é um processo exotérmico, o que ocasiona o aumento de temperatura na massa de fermentação para 35-40°C, ocorrendo sob condição anaeróbica devido ao empilhamento das sementes de cacau e à produção de CO₂ pelas leveduras (HO; ZHAO; FLEET, 2014).

Além do etanol, CO₂ e glicerol, as leveduras também produzem ácidos orgânicos como ácido acético e succínico, bem como álcoois superiores, aldeídos, cetonas e ésteres de ácidos graxos, os quais podem ser contribuintes na formação do sabor e aroma característicos do cacau (SCHWAN; WHEALS, 2004).

À medida que a fermentação avança e a polpa é escoada, mais ar entra na massa de fermentação, criando condições ideais para o crescimento de bactérias, como as lácticas e acéticas, em torno das 24-72 horas de fermentação (SCHWAN; WHEALS, 2004). A glicose residual que ainda se encontra disponível é fermentada a ácido láctico, ácido acético, CO₂ e/ou etanol. A frutose, que está presente em abundância, também é fermentada aos mesmos produtos, no entanto, por espécies de bactérias lácticas (SCHWAN; PEREIRA; FLEET, 2014).

Nas primeiras 24 horas da fermentação, o ácido cítrico é utilizado como co-substrato por bactérias lácticas citrato-positivas, onde é convertido em ácido láctico ou ácido acético e/ou compostos aromáticos do metabolismo do piruvato, como diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol (OUATTARA et al., 2017), causando ligeiro aumento no pH da polpa, o que favorece o crescimento bacteriano (MOENS et al., 2014). No entanto, devido ao decréscimo de fontes de energia, ao aumento da concentração de etanol e a elevação da temperatura na fermentação, a população de bactérias lácticas declina durante os estágios posteriores do processo fermentativo das sementes de cacau (SCHWAN; WHEALS, 2004).

O segundo estágio da fermentação ocorre a partir do momento em que há o revolvimento da massa (a partir das 48 horas), e conseqüentemente o ar é introduzido no sistema. As espécies de bactérias acéticas predominam no processo fermentativo, as quais oxidam o etanol produzido pelas leveduras em ácido acético, e o ácido láctico produzido pelas bactérias lácticas em ácido acético e acetoína (ADLE et al., 2014), ocasionando em um ligeira diminuição do pH da massa de fermentação. Subseqüentemente o ácido acético é oxidado em CO₂ e água (CAMU et al., 2007).

Devido ao aumento da concentração dos ácidos, estes penetram na testa e entram em contato com o cotilédone, causando a morte do gérmen e o rompimento das paredes celulares, permitindo que as substâncias presentes naquele meio (lipídios, proteínas, carboidratos, compostos fenólicos, enzimas) sejam liberadas, o que dá início às reações responsáveis pela mudança de coloração e formação de aroma e sabor das sementes (JINAP; DIMICK, 1990; NIELSEN; SNITKJAER; BERG, 2008). Nessa etapa, a temperatura das sementes alcança temperaturas em torno de 45-50°C (DOMÍNGUEZ-PÉREZ et al., 2020; WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

A produção desses ácidos durante a fermentação é essencial também para dar início a reações bioquímicas, no entanto, a produção excessiva pode ser prejudicial para o

desenvolvimento de precursores da cor, do sabor e aroma característicos da amêndoa de cacau (REED; NAGODAWITHANA, 1995). Dentre as reações bioquímicas, está presente a formação de aminoácidos livres e peptídeos através da ação de enzimas nas proteínas. As estruturas proteicas predominantes nas sementes de cacau, são a vicilina, albumina, globulina, prolamina e glutenina (DOMÍNGUEZ-PÉREZ et al., 2020; HUE et al., 2016; VOIGT; BIEHL, 1995).

Entre as enzimas envolvidas na degradação de proteínas, está presente a endopeptidase aspártica, a qual hidrolisa a cadeia polipeptídica, preferencialmente, nas regiões internas, entre as moléculas de nitrogênio (N) e carbono (C) terminais. Essa enzima gera resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, os quais são substratos para a enzima carboxipeptidase, que atua removendo os resíduos que apresentam hidrofobicidade do terminal carboxila (D'SOUZA et al., 2018; VOIGT; BIEHL, 1995).

Dessa maneira, essa enzima desempenha um papel importante na conversão de oligopeptídeos hidrofóbicos em precursores específicos do aroma do cacau, ou seja, em moléculas hidrofílicas e aminoácidos livres (hidrofóbicos), como a leucina, valina, alanina, isoleucina, fenilalanina, os quais são necessários para a formação dos componentes aromáticos característicos do cacau (D'SOUZA et al., 2018; GALLA et al., 2001; KRATZER et al., 2009; MARSEGLIA et al., 2014).

Além disso, nas sementes de cacau há a presença de carboidratos, os quais se fazem presente tanto nos cotilédones como na polpa (LIMA et al., 2011). Essas moléculas desempenham papel importante para a formação de aromas, principalmente na fermentação (TRAN et al., 2015).

A partir dos carboidratos ocorre a geração de açúcares redutores, como a frutose e glicose, sob a ação da enzima invertase na molécula de sacarose (PEREIRA et al., 2013; VOIGT et al., 1994), presente em maior concentração na semente, correspondente à aproximadamente 80% do total de açúcares (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011). Mas ao longo do processo de fermentação, essa quantidade reduz cerca de 90%, à medida que o teor de glicose e frutose aumentam (GALLA et al., 2001).

Esses açúcares redutores condensam com os aminoácidos livres e peptídeos (formados a partir da degradação das proteínas), através da reação de Maillard, formando pirazinas,

representando em torno de 40% do total de compostos identificados no sabor e aroma característicos do chocolate durante a torração das amêndoas de cacau (FARAH et al., 2012).

A etapa da fermentação também é responsável pela significativa redução dos teores de compostos fenólicos das sementes de cacau frescas, uma vez que essas moléculas também participam de reações na formação da cor, do sabor e aroma característicos do chocolate através de reações enzimáticas e não-enzimáticas, implicando na redução da adstringência das sementes (LUNA et al., 2002; QUIROZ-REYES; FOGLIANO, 2018).

Uma das principais enzimas responsáveis por essas transformações é a polifenoloxidase, a qual está presente em várias plantas como: maçã, tomate, batata, uva e cacau. A polifenoloxidase possui dois mecanismos reacionais intermediadas por duas enzimas: a cresolase catalisa a hidroxilação de monofenóis em difenóis e a catecolase, oxida estes em quinonas, as quais reagem entre si, mas também com proteínas, aminoácidos ou outros grupos aminos para formar polímeros de alto peso molecular, melaninas e melanoproteínas (NICOLAS et al., 2003; WONG; DIMICK; HAMMERSTEDT, 1990; YAMANE et al., 2010), os quais são insolúveis e são, dentre outras, responsáveis pela coloração marrom das amêndoas de cacau (MAYER, 2006).

2.1.5 Índice de qualidade do cacau

No intuito de definir um padrão para amêndoas de cacau de qualidade, Araujo et al. (2014), propõem variáveis que possam ser utilizados com a finalidade de uniformizar os índices de qualidade dessa matéria-prima, acrescido ao que é regido pela legislação quanto aos demais parâmetros como: percentuais de tolerância de defeitos (BRASIL, 2008) e limites máximos de contaminantes inorgânicos (ANVISA, 2013).

É essencial entender as características qualitativas de um alimento para adequar o controle para cada matéria-prima, uma vez que se torna muito complexo mensurar a qualidade através de índices generalizados quanto às propriedades nutricionais, microbiológicas e físico-químicas e utilizá-las para definir o grau de excelência do alimento (CARDELLO, 1995).

Araujo et al. (2014), com a finalidade de melhor definir a qualidade de amêndoas de cacau, avaliaram esta matéria-prima de maneira mais abrangente com base em variáveis-chave, proporcionando melhor entendimento sobre o que afeta a qualidade do cacau, permitindo, dessa forma, o melhoramento do produto. As análises realizadas para alcançar tal objetivo foram definidas de acordo com as características desejáveis nas amêndoas de cacau: lipídios totais, acidez total, fenólicos totais, ácidos orgânicos, metais pesados (bário – Ba, cádmio – Cd, cobre – Cu e chumbo – Pb), aminoácidos, cafeína, teobromina, pH, açúcares e macro (cálcio – Ca, potássio – K, magnésio – Mg e fósforo – P) e micronutrientes (ferro – Fe, manganês – Mn, silício – Si e zinco – Zn).

Com isso, foram definidos valores, nos quais é possível averiguar o índice de qualidade do cacau – IQC (Quadro 1), dividindo os parâmetros em três categorias:

- A: menos é melhor. Associado a propriedades que quanto menores os valores (mais próximos do limite inferior), maior a qualidade das amêndoas;

- B: valor ótimo. Propriedades em que o valor médio possui efeito positivo para a melhoria da qualidade das amêndoas de cacau;

- C: mais é melhor. Propriedade benéfica que soma na qualidade das amêndoas de cacau, quando associada a valores mais altos (mais próximos do limite superior).

Quadro 1. Limites propostos como índices de qualidade do cacau (ARAUJO et al., 2014).

Indicador (variável)	Unidade	Categoria	Limites		
			Inferior	Médio (ótimo)	Superior
Cafeína (<i>flavor</i>)	%	A	0,32	-	-
Cafeína (<i>saúde</i>)	%	B	0,32	0,58	0,96
Metal pesado – Ba	mg/kg	A	1,90	-	-
Metal pesado – Cd	mg/kg	A	0,20	-	-
Metal pesado – Cu	mg/kg	A	0,68	-	-
Metal pesado – Pb	mg/kg	A	< 4,3	-	-
Macronutriente – Ca	g/kg	B	2,21	2,65	3,09

Macronutriente – K	g/kg	B	0,58	1,89	7,48
Macronutriente – Mg	g/kg	B	0,16	0,20	0,24
Macronutriente – P	g/kg	B	0,20	0,26	0,31
Micronutriente – Fe	mg/kg	B	0,55	2,80	9,20
Micronutriente – Mn	mg/kg	B	1,11	2,04	3,29
Micronutriente – Si	%	B	0,04	0,16	0,47
Micronutriente – Zn	mg/kg	B	2,19	2,94	4,24
Ácido orgânico – acético	mg/g	B	0,93	2,15	3,60
Ácido orgânico – láctico	mg/g	A	0,47	-	-
pH		B	5,60	6,01	6,57
Fenólicos – catequina	mg/kg	C	82,79	-	-
Fenólicos – epicatequina	mg/kg	C	2.223,44	-	-
Açúcar – frutose	mg/g	C	2,59	-	-
Açúcar – glicose	mg/g	C	0,85	-	-
Açúcar – sacarose	mg/g	A	0,76	-	-
Teobromina (<i>flavor</i>)	%	A	2,47	-	-
Teobromina (<i>saúde</i>)	%	B	2,47	3,04	3,78
Acidez total	g/100 g	B	10,53	14,95	19,37
Aminoácidos	mg/kg	B	8.504,35	14.230,78	20.033,81
Lipídios	g/100 g	C	30,77	-	-
Fenólicos totais	mg/kg	A	45.990,50	-	-

2.2 FUNGOS FILAMENTOSOS

2.2.1 Aspectos gerais

Os fungos pertencem ao Reino Fungi, o qual compreende em 4 Filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota (DEACON, 2005). Para realizar a identificação morfológica dos fungos filamentosos é necessário analisar tanto características macroscópicas como microscópicas, sendo que estas possuem grande importância.

Fungos que fazem parte do Filo Zygomycota possuem características distintas dos demais Filos, uma vez que apresentam rápido crescimento, as hifas não possuem septo e a reprodução se dá através de esporangióforos, produzidos no esporângio, uma estrutura reprodutora assexuada (DEACON, 2005).

A presença de micélio septado e reprodução sexuada são características dos Filos Basidiomycota e Ascomycota, ocorrendo através de ascósporos, produzidos em ascos (Ascomycota) e basidiósporos, que são presentes em basídios (Basidiomycota). Paralelamente à reprodução sexuada, pode ocorrer a assexuada, com produção de esporos assexuados, os conídios (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999). Essas estruturas e o processo de formação delas, a conidiogênese, são as características microscópicas mais importantes na identificação do fungo filamentoso ao nível de gênero e, por vezes, de espécie (PITT; HOCKING, 2009).

Apesar da observação microscópica ter grande relevância na identificação de fungos filamentosos, existem características macroscópicas como o diâmetro, cor e textura da colônia, presença ou ausência de rebordo, rugosidade, elevação, exsudato, cor, que permitem uma identificação prévia. Os fungos pertencentes ao gênero *Eurotium*, por exemplo, formam micélios amarelos; já o *Trichoderma*, apresenta crescimento rápido, micélio branco a amarelo, podendo apresentar a formação de tufo amarelados ao fim de uma semana de desenvolvimento; já o fungo pertencente ao gênero *Cladosporium* apresenta crescimento lento, e os micélios possuem coloração escura (PITT; HOCKING, 2009).

2.2.2 *Cladosporium cladosporioides*

O fungo *C. cladosporioides* é pertencente ao Filo Ascomycota, é um micro-organismo saprotófico, ou seja, alimenta-se da matéria orgânica em decomposição ou necróticas das plantas, sendo um dos fungos aéreos ao ar livre mais comum, colonizando materiais vegetais e solo (BENSCH et al., 2010). Esse micro-organismo já foi encontrado em matrizes como uva (LATORRE; BRICEÑO; TORRES, 2011), morango (NAM et al., 2015), café (BASTOS et al., 2013; PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005) e cacau (DE ARAÚJO et al., 2019).

O *C. cladosporioides* se reproduz de forma assexuada, sendo assim, um micro-organismo anamorfo. É um fungo de crescimento lento, com superfície plana e aveludada que apresentam cor escura (PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005). Dependendo do meio em que esse micro-organismo é inoculado, apresenta características morfológicas ligeiramente distintas.

Em meio Ágar Dextrose Batata (PDA), os micélios desse micro-organismo são difusos, apresentam coloração cinza-oliva a verde fosco, com aparência aveludada, os micélios formam esteiras e as bordas são cinza-oliva a branca (BENSCH et al., 2010). Já em meio Ágar com Extrato de Malte (MEA), os micélios são cinza-oliva ou esbranquiçadas, apresenta crescimento vertical, com aparência aveludada em tufo ou cobrindo toda a colônia, com bordas preto-oliva ou marrom-azeitona (BENSCH et al., 2012).

Esse micro-organismo produz conídios solitários de cor marrom a marrom-oliva, que se ramificam de forma irregular, onde cada ramo tende a apresentar entre 40-300 μm de comprimento e de 2-6 μm de largura (CAMPBELL; JOHNSON; WARNOCK, 2013), apresentam forma cilíndrica e são formados no final das hifas ascendentes (BENSCH et al., 2012).

O fungo *C. cladosporioides* produz metabólitos antifúngicos voltados para patógenos de plantas. Quatro compostos já isolados desse micro-organismo foram identificados com tal atividade: cladosporina, isocladosporina, 5'-hidroxiasperentina e cladosporina-8-metil éter (WANG et al., 2013). Dessa maneira, esse micro-organismo possui potencial para tratamento e controle de fungos toxigênicos de plantas (KÖHL et al., 2009).

Além disso, esse micro-organismo possui potencial biotecnológico devido à excreção de enzimas como pectinase (BASTOS et al., 2013), lacase (HALABURGI et al., 2011), glucanase (TORRES et al., 2017), amilase, celulase e xilanase (DE ARAÚJO et al., 2019).

As enzimas pectinolíticas são um grupo enzimático heterogêneo relacionado à hidrólise de substâncias pécicas, presente na maioria das plantas. As pectinases são amplamente utilizadas na fermentação de chá, café e cacau (OUATTARA et al., 2017; PHUTELA et al., 2005). Na fermentação de sementes de cacau, a pectinase pode atuar principalmente no início do processo, uma vez que a pectina está presente principalmente na polpa. Além disso, essa enzima possui a capacidade de diminuir a viscosidade e clarificar sucos concentrados (OUATTARA et al., 2017; PHUTELA et al., 2005), o que pode facilitar o acesso de leveduras aos açúcares presentes na polpa.

A lacase catalisa a oxidação de muitos substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo difenóis, polifenóis, diaminas, aminas aromáticas e ascorbato, com isso, pode contribuir na clarificação de vinho, descoloração de corantes sintéticos e até mesmo no desenvolvimento da cor nas sementes de cacau (THURSTON, 1994; ULLAH; BEDFORD, 2000).

A glucanase, por sua vez, é capaz de hidrolisar ligações glicosídicas presentes em carboidratos, normalmente atuam nas porções internas das ligações dos polímeros de glicose, sendo assim, importante em diversos processos biológicos, como por exemplo, durante o processo de envelhecimento do vinho; no auxílio da autólise de leveduras para liberar polissacarídeos e proteínas, o que pode auxiliar no desenvolvimento da cor e no melhoramento da textura do vinho (HUMBERT-GOFFARD et al., 2004). Com isso, na fermentação de sementes de cacau, a glucanase pode atuar no desenvolvimento da cor das amêndoas.

A enzima amilase, por sua vez, catalisa a hidrólise da amilopectina, da amilose e do glicogênio em maltose - um açúcar redutor (MOJSOV, 2016), o qual juntamente com aminoácidos livres, na fermentação de sementes de cacau, gera precursores do sabor e aroma do chocolate através da reação de Maillard, que pode ocorrer no processo fermentativo, mas acontece principalmente na secagem (D'SOUZA et al., 2018; DE ARAÚJO et al., 2019).

A celulase é uma enzima que catalisa a hidrólise da celulose (MOJSOV, 2016), molécula presente na polpa da sementes de cacau, com isso, gera a glicose, que pode ser

consumida pelos micro-organismos presentes na fermentação, como também pode participar da reação da Maillard (DE ARAÚJO et al., 2019).

A xilanase é uma classe de enzima que atua na degradação do polissacarídeo β -1,4-xilano em xilose ou em outra unidade monossacarídica, decompondo, assim, a hemicelulose (POLIZELI et al., 2005). Os produtos da hidrólise, pela enzima xilanase, podem, então, atuar principalmente no desenvolvimento da cor das amêndoas de cacau, através da reação de Maillard.

O fungo *C. cladosporioides*, por apresentar grande potencial biotecnológico, ao ser identificado molecularmente e isolado de uma planta costeira (*Suaeda salsa*), foi utilizado em estudo para o melhoramento da germinação de sementes desta mesma planta e de liquidâmbar (*Liquidambar styraciflua*), mostrando ser promissor para essa finalidade (QIN; PAN; YUAN, 2016).

Outro trabalho envolvendo esse micro-organismo, foi para produção e otimização da enzima L-asparaginase a partir de resíduos agrícolas por fermentação em estado sólido, utilizando um fungo filamentosso do gênero *Cladosporium*. Para tal estudo, utilizou-se diversos rejeitos da agroindústria, como farelo de trigo, palha de arroz, espiga de milho, folhas secas, dentre outros, obtendo melhores resultados no uso do farelo de trigo, o que possibilita a agregação de valor para tal resíduo (KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013).

Dessa maneira, o *C. cladosporioides* é um micro-organismo que possui potencial biotecnológico para diversas finalidades: aprimorando a germinação de sementes, auxiliando no reaproveitamento de resíduos agroindustriais, além de poder atuar como um agente de controle biológico em plantações e, através da excreção de diversas enzimas, esse micro-organismo pode atuar de maneira eficiente em fermentações em estado sólido, como por exemplo, em sementes de cacau.

O *C. cladosporioides* é um micro-organismo que já foi isolado da fermentação do cacau amazônico e identificado molecularmente (DE ARAÚJO et al., 2019). No entanto, ainda não se conhece a influência desse fungo filamentosso no processo e na literatura são encontrados muitos trabalhos com cultura *starter* de bactérias (DE VUYST; WECKX, 2016; LEFEBER et al., 2011; SCHWAN, 1998) e leveduras (CEMPAKA et al., 2014; CRAFACK

et al., 2014; DE VUYST; WECKX, 2016; SANDHYA et al., 2016; SCHWAN, 1998), porém, ainda não se tem conhecimento do uso de fungos filamentosos para tal finalidade.

2.3 CULTURAS *STARTERS* NA FERMENTAÇÃO DE CACAU

Cultura *starter* pode ser definida como um preparo de micro-organismos vivos, os quais normalmente são utilizados para auxiliar no início e/ou no processo da fermentação, produzindo alterações específicas na composição química e nas propriedades sensoriais do substrato, com o intuito de obter um produto mais homogêneo (MEDINA-PRADAS et al., 2017).

O estudo da utilização de culturas *starters* na massa de fermentação de cacau tem crescido, uma vez que há a busca pela melhoria da qualidade, e consequente homogeneização do produto final (FIGUEROA-HERNÁNDEZ et al., 2019). Com isso, na literatura existem diversos estudos relacionados ao assunto, nos quais são utilizadas diversas espécies de leveduras e bactérias, as quais normalmente são isoladas de fermentações espontâneas de sementes de cacau (CEMPAKA et al., 2014; CRAFACK et al., 2014; LEFEBER et al., 2012; OOI; TING; SIOW, 2020; SANDHYA et al., 2016).

LEFEBER et al. (2012) estudaram a influência de dois preparos de cultura *starter* contendo espécies de leveduras, bactérias lácticas e acéticas e com isso, observaram que o principal parâmetro afetado entre os diferentes tratamentos e espécies, foi o sabor. Com isso, o estudo mostrou possibilidades para o uso de culturas *starters* no processo da fermentação de sementes de cacau, para a obtenção de uma matéria-prima confiável e melhorada, em relação à qualidade sensorial.

CEMPAKA et al. (2014) estudaram os efeitos da adição de *Saccharomyces cerevisiae* var. Chevalieri na fermentação de sementes de cacau, onde os parâmetros comparados foram: concentração de leveduras, açúcares e de produtos metabólicos ao longo da fermentação e índice de fermentação. A principal diferença entre a fermentação natural e a com adição de inóculo foi no índice de fermentação, no qual foi observado um grau mais elevado para as amêndoas do ensaio com cultura *starter*, que foi de 1,13, enquanto que na fermentação

espontânea foi de 0,84. Com isso, os autores sugerem que a duração do processo pode ser reduzida pela adição do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* var. Chevalieri.

CRAFAK et al. (2014) avaliaram o impacto de culturas *starters* no perfil aromático e sensorial do chocolate. Para isso, utilizaram dois preparos, um com *Pichia kluyveri* e outro com *Kluyveromyces marxianus*, nos quais ambos foram constituídos pelas bactérias *Lactobacillus fermentum* L18 e *Acetobacter pasteurianus* A149, tais micro-organismos foram isolados da fermentação espontânea do cacau. Com isso, os autores observaram que, em comparação com a fermentação espontânea (controle), os inoculados apresentaram diferença aromática e sensorial, uma vez que estas apresentaram chocolates com aromas caracterizados como frutado, ácido e amargo, com sabores de frutas silvestres, iogurte e balsâmico, enquanto que as amêndoas da fermentação controle apresentaram chocolates com sabores de cacau e caramelo.

SANDHYA et al. (2016) avaliaram a influência de diferentes concentrações (10 a 60%) de cultura *starter* composta por *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* e *Acetobacter aceti*. A concentração de 10% apresentou melhores resultados, uma vez que as concentrações de 30 a 60% resultaram em uma fermentação indesejável, de baixa qualidade. Além disso, a concentração celular de 10% reduziu o tempo de fermentação, de 7 para 3 dias, em comparação com o processo espontâneo, e manteve as propriedades físicas, bioquímicas e organolépticas das sementes.

OOI, TING, SIOW (2020) estudaram a influência de culturas *starters* de leveduras isoladas da fermentação espontânea de sementes de cacau na atividade antioxidante, no índice de fermentação e nos sólidos solúveis totais de sementes de cacau. Dentre as espécies estudadas, os autores concluíram que sementes fermentadas com os inóculos de *Hanseniaspora thailandica* (MH979675) e *Pichia kudriavzevii* (MH979681) foram os que apresentaram maiores teores de polifenóis e flavonoides, em comparação com as sementes do experimento controle, podendo ser espécies de leveduras com grande potencial na modulação das atividades antioxidantes das amêndoas de cacau secas.

Apesar de haver diversos estudos com cultura *starter* na fermentação de cacau, ainda não foi relatada a utilização de fungos filamentosos como inóculo para tal processo. Conseqüentemente, ainda não se conhece a influência desses micro-organismos no meio fermentativo da massa de cacau. No entanto, espera-se que, assim como nos trabalhos citados,

o uso de fungos filamentosos resulte na redução do tempo de fermentação, bem como na obtenção de um perfil aromático distinto, em relação à fermentação espontânea.

A inoculação do fungo *C. cladosporioides* na fermentação de sementes de cacau pode ter impacto positivo, por conta da produção de metabólitos secundários (WANG et al., 2013), os quais possivelmente beneficiem na obtenção de amêndoas de cacau de qualidade através da inibição de fungos toxigênicos que possam atuar durante o processo, que normalmente alteram negativamente o sabor e aroma das amêndoas, diminuindo a qualidade da matéria-prima, além de apresentarem riscos à saúde pública (COPETTI et al., 2014).

Além disso, o processo fermentativo pode ser beneficiado principalmente por conta da excreção de enzimas pelo fungo *C. cladosporioides* (BASTOS et al., 2013; DE ARAÚJO et al., 2019; HALABURGI et al., 2011; TORRES et al., 2017), as quais podem acelerar o processo, através da aceleração da formação de compostos intermediários responsáveis pelo desenvolvimento da cor, do sabor e aroma característicos de amêndoas de cacau.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* NA FERMENTAÇÃO DE CACAU

RESUMO

O *Cladosporium cladosporioides* é um fungo que possui potencial biotecnológico no melhoramento da qualidade das amêndoas de cacau através de excreção de diversas enzimas já reportadas, além disso, foi identificado molecularmente na fermentação do cacau. O objetivo deste estudo é, portanto, avaliar a influência desse fungo filamentososo durante o processo fermentativo, de maneira inédita, através de análises físico-químicas e microbiológicas. Para isso, realizou-se dois experimentos de fermentação: sem inóculo (controle) e com cultura *starter*. O uso do fungo filamentososo não impactou de maneira significativa na formação de compostos aromáticos nas amêndoas, em relação ao experimento controle. No entanto, a presença do *C. cladosporioides* exerceu influência significativa na porcentagem de amêndoas bem fermentadas ($p \leq 0,05$), através da prova de corte, como provável consequência do menor teor de compostos fenólicos totais, e de catequina e epicatequina. Além disso, houve menor concentração de ácido acético e apresentou maior teor de aminas bioativas ($p \leq 0,05$), quando comparado com o experimento controle. Esses aspectos observados foram confirmados através da análise multivariada. Baseado nesses resultados, pode-se afirmar que o uso do *C. cladosporioides* se mostrou promissor, podendo proporcionar melhorias nas amêndoas de cacau fermentadas e secas.

Palavras-chave: aminas, aroma, compostos fenólicos, cultura *starter*, fungo filamentososo, *Theobroma cacao*.

1 INTRODUÇÃO

O *Cladosporium cladosporioides* é um fungo filamentososo que comumente coloniza materiais vegetais e o solo (BENSCH et al., 2010), é um micro-organismo que já fora identificado molecularmente na fermentação de sementes de cacau (DE ARAÚJO et al., 2019; SERRA et al., 2019), possuindo potencial biotecnológico no melhoramento de tal processo, por ter sido descrito como produtor de metabólitos antifúngicos (WANG et al., 2013), além de excretar enzimas que são importantes para a obtenção de amêndoas bem fermentadas (BASTOS et al., 2013; HALABURGI et al., 2011; TORRES et al., 2017).

Contudo, ainda não há relatos da utilização de fungos filamentosos como cultura *starter* na fermentação de cacau. Em contrapartida, estudos com o uso de leveduras e/ou bactérias já foram reportados, nos quais a adição de inóculo na massa fermentativa se mostrou viável na obtenção de amêndoas com qualidade e mais homogênea entre diferentes lotes (CRAFACK et al., 2014; LEFEBER et al., 2012; OOI; TING; SIOW, 2020).

A fermentação espontânea normalmente resulta em amêndoas de cacau com qualidade diferente entre lotes, uma vez que há muitos fatores biológicos e ambientais que influenciam diretamente no processo fermentativo (BECKETT, 2009; MARTINS et al., 2011; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2007). Com isso, o processo de obtenção de um padrão entre lotes pela indústria é dificultado, uma vez que parâmetros como: lipídios, acidez, açúcares, compostos fenólicos e aromáticos, dentre outros; podem ser distintos, podendo modificar a qualidade do produto final (ARAÚJO et al., 2014; MARSEGLIA et al., 2020).

Haja vista que o uso de culturas *starters* de leveduras e/ou bactérias se mostraram promissoras na fermentação de sementes de cacau, o uso do fungo filamentososo *C. cladosporioides* também pode ser benéfico, devido à sua atuação na defesa contra micro-organismos toxigênicos (WANG et al., 2013) e por possuir potencial de ser um colaborador na fermentação das sementes de cacau amazônico através da liberação de enzimas (BASTOS et al., 2013; HALABURGI et al., 2011; TORRES et al., 2017). Com isso, este trabalho tem como objetivo utilizar o *C. cladosporioides* como cultura *starter* na fermentação de sementes de cacau, sendo o primeiro trabalho realizar este estudo, e avaliar a influência deste no processo, através de análises físico-químicas e microbiológicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO FUNGO *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES*

O fungo *C. cladosporioides* foi obtido através do isolamento em uma fermentação de cacau amazônico durante a primeira semana do mês de julho de 2015, no município de Tucumã - Pará (06°51'44"S e 51°09'40"W), identificado através de técnica molecular (DE ARAÚJO et al., 2019) e se encontra depositado no Banco de Micro-Organismos da Fermentação de Cacau da Amazônia do LABIOTEC/PPGCTA/ITEC/UFPa.

2.2 ÍNDICE DE VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL

A avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *C. cladosporioides* foi realizada em seis diferentes meios de cultura: meio Czapek-Dox, com modificações (SMITH, 1949); ágar MC, ágar saboraud (Himedia), ágar extrato de malte (PITT; HOCKING, 2009), ágar YPD (BROWN et al., 1981) e PDA (Acumedia). Além disso, avaliou-se a influência de duas temperaturas de incubação: temperatura ambiente e de 30 °C. O experimento em cada meio de cultura e temperatura foi realizada em triplicata.

O IVCM foi obtido através da medição a cada 24 horas, com o auxílio de um paquímetro digital, do diâmetro das colônias em dois eixos, durante 10 dias de incubação, a partir do momento em que um fragmento de micélio, de aproximadamente 3,5 mm de lado, foi inoculado. Os dados coletados foram utilizados no cálculo do IVCM, através da média do resultado da seguinte fórmula, obtendo-se o índice em milímetros por dia (mm/dia) (DE ARAÚJO et al., 2019):

$$IVCM = \frac{(D - D_a)}{N}$$

Onde:

D= diâmetro atual do micélio;

Da= diâmetro do micélio no dia anterior;

N= número de dias após a inoculação.

2.3 PRODUÇÃO DE INÓCULO

Após a avaliação do IVCN do fungo *C. cladosporioides*, foi realizada a escolha do meio de cultura e temperatura em que houve maior taxa de crescimento por dia, juntamente com a produção de esporos. Assim, o fungo foi cultivado no meio PDA em tubo inclinado, incubado em temperatura ambiente por 10 dias.

Depois do tempo de incubação, uma suspensão de esporos foi obtida com solução salina de Tween estéril (0,05% Tween 80 e 0,8 g/L cloreto de sódio) (GIFFORD; SCHOUSTR, 2013), na qual foi adicionada quantidade suficiente de solução para cobrir os micélios cultivados e foi feita uma raspagem de forma branda, a fim de que não houvesse obtenção de fragmentos de micélio ou do meio de cultivo, com o auxílio de uma alça descartável estéril.

A suspensão de esporos obtida em cada tubo foi, então, transferida à uma garrafa esterilizada, onde uma alíquota foi retirada para contagem em Câmara de Neubauer. A partir dessa contagem, realizou-se diluição em solução salina de Tween para obtenção de uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^7 esporos/mL (KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017), e assim, preparou-se 500 mL de suspensão de esporos para cada cocho de fermentação.

2.4 FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU

O processo fermentativo das sementes de cacau foi realizado no município de Tomé-Açu – Pará (2°28'41,3"S e 48°16'50,7"W), na primeira quinzena do mês de maio de 2019, referente ao início da safra, com índice pluviométrico médio de 1,87 mm e temperatura ambiente em torno de 32 °C durante o dia e 23 °C a noite.

A fermentação foi conduzida de acordo com o descrito por CEPLAC (2011), onde foram realizados dois tipos de fermentações: uma espontânea (controle) e outra contendo o inóculo fúngico de *C. cladosporioides*. Para a inoculação da suspensão de esporos, utilizou-se um borrifador, onde fora disposta uma camada de sementes e em torno de 30 mL da suspensão foi borrifada. Esse processo foi repetido até que fosse despejada a massa total de sementes e todo o conteúdo da suspensão de esporos.

Os dois experimentos de fermentação foram realizados em duplicata, o que totalizou quatro cochos de fermentação, onde cada um continha em torno de 60 kg de sementes, e foram cobertos com folhas de bananeira. A fermentação teve duração de seis dias (144 horas), sendo realizado o acompanhamento da temperatura ao longo de todos os dias do processo fermentativo, na qual foi feita a medição em cinco pontos na superfície, meio e fundo do cocho de fermentação, no período matutino e vespertino. Após esse período, as amêndoas foram secas por um período de quatro dias em uma estufa de secagem natural utilizada pelo produtor (Figura 4).



Figura 4. Estufa de secagem utilizada pelo produtor de cacau para secagem após a fermentação.

2.4.1 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras secas de cada fermentação e ao longo do processo fermentativo, em pontos distintos do cocho, nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Em torno de 100 g de cada amostra foi armazenada em embalagem de polietileno estéril e acondicionada em temperatura de refrigeração (4~8 °C) para as análises microbiológicas e aproximadamente 500 g foram armazenadas sob temperatura de congelamento (-18 °C) para as demais análises, até o momento de serem realizadas no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC).

2.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Em torno de 40 g de sementes de cacau de todos os tempos da fermentação foram homogeneizados em 360 mL de água peptonada 1,5%, obtendo-se, dessa forma, a diluição 10^{-1} . Diluições decimais seriadas foram realizadas até a 10^{-8} (SILVA et al., 2017) e a contagem das colônias foi expresso em \log_{10} UFC/g. Para a análise de leveduras, alíquotas cada diluição foram inoculadas pela técnica de inoculação em superfície (*spread plate*), utilizando meio ágar YPD suplementado com cloranfenicol, para inibição de crescimento bacteriano. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 30 °C por quatro dias (PEREIRA et al., 2013).

Para análise de bactérias lácticas, utilizou-se a técnica de inoculação em profundidade (*pour plate*), utilizando o meio Ágar Man Rogosa e Sharpe (Kasvi), suplementado com 0,2 mL de nistatina em cada placa, para inibir o crescimento de fungos, incubadas em estufa a 30 °C por quatro dias (PEREIRA et al., 2013). A contagem de bactérias acéticas se deu através da técnica de inoculação em superfície (*spread plate*), contendo meio ágar GYC, suplementado com 0,2 mL de nistatina. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por três dias (CHAGAS JUNIOR et al., 2021).

2.6 PROVA DE CORTE

A prova de corte foi realizada com o intuito de avaliar e comparar os dois processos fermentativos, onde foram utilizados três lotes de 100 amêndoas fermentadas e secas, retiradas aleatoriamente, as quais foram cortadas longitudinalmente e observadas individualmente quanto aos parâmetros descritos na Tabela 1, de acordo com a Instrução Normativa número 38, de 23 de junho de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau (BRASIL, 2008).

Tabela 1. Tolerância de defeitos (%) e respectiva classificação de amêndoas de cacau (BRASIL, 2008).

Enquadramento do Produto	Defeitos					
	Mofadas	Fumaça	Danificadas por Insetos	Ardósia	Germinadas	Achatadas
Tipo 1	0 – 4%	0 – 1%	0 – 4%	0 – 5%	0 – 5%	0 – 5%
Tipo 2	> 4 – 6%	> 1 – 4%	> 4 – 6%	> 5 – 10%	> 5 – 6%	> 5 – 6%
Tipo 3	> 6 – 12%	> 4 – 6%	> 6 – 8%	> 10 – 15%	> 6 – 7%	> 6 – 7%
Fora de Tipo	> 12 – 25%	> 6%	> 8%	> 15%	> 7%	> 7%

2.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas das amostras de amêndoas de cacau foram realizadas em triplicata, de acordo com os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), para isso, analisou-se os cotilédones previamente triturados em moinho de facas (Ika® A11B). Para as análises de pH (método 970.21) e acidez total titulável (método 31.06.06), utilizou-se amostras secas e de todos os tempos de fermentação, já para umidade (método 931.04), resíduo mineral fixo total (método 972.15), lipídios (método 963.15) e proteínas totais (método 970.22), somente as amostras do tempo zero e amêndoas fermentadas e secas foram analisadas.

2.8 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos foram extraídos a partir dos cotilédones das amêndoas, os quais foram previamente liofilizados durante 30 horas, triturados em moinho de facas (Ika® A11B) e desengordurados de acordo com BRITO et al. (2017). Para a extração, pesou-se 0,1 g de amostra em tubos e foi adicionado cinco mililitros de solução extratora, composta por acetona, água e ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v), os tubos foram agitados em vórtex por cinco minutos, centrifugados a $2.000 \times g$ por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um balão âmbar de 10 mL (BRITO et al., 2017). Esse processo foi repetido mais uma vez, a fim de obter a máxima transferência de compostos no extrato obtido. O balão foi então aferido com solução extratora e homogeneizado.

A partir do extrato, foi realizada a quantificação pelo método de Folin-Ciocalteu, por espectrofotômetro (Nova Instruments® NI 2000UV), utilizando o comprimento de onda de 760 nm (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-REVENTÓS, 1999). Os resultados foram expressos em miligrama de equivalente catequina por grama de amêndoa seca (mgEC/g), baseados na curva analítica com padrão do composto, com concentrações variando entre 0,005 a 0,1 g/L ($R^2 > 0,99$). A análise foi realizada em triplicata, onde amostras de todos os tempos da fermentação e amêndoas fermentadas e secas foram analisadas.

2.9 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA

A extração dos compostos foi realizada com amostras previamente liofilizadas, trituradas em moinho (Ika® A11B) e desengorduradas (BRITO et al., 2017), onde 250 mg de amêndoas de cacau foram pesadas, homogeneizadas com 2,5 mL de solução aquosa de etanol (1:1 v/v) e os compostos fenólicos foram extraídos por ultrassom (Ultronique® Q3.0/40A), durante 10 min (HE et al., 2010). Após esse período, os extratos foram centrifugados a $2.000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi, então, transferido para outro tubo e o procedimento da extração foi realizado novamente com o precipitado, e os sobrenadantes foram unidos,

totalizando cinco mililitros de extrato. O conteúdo foi filtrado com filtro de seringa de 0,22 μm .

A análise de compostos fenólicos foi realizada por HPLC-DAD (*High Performance Liquid Chromatography* com Detector por Arranjo de Diodos) (Agilent Technologies®, 1260 Infinity), utilizando uma coluna C18 (20 cm \times 5 μm , 4,6 \times 150 mm. Zorbax Eclipse XDB-C18) a 25 °C. As fases móveis foram compostas por (A) água e acetonitrila (99,8:0,2 v/v) e (B) metanol, onde foi utilizado um gradiente linear de 0 a 50% de (B) durante 0-12 min e de 50 a 100% durante 13-20 min, com fluxo de 1,2 mL/min e volume de injeção de 20 μL (HE et al., 2010).

Os compostos fenólicos foram identificados com base na ordem de eluição e tempo de retenção dos picos em relação aos padrões analisados nas mesmas condições, a 280 nm, e quantificados através da utilização de curvas analíticas de catequina (Sigma-Aldrich), com concentrações variando entre 3,125 a 50 g/L [$R^2 > 0,99$, limite de quantificação (LOQ) = 0,31mg/g] e epicatequina (Sigma-Aldrich), com concentrações entre 3,125 a 100 g/L [$R^2 > 0,99$, limite de quantificação (LOQ) = 0,11 mg/g]. A análise foi realizada em triplicata, onde amostras fermentadas e secas e de todos os tempos de fermentação foram analisadas.

2.10 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES, ÁLCOOL E ÁCIDO ORGÂNICO

Para a extração dos açúcares, álcool e ácido orgânico, os cotilédones foram moídos manualmente, pesou-se 1 g de amostra em um tubo e adicionou-se 1 mL de água deionizada, o tubo foi, então, submetido a agitação em vórtex por 5 min. O conteúdo foi transferido para um novo tubo e mais 1 mL de água deionizada foi adicionada novamente ao precipitado, o qual foi homogeneizado em vórtex nas mesmas condições. Os tubos contendo 2 mL do homogeneizado foram centrifugados a 2.000 \times g por 10 min e o sobrenadante foi armazenado em outro tubo. O precipitado foi, então, ressuscitado com 0,5 mL de água deionizada, agitado e centrifugado como descrito anteriormente. O volume final de 2,5 mL foi novamente centrifugado e o sobrenadante foi filtrado com filtro de seringa de 0,22 μm (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011).

A análise de açúcares, ácido orgânico e álcool foi realizada por HPLC (Thermo Scientific® modelo Finnigan Surveyor), equipado com sistema de detecção por índice de refração (IR) a 35 °C, utilizando uma coluna de troca iônica (300 × 7,8 mm. Aminex® HPX-87H) a 30 °C. A solução de ácido sulfúrico (5 mM) foi utilizada como eluente com uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min, durante 25 min e volume de injeção de 20 µL (RAMOS et al., 2014).

Os compostos foram identificados e quantificados com base no tempo de retenção dos padrões da marca Sigma-Aldrich que foram injetados nas mesmas condições e através do cálculo da curva analítica de sacarose, com concentrações variando entre 0,005 a 3 g/L [$R^2 = 0,98$, limite de detecção (LOD) = 0,30 mg/g e limite de quantificação (LOQ) = 0,92 mg/g], glicose [$R^2 > 0,99$, limite de detecção (LOD) = 0,03 mg/g e limite de quantificação (LOQ) = 0,08 mg/g], frutose [$R^2 > 0,99$, limite de detecção (LOD) = 0,03 mg/g e limite de quantificação (LOQ) = 0,08 mg/g], ácido acético, com concentrações variando entre 0,005 a 1 g/L [$R^2 > 0,99$, limite de detecção (LOD) = 0,03 mg/g e limite de quantificação (LOQ) = 0,09 mg/g] e etanol, com concentrações variando entre 0,2 a 3 g/L [$R^2 > 0,99$, limite de detecção (LOD) = 0,04 mg/g e limite de quantificação (LOQ) = 0,11 mg/g]. As amostras analisadas foram as fermentadas e secas e de todos os tempos de fermentação, sendo a análise realizada em triplicata.

2.11 AMINAS BIOATIVAS

Para análise de aminas bioativas, as amostras foram previamente secas em estufa a 70 °C até peso constante. Os compostos foram extraídos a partir de 5 g das amostras com 7 mL de ácido tricloroacético homogeneizado em agitador por 5 min, seguido por centrifugação a $11.180 \times g$ a 4 °C por 10 min (ADÃO; GLÓRIA, 2005). A extração foi realizada duas vezes e os sobrenadantes foram despejados em balão volumétrico e filtrados em papel filtro qualitativo.

Nove aminas bioativas livres foram determinadas por HPLC de fase reversa por pares de íons (ADÃO; GLÓRIA, 2005): espermidina, putrescina, agmatina, cadaverina, serotonina, histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina (Sigma-Aldrich). O equipamento utilizado foi Shimadzu® LC-10AD com injetor automático SIL-10AD VP (Kyoto, Japão), e as amidas

foram separadas utilizando uma coluna Novapak® C18 (3,9 × 300 mm, 4 µm, 60 Å, Waters, MA, EUA) e o gradiente de eluição de acetato de sódio (0,2 mol/L) e octanosulfonato de sódio (15 mmol/L) com pH ajustado para 4,9 (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B) (BRITO et al., 2017).

As aminas bioativas foram identificadas por comparação com o tempo de retenção e eluição dos padrões. A quantificação foi realizada por fluorimetria (340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente) após a derivatização pós-coluna com o-ftalaldeído, utilizando curvas analíticas (medidas em duplicata) para cada amina ($R^2 > 0,99$). Os resultados foram expressos em mg/kg de matéria-prima, sendo que serão analisadas amostras fermentadas e secas e as do tempo 0, 96 e 144 horas de fermentação.

2.12 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

As amostras de amêndoas de cacau foram moídas em moinho analítico de facas (Ika® A11B) e submetidas à destilação/extração simultânea por duas horas utilizando 4 mL de pentano. Dois µL do concentrado pentânico foi injetado em cromatógrafo em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), em sistema Shimadzu® QP-2010 Plus, equipado com coluna DB-5MS (30m × 0,25mm × 0,25µm de espessura de filme). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL/min e a temperatura do injetor e da interface foi de 250 °C.

Foi utilizado espectrômetro de massa por ionização por elétrons a 70 eV e a temperatura da fonte de íons a 220 °C. A identificação química foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas e índices de retenção (IR) com as substâncias padrão existentes na biblioteca de dados do sistema e com dados da literatura (ADAMS, 2017) e os resultados foram expressos em %. As amostras analisadas foram as fermentadas e secas e as do tempo 0, 96 e 144 horas de fermentação.

2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as médias obtidas nas análises foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparadas através do Teste de Tukey, com nível de significância de 95%. Além disso, duas técnicas de análises multivariadas exploratórias foram aplicadas, com o auxílio do *software* StatSoft® STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Para a análise do componente principal (PCA), temperatura; contagem de leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas; pH; acidez total titulável; catequina; epicatequina; sacarose; glicose; frutose; etanol; ácido acético; triptamina; tiramina; espermidina; feniletilamina; cadaverina e putrescina foram utilizadas como variáveis ativas na derivação dos componentes principais, e a variável suplementar (compostos fenólicos totais) foi projetada no espaço do fator, para cada experimento de fermentação. A análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi obtida considerando as mesmas variáveis ativas aplicadas ao PCA e os grupos foram formados com base em distâncias euclidianas como coeficiente de similaridade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ÍNDICE DE VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL

Os resultados do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *C. cladosporioides* em diferentes meios de cultura e temperaturas distintas, estão dispostos na Figura 5, onde é possível visualizar a influência do meio de cultura e da temperatura de incubação no crescimento do micro-organismo.

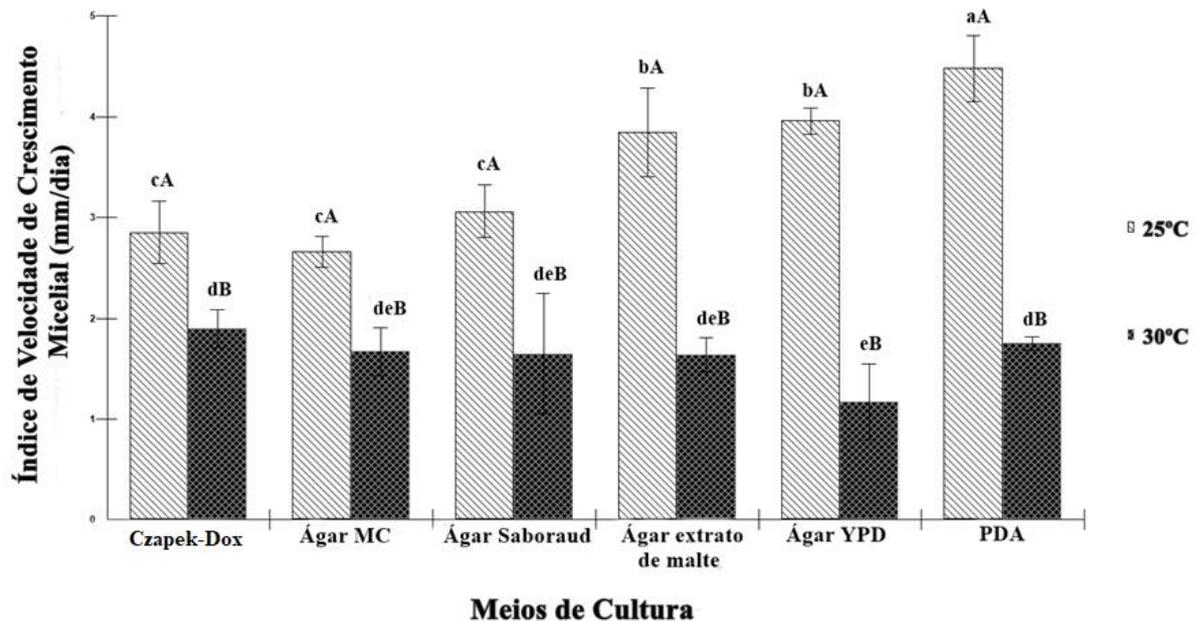


Figura 5. Índice de velocidade de crescimento micelial – IVCM (mm/dia) do fungo *C. cladosporioides* em diferentes meios de cultura. Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si com a variação do meio de cultura ($p > 0,05$, Teste de Tukey). Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si com a variação da temperatura de acordo com o meio de cultura ($p > 0,05$, Teste de Tukey).

Tal observação pode ser atribuída ao fato de que entre os componentes essenciais do meio de cultura, fazem-se presentes as fontes de nitrogênio, fósforo, sais minerais, carbono e energia (açúcares). Onde em diferentes meios são disponibilizados moléculas distintas, as quais variam de acordo com a composição, influenciando de maneira distinta no crescimento

de um micro-organismo, onde este se adaptará melhor de acordo com o seu metabolismo (MADIGAN et al., 2016).

Já a temperatura de incubação, por sua vez, pode afetar de duas maneiras: ao passo que a temperatura aumenta, reações químicas e enzimáticas do micro-organismo passam a decorrer com maior velocidade, resultando no crescimento mais acelerado. Entretanto, acima de determinada temperatura, os componentes microbianos podem sofrer danos, afetando negativamente o crescimento, e há também uma temperatura mínima, onde abaixo desta, o crescimento não é possível ou é lento (MADIGAN et al., 2016).

Com isso, a partir da Figura 5, pode-se observar que o meio de cultivo em que o fungo melhor se adaptou foi o PDA (0,4% infusão de batata, 2% glicose e 1,5% ágar), com incubação à temperatura ambiente, apresentando diferença estatística entre todos os demais meios de cultura, com índice de velocidade de crescimento micelial de 4,48 mm/dia.

3.2 TEMPERATURA DA MASSA DE FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU

Os resultados da temperatura média da massa de fermentação das sementes de cacau ao longo do tempo nos dois experimentos, controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*, são apresentados na Figura 6.

Observa-se que em ambos os processos, a temperatura aumentou ao longo do tempo, alcançando níveis máximos a partir de 72 horas (controle: 43,02 °C e com inóculo: 46,64 °C) até às 120 horas (controle: 45,32 °C e com inóculo: 44,58 °C), e decresceu ao final da fermentação (controle: 42,00 °C e com inóculo: 41,90 °C), mostrando que a fermentação controle (espontânea) e a inoculada com o micro-organismo ocorreram de maneira semelhante, dentro do esperado (BRITO et al., 2017).

O aumento de temperatura no início do processo, entre 0 e 48 horas, é atribuído à atuação de espécies de leveduras, através da conversão de açúcares, presentes na polpa das sementes, em etanol e de bactérias do ácido láctico (BAL) citrato-positivas que atuam na conversão do ácido cítrico em ácido láctico (SCHWAN; WHEALS, 2004). A partir de 48 horas de fermentação, o aumento da temperatura se atribui principalmente à atuação de

bactérias, tanto das BAL, como as do ácido acético (BAA), onde estas convertem o etanol a ácido acético (reação exotérmica) (SCHWAN; WHEALS, 2004).

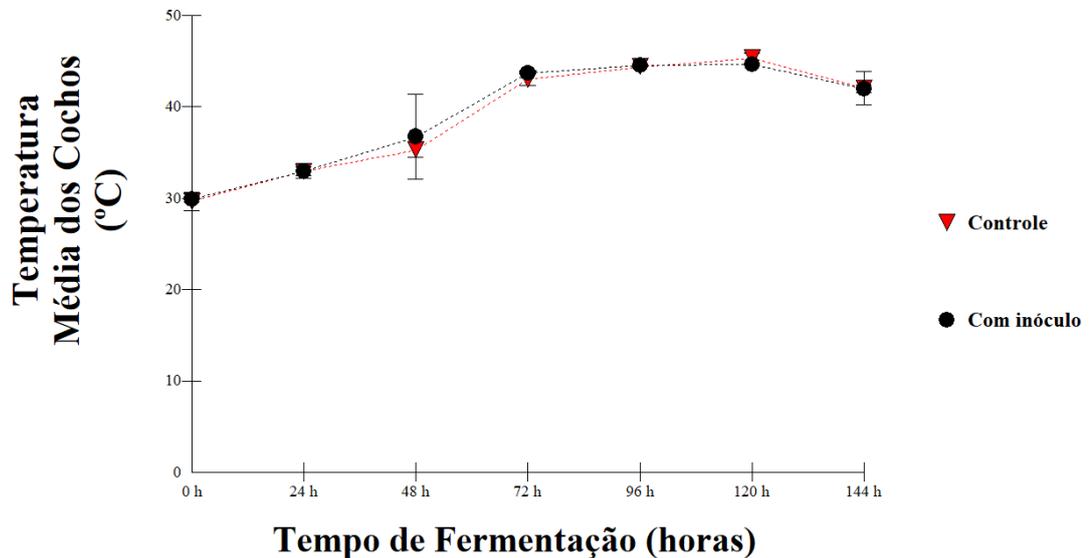


Figura 6. Temperatura média (°C) da massa de fermentação de cacau ao longo do tempo (horas) nos experimentos controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Portanto, o acompanhamento da temperatura da massa de fermentação de sementes de cacau ao longo do processo é de suma importância, a fim de avaliar o progresso do processo, como consequência da interação microbiana presente no meio (SCHWAN, 1998). E a adição do inóculo de *C. cladosporioides* no meio fermentativo mostrou não influenciar de maneira direta neste parâmetro.

3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.3.1 Contagem de leveduras

É possível visualizar na Tabela 2 os resultados da contagem de leveduras ao longo do processo fermentativo, sendo possível observar que a dinâmica populacional ocorreu de maneira distinta entre as duas fermentações (controle e com inóculo do *C. cladosporioides*), onde em ambas, a concentração desses micro-organismos foi inicialmente alta, sofrendo um declínio após 24 horas e aumentando após 96 horas na fermentação controle, e após 120 horas na fermentação conduzida com inóculo, perfis semelhantes ao encontrado por SERRA et al. (2019) no município de Tomé-Açu, no estudo metagenômico da comunidade microbiana na fermentação do cacau Amazônico.

Tabela 2. Valores médios da contagem de leveduras (\log_{10} UFC/g) ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Tempo de Fermentação	Contagem de Leveduras ao Longo do Tempo de Fermentação (\log_{10} UFC/g)	
	Controle	Com Inóculo
0 h	7,00 \pm 0,05 ^{aA}	6,24 \pm 0,00 ^{aB}
24 h	3,76 \pm 0,15 ^{cB}	4,99 \pm 0,05 ^{bA}
48 h	3,46 \pm 0,41 ^{cA}	3,13 \pm 0,13 ^{dA}
72 h	2,40 \pm 0,17 ^{dB}	3,63 \pm 0,07 ^{cA}
96 h	6,13 \pm 0,03 ^{bA}	3,09 \pm 0,04 ^{dB}
120 h	6,35 \pm 0,19 ^{bA}	4,91 \pm 0,27 ^{bB}
144 h	6,70 \pm 0,12 ^{abA}	5,89 \pm 0,05 ^{aB}

* Médias \pm desvio-padrão com letras iguais em uma mesma coluna (minúsculas) e/ou em uma mesma linha (maiúsculas) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey).

No tempo 0 da fermentação, é possível observar que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, fato que pode ter ocorrido devido à presença da suspensão de esporos nas amostras que em sua composição possui NaCl e Tween, os quais podem ter interferido na população inicial de leveduras.

A diminuição da população de leveduras a partir das 24 horas de fermentação é um comportamento esperado, pois de acordo com PAPALEXANDRATOU et al. (2011), esses micro-organismos possuem a importante atividade de metabolização de carboidratos presentes no meio, mais especificamente na polpa das sementes, liberando álcool como metabólito principal, sendo uma reação exotérmica, ou seja, há um aumento na temperatura da massa de fermentação. Com isso, o álcool produzido pelas leveduras, inibe o crescimento desses micro-organismos e diminui a população já preexistente (MOREIRA et al., 2013).

Destaca-se que após o decréscimo na contagem de leveduras em 72 horas, houve um aumento significativo de 2,40 para 6,13 \log_{10} UFC/g nas 96 horas de fermentação no experimento controle, e no processo conduzido com o inóculo do fungo *C. cladosporioides*, o aumento significativo, de 3,09 para 4,91 \log_{10} UFC/g, ocorreu em 120 horas de fermentação.

Dessa maneira, infere-se que a diferença na dinâmica populacional entre os experimentos, e principalmente o aumento mais sutil na contagem de leveduras na fermentação conduzida com o inóculo fúngico, pode ser atribuído à presença do *C. cladosporioides*. Isso se deve ao fato de que esse micro-organismo excreta diversas enzimas, dentre elas, a glucanase (TORRES et al., 2017) que, de acordo com HUMBERT-GOFFARD et al., (2004), essa molécula pode auxiliar na autólise de leveduras.

3.3.2 Contagem de bactérias lácticas

É possível observar na Tabela 3 os resultados da contagem de bactérias lácticas ao longo de ambos os processos fermentativos, os quais são distintos quanto à dinâmica populacional. Nota-se que o tempo 0 apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, fato que pode ter ocorrido devido à presença da suspensão de esporos, o qual contém NaCl e Tween, que podem ter interferido na população inicial de bactérias lácticas.

Tabela 3. Valores médios da contagem de bactérias lácticas (\log_{10} UFC/g) ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Tempo de Fermentação	Contagem de Bactérias Lácticas ao Longo do Tempo de Fermentação (\log_{10} UFC/g)	
	Controle	Com Inóculo
0 h	5,89 \pm 0,03 ^{dA}	5,79 \pm 0,04 ^{cB}
24 h	4,98 \pm 0,00 ^{eB}	6,18 \pm 0,04 ^{bcA}
48 h	4,30 \pm 0,08 ^{fB}	4,64 \pm 0,05 ^{dA}
72 h	3,90 \pm 0,09 ^{gA}	3,74 \pm 0,63 ^{eA}
96 h	6,90 \pm 0,04 ^{cA}	3,55 \pm 0,03 ^{eB}
120 h	7,13 \pm 0,02 ^{bA}	6,80 \pm 0,04 ^{abB}
144 h	8,23 \pm 0,00 ^{aA}	7,23 \pm 0,03 ^{aB}

* Médias \pm desvio-padrão com letras iguais em uma mesma coluna (minúsculas) e/ou em uma mesma linha (maiúsculas) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey).

A partir de 24 horas da fermentação, no experimento controle houve um decréscimo na contagem e aumentou a partir das 96 horas (de 3,90 para 6,90 \log_{10} UFC/g), enquanto que na fermentação conduzida com inóculo fúngico houve leve aumento nas 24 horas, diminuindo a partir das 48 horas e aumentando a partir das 120 horas do processo (de 3,55 para 6,80 \log_{10} UFC/g). Tal aumento na contagem de bactérias lácticas ao final do processo fermentativo não é um perfil comumente observado. É possível, portanto, que a espécie híbrida de cacau utilizada tenha influência direta em tal parâmetro (MOREIRA et al. 2013).

Além disso, os metabólitos liberados pelo *C. cladosporioides*, como cladosporina, isocladosporina, 5'-hidroxiasperentina e cladosporina-8-metil éter, os quais já foram reportados com atividade antimicrobiana (DE SILVA et al., 2019; HUANG et al., 2016; WANG et al., 2013), podem ter impactado diretamente no crescimento desses micro-organismos. No entanto, é importante ressaltar que ainda não há estudos específicos sobre o impacto dessas moléculas liberadas pelo *C. cladosporioides* em bactérias da fermentação do cacau, mas é possível que retardem o crescimento desses micro-organismos.

3.3.3 Contagem de bactérias acéticas

É possível visualizar na Tabela 4 os resultados da contagem de bactérias acéticas ao longo da fermentação, onde no tempo 0 houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, podendo ter ocorrido devido à presença da suspensão de esporos que, possuindo NaCl e Tween, podem ter interferido na população inicial de bactérias acéticas.

Tabela 4. Valores médios da contagem de bactérias acéticas (\log_{10} UFC/g) ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Tempo de Fermentação	Contagem de Bactérias Acéticas ao Longo do Tempo de Fermentação (\log_{10} UFC/g)	
	Controle	Com Inóculo
0 h	6,21 \pm 0,01 ^{dB}	6,35 \pm 0,01 ^{cA}
24 h	5,02 \pm 0,04 ^{eB}	5,87 \pm 0,01 ^{dA}
48 h	3,74 \pm 0,09 ^{fA}	3,74 \pm 0,07 ^{eA}
72 h	3,37 \pm 0,28 ^{gA}	3,59 \pm 0,05 ^{efA}
96 h	6,85 \pm 0,01 ^{cA}	3,48 \pm 0,06 ^{fB}
120 h	7,72 \pm 0,07 ^{bA}	7,07 \pm 0,05 ^{bB}
144 h	8,10 \pm 0,03 ^{aA}	7,26 \pm 0,01 ^{aB}

* Médias \pm desvio-padrão com letras iguais em uma mesma coluna (minúsculas) e/ou em uma mesma linha (maiúsculas) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey).

Contudo, ambos os experimentos apresentaram perfis semelhantes até 72 horas, e após esse período, verificou-se um retardo no aumento da população desses micro-organismos no experimento conduzido com inóculo de *C. cladosporioides*, pois na fermentação controle houve crescimento a partir de 96 horas (de 3,37 para 6,85 \log_{10} UFC/g), e na contendo a cultura *starter*, a partir de 120 horas (de 3,48 para 7,07 \log_{10} UFC/g).

Essa diferença observada pode ser atribuída à presença da cultura *starter* na fermentação, pois MIGUEL et al., (2017) estudaram a dinâmica microbiológica de duas

fermentações: uma espontânea e outra inoculada com uma espécie de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e outra de bactéria láctica (*Lactobacillus fermentum*), e foi observada a distinção na contagem de bactérias acéticas entre os dois processos. Portanto, a presença de levedura, bactéria e/ou fungo filamentosos como cultura *starter*, pode influenciar diretamente na dinâmica populacional de bactérias acéticas ao longo do processo.

Além disso, os metabólitos liberados pelo *C. cladosporioides*, descritos com atividade antimicrobiana, de acordo com DE SILVA et al. (2019); HUANG et al. (2016) e WANG et al. (2013), também podem ter retardado o crescimento de bactérias acéticas no meio fermentativo.

3.4 PROVA DE CORTE

A Tabela 5 contém os percentuais de defeitos (prova de corte) observados nos dois experimentos de fermentação: controle e conduzida com inóculo do fungo *C. cladosporioides*. Com base no que é regido pelo MAPA (BRASIL, 2008), as amêndoas fermentadas e secas dos dois experimentos, enquadram-se no Tipo 1, uma vez que a porcentagem de amêndoas achatadas foi abaixo de 5% e, além disso, não houve percentual de amêndoas mofadas, com odor de fumaça, danificadas por inseto, ardósias (não fermentadas) e germinadas.

Tabela 5. Classificação das amêndoas fermentadas e secas dos diferentes experimentos de fermentação: controle e com inóculo do fungo *C. cladosporioides*, através do teste de corte.

Classificação	Proporção (%)	
	Controle	Com Inóculo
Fermentado	61,50 ± 1,87 ^{aB}	70,33 ± 3,93 ^{aA}
Fermentação Incompleta	38,33 ± 2,16 ^{bA}	29,33 ± 3,88 ^{bB}
Não Fermentado	0	0
Fermentação Excessiva	0	0
Achatadas	1 ^{cA}	2 ^{cA}

* Médias ± desvio-padrão com letras iguais em uma mesma coluna (minúsculas) e/ou em uma mesma linha (maiúsculas) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey).

Nota-se que, apesar de as contagens microbianas de leveduras, bactérias lácticas e acéticas, na fermentação conduzida com o inóculo fúngico diferirem ao experimento controle, produziram maior proporção de amêndoas bem fermentadas (> 8%) quando comparado ao processo controle (Tabela 5). Esse resultado pode ter sido influência direta do fungo *C. cladosporioides*, através da liberação de enzimas como a pectinase (BASTOS et al., 2013), lacase (HALABURGI et al., 2011), glucanase, celulase e xilanase (DE ARAÚJO et al., 2019), as quais podem contribuir com a aceleração da fermentação e/ou com maior desenvolvimento da cor das amêndoas de cacau.

3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

É possível observar na Tabela 6 os resultados das análises físico-químicas de pH, acidez total titulável (mEq NaOH/100 g), umidade (%), cinzas (%), lipídios (%) e proteínas (%) ao longo do processo de fermentação de cacau nos dois experimentos: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides* e após a secagem das amêndoas.

Tabela 6. Valores médios de pH e acidez total titulável (mEq NaOH/100 g) ao longo do tempo e após a secagem das amêndoas, e valores médios de umidade (%), cinzas (%), lipídios (%) e proteínas (%) em dois tempos de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Tempo	pH		Acidez Total Titulável		Umidade		Cinzas **		Proteínas ***		Lipídios **	
	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo
0 h	6,55 ±	6,52 ±	7,89 ±	6,17 ±	35,63 ±	35,14 ±	2,39 ±	2,40 ±	14,32 ±	14,31 ±	37,75 ±	36,15 ±
	0,04 ^{aA}	0,05 ^{aA}	0,95 ^{eA}	0,34 ^{eB}	0,12 ^{aA}	0,08 ^{aA}	0,03 ^{aA}	0,02 ^{aA}	0,35 ^{aA}	0,33 ^{bA}	0,60 ^{bA}	1,72 ^{bA}
24 h	6,50 ±	6,48 ±	12,14 ±	7,28 ±	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,07 ^{aA}	0,09 ^{aA}	1,18 ^{dA}	0,48 ^{eB}	-	-	-	-	-	-	-	-
48 h	5,44 ±	5,34 ±	15,74 ±	15,22 ±	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,08 ^{bA}	0,04 ^{bA}	2,92 ^{dfA}	2,15 ^{dA}	-	-	-	-	-	-	-	-
72 h	4,43 ±	4,42 ±	33,27 ±	34,69 ±	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,01 ^{fA}	0,05 ^{eA}	0,41 ^{aA}	2,49 ^{aA}	-	-	-	-	-	-	-	-
96 h	4,61 ±	4,53 ±	24,12 ±	25,17 ±	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,01 ^{eA}	0,01 ^{deA}	1,40 ^{bA}	0,23 ^{bA}	-	-	-	-	-	-	-	-
120 h	4,84 ±	4,73 ±	17,74 ±	19,14 ±	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,02 ^{dA}	0,02 ^{cdB}	0,20 ^{cfB}	0,20 ^{cA}	-	-	-	-	-	-	-	-
144 h	4,92 ±	4,78 ±	17,40 ±	17,08 ±	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,03 ^{dA}	0,19 ^{cA}	0,32 ^{cfA}	0,30 ^{cdB}	-	-	-	-	-	-	-	-
Seco	5,30 ±	5,31 ±	20,33	19,74 ±	4,68 ±	4,89 ±	2,30 ±	2,26 ±	16,57 ±	17,24 ±	50,91 ±	51,64 ±
	0,03 ^{cA}	0,04 ^{dA}	±0,34 ^{cA}	0,20 ^{cA}	0,14 ^{bA}	0,09 ^{bA}	0,02 ^{aA}	0,06 ^{aA}	0,22 ^{aB}	0,30 ^{aA}	0,44 ^{aA}	0,76 ^{aA}

* Médias ± desvio-padrão com letras iguais em uma mesma coluna (minúsculas) e/ou em uma mesma linha (maiúsculas) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey) em uma mesma análise.

** Expresso em base úmida. *** Expresso em base úmida e engordurada.

3.5.1 pH

O pH nos dois experimentos decresceu ao longo do tempo, sofrendo leve aumento a partir de 96 horas, e após a secagem, perfil normalmente encontrado, conforme BIEHL et al. (1985) e BRITO et al. (2017). Esse parâmetro apresentou diferença significativa entre os processos, apenas em 120 horas de fermentação ($p \leq 0,05$), não havendo distinção ao final.

O decréscimo do pH ao longo do tempo de fermentação é atribuído aos metabólitos excretados pelos micro-organismos presentes no meio, como: etanol, ácido lático e ácido acético (AFOAKWA, 2016). Com o aumento da temperatura ao passar do tempo, essas substâncias, são difundidas no cotilédone (QUESNEL, 1965), acarretando na diminuição do pH (SCHWAN; WHEALS, 2004). O leve aumento observado neste trabalho a partir de 96 horas de fermentação ocorreu como consequência da evaporação dos ácidos, por conta do aumento da temperatura e dos revolvimentos diários que são realizados a partir de 48 horas (AFOAKWA et al., 2011; NIELSEN; SNITKJAER; BERG, 2008).

O valor de pH é um parâmetro também utilizado na análise do índice de qualidade do cacau – IQC (ARAUJO et al., 2014), onde, segundo os autores, os valores devem estar na faixa de 5,60 a 6,57, tendo o valor ótimo de 6,01. Neste trabalho, as amêndoas fermentadas e secas obtiveram um valor médio de pH de 5,31, estando abaixo do que é proposto para o índice de qualidade.

3.5.2 Acidez total titulável

É possível notar que os resultados de acidez total titulável (ATT) ratificam os de pH, onde a acidez aumenta à medida que o processo avança, decrescendo a partir de 96 horas de fermentação, perfil comumente observado (NAZARUDDIN et al., 2006). Nota-se que nos dois primeiros tempos da fermentação (0 e 24 horas) há diferença estatística no teor de ATT entre os experimentos ($p \leq 0,05$), onde o processo conduzido com o inóculo fúngico apresentou menor concentração, fato que pode ter sido ocasionado pela presença da solução

de suspensão de esporos, a qual possui pH 6,7, e possivelmente penetrou a testa das sementes, modificando a ATT do cotilédono no início da fermentação.

Entre 48 e 96 horas, não houve diferença estatística entre os processos, onde em ambos, observou-se um aumento no teor de ATT ao longo do tempo, ocasionado pela presença de ácidos (acético, cítrico, láctico, málico), sintetizados através do metabolismo microbiano, conforme AFOAKWA (2014), HOLM; ASTON; DOUGLAS (1993) e PAPALEXANDRATOU et al. (2011). A partir de 120 horas de fermentação, é possível notar que a diminuição da ATT no processo conduzido com o inóculo do fungo *C. cladosporioides* foi mais lento, em comparação com o processo controle.

No entanto, após a secagem, obteve-se teores iguais estatisticamente em ambas as fermentações (controle: 20,33 e com inóculo: 19,74 mEq NaOH/100 g) que, de acordo com o IQC (ARAUJO et al., 2014), tais valores estão próximos do máximo que é proposto, onde a faixa de acidez é de 10,53 a 19,37 g/100 g.

3.5.3 Umidade, resíduo mineral fixo total, lipídios e proteínas totais

De acordo com os resultados de umidade, é possível observar que houve redução de mais de 86% da umidade ao final do processo, o que é essencial para evitar o desenvolvimento de fungos toxigênicos, segundo KEDJEBO et al. (2015), além de que ocorre a continuidade de diversas reações bioquímicas, contribuindo na formação do sabor, aroma e cor característicos das amêndoas de cacau (LUNA et al., 2002). Os teores de umidade finais dos dois experimentos de fermentação não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

Os resultados de resíduo mineral fixo total (cinzas) não apresentaram diferença significativa entre ambas as fermentações ($p > 0,05$), e os valores se assemelham ao que já foi reportado em outros estudos (AFOAKWA et al., 2011; AGUS; MOHAMAD; HUSSAIN, 2018). O teor de proteínas totais das amêndoas fermentadas e secas entre os experimentos apresentou diferença estatística ($p \leq 0,05$), onde o processo conduzido com o inóculo fúngico apresentou maior concentração.

A inoculação da cultura *starter* na fermentação não exerceu influência no conteúdo lipídico final em comparação com o experimento controle, e se enquadra ao que já foi reportado em sementes e amêndoas de cacau, segundo AFOAKWA et al. (2011) e BERTAZZO et al. (2011). De acordo com o IQC (ARAUJO et al., 2014), a fim de que o cacau tenha conteúdo lipídico para obtenção de produto de qualidade, este deve apresentar porcentagem maior que 30,77%. Com isso, os valores encontrados ao final de todo o processo, se adequam no índice, sendo este fato positivo, uma vez que, segundo RAMLI et al. (2001), os lipídios exercem atividades importantes na participação de reações na definição do sabor e aroma característicos do cacau.

3.6 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

É possível observar os resultados do teor de compostos fenólicos totais na Tabela 7, onde se nota que à medida que o processo de fermentação avança, o teor de compostos fenólicos totais decresce nos dois experimentos de fermentação: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Esse comportamento é característico na fermentação de sementes de cacau (BRITO et al., 2017), uma vez que ao longo do processo ocorrem diversas reações bioquímicas, onde uma delas é catalisada pela enzima polifenol-oxidase, onde os compostos fenólicos, ao se difundirem através dos líquidos liberados das células pigmentadas dos cotilédones, são oxidados a moléculas de alto peso molecular, sendo a maioria taninos insolúveis (AFOAKWA et al., 2012; WOLLGAST; ANKLAM, 2000). No entanto, é importante ressaltar que o decréscimo no teor de compostos fenólicos totais também é atribuído a outros fatores, como à difusão dessas moléculas através dos líquidos liberados na fermentação, o mel do cacau (KIM; KEENEY, 1984).

É possível observar que o experimento de fermentação com cultura *starter* ocasionou uma diminuição mais acentuada do teor de compostos fenólicos das amêndoas fermentadas e secas. A correlação entre a concentração dessas moléculas com a formação do sabor, aroma e da coloração do cacau é inversamente proporcional (KEALEY et al., 1998), ou seja, quanto

menor o teor de compostos fenólicos, maior é a formação desses atributos, ratificando com a prova de corte (Tabela 5), onde o percentual de amêndoas bem fermentadas foi maior na fermentação conduzida com inóculo do fungo *C. cladosporioides*.

Tabela 7. Valores médios de compostos fenólicos totais (mgEC/g) ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Tempo	Compostos Fenólicos Totais (mgEC/g)	
	Controle	Com Inóculo
0 h	119,77 ± 0,58 ^{aA}	114,51 ± 2,73 ^{aA}
24 h	105,66 ± 3,49 ^{abA}	103,11 ± 2,91 ^{bcA}
48 h	98,31 ± 5,61 ^{bA}	107,81 ± 2,58 ^{abA}
72 h	96,37 ± 8,11 ^{bA}	95,34 ± 4,88 ^{cA}
96 h	75,97 ± 4,01 ^{cA}	78,53 ± 1,19 ^{dA}
120 h	78,44 ± 4,84 ^{cA}	69,98 ± 2,74 ^{dA}
144 h	57,45 ± 3,01 ^{dB}	71,73 ± 6,02 ^{dA}
Seco	78,35 ± 3,06 ^{cA}	59,14 ± 1,04 ^{eB}

* Médias ± desvio-padrão com letras iguais em uma mesma coluna (minúsculas) e/ou em uma mesma linha (maiúsculas) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey).

Esse fato pode ter sido ocasionado pela atividade de diversas enzimas excretadas pelo fungo filamentososo, especialmente a lacase, a qual catalisa a oxidação de fenóis, podendo, dessa forma, contribuir no desenvolvimento da cor nas amêndoas de cacau em detrimento da diminuição de compostos fenólicos (THURSTON, 1994).

Com isso, é possível inferir que o fungo *C. cladosporioides* possui influência negativa no teor de compostos fenólicos totais das amêndoas fermentadas e secas, no entanto, pode ser atuante no melhoramento da qualidade da matéria-prima ao final do processo de secagem, aumentando a porcentagem de amêndoas fermentadas (70,33%), quando comparada com o experimento controle (61,50%).

O parâmetro de compostos fenólicos totais é analisado no IQC (ARAÚJO et al., 2014), onde o cacau deve apresentar conteúdo menor que 4,60%, para que não haja decaimento na

qualidade do sabor e aroma. Com isso, neste trabalho, tanto o experimento controle (~ 7,84%), como o com inóculo do fungo filamentososo (~ 5,48%), apresentaram-se um pouco acima do que é recomendado no referido estudo, no qual este apresentou menor diferença quanto ao recomendado.

3.7 CATEQUINA E EPICATEQUINA

É possível observar na Tabela 8 a concentração dos compostos fenólicos catequina e epicatequina ao longo da fermentação e após a secagem dos dois processos, onde em ambos verifica-se que houve muita semelhança entre as fermentações. A epicatequina, em especial, é o composto fenólico majoritário presente nas sementes de cacau frescas, seguida pela catequina (ALLGROVE; DAVISON, 2014; BONETTI; BROMBO; ZULIANI, 2017; SHUKLA et al., 2019), perfil observado neste estudo.

Tabela 8. Valores médios de catequina e epicatequina ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Tempo	Catequina (mg/g)		Epicatequina (mg/g)	
	Controle	Com Inóculo	Controle	Com Inóculo
0 h	2,61 ± 0,26 ^{aA}	3,17 ± 0,25 ^{aA}	12,69 ± 0,65 ^{aA}	13,77 ± 1,40 ^{aA}
24 h	2,19 ± 0,20 ^{abcB}	2,87 ± 0,08 ^{abA}	11,57 ± 1,06 ^{aA}	13,20 ± 0,21 ^{aA}
48 h	2,43 ± 0,10 ^{aA}	2,62 ± 0,31 ^{bcA}	13,20 ± 0,12 ^{aA}	14,05 ± 1,28 ^{aA}
72 h	2,34 ± 0,02 ^{abA}	2,55 ± 0,24 ^{bcA}	11,28 ± 0,45 ^{aA}	11,72 ± 0,08 ^{aA}
96 h	2,24 ± 0,06 ^{abcA}	2,37 ± 0,15 ^{cA}	7,71 ± 0,34 ^{bA}	8,55 ± 0,63 ^{bA}
120 h	1,33 ± 0,23 ^{dA}	1,69 ± 0,03 ^{dA}	5,44 ± 0,74 ^{cA}	4,60 ± 0,17 ^{cA}
144 h	1,76 ± 0,04 ^{cdA}	1,84 ± 0,02 ^{dA}	4,24 ± 0,10 ^{cB}	5,05 ± 0,12 ^{cA}
Seco	1,84 ± 0,31 ^{bcdA}	1,13 ± 0,04 ^{eB}	3,24 ± 0,37 ^{cA}	2,28 ± 0,07 ^{dB}

* Médias ± desvio-padrão com letras iguais em uma mesma coluna (minúsculas) e/ou em uma mesma linha (maiúsculas) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey).

A catequina, sofreu em média uma perda de 32% do conteúdo inicial, onde a fermentação contendo o inóculo fúngico apresentou teor menor significativamente ($p \leq 0,05$) em comparação com o processo controle. Em contrapartida, nota-se que a perda de epicatequina ao longo do processo fermentativo e após a secagem é mais acentuada, ocorrendo diminuição significativa após 72 horas, chegando ao final de todo processo com uma perda de mais de 70% do conteúdo inicial, processo que normalmente é observado, segundo o que já foi reportado de acordo com ALBERTINI et al. (2015); KIM; KEENEY, (1984) e PAYNE et al. (2010).

Tais decréscimos no teor de compostos fenólicos, principalmente da epicatequina, ocorrem devido às diversas reações bioquímicas que se sucedem ao longo do processo de fermentação e que continuam na secagem das amêndoas de cacau, onde as moléculas desses compostos participam nas reações enzimáticas e não-enzimáticas, responsáveis para a formação de cor, sabor e aroma das amêndoas de cacau (KIM; KEENEY, 1984; LUNA et al., 2002; QUIROZ-REYES; FOGLIANO, 2018).

Os teores de catequina e epicatequina são parâmetros estudados no IQC, onde é desejável que se disponha conteúdos iguais ou superiores a 0,08 e 2,22 mg/g, respectivamente, a fim de se dispor de um equilíbrio para a promoção da saúde e para que se tenha uma matéria-prima mais interessante para a indústria nos quesitos sensoriais e aromáticos (ARAUJO et al., 2014). Com isso, observa-se que neste estudo, o conteúdo final de catequina e epicatequina que mais se aproximaram do IQC, foi da fermentação conduzida com o inóculo do fungo *C. cladosporioides*, apresentando concentrações de 1,13 e 2,28 mg/g, respectivamente.

3.8 AÇÚCARES, ÁLCOOL E ÁCIDO ORGÂNICO

É possível observar na Tabela 9, a média da concentração dos açúcares (sacarose, glicose e frutose), do etanol e ácido acético ao longo do processo fermentativo e após a secagem de cacau em dois experimentos: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Tabela 9. Valores médios da concentração de açúcares (mg/g): sacarose, glicose e frutose, ao longo do tempo de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Tempo	Sacarose (mg/g)		Glicose (mg/g)		Frutose (mg/g)		Etanol (mg/g)		Ácido acético (mg/g)	
	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo
0 h	4,35 ±	5,82 ±	7,07 ±	6,99 ±	7,33 ±	7,23 ±	-	-	-	-
	1,37 ^{ba}	0,34 ^{ba}	2,61 ^{aA}	1,42 ^{aB}	2,72 ^{bcA}	1,51 ^{aA}	-	-	-	-
24 h	6,16 ±	8,91 ±	1,48 ±	1,59 ±	1,48 ±	2,11 ±	5,23 ±	12,14 ±	1,53 ±	1,97 ±
	2,98 ^{bb}	0,55 ^{aA}	1,17 ^{bcA}	0,21 ^{cdA}	0,48 ^{da}	0,19 ^{da}	0,68 ^{bb}	0,13 ^{aA}	0,07 ^{dB}	0,08 ^{eA}
48 h	4,35 ±	4,11 ±	4,47 ±	4,99 ±	8,25 ±	8,18 ±	15,10 ±	7,84 ±	6,08 ±	5,39 ±
	0,76 ^{aA}	0,38 ^{cA}	0,48 ^{aA}	0,16 ^{cdA}	0,77 ^{aA}	1,10 ^{da}	4,13 ^{aA}	0,08 ^{bb}	3,10 ^{aA}	0,57 ^{cdB}
72 h	-	0,36 ±	3,18 ±	3,55 ±	5,05 ±	4,93 ±	-	0,24 ±	13,68 ±	13,15 ±
	-	0,21 ^d	0,23 ^{abA}	0,26 ^{bA}	0,23 ^{bcA}	0,19 ^{cA}	-	0,08 ^c	0,22 ^{abA}	1,52 ^{aA}
96 h	-	-	3,19 ±	3,91 ±	5,29 ±	6,12 ±	-	-	9,05 ±	8,72 ±
	-	-	0,73 ^{abA}	0,20 ^{bA}	1,06 ^{bcA}	0,55 ^{bcA}	-	-	0,68 ^{bcA}	0,91 ^{bA}
120 h	-	-	2,40 ±	3,12 ±	3,53 ±	4,81 ±	-	-	3,47 ±	5,90 ±
	-	-	0,55 ^{abcA}	0,16 ^{bcA}	0,67 ^{cdB}	0,31 ^{cA}	-	-	0,23 ^{dB}	0,58 ^{cdA}
144 h	-	-	1,90 ±	4,88 ±	3,14 ±	6,72 ±	-	-	4,71 ±	8,27 ±
	-	-	0,38 ^{bcB}	0,26 ^{bA}	0,60 ^{cdB}	0,06 ^{bA}	-	-	0,54 ^{cdB}	0,47 ^{bA}
Seco	-	-	0,87 ±	0,94 ±	6,35 ±	5,15 ±	-	-	4,42 ±	2,85 ±
	-	-	0,08 ^{cA}	0,17 ^{dA}	1,18 ^{abA}	0,45 ^{bcA}	-	-	1,08 ^{cdA}	0,26 ^{deB}

* Médias ± desvio-padrão com letras iguais em uma mesma coluna (minúsculas) e/ou em uma mesma linha (maiúsculas) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey).

3.8.1 Açúcares

Em ambos os processos de fermentação, o teor de sacarose decresceu até abaixo do limite de quantificação da metodologia, sendo uma característica comum das sementes de cacau ao longo desse processo, pois segundo KONGOR et al. (2016) e PEREIRA et al. (2013), essa molécula é hidrolisada em glicose e frutose, através da atuação da enzima invertase excretada pelas leveduras presentes no meio.

Nota-se que a dinâmica das moléculas de açúcares ocorreu de maneira muito distinta nas primeiras 48 horas entre ambos os experimentos. Já a partir de 72 horas de fermentação, o consumo das moléculas de glicose e frutose apresentaram perfil semelhante, os quais, de acordo com FARAH et al. (2012), participam de reações de condensação com aminoácidos livres e peptídeos, através da reação de Maillard, gerando compostos responsáveis pelo sabor e aroma das amêndoas.

No entanto, ao final do processo fermentativo, a concentração de glicose e frutose apresentou diferença significativa entre os processos ($p \leq 0,05$), em que o teor de ambos os compostos foi maior no experimento com o fungo *C. cladosporioides*. Dessa maneira, essas moléculas ficaram disponíveis na secagem para reações de formação da cor, do sabor e aroma característicos, principalmente através da reação de Maillard, impactando de maneira positiva na formação desses atributos sensoriais (D'SOUZA et al., 2018).

Através da excreção de enzimas na polpa, como a celulase (DE ARAÚJO et al., 2019; HALABURGI et al., 2011; TORRES et al., 2017), o fungo *C. cladosporioides* pode ter proporcionado um consumo lento das moléculas de açúcares, gerando assim, maior concentração de substratos para a realização de reações bioquímicas durante a fermentação. Dessa maneira, ao final do processo fermentativo, obteve-se maior concentração de açúcares nas amêndoas, resultando em maior disponibilidade dessas moléculas para o desenvolvimento de compostos sensoriais importantes durante a secagem.

O teor de açúcares é um parâmetro estudado pelo IQC, onde é desejável que a sacarose tenha concentração máxima de 0,76 mg/g e que a glicose e a frutose estejam acima de 0,85 e 2,59 mg/g, respectivamente, para que haja melhor desenvolvimento dos atributos sensoriais

das amêndoas de cacau (ARAÚJO et al., 2014). Portanto, de acordo com o IQC, as amêndoas deste estudo estão dentro do estabelecido, quanto ao teor de açúcares.

3.8.2 Álcool e ácido orgânico

Tanto o etanol como o ácido acético são produtos da fermentação e, por conta disso, não se fazem presentes no tempo inicial do processo, como é possível observar na Tabela 9. É notável que ambos os compostos apresentaram diferença estatística em 24 e 48 horas do processo. O etanol é produto da metabolização das moléculas de açúcares pelas leveduras presentes no meio fermentativo (RAMOS et al., 2014). Esse composto foi produzido após 24 horas e logo foi consumido, ficando abaixo do limite de detecção após 48 e 72 horas, no experimento controle e com a cultura *starter*, respectivamente.

Pode-se observar na Tabela 2 que a população de leveduras no início da fermentação é alta, portanto, em 24 e 48 horas de ambos os processos, e em 72 horas também no experimento conduzido com a cultura *starter*, é detectada a presença de etanol. Este composto, no entanto, inibe o crescimento das próprias leveduras e, somado à menor disponibilidade de substrato para esses micro-organismos, a concentração de etanol diminui de maneira significativa.

Além disso, esse produto da fermentação é uma fonte de carbono para o metabolismo de bactérias acéticas, as quais o oxidam a ácido acético, podendo ser observado o aumento significativo na concentração deste composto em 48 horas de fermentação em ambos os experimentos. Já o decréscimo da concentração do ácido ocorre principalmente devido à evaporação, como consequência do aumento da temperatura somado aos revolvimentos diários da massa de fermentação (CAMU et al., 2007; NIELSEN; SNITKJAER; BERG, 2008).

A concentração de ácido acético nas amêndoas de cacau é um parâmetro estudado pelo IQC, onde é estabelecido que o teor deve variar entre 0,93 a 3,60 mg/g, a fim de que haja um melhor desenvolvimento dos atributos sensoriais, atendendo, dessa forma, diretamente à indústria, além de proporcionar um produto funcional em termos de saúde. Neste estudo, o

experimento controle resultou na concentração de 4,42 mg/g, enquanto que na fermentação conduzida com o inóculo fúngico, foi de 2,85 mg/g. Com isso, este experimento alcançou o melhor resultado neste parâmetro.

3.9 AMINAS BIOATIVAS

É possível observar na Tabela 10 o teor de aminos bioativas nos tempos 0, 96 e 144 da fermentação de sementes de cacau e das amêndoas fermentadas e secas. Dentre os nove compostos analisados, seis foram detectados: uma poliamina (espermidina) e cinco aminos biogênicas (putrescina, cadaverina, triptamina, tiramina e feniletilamina).

Dentre as amostras analisadas, no tempo 0 da fermentação não foi possível detectar teor de aminos. Esse fato provavelmente pode ter ocorrido pela baixa concentração desses compostos no cacau fresco, uma vez que são formados ao longo do processo fermentativo (BRITO et al., 2017).

É possível observar que a espermidina se faz presente na fermentação conduzida com o inóculo de *C. cladosporioides* já em 96 horas do processo, enquanto que no experimento controle, somente a partir de 144 horas. Conforme FARIDUDDIN et al. (2013) e PRABHAVATHI, RAJAM (2007), isso pode ter ocorrido devido à uma das funções que a espermidina possui em plantas: aumentar a vida útil em condições de estresse, incluindo a presença de fungos. Portanto, a presença do inóculo utilizado neste estudo pode ter induzido uma resposta mais acelerada na síntese dessa amina, com o intuito de proteger as sementes.

A presença de putrescina normalmente é associada com putrefação da matéria (HUI, 2005). No entanto, é um importante intermediário em uma das vias de síntese das poliaminas (FARAH, 2019; MIAO et al., 2018). A maior concentração dessa amina no experimento conduzido com o inóculo de *C. cladosporioides* pode ter sido ocasionada pela adição dessa cultura *starter*, a qual pode ter aumentado a concentração de descarboxilases, dentre elas, a ornitina descarboxilase, a qual cataboliza a ornitina, precursora de uma das vias de síntese da putrescina.

Tabela 10. Valores médios da concentração de aminos bioativas (mg/kg) nos tempos 0, 96 e 144 horas de fermentação de sementes de cacau e nas amêndoas fermentadas e secas de dois experimentos: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Tempo	Aminas bioativas (mg/kg)											
	Espermidina		Putrescina		Cadaverina		Triptamina		Tiramina		Feniletilamina	
	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo	Controle	Inóculo
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		11,68 ±					2,39 ± <	3,14 ± <		38,24 ±	3,65 ±	6,02 ±
96	-	0,18 ^a	-	-	-	-	0,01 ^{aA}	0,01 ^{aA}	-	3,71 ^a	2,43 ^{aB}	0,25 ^{aA}
	8,99 ± <	10,67 ±	2,77 ± <	6,97 ±	0,73 ± <	6,03 ±			32,18 ±	38,25 ±	3,97 ± <	5,51 ±
144	0,01 ^{aA}	0,95 ^{aA}	0,01 ^B	0,03 ^{aA}	0,01 ^B	0,10 ^{aA}	-	-	< 0,01 ^{bB}	0,09 ^{aA}	0,01 ^{aB}	0,08 ^{aA}
	9,04 ± <	7,71 ±		5,15 ±		3,70 ±	2,23 ±	0,63 ±	35,78 ±	39,21 ±	4,38 ±	5,36 ±
Seco	0,01 ^{aA}	0,28 ^{bB}	-	0,32 ^b	-	0,28 ^b	0,60 ^{aA}	0,62 ^{bA}	0,93 ^{aB}	1,54 ^{aA}	0,01 ^{aB}	0,16 ^{aA}

* Médias ± desvio-padrão com letras iguais em uma mesma coluna (minúsculas) e/ou em uma mesma linha (maiúsculas) – do mesmo composto – não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey).

Da mesma forma, a presença de cadaverina não é muito desejável devido à associação com a decomposição da matéria-prima (HUI, 2005). Essa amina é sintetizada a partir da catabolização da lisina, através da enzima lisina descarboxilase (FARAH, 2019; MIAO et al., 2018), a qual também pode ter tido sua concentração aumentada devido à presença do inóculo fúngico no respectivo experimento de fermentação.

No entanto, estudos já mostraram que a putrescina e cadaverina são moléculas que podem ser benéficas no processo de proteção da matéria-prima, através da inibição da peroxidação lipídica e da prevenção da senescência. Além disso, se mostraram eficientes na eliminação de radicais livres em ensaio *in vitro* (DROLET et al., 1986; HUI, 2005).

O teor de triptamina não sofreu influência significativa pelo *C. cladosporioides*. Essa molécula é naturalmente presente em plantas, pois auxilia na biossíntese de hormônios de crescimento (SMITH, 1977). Além disso, pode ser utilizada como precursora na formação de alcaloides, os quais, nas amêndoas de cacau, apresentam grande importância no amargor característico (RUNGUPHAN; MARESH; O'CONNOR, 2009; TUENTER et al., 2020).

A presença de tiramina nas amêndoas fermentadas e secas é predominante, responsável por 66,53%, em média, do teor total de aminas bioativas. Observa-se que esse composto sofreu influência significativa na presença do inóculo fúngico, fato que pode ser atribuído pela presença maior de descarboxilase no meio fermentativo, uma vez que, de acordo com FARAH (2019) e MIAO et al. (2018), a tiramina é produto da descarboxilação da tirosina.

Dependendo da concentração, esse composto pode ser benéfico à saúde, sendo correlacionado à liberação de neurotransmissores, como dopamina, noradrenalina e serotonina (HUI, 2005). No entanto, ainda não há legislação vigente para determinar o limite máximo de tiramina, porém, recomenda-se que os alimentos contenham de 100 a 800 mg/kg (HALÁSZ et al., 1994).

A feniletilamina sofreu influência significativa na presença do *C. cladosporioides* na massa de fermentação do cacau, podendo ter havido aumento na concentração de descarboxilases excretadas pelo fungo, ampliando a síntese dessa amina bioativa, pois, segundo FARAH (2019), a feniletilamina é produto da descarboxilação da fenilalanina. Essa amina também possui grande importância na atividade de neurotransmissores, similar à

tiramina, no entanto, em certas concentrações, pode ser tóxico, afetando os sítios de ligação da serotonina no cérebro humano, portanto, é recomendável que esse composto esteja presente no teor máximo de 30 mg/kg nos alimentos (HALÁSZ et al., 1994).

3.10 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Foram detectados 27 compostos voláteis, no total, os quais foram agrupados em 8 famílias: álcool, aldeídos, cetona, ésteres, furano, hidrocarbonetos, pirazina e terpeno. Na Tabela 11 é possível observar em quais amostras cada composto fora identificado e a descrição aromática do mesmo.

3.10.1 Variação de aldeídos

Seis aldeídos foram identificados em ambos os experimentos de fermentação, onde o comportamento desses compostos ao longo dos processos se deu de maneira semelhante. Destaca-se no início a presença significativa de n-hexanal, o qual, segundo CRAFTACK et al. (2014), possui um odor marcante, perfil da maioria das moléculas provenientes de precursores lipídicos.

Ao longo e ao final do processo, destaca-se a presença de fenilacetaldeído, que, conforme CRAFTACK et al. (2014), é um importante componente aromático para a produção do principal produto, o chocolate. Em seguida, notabiliza-se o benzaldeído, o qual, de acordo com UTRILLA-VÁZQUEZ et al. (2020), apresenta a característica aromática de açúcar queimado, remetendo ao amargor das amêndoas de cacau.

Esses compostos, assim como grande parte dos aldeídos no cacau, podem ser formados a partir da degradação de Strecker, uma das etapas da reação de Maillard, onde há a geração de componentes voláteis e aromáticos a partir da degradação de moléculas de aminoácidos hidrofóbicos, como alanina, valina, leucina e isoleucina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2018).

Tabela 11. Valores médios da concentração (%) de compostos voláteis nos tempos de 0, 96 e 144 horas ao longo da fermentação e de amêndoas fermentadas e secas, de dois experimentos de fermentação de cacau: controle e com inoculação do fungo *C. cladosporioides*.

Grupos	Compostos	IR	Descrição do Aroma	Controle				Com Inóculo			
				0 h	96 h	144 h	Seco	0 h	96 h	144 h	Seco
Álcool	2-Heptanol	894	Cítrico, fresco, limão		0,32						
					$\pm 0,00$						
					0,32						
Aldeídos	(E,E)-2,4-Decadienal	1315	Ceroso	1,23 \pm				0,98 \pm			
				0,84				0,01			
Aldeídos	5-metil-2-fenil-2-hexenal	1489	Doce, cacau torrado			0,31 \pm					
						0,00					
Aldeídos	Benzaldeído	954	Amêndoa amarga	1,03 \pm	3,54	5,87 \pm	2,70 \pm		4,20 \pm	6,39 \pm	4,14 \pm
				0,00	$\pm 0,00$	0,30	0,00		2,07	1,03	0,25
Aldeídos	Fenilacetaldéido	1039	Mel, florado	8,38 \pm	69,78 \pm	85,30 \pm	28,21 \pm	7,20 \pm	79,68 \pm	85,41 \pm	28,80 \pm
				4,63	0,00	8,39	1,95	1,46	10,06	1,95	0,26
Aldeídos	N-Hexanal	793	Ervas, grama	80,74 \pm				82,55 \pm			
				1,75				3,85			
Aldeídos	N-Nonanal	1102	Seboso, gorduroso	0,78 \pm							
				0,00							
			Total	92,15	73,32	91,48	30,91	90,72	83,88	91,80	32,93
Cetona	Acetofenona	1062	Mosto, florado,	0,96			4,00 \pm				6,16 \pm

		amendado, doce	$\pm 0,00$							0,07			0,64
		Total	0,96							4,00			6,16
	2-Fenetil acetato	1255	Frutado, doce, floral	$3,47 \pm$ $1,76$	$1,42 \pm$ $0,63$	$3,95 \pm$ $0,67$		$3,43 \pm$ $3,15$	$1,32 \pm$ $0,17$				$6,49 \pm$ $0,57$
	2-Metilbutil acetato	883		$1,50 \pm$ $0,00$									
	Acetato de isopentila	867		$11,04 \pm$ $4,87$		$4,05 \pm$ $1,26$		$10,10 \pm$ $0,00$					$3,94 \pm$ $0,00$
	Acetoacetato de isoamila	880	Banana, pera			$0,51 \pm$ $0,00$							$0,24 \pm$ $0,00$
	Benzoato de isoamila	1393	Bálsamo, doce	$3,27 \pm$ $0,54$	$2,35 \pm$ $1,88$	$3,12 \pm$ $1,36$	$1,44 \pm$ $0,62$	$5,51 \pm$ $0,81$	$2,30 \pm$ $0,27$	$2,64 \pm$ $0,75$			$1,27 \pm$ $0,35$
	Decanoato de etila	1395	Pera, uva				$0,21 \pm$ $0,12$						
	Dodecanoato de etila	1594	Frutado, floral									$0,33 \pm$ $0,00$	
	Fenilacetato de etila	1243	Doce, frutado, mel		$0,56 \pm$ $0,00$				$0,60 \pm$ $0,25$	$0,47 \pm$ $0,07$			
	Hexadecanoato de etila	1993		$0,89 \pm$ $0,67$	$0,50 \pm$ $0,00$					$0,13 \pm$ $0,00$			
	Octanoato de etila	1196	Frutado, floral, abacaxi	$5,10 \pm$ $3,08$	$2,85 \pm$ $0,00$	$0,63 \pm$ $0,00$		$2,55 \pm$ $1,29$	$1,93 \pm$ $0,42$				$0,49 \pm$ $0,21$

Ésteres

			Total	3,27	24,90	7,88	10,78	5,51	18,97	6,82	12,42
Furano	2-pentil-furano	988	Semente verde,	4,04 ±				3,31 ±			
			frutado	1,65			1,53				
			Total	4,04			3,31				
	Dodecano	1199		0,16 ±			0,45 ±				
				0,00			0,00				
	Estireno	887	Bálsamo				7,09 ±				6,45 ±
							2,22				1,03
Hidrocarbonetos	Etilbenzeno	853					1,53 ±				0,90 ±
							0,84				0,01
	Naftaleno	1181	Enxofre, pungente	0,41 ±							
				0,00							
	Tridecano	1299		0,30 ±			0,52 ±				0,24 ±
				0,00			0,31				0,11
			Total	0,87			9,59				7,59
Pirazina	Tetrametilpirazina	1084	Café com leite,				45,04 ±				43,17 ±
			torrado, chocolate				7,35				1,78
			Total				45,04				43,17
Terpeno	Linalol	1098	Florado	0,72 ±	4,93 ±	3,17 ±	0,81 ±				0,23 ±
				0,00	1,44	0,00	0,20				0,00
			Total	0,72	4,93	3,17	0,81				0,23

*IR: índice de retenção calculado.

O fenilacetaldeído e o benzaldeído são formados a partir da degradação da fenilalanina, podendo ser pela degradação de Strecker (AFOAKWA et al., 2008; BECKETT, 2009), mas também através da metabolização desse aminoácido pelas bactérias lácticas presentes no meio fermentativo (BONNARME et al., 2004; SMIT; SMIT; ENGELS, 2005). Pode-se notar que após a secagem das amêndoas de cacau, tem-se teores semelhantes desses dois compostos em ambos os experimentos de fermentação.

3.10.2 Variação de ésteres

Foram identificados dez ésteres, dos quais seis estavam presentes nas amêndoas fermentadas e secas do experimento controle, e cinco nas do experimento conduzido com o inóculo fúngico. A família dos ésteres é caracterizada por apresentar aromas de notas frutadas, adocicadas e floradas, representando um grupo químico importante nas amêndoas de cacau, onde a maioria são produtos da esterificação do ácido acético e etanol (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012).

É possível observar que em ambos os experimentos, a concentração de ésteres apresentou aumento significativo em 96 horas da fermentação, sofrendo um grande declínio ao final e aumentou levemente após a secagem, ou seja, houve oscilação no teor desses compostos, dependendo do tempo de fermentação, que foi o mesmo observado por HAMDOUCHE et al. (2019).

Portanto, o acentuado aumento de ésteres observado em 96 horas de fermentação pode ter sido ocasionado pela alta concentração de álcool e ácido acético em 48 e 72 horas, respectivamente (Tabela 9). Já o decréscimo dessa classe de compostos com o decorrer do processo, é um perfil comum observado (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012). Nota-se que ao final da secagem das amêndoas fermentadas, ambos os experimentos apresentaram teores semelhantes de ésteres de 10,78% e 12,42% na fermentação controle e na conduzida com cultura *starter*, respectivamente.

3.10.3 Variação de hidrocarbonetos

Seis hidrocarbonetos foram identificados, onde apenas no experimento controle foram identificados compostos em um dos tempos da fermentação (0 horas), porém, em baixa concentração (0,87%), o que corrobora com estudos anteriores, nos quais essa classe não apresentou compostos aromáticos ao longo do processo fermentativo (ACULEY et al., 2010; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011, 2012).

Observou-se, portanto, que os hidrocarbonetos se fazem presente, majoritariamente, após o processo de secagem. É comum que os compostos aromáticos sejam desenvolvidos ao longo do processo fermentativo ou após o término, uma vez que é na fermentação e secagem que ocorrem diversas reações bioquímicas de formação dos aromas característicos das amêndoas de cacau (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2018; TRAN et al., 2015).

Quatro compostos aromáticos estavam presentes nas amostras secas provindas da fermentação controle, enquanto que no experimento conduzido com inóculo fúngico, três. No entanto, nota-se que o total de compostos são semelhantes entre os processos, onde se predomina o estireno em ambos, responsável por, em média, 82,16% do total de hidrocarbonetos presentes.

3.10.4 Variação de demais compostos

Em relação ao teor de álcool entre as amostras analisadas, encontrou-se apenas o 2-heptanol, em baixa concentração (0,32%), no tempo de 96 horas da fermentação controle e não se identificou nas demais amostras, corroborando com o que foi encontrado no perfil de etanol em ambos os experimentos (Tabela 9), onde no processo controle, esse composto foi identificado em 24 e 48 horas e no conduzido com inóculo fúngico, em 24, 48 e 72 horas.

A molécula de cetona identificada foi a acetofenona, a qual foi encontrada no tempo 0 da fermentação controle, em baixa concentração (0,96%), e nas amêndoas fermentadas e secas de ambos os experimentos em teores semelhantes entre si. A acetofenona, assim como a

maioria dos aldeídos, também é provinda a partir da degradação de Strecker, a partir da fenilalanina (BECKETT, 2009; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012).

Na família do furano, identificou-se o 2-pentil-furano, no tempo 0 de ambos os experimentos, corroborando ao que UTRILLA-VÁZQUEZ et al. (2020), reportaram: grande parte das moléculas dessa classe se fazem presentes no início da fermentação.

Tetrametilpirazina foi a molécula identificada na família da pirazina, em teores semelhantes em ambos os experimentos após a secagem das amêndoas fermentadas. Estudos apontam que essa molécula pode ser obtida tanto a partir da atividade microbiana durante a fermentação (SCHWAN; WHEALS, 2004; ZAK; OSTOVAR; KEENEY, 1972), como pela degradação de Strecker, a partir da oxidação de aminocetonas (BECKETT, 2009; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012).

O terpeno identificado foi o linalol, onde na fermentação controle se apresentou em todas as amostras analisadas, chegando ao fim do processo com teor de 0,81%, enquanto que na conduzida com a cultura *starter*, apenas após a secagem com 0,23%. O estudo de SCHWAN; FLEET (2014), aponta que esse composto é resultado do catabolismo da leucina, pela espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, além de que o linalol também é um constituinte natural da polpa do cacau que pode ser transferido para o cotilédone.

É possível observar, portanto, que a presença da cultura *starter* no processo de fermentação de sementes de cacau não exerceu influência significativa na formação de compostos aromáticos nas amêndoas fermentadas e secas.

3.11. ANÁLISE MULTIVARIADA DOS EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO

Nos experimentos de fermentação, os dois primeiros componentes (PC1 + PC2) explicaram 60,10 e 60,79% da variância dos dados, na fermentação controle e com inóculo fúngico, respectivamente, levando em consideração os parâmetros analisados: temperatura; contagem de leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas; pH; acidez total titulável; catequina; epicatequina; sacarose; glicose; frutose; etanol; ácido acético; triptamina; tiramina; espermidina; feniletilamina; cadaverina; putrescina e compostos fenólicos totais (Figura 7).

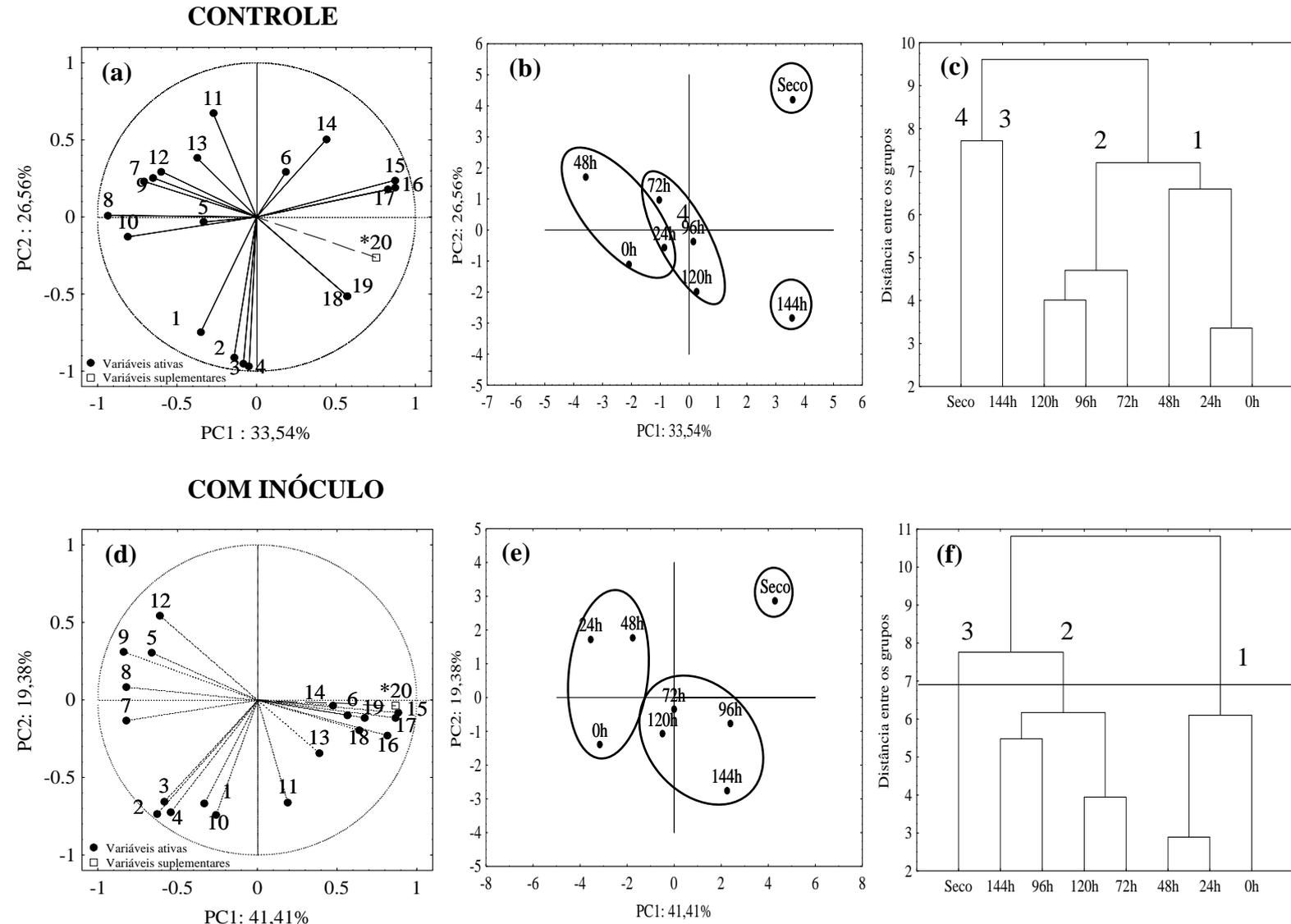


Figura 7. Análise do componente principal (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA) ao longo da fermentação de sementes e após a secagem de amêndoas de cacau do experimento controle e com cultura starter de *Cladosporium cladosporioides*. 1: temperatura, 2: contagem de leveduras, 3: bactérias lácticas, 4: bactérias acéticas, 5: pH, 6: acidez total titulável, 7: catequina, 8: epicatequina, 9: sacarose, 10: glicose, 11: frutose, 12: etanol, 13: ácido acético, 14: triptamina, 15: tiramina, 16: espermidina, 17: feniletilamina, 18: cadaverina, 19: putrescina, 20: compostos fenólicos totais.

A fermentação controle foi separada em quatro grupos, considerando suas similaridades (Figura b e c), no qual o primeiro grupo é constituído pelos tempos 0, 24 e 48 horas (início da fermentação), caracterizado pela alta presença de leveduras e bactérias lácticas, alto pH e presença de sacarose. O segundo grupo é formado pelos tempos 72, 96 e 120 horas (meio da fermentação), sendo marcado pela temperatura elevada, alta acidez total titulável, alta concentração de ácido acético e alta presença de bactérias acéticas. O tempo de 144 horas

(final da fermentação) compõe o terceiro grupo, caracterizado pelos baixos teores de compostos fenólicos totais, catequina, glicose e frutose, havendo a presença de putrescina e cadaverina, e alta presença de leveduras, bactérias lácticas e acéticas. O quarto grupo é constituído pelas amêndoas secas, as quais apresentam baixo teor de catequina, epicatequina e glicose e presença de espermidina, triptamina, tiramina e feniletilamina.

Já a fermentação conduzida com inóculo fúngico foi separada em três grupos (Figura e e f), sendo o primeiro grupo constituído pelos tempos 0, 24 e 48 horas (início da fermentação), determinado pela alta presença de leveduras e bactérias lácticas, alto pH e presença de sacarose. O segundo grupo é composto pelos tempos 72, 96, 120 e 144 horas (meio e final da fermentação), apresentando temperatura, acidez total titulável e presença de bactérias acéticas altas. Já o terceiro grupo é formado pelas amêndoas secas, as quais apresentam baixo teor de compostos fenólicos totais, catequina, epicatequina, glicose e ácido acético, possuindo presença das seis aminas bioativas.

Como é possível observar na Figura a e d, houve correlação negativa entre tiramina, espermidina, feniletilamina, cadaverina, putrescina e compostos fenólicos totais, tanto no experimento controle como no conduzido com inóculo fúngico ($r = -0,63, -0,65, -0,75, -0,64$ e $-0,64$ e $r = -0,73, -0,65, -0,70, -0,60$ e $-0,63$, respectivamente), indicando que a baixa concentração de compostos fenólicos é favorável para a formação dessas aminas bioativas.

Considerando os dados observados a partir da análise multivariada, é possível notar que o início da fermentação de ambos os experimentos ocorreu de maneira similar. No entanto, no decorrer do tempo, ocorreram mudanças que influenciaram no final do processo, no qual o experimento conduzido com o inóculo fúngico de *C. cladosporioides* apresentou menor concentração de compostos fenólicos totais e ácido acético, promovendo melhores atributos sensoriais, em termos de cor, sabor e aroma, além disso, nesse experimento, houve presença das seis aminas bioativas detectadas, as quais, conforme RUNGUPHAN, MARESH, O'CONNOR (2009) e TUENTER et al. (2020), espermidina, putrescina e cadaverina promovem maior proteção da matéria-prima, a triptamina é um importante precursor para a formação do sabor e de acordo com HALÁSZ et al. (1994) e HUI (2005), tiramina e feniletilamina são relevantes para a promoção da saúde neurológica.

4 CONCLUSÕES

Através deste estudo inédito, foram observadas diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos totais, catequina, epicatequina, ácido acético, espermidina, putrescina, cadaverina, tiramina e feniletilamina entre o cacau fermentado sem e com inóculo do fungo *C. cladosporioides*, além de que neste, apresentaram maiores porcentagens de amêndoas bem fermentadas. A presença do inóculo fúngico, no entanto, não exerceu influência significativa nas moléculas aromáticas das amêndoas de cacau. Através da análise multivariada, pôde-se confirmar tais diferenças, além de diferenciar os grupos de ambas as fermentações de acordo com as similaridades. Portanto, o *C. cladosporioides* exerceu influência negativa nos teores de compostos fenólicos, o que favoreceu a formação de moléculas responsáveis na formação do sabor, aroma e cor característicos das amêndoas de cacau, além de apresentar maior concentração de aminas bioativas. Dessa maneira, este estudo mostra, de maneira inédita, que a presença de fungos filamentosos na fermentação de sementes de cacau pode ser benéfica, sendo necessário mais estudos a fim de se conhecer a concentração que proporcione melhorias em aspectos como sabor e aroma, das amêndoas de cacau.

REFERÊNCIAS

- ACULEY, P. C. et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 300–307, 2010.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Texensis Publishing**, p. 698, 2017.
- ADÃO, R. C.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of “Prata” banana (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*). **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 705–711, 2005.
- ADLE, P. et al. The key to acetate: Metabolic fluxes of acetic acid bacteria under cocoa pulp fermentation simulating conditions. n. May, 2014.
- AFOAKWA, E. **Cocoa Production and Processing Technology**. [s.l.] CRC Press, 2014.
- AFOAKWA, E. O. et al. 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.
- AFOAKWA, E. O. et al. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 6, p. 1097–1105, 15 dez. 2011.
- AFOAKWA, E. O. et al. Changes in the Polyphenol in Fermented Beans. v. 19, n. 3, p. 1071–1077, 2012.
- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016.
- AGUS, B. A. P.; MOHAMAD, N. N.; HUSSAIN, N. Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malaysia. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 4, p. 2581–2589, 2018.
- AKINFALA, T. O. et al. Moulds and their secondary metabolites associated with the fermentation and storage of two cocoa bean hybrids in Nigeria. **International Journal of**

Food Microbiology, v. 316, n. August 2019, p. 108490, 2020.

ALBERTINI, B. et al. Effect of Fermentation and Drying on Cocoa Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 45, p. 9948–9953, 2015.

ALLGROVE, J.; DAVISON, G. Dark Chocolate/Cocoa Polyphenols and Oxidative Stress. In: **Polyphenols in Human Health and Disease**. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 1p. 241–251.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 42, de 29 de Agosto de 2013. p. 17, 2013.

APROTOSOAIÉ, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 73–91, 2016.

ARAÚJO, J. A. DE et al. Filamentous Fungi not Reported in the Fermentation of Amazonian Cocoa : Molecular Identification and Enzymatic Potential. 2017.

ARAUJO, Q. R. et al. Cocoa Quality Index: A proposal. **Food Control**, v. 46, p. 49–54, 2014.

ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1–2, p. 87–99, 2003.

BARTLEY, B. G. D. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. Wallingford: CABI, 2005.

BASTOS, S. C. et al. Pectinases from a New Strain of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries Isolated from Coffee Bean. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 2, p. 167–172, 2013.

BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition**. [s.l: s.n.].

BENSCH, K. et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1–94, 2010.

BENSCH, K. et al. The genus *cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1–401, 2012.

BERTAZZO, A. et al. The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 93–96, 2011.

BIEHL, B. et al. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, n. 7, p. 583–598, 1985.

BONETTI, F.; BROMBO, G.; ZULIANI, G. **Nootropics, Functional Foods, and Dietary Patterns for Prevention of Cognitive Decline**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

BONNARME, P. et al. Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from L-methionine by *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 1, p. 85–90, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 38, de 13 de jun. de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau. **Diário Oficial da União**, p. 2, 2008.

BRITO, B. DE N. DO C. et al. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chemistry**, v. 228, p. 484–490, 2017.

BROWN, S. W. et al. Ethanol Inhibition of Yeast Growth and Fermentation: Differences in the Magnitude and Complexity of the Effect. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, p. 151–155, 1981.

CAMPBELL, C. K.; JOHNSON, E. M.; WARNOCK, D. W. **Identification of Pathogenic Fungi**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2013.

CAMU, N. et al. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. 2007.

CARDELLO, A. V. Food quality: Relativity, context and consumer expectations. **Food Quality and Preference**, v. 6, n. 3, p. 163–170, 1995.

CEMPAKA, L. et al. Dynamics of Cocoa Bean Pulp Degradation during Cocoa Bean Fermentation: Effects of Yeast Starter Culture Addition. **Journal of Mathematical and Fundamental Sciences**, v. 46, n. 1, p. 14–25, 2014.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M. et al. Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.

- CHAGAS JUNIOR, G. C. A. et al. Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. **Food Chemistry**, v. 338, p. 127834, fev. 2021.
- COPETTI, M. V. et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 1–2, p. 67–70, 2010.
- COPETTI, M. V. et al. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 178, p. 13–20, 2014.
- COPETTI, M. V. et al. Mycobiota of cocoa : From farm to chocolate. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1499–1504, 2011.
- CRAFACK, M. et al. 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.
- D'SOUZA, R. N. et al. Degradation of cocoa proteins into oligopeptides during spontaneous fermentation of cocoa beans. **Food Research International**, v. 109, n. April, p. 506–516, 2018.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. [s.l: s.n.].
- DE ARAÚJO, J. A. et al. Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 975–987, 20 set. 2019.
- DE SILVA, N. I. et al. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 133–148, mar. 2019.
- DE VUYST, L.; STEFAN, W. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. In: **Animal Genetics**. [s.l: s.n.]. v. 39p. 561–563.
- DE VUYST, L.; WECKX, S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 5–17, 2016.
- DEACON, J. **Fungal Biology**. Malden, MA USA: Blackwell Publishing Ltd., 2005. v. 11

- DOMÍNGUEZ-PÉREZ, L. A. et al. Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 73, n. 46, p. 104134, out. 2020.
- DROLET, G. et al. Radical scavenging properties of polyamines. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 367–371, jan. 1986.
- FAGUNWA, A. O.; KOYA, O. A.; FAVORODE, M. O. Development of an Intermittent Solar Dryer for Cocoa Beans. **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, v. XI, n. 1292, p. 1–14, 2009.
- FARAH, A. **Coffee. Production, Quality and Chemistry**. London: Royal Society of Chemistry, 2019.
- FARAH, D. M. H. et al. Effect of Roasting Process on the Concentration of Acrylamide and Pyridines in Roasted Cocoa Beans from Different Origins. **APCBEE Procedia**, v. 4, p. 204–208, 2012.
- FARIDUDDIN, Q. et al. Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2013.
- FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C. et al. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, n. April, p. 41–50, 2019.
- GALLA, M. I. et al. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation , drying and roasting. v. 288, n. September 2000, p. 281–288, 2001.
- GARCÍA-ALAMILLA, P. et al. Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 4, p. 1159–1165, 2007.
- GIFFORD, D. R.; SCHOUSTRA, S. E. Modelling colony population growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of Theoretical Biology**, v. 320, p. 124–130, 2013.
- GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. **Developments in fungal taxonomy**. [s.l: s.n.]. v. 12

- HALABURGI, V. M. et al. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1146–1152, 2011.
- HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 42–49, 1994.
- HAMDOUCHE, Y. et al. Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. **Food Research International**, v. 119, n. March 2018, p. 477–491, 2019.
- HE, Q. et al. Simultaneous determination of caffeine and catechins in tea extracts by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 33, n. 4, p. 491–498, 2010.
- HERMAN, C. et al. Convective drying of fermented Amazonian cocoa beans (*Theobroma cacao* var. Forasteiro). Experiments and mathematical modeling. **Food and Bioprocess Processing**, v. 108, p. 81–94, 2018.
- HO, V. T. T.; ZHAO, J.; FLEET, G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 72–87, 2014.
- HO, V. T. T.; ZHAO, J.; FLEET, G. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 54–67, 2015.
- HOLM, C. S.; ASTON, J. W.; DOUGLAS, K. The effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 61, n. 1, p. 65–71, 1993.
- HUANG, Y. et al. Exploring potential bacterial and fungal biocontrol agents transmitted from seeds to sprouts of wheat. **Biological Control**, v. 98, p. 27–33, 2016.
- HUE, C. et al. Impact of fermentation on nitrogenous compounds of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from various origins. **Food Chemistry**, v. 192, p. 958–964, 2016.
- HUI, Y. H. **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - 4 Volume Set**. London: CRC Press, 2005.

- HUMBERT-GOFFARD, A. et al. An assay for glucanase activity in wine. v. 34, p. 537–543, 2004.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Agrícola. 2020.
- JAHURUL, M. H. A. et al. Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 467–476, 2013.
- JAMPÍLEK, J.; KRÁLOVÁ, K. **Impact of nanoparticles on toxigenic fungi**. [s.l.: s.n.].
- JINAP, S.; DIMICK, P. S. Acidic Characteristics of Fermented and Dried Cocoa Beans from Different Countries of Origin OF FOOD SCIENCE-547. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 2, p. 547–550, 1990.
- JINAP, S. M.; NAZAMID, S.; JAMILAH, B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 407–417, 2002.
- KEALEY, K. S. et al. Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same medical uses. **Patent Corporation Treaty (PCT) WO 98/09533**, 1998.
- KEDJEBO, K. B. D. et al. Effect of post-harvest treatments on the occurrence of ochratoxin a in raw cocoa beans. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 33, n. 1, p. 157–166, 2015.
- KIM, H.; KEENEY, P. G. (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented cocoa beans. **Journal of food science**, v. 49, p. 1090–1092, 1984.
- KÖHL, J. J. et al. Selection and orchard testing of antagonists suppressing conidial production by the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, n. 4, p. 401–414, 2009.
- KONGOR, J. E. et al. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. **Food Research International**, v. 82, p. 44–52, 2016.
- KRATZER, U. et al. Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa

- seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 903–913, 2009.
- KUMAR, N. S. M.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 150–158, 2013.
- LAMBERT, J. D. Cocoa and human health. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 6, p. 933–933, 2013.
- LATORRE, B. A.; BRICEÑO, E. X.; TORRES, R. Increase in *Cladosporium* spp. populations and rot of wine grapes associated with leaf removal. **Crop Protection**, v. 30, n. 1, p. 52–56, 2011.
- LEFEBER, T. et al. Interesting Starter Culture Strains for Controlled Cocoa Bean Fermentation Revealed by Simulated Cocoa Pulp Fermentations of Cocoa-Specific Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 6694–6698, 2011.
- LEFEBER, T. et al. 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.
- LIMA, LÍ. J. R. et al. *Theobroma cacao* L., “the food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 8, p. 731–761, 2011.
- LUNA, F. et al. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3527–3532, 2002.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. [s.l: s.n.]. v. 14
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi : Their Physiology and Enzymes Thermophilic Fungi : Their Physiology and Enzymes †. v. 64, n. 3, 2000.
- MARSEGLIA, A. et al. Extraction, identification and semi-quantification of oligopeptides in cocoa beans. **Food Research International**, v. 63, p. 382–389, 2014.

- MARSEGLIA, A. et al. Volatile fingerprint of unroasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from different geographical origins. **Food Research International**, v. 132, p. 109101, 2020.
- MARTINS, J. M. et al. Melhoria da Qualidade do Cacau. **CEPLAC/CENEX**, p. 48, 2011.
- MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi : Going places ? A review. v. 67, p. 2318–2331, 2006.
- MEDINA-PRADAS, E. et al. Review of Vegetable Fermentations With Particular Emphasis on Processing Modifications, Microbial Ecology, and Spoilage. **The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers**, p. 211–236, 2017.
- MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. April, p. 124–130, 2017.
- MIAO, L. Y. et al. Transcriptome analysis of a taxol-producing endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* MD2. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 2018.
- MIGUEL, M. G. DA C. P. et al. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **LWT**, v. 77, p. 362–369, abr. 2017.
- MOENS, F. et al. Oxidation of Metabolites Highlights the Microbial Interactions and Role of *Acetobacter pasteurianus* during Cocoa Bean Fermentation. v. 80, n. 6, p. 1848–1857, 2014.
- MOJSOV, K. D. **Aspergillus Enzymes for Food Industries**. [s.l.] Elsevier B.V., 2016.
- MOREIRA, I. M. DA V. et al. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 9–17, 2013.
- MOTAMAYOR, J. C. et al. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, 2008.
- MOUNJOUENPOU, P. et al. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 234–241, 2008.

NAM, M. H. et al. Cladosporium cladosporioides and C. tenuissimum cause blossom blight in strawberry in Korea. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 354–359, 2015.

NAZARUDDIN, R. et al. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (Theobroma Cacao) during fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 1, p. 87–94, 2006.

NICOLAS, J. et al. BROWNING | Enzymatic – Biochemical Aspects. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. [s.l.] Elsevier, 2003. p. 678–686.

NIELSEN, D. S.; SNITKJAER, P.; BERG, F. VAN DEN. Investigating the fermentation of cocoa by correlating Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiles and Near Infrared spectra. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 133–140, 2008.

OOI, T. S.; TING, A. S. Y.; SIOW, L. F. Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. **Lwt**, v. 122, p. 108977, 2020.

OSTOVAR, K.; KEENEY, P. G. Isolation and Characterization in the Fermentation of F Trinidad. **Journal of food science**, v. 38, n. 7973, p. 611–6117, 1973.

OUATTARA, H. D. et al. Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 256, n. May, p. 11–19, 2017.

PAPALEXANDRATOU, Z. et al. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1326–1338, 2011.

PASIN, L. A. A. P.; ABREU, M. S. DE; SOUZA, I. P. Influence of the fungi population on the physicochemical and chemical composition of coffee (Coffea arabica L.). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 3, p. 681–687, 2011.

PAYNE, M. J. et al. Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10518–10527, 2010.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-

design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 121–133, 2013.

PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. DE. Characterization and dynamic of colonization of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries in coffee fruits (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1112–1116, 2005.

PHUTELA, U. et al. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 63–69, mar. 2005.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. [s.l: s.n.].

PŁONKA, J.; MICHALSKI, A. The influence of processing technique on the catecholamine and indolamine contents of fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 57, p. 102–108, 2017.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PRABHAVATHI, V. R.; RAJAM, M. V. Polyamine accumulation in transgenic eggplant enhances tolerance to multiple abiotic stresses and fungal resistance. **Plant Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 273–282, 2007.

QIN, Y.; PAN, X.; YUAN, Z. Seed endophytic microbiota in a coastal plant and phytobeneficial properties of the fungus *Cladosporium cladosporioides*. **Fungal Ecology**, v. 24, p. 53–60, 2016.

QUESNEL, V. C. Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 16, n. 8, p. 441–447, ago. 1965.

QUIROZ-REYES, C. N.; FOGLIANO, V. Design cocoa processing towards healthy cocoa products: The role of phenolics and melanoidins. **Journal of Functional Foods**, v. 45, n. April, p. 480–490, 2018.

RAMLI, N. et al. HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Levels In Cocoa and Chocolate Products. **Malaysian Journal of Analytical Science**, v. 7, n. 2, p. 377–386,

2001.

RAMOS, C. L. et al. 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**, v. 64, p. 908–918, 2014.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed**. [s.l: s.n.].

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 250–258, 2011.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. et al. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 277–288, 2012.

ROHAN, T. A.; CONNELL, M. The Precursors of Chocolate Aroma : A Study Flavonoids and Phenolic Acids of the. p. 460–463, 1964.

ROJAS, V. et al. Measurement of alcohol acetyltransferase and ester hydrolase activities in yeast extracts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 2, p. 224–230, 2002.

RUNGUPHAN, W.; MARESH, J. J.; O’CONNOR, S. E. Silencing of tryptamine biosynthesis for production of nonnatural alkaloids in plant culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 13673–13678, 2009.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCHE, 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.

SÁNCHEZ-HERVÁS, M. et al. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 336–340, 2008.

SANDHYA, M. V. S. et al. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 731–738, 2016.

- SCHWAN, R. F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1477–1483, 1998.
- SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. **Cocoa and Coffee Fermentations**. [s.l.: s.n.].
- 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.
- SCHWAN, R.; PEREIRA, G.; FLEET, G. H. Microbial Activities during Cocoa Fermentation. **Cocoa and Coffee Fermentations**, n. January 2014, p. 129–192, 2014.
- SERRA, J. L. et al. Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. **LWT**, v. 106, p. 229–239, 2019.
- SHUKLA, R. et al. **Role of Flavonoids in Management of Inflammatory Disorders**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- SHUKLA, V. K. S. Cocoa Butter, Cocoa Butter Equivalents, and Cocoa Butter Substitutes. **Handbook of Functional Lipids**, n. ii, p. 279–307, 2006.
- SILVA, N. DA et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. [s.l.: s.n.]. v. 5^o Edição
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-REVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.
- SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3 SPEC. ISS., p. 591–610, 2005.
- SMITH, G. The effect of adding trace elements to Czapek-Dox medium. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 32, n. 3–4, p. 280–283, 1949.
- SMITH, T. A. Tryptamine and related compounds in plants. **Phytochemistry**, v. 16, n. 2, p. 171–175, 1977.
- THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. **Food Microbiology**:

Fundamentals and Frontiers, v. 3, p. 837–850, 2007.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19–26, 1 jan. 1994.

TORRES, D. E. et al. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. p. 1–16, 2017.

TRAN, P. D. et al. Assessing cocoa aroma quality by multiple analytical approaches. **Food Research International**, v. 77, p. 657–669, 2015.

TUENTER, E. et al. Non-volatile and volatile composition of West African bulk and Ecuadorian fine-flavor cocoa liquor and chocolate. **Food Research International**, v. 130, n. December 2019, p. 108943, abr. 2020.

ULLAH, M. A.; BEDFORD, C. T. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. p. 230–234, 2000.

UTRILLA-VÁZQUEZ, M. et al. Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. **Food Research International**, v. 129, p. 108834, 2020.

VOIGT, J. et al. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. v. 50, 1994.

VOIGT, J.; BIEHL, B. Precursors of the Cocoa-Specific Aroma Components are Derived from the Vicilin-Class (7S) Globulin of the Cocoa Seeds by Proteolytic Processing. 1995.

WANG, X. et al. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *cladosporium cladosporioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4551–4555, 2013.

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

WONG, K.; DIMICK, P. S.; HAMMERSTEDT, R. O. Y. H. Extraction and High

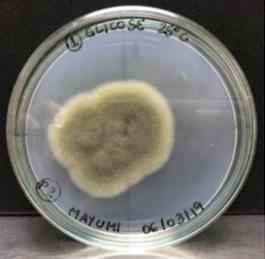
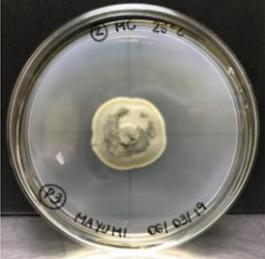
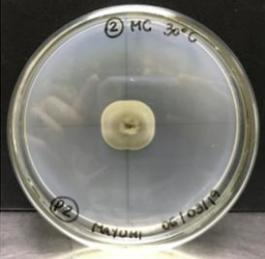
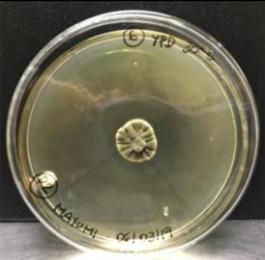
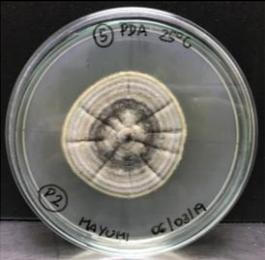
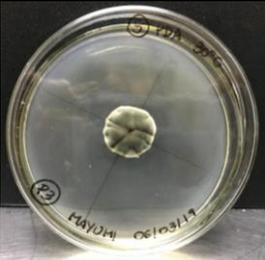
Performance Liquid Chromatographic Enrichment of Polyphenol Oxidase from Theobroma cacao Seeds. v. 55, n. 4, p. 2–5, 1990.

YAMANE, H. et al. Chemical defence and toxins of plants. **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**, v. 4, p. 339–385, 2010.

ZAK, O. L.; OSTOVAR, K.; KEENEY, P. G. IMPLICATION OF *Bacillus subtilis* IN THE SYNTHESIS OF TETRAMETHYLPYRAZINE DURING FERMENTATION OF COCOA BEANS. **Journal of Food Science**, v. 37, n. 6, p. 967–968, nov. 1972.

ZHANG, W. et al. Insights into the major aroma-active compounds in clear red raspberry juice (*Rubus idaeus* L. cv. Heritage) by molecular sensory science approaches. **Food Chemistry**, v. 336, p. 127721, jan. 2020.

APÊNDICE A – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MACROSCÓPICAS DO FUNGO *CLADOSPORIUM CLADOSPORIODES* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

			
Czapek-Dox 25 °C	Czapek-Dox 30 °C	Ágar MC 25 °C	Ágar MC 30 °C
			
Ágar Saboraud 25 °C	Ágar Saboraud 30 °C	Ágar Extrato de Malte 25 °C	Ágar Extrato de Malte 30 °C
			
Ágar YPD 25 °C	Ágar YPD 30 °C	PDA 25 °C	PDA 30 °C

ANEXO A – MEIOS DE CULTURA E COMPOSIÇÃO

Meio de cultura	Composição
Ágar Extrato de Malte	2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura e 1,5% ágar
Ágar GYC	5% glicose, 1% extrato de levedura, 3% carbonato de cálcio e 2% ágar
Ágar Man Rogosa e Sharpe	1% peptona, 1% extrato de carne bovina, 0,4% extrato de levedura, 2% glicose, 0,5% acetato de sódio tri-hidratado, 0,1% Tween 80, 0,2% hidrogenofosfato de dipotássio, 0,2% citrato de triamônio, 0,02% sulfato de magnésio heptahidratado, 0,005% de sulfato de manganês tetrahidratado e 1% ágar
Ágar MC	0,05% cloreto de potássio, 0,15% fosfato monopotássico, 0,05% sulfato de magnésio, 0,6% nitrato de sódio, 0,15% caseína hidrolisada, 0,05% extrato de levedura, 1% glicose, 0,2% peptona e 2% ágar
Ágar Saboraud	0,5% caseína hidrolisada, 0,5% peptona, 4% glicose e 1,5% ágar
Czapek-Dox	5% glicose, 2% ágar, 0,2% nitrato de sódio, 0,05% sulfato de magnésio e 0,1% fosfato monopotássico
PDA	0,4% infusão de batata, 2% glicose e 1,5% ágar
Ágar YPD	2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura e 1,5% ágar) e PDA (0,4% infusão de batata, 2% glicose e 1,5% ágar