



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

**DANIELA PINHEIRO GASPAR**

**PERFIL AROMÁTICO E DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMÊNDOAS DE  
CACAU FERMENTADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA EM DIFERENTES  
TEMPORADAS DO ANO**

**BELÉM – PA  
2019**

DANIELA PINHEIRO GASPAR

**PERFIL AROMÁTICO E DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMÊNDOAS DE  
CACAU FERMENTADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA EM DIFERENTES  
TEMPORADAS DO ANO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ca</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Santos Lopes

**BELÉM - PA  
2019**

DANIELA PINHEIRO GASPAR

**PERFIL AROMÁTICO E DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AMÊNDOAS DE  
CACAU FERMENTADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA EM DIFERENTES  
TEMPORADAS DO ANO**

Avaliada em. \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profª. Drª. Alessandra Santos Lopes**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA)  
Orientadora

---

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

---

**Profª. Drª Eloisa Helena de Aguiar Andrade**  
(PPGBIONORTE/PA)  
Membro Externo

---

**Profª. Drª Luiza Helena Meller da Silva**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA)  
Membro Interno

---

**Dr. Santelmo Selmo de Vasconcelos Júnior**  
(ITV- Instituto Tecnológico Vale)  
Membro Externo

**BELÉM - PA**  
**2019**

Dedico ao meu pai, Antônio Sérgio Gaspar,

A minha mãe, Sonia Gaspar

A minha irmã, Patrícia Gaspar

A vocês, todo meu amor e gratidão e por serem as melhores pessoas do mundo.

“As pessoas que são loucas o suficiente para achar que podem mudar o mundo são as que, de fato, mudam.”

Steve Jobs

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui e por ter me amparado e protegido durante toda essa trajetória.

Agradeço aos meus pais que me apoiaram psicologicamente e financeiramente durante o mestrado, que sempre me deram muito amor e carinho, além de me mostrarem que o melhor caminho é o dos estudos. Obrigada por serem os melhores pais do mundo! Agradeço também a Paty por todo o apoio e por ter me aguentado durante minhas crises de ansiedade e estresse, sei que esses momentos não foram poucos. Obrigada por sempre ter sido minha melhor companhia da vida.

Ao meu companheiro de todas as horas, Paulinho, por ter sido meu principal incentivador em encarar o mestrado, mesmo com medo e com insegurança. Obrigada por ter me acolhido todas as vezes em que eu precisei e por também ter aguentado meu estresse e ansiedade. Sem o seu apoio eu não teria chegado até aqui. Sou muito feliz em dividir minha vida com você!

A minha orientadora, Alessandra Lopes, por ter depositado confiança em mim e por todos os ensinamentos técnicos e de vida. A senhora é um exemplo de mulher. Obrigada por toda a paciência e por ter me ensinado tanto. Obrigada também pela sua amizade.

Agradeço aos meus amigos da UFPA que estiveram comigo durante essa caminhada, Osienne, Letícia, Felipe, Evellyn, Brenda, Mayara e Mayumi, que me fizeram rir apesar das adversidades e me ajudaram em muitas análises. Agradeço também a Marília, por não me fazer esquecer que é importante pensar fora da caixinha, por ser um exemplo de empreendedora e por toda a amizade durante esse tempo de mestrado. Não poderia deixar de agradecer a Luiza, que chegou no finalzinho do meu mestrado, mas que me ajudou grandemente com muita paciência e amorosidade.

Obrigada a Francilia e Deusa por toda amizade e apoio durante esses dois anos. Obrigada por aguentarem minhas dúvidas e me mostrarem que mesmo nesse meio tão duro, é possível ser verdadeira, amável e amigável. Vocês significam tudo isso pra mim.

Serei eternamente grata ao Gilson, por toda amizade a mim dedicada e por todos os ensinamentos. Se eu consegui chegar até aqui, devo isso a você também! Muito obrigada por

ter me acolhido logo de cara e por todos os momentos que passamos juntos, que não foram poucos. És uma pessoa que eu sempre vou guardar com muito carinho e admiração.

Agradeço ao Dr. Silveira da Ceplac de Castanhal, que me ajudou em uma das etapas mais difíceis. Agradeço também ao “Capim”, uma das pessoas mais simples e de bom coração que me ensinou tanta coisa *in loco*.

Agradeço a todos os professores que eu tive contato durante o programa. Muito obrigada pelos conhecimentos repassados.

Agradeço ao Laboratório Adolpho Ducke pelo apoio na realização das análises e por me acolherem tão bem e ao ITV (Instituto Tecnológico Vale) pelo suporte nas análises realizadas e por todo conhecimento repassado.

Agradeço também a Hadriane Pombo por sempre me atender com paciência e educação.

A minha banca que muito contribuiu para este trabalho dar certo, Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Eloisa Helena de Aguiar Andrade e Dr. Santelmo Selmo de Vasconcelos Júnior.

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

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Funções e efeitos de leveduras na fermentação do cacau	<b>23</b>
<b>Tabela 2.</b> Funções e efeitos de bactérias do ácido lático na fermentação do cacau	<b>26</b>
<b>Tabela 3.</b> Funções e efeitos de bactérias do ácido lático na fermentação do cacau	<b>27</b>
<b>Tabela 4.</b> Compostos voláteis de massa de cacau e suas referências sensoriais	<b>35</b>
<b>Tabela 5.</b> Concentração de (-) epicatequina em sementes de cacau fermentadas em vários países de produção (mg/g)	<b>40</b>
<b>Tabela 6.</b> Valores médios da temperatura da massa de fermentação de cacau, temperatura ambiente e umidade do ar no verão e no inverno	<b>49</b>
<b>Tabela 7.</b> Valores médios de pH e acidez total titulável (mEQ NaOH/100g)	<b>52</b>
<b>Tabela 8.</b> Valores médios da caracterização física e química das amêndoas fermentadas e secas de cacau no verão e inverno	<b>57</b>
<b>Tabela 9.</b> Valores médios dos compostos fenólicos totais mgECAT/g	<b>59</b>
<b>Tabela 10.</b> Valores médios de catequina (mg/g) e epicatequina (mg/g)	<b>62</b>
<b>Tabela 11.</b> Valores médios de teobromina (mg/g), teofilina (mg/g) e cafeína (mg/g)	<b>64</b>
<b>Tabela 12.</b> Teores médios de metais (mg/kg) de cacau fermentado e seco dos períodos verão e inverno	<b>65</b>
<b>Tabela 13.</b> Concentração (%) dos compostos voláteis de acordo com o tempo de fermentação e período climático	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da Ocratoxina	<b>28</b>
<b>Figura 2.</b> Estrutura da Cafeína, Teobromina e Teofilina	<b>34</b>
<b>Figura 3.</b> Estrutura Epicatequina e da catequina	<b>35</b>
<b>Figura 4.</b> Comportamento da temperatura ambiente no verão e no inverno (a) e umidade relativa do ar (%) no verão e no inverno (b)	<b>47</b>
<b>Figura 5.</b> Comportamento da temperatura da massa fermentativa nos períodos verão e inverno	<b>49</b>
<b>Figura 6.</b> Comportamento do pH no verão e no inverno (a) e da acidez total titulável (mEq NaOH/100g) no verão e no inverno (b) das sementes de cacau durante a fermentação	<b>51</b>
<b>Figura 7.</b> <i>Eigenvalue</i> para análise de componentes principais	<b>55</b>
<b>Figura 8.</b> Score para as componentes principais PC1 (88,87%) e PC2 (5,56%)	<b>56</b>
<b>Figura 9.</b> 9(a) Dendrograma utilizando a distância euclidiana para todos os ensaios 9(b) Score com os grupos formados após análise do dendrograma	<b>56</b>
<b>Figura 10.</b> Teores médios de fenólicos (mg ECAT/g) totais em amêndoas de cacau nos períodos verão e inverno	<b>58</b>
<b>Figura 11.</b> Teores médios de catequina e epicatequina em amêndoas de cacau nos períodos verão e inverno	<b>61</b>
<b>Figura 12.</b> Teores médios de teobromina, teofilina e cafeína em amêndoas de cacau nos períodos verão e inverno	<b>63</b>
<b>Figura 13.</b> Comportamento dos compostos voláteis de acordo com a sua classe e período	<b>67</b>
<b>Figura 14.</b> <i>Eigenvalue</i> para análise de componentes principais	<b>73</b>
<b>Figura 15.</b> Score para as componentes principais PC1 (51,082%) e PC2 (33,385%)	<b>73</b>
<b>Figura 16.</b> (a) Dendrograma utilizando a distância euclidiana para todos os ensaios (b) Score com os grupos formados após análise do dendrograma	<b>74</b>
<b>Figura 17.</b> Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 0 do verão	<b>95</b>
<b>Figura 18.</b> Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 96 do verão	<b>95</b>
<b>Figura 19.</b> Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 144 do verão	<b>95</b>
<b>Figura 20.</b> Cromatograma de amostras de semente de cacau fermentado e seco do verão	<b>95</b>
<b>Figura 21.</b> Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 0 do inverno	<b>96</b>
<b>Figura 22.</b> Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 96 do inverno	<b>96</b>
<b>Figura 23.</b> Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 144 do inverno	<b>96</b>
<b>Figura 24.</b> Cromatograma de amostras de semente de cacau fermentado e seco do inverno	<b>96</b>

**LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS**

<b>%</b>	Por cento ou porcentagem
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>AAB</b>	Bactérias do ácido acético ( <i>Acetic acid bacteria</i> )
<b>AOAC</b>	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CEPLAC</b>	Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CV</b>	Concentrado volátil
<b>ECAT</b>	Equivalente de catequina
<b>EG</b>	Equivalente de ácido gálico
<b>EM</b>	Espectrometria de massa
<b>G</b>	Grama
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High performance liquid chromatography</i> ) – CLAE
<b>HRGC</b>	Cromatografia gasosa capilar
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>ICCO</b>	Organização Internacional do Cacau ( <i>International Cocoa Organization</i> )
<b>IG</b>	Indicação Geográfica
<b>INMET</b>	Instituto Nacional de Meteorologia
<b>INPI</b>	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
<b>IR</b>	Índice de retenção
<b>kg</b>	Quilogramas
<b>LAB</b>	Bactérias do ácido lático ( <i>Lactic acid bacteria</i> )
<b>LAD</b>	Laboratório Adolpho Ducke
<b>m<sup>2</sup></b>	Metro quadrado
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>mEq NaOH/100 g</b>	Miliequivalente de hidróxido de sódio por 100 gramas de amostra
<b>min</b>	Minuto
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro

<b>mm</b>	Milímetro
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio
<b>PCA</b>	Análise do componente principal ( <i>principal component analysis</i> )
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>S</b>	Sul ( <i>South</i> )
<b>UFPA</b>	Universidade Federal do Pará
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrômetro
<b>W</b>	Leste ( <i>West</i> )

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
3.1 FERMENTAÇÃO DE CACAU	19
3.2 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA FERMENTAÇÃO DE CACAU	22
3.3 INFLUÊNCIA DOS FATORES CLIMÁTICOS NA QUALIDADE DO CACAU	29
3.4 VARIÁVEIS DA PRODUÇÃO DE CACAU	30
3.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E INDICAÇÃO GEOGRÁFICA	31
3.6 ÍNDICE DE QUALIDADE DO CACAU ( <i>COCOA QUALITY INDEX</i> )	33
3.7 PERFIL AROMÁTICO DAS SEMENTES E AMÊNDOAS DE CACAU	34
3.8 COMPOSTOS FENÓLICOS E METILXANTINAS DAS SEMENTES DE CACAU	38
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU	44
4.2 AMOSTRAGEM	44
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	44
4.4.1 Compostos fenólicos totais	45
4.4.2 Perfil de compostos fenólicos e metilxantinas	45
4.4.4 Metais pesados: bário, cádmio, chumbo e cobre	46
4.5 Extração dos compostos voláteis das sementes de cacau fermentadas	46
4.6 Identificação dos compostos voláteis por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM)	46
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5.1 TEMPERATURA AMBIENTE, UMIDADE DO AR E TEMPERATURA DA MASSA DE FERMENTAÇÃO DE CACAU	47
5.2 pH E ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL	51
5.2.1 Análise do componente principal (ACP) da temperatura da massa de fermentação, pH e acidez total titulável	55
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO CACAU AMAZÔNICO EM OUTUBRO E EM FEVEREIRO	58
5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	59

5.5 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS	62
5.6 PERFIL DE METILXANTINAS	64
5.7 METAIS PESADOS	65
5.8 COMPOSTOS VOLÁTEIS DAS SEMENTES DE CACAU DURANTE A FERMENTAÇÃO	66
5.8.1 Análise do componente principal (ACP) dos compostos voláteis majoritários	73
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS DA LITERATURA</b> .....	<b>78</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>96</b>

## RESUMO

O cacau é um dos alimentos mais conhecidos no mundo e seus atributos sensoriais e características físico-químicas definem qual subproduto será fabricado a partir dele e qual o seu valor de mercado. A Amazônia apresenta grande potencial para produção de cacau fino e com reconhecimento no mercado, devido sua importante biodiversidade e percepção de qualidade aliada aos produtos provenientes desta região. A complexa composição do cacau fermentado e seco irá depender de vários fatores, como genótipo do fruto, condições ambientais e estresse abiótico em que o cacau cresce, composição química do solo e os tratamentos no pós-colheita, sendo a fermentação a etapa primordial para obtenção de amêndoas de qualidade. É durante a fermentação que vários grupos de microrganismos, como leveduras e bactérias lácticas e acéticas, atuam gerando reações bioquímicas que modificam o interior das sementes de cacau. Neste estudo foi verificado que a temporada do ano em que o cacau é fermentado influencia na composição química e perfil de voláteis de suas amêndoas fermentadas. A temperatura da massa fermentativa, pH e acidez das sementes sofreram influência da temporada do ano. O pH e a acidez das sementes de cacau também sofreram influência de acordo com a temporada do ano pois variaram no decorrer dos dias de fermentação. A análise componente principal mostrou que os tempos 0 h e 24 h são os que mais recebem influência do período do ano, devido sua maior variação. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ) na composição centesimal do cacau fermentado em ambas temporadas. Os compostos fenólicos totais e os majoritários do cacau (catequina e epicatequina) reduziram ao longo da fermentação e sofreram influência do período do ano, com ênfase na epicatequina que apresentou diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) nas amêndoas fermentadas secas. Assim como os compostos fenólicos, as metilxantinas também decaíram ao longo da fermentação, porém não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre os períodos do ano. O perfil de compostos voláteis majoritários presentes na fermentação e secagem do cacau apresentou diferenças entre as temporadas do ano, e tal informação pode ser usada pelos produtores na rotulagem de seus produtos para informar a percepção sensorial dos voláteis presentes identificados neste trabalho. Foram encontrados compostos voláteis presentes em cacau fino, como 2-nonanone e fenilacetaldéido, e isso indica uma potencial utilização do cacau da Amazônia para produção de chocolates finos.

**Palavras-chave:** cacau, aroma, compostos fenólicos, temporada do ano.

## ABSTRACT

Cocoa is one of the most well-known foods in the world and its sensory attributes and physicochemical characteristics define which by-product will be manufactured from it and what its market value. The Amazon has great potential for production of fine and recognized cocoa in the market, due to its important biodiversity and perception of quality allied to the products coming from this region. The complex composition of the fermented and dry cacao will depend on several factors, such as fruit genotype, environmental conditions and abiotic stress in which the cacao tree grows, soil chemical composition and post-harvest treatments, being the fermentation the primordial stage for obtaining of quality almonds. It is during the fermentation that several groups of microorganisms, like yeasts and lactic and lactic bacteria, act generating biochemical reactions that modify the interior of the cacao seeds. In this study it was verified that the season of the year in which the cocoa is fermented influenced the chemical composition and volatile profile of its fermented almonds. The temperature of the fermentative mass, pH and acidity of the seeds were influenced by the season of the year. The pH and acidity of cocoa beans were also influenced according to the season of the year because they varied during the fermentation days. The principal component analysis showed that the times 0 h and 24 h are the ones that receive the most influence of the period of the year, due to their greater variation. No significant statistical differences ( $p>0,05$ ) were observed in the centesimal composition of the fermented cocoa in both seasons. The total phenolic compounds and the majority of cocoa (catechin and epicatechin) decreased throughout the fermentation and were influenced by the period of the year, with an emphasis on epicatechin, which presented a significant statistical difference ( $p\leq 0.05$ ) in dry fermented almonds. Like phenolic compounds, methylxanthines also decayed throughout the fermentation, but there was no significant statistical difference ( $p>0.05$ ) between the periods of the year. The profile of volatile compounds present in cocoa fermentation and drying showed differences between the seasons of the year, and this information can be used by producers in the labeling of their products to inform the sensory perception of the present volatiles identified in this work. Volatile compounds were found in fine cocoa, such as 2-nonanone and phenylacetaldehyde, and this indicates a potential use of Amazonian cocoa for the production of fine chocolates.

**Key words:** cocoa, aroma, phenolic compounds, season of the year

## 1 INTRODUÇÃO

Entender como fatores ambientais influenciam na qualidade das sementes de cacau fermentadas na região amazônica é de extrema importância para que se possa melhorar a qualidade das amêndoas utilizadas na fabricação de chocolate, tornando o produto mais competitivo no mercado, além de valorizar sua reputação e sua qualidade para que no futuro seja possível rastrear os produtos à base de cacau da Amazônia a partir da sua Indicação Geográfica.

É importante destacar que o clima na região amazônica funciona de forma diferente, as quatro estações do ano na verdade, se dividem em períodos menos chuvosos e períodos mais chuvosos. O período menos chuvoso se concentra nos meses de junho até novembro, enquanto que os períodos mais chuvosos se concentram de meados de dezembro até meados de maio.

Apesar da Amazônia se destacar pela sua grande diversidade de flora, alguns produtos apresentam baixa qualidade devido a práticas inadequadas no pós-colheita. É o que acontece com a cacauicultura, devido à falta de qualidade e homogeneidade das amêndoas de cacau fermentadas na Amazônia, faz com que o produto perca valor e seja depreciado no mercado, dificultando o desenvolvimento local e o potencial de polos industriais associadas a esta cultura (SALTINI et al., 2013).

Por ser um processo espontâneo e natural e realizado em condições que dificultam a implementação de técnicas de padronização, a indústria de chocolate deve concentrar esforços para melhorar a qualidade do cacau, otimizar os protocolos de fermentação e treinar os agricultores com práticas adequadas de fermentação. Além disso, é indispensável o entendimento dos fatores ambientais externos para que no futuro se possa adequar processos garantindo cacau de qualidade durante todo o ano, independente da temporada de colheita de cacau. Deste modo, a fermentação de cacau cumpre um papel significativo na determinação da composição e sabor do chocolate e de outros produtos à base de cacau, e, portanto, está na base de todo o processo de fabricação de chocolate.

A floresta Amazônica é a floresta mais extensa do mundo e a que apresenta o maior reservatório de espécies vegetais e animais, abrigando cerca de um quarto de todas as espécies existentes. Uma das espécies vegetais de grande importância da Amazônia é o cacau, visto que suas sementes são utilizadas como matéria-prima para a produção do chocolate, um dos alimentos mais consumidos no mundo (SCHWAN e WHEALS, 2004). O *Theobroma cacao* L., árvore frutífera do cacau, prospera melhor em climas tropicais encontrados na África do Sul,

Ásia, América Central e América do Sul e apresenta importância social, econômica e ambiental para a região amazônica (FRANZEN e MULDER, 2007).

Por se tratar de uma cultura permanente, com duração média de trinta anos, a cacauicultura induz a fixação do homem na terra, diminuindo o êxodo rural, a valorização do produto local e de geração de oportunidades de negócios. Além disso, é uma das poucas commodities do mundo que pratica o *Fairtrade* (comércio justo), possibilitando parcerias comerciais de longo prazo diretamente com os agricultores, gerando assim, um desenvolvimento sustentável (FOWLER e COUTEL, 2009). Outra vantagem que esta cultura apresenta é não necessitar de desmatamento para a introdução de cacauzeiros, visto que as árvores precisam de sombreamento de outras árvores para o seu bom desenvolvimento, sendo favorável ao sequestro de carbono e diminuindo, desta forma, o impacto ambiental.

Sua origem, ao que indicam alguns estudos, se dá na região amazônica sendo a sua cultura expandida para demais localidades do continente americano e africano. O nome do fruto é de origem dos povos Astecas e Maias que preparavam o chocolate como uma bebida aromática obtida através das sementes secas do cacau (FOWLER e COUTEL, 2009).

A produção dos precursores de sabor de chocolate, que ocorre dentro das sementes de cacau, é o resultado de mudanças bioquímicas durante a fermentação e secagem. O modo de fermentação e o ambiente microbiano durante esses estágios proporcionam as condições necessárias para que as reações bioquímicas complexas ocorram. A população microbiana espontânea da fermentação das sementes de cacau é diversa, ela é formada por diferentes espécies de leveduras, bactérias do ácido lático (*Lactic acid bacteria* - LAB) e bactérias do ácido acético (*Acetic acid bacteria* - AAB) (SCHWAN, 1998).

O cacau além de ser apreciado no mundo todo pelo seu sabor, está ganhando mais atenção devido as descobertas dos seus compostos bioativos. Esses compostos, principalmente os compostos fenólicos e as metilxantinas apresentam efeitos benéficos a saúde humana através da sua propriedade antioxidante, sendo eficiente no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias, distúrbios metabólicos e câncer, onde o estresse oxidativo é uma das principais causas (ANDÚJAR et al., 2012). Além disso, Lee et al. (2003) provou que o cacau apresenta mais compostos bioativos e uma maior capacidade antioxidante do que produtos reconhecidos por estas propriedades, como chás e vinho tinto.

Devido à grande produção de cacau no Pará e uma demanda cada vez maior de fornecer produtos de qualidade tanto sensorial como da sua composição durante todo o ano, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os parâmetros de qualidade do cacau a partir da

fermentação espontânea em um microclima localizado na região amazônica, no município de Inhangapi-Pará, em duas épocas distintas de produção agrícola do cacau, em outubro e em fevereiro, para avaliar a influência das temporadas do ano no perfil aromático e dos compostos fenólicos das sementes fermentadas.

## 2 OBJETIVOS

### ❖ Geral

- Avaliar o perfil aromático, de compostos fenólicos, metilxantinas e parâmetros físicos e químicos de qualidade das amêndoas de cacau em diferentes temporadas do ano na Amazônia.

### ❖ Específicos

- Avaliar a influência das temporadas do ano sobre o perfil de componentes voláteis das amêndoas de cacau.
- Avaliar a influência das temporadas do ano no perfil de compostos fenólicos (catequina e epicatequina) e metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) das amêndoas de cacau.
  - Avaliar os parâmetros físicos e químicos que compõe o Índice de Qualidade do Cacau (Cocoa Quality Index): pH, acidez total titulável, proteínas, lipídios, cinzas, compostos fenólicos totais, e metais pesados (bário, cádmio, chumbo e cobre) nas diferentes temporadas do ano.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 FERMENTAÇÃO DE CACAU

A fermentação de cacau é uma etapa primordial para a obtenção de amêndoas de qualidade. A fermentação espontânea ocorre através do desenvolvimento natural de microrganismos presentes no ambiente fermentativo que encontram o meio ideal para crescimento e desenvolvimento (JAMILI et al., 2016). Para uma fermentação adequada, é preciso que as etapas anteriores (colheita e quebra) tenham sido executadas com eficiência (MARTINS et al., 2011).

Segundo De Vuyst e Weckx (2016), a fermentação apresenta várias finalidades: facilita a remoção da polpa mucilaginoso em torno das sementes de cacau; contribui para formação de cor e sabor característico, pois evita o crescimento embrionário e favorece a atividade enzimática que ocorre no interior das sementes, possibilitando a expressão do potencial genético e enzimático, além de reduzir o amargor e adstringência devido a troca de compostos através da difusão entre os cotilédones e o ambiente.

A fermentação é iniciada quando o fruto é quebrado após a colheita, ficando a semente com a polpa exposta ao meio ambiente sofrendo contato com os microrganismos naturalmente presentes no meio (PAPALEXADRATOU 2011a; NIELSEN et al., 2013; PAPALEXADRATOU e NIELSEN, 2016).

Na massa fermentativa, o espaço entre as sementes de cacau é praticamente ocluído pela polpa e o teor de oxigênio da massa é baixo. Isto, juntamente com o alto teor de açúcar da polpa e seu baixo pH, favorece o crescimento de leveduras que se multiplicam rapidamente e produzem grandes quantidades de etanol e dióxido de carbono. Ao mesmo tempo, as bactérias lácticas metabolizam o ácido cítrico presente na polpa em ácido lático, gerando um aumento do pH do meio. No final do primeiro dia, a polpa é perdida pela drenagem, aumentando discretamente a oxigenação e gera condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias acéticas (FORSYTH e QUESNEL, 1963).

As leveduras iniciam a fermentação alcoólica através da utilização dos açúcares presentes na polpa, gerando etanol, que juntamente com o ácido acético produzido pelas bactérias acéticas por meio da oxidação do etanol, penetram as sementes de cacau para promover a morte do embrião, além de desencadear o aumento da temperatura da massa de fermentação para 45-50 °C (HO et al., 2014).

Após a morte do embrião, os compostos fenólicos presentes nas amêndoas entram em contato com enzimas como a polifenoloxidase e glicosidases, sofrendo reações de oxidação, complexações com proteínas, formação de compostos denominados quinonas, que por sua vez sofrem condensação covalente com os grupos reativos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e fibras. (FORSYTH e QUESNEL, 1963). Assim, durante a etapa de fermentação os compostos fenólicos totais reduzem cerca de 70% e o teor de flavonóis reduz cerca de 90% (EFRAIM, 2004).

O declínio no número de bactérias do ácido acético coincide com o aumento de temperatura acima de 40 °C, visto que apenas uma pequena parcela dessas bactérias sobrevive em condições extremas de temperaturas. Apesar deste declínio, a temperatura da massa permanece entre 45-50 °C por mais quatro dias (FORSYTH e QUESNEL, 1963).

Algumas espécies de leveduras também são responsáveis pela degradação da pectina da polpa, facilitando a aeração do meio e conseqüentemente o crescimento de bactérias do ácido acético. A função das bactérias do ácido láctico na fermentação do cacau ainda não está completamente elucidada. Sua fermentação de açúcares para produzir ácido láctico pode prejudicar a qualidade das amêndoas devido ao aumento da acidez do meio. Porém, acredita-se que a produção deste ácido e o potencial para utilizar o ácido cítrico da polpa podem colaborar para o equilíbrio do pH durante o processo fermentativo. O pH interno das amêndoas de cacau antes da fermentação, cerca de 7,0, deve diminuir entre pH 5,0 e 5,5 para possibilitar uma boa atividade das proteases endógenas, que irão propiciar a formação das características sensoriais de sabor de chocolate (BIEHL et al. 1985, HANSEN et al., 1998, HO et al., 2014).

Beckett (2011) considera o processo fermentativo de cacau em três fases: fase anaeróbica: nas primeiras 24-36h de fermentação há leveduras convertendo o açúcar em álcool em condições anaeróbicas e com pH inferior a 4; fase microaeróbica e das bactérias do ácido láctico: as bactérias do ácido láctico estão presentes desde o início da fermentação, porém, com a entrada de ar entre as 48-96 (início do processo de revolvimento) horas elas se tornam mais dominantes; fase aeróbica e das bactérias acéticas: essas bactérias também estão presentes desde o início da fermentação, porém, somente com o aumento da aeração do meio é que elas atuam de forma mais significativa.

A produção de etanol é um processo exotérmico, que gera um aumento da temperatura da massa fermentada, de 25-30 °C (temperatura ambiente) para 35-40 °C durante as primeiras 48h de fermentação. Este produto é considerado o agente primário da morte do embrião para

dar início as reações que desenvolvem o sabor de chocolate (ROELOFSEN, 1958). Estas reações enzimáticas endógenas e exógenas diminuem a solubilidade dos polifenóis, reduzindo assim amargor e a adstringência, além de contribuir para a cor típica das sementes fermentadas (HANSEN; DEL-OLMO; BURRI, 1998; LIMA et al., 2011; BRITO, 2013).

As fermentações conduzidas com a presença da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em grande quantidade, que são espécies altamente fermentativas, são propensas a uma maior concentração de etanol (ARDHANA e FLEET, 2003; PAPALEXANDRATOU et al., 2011a, SCHWAN, 1998).

Os produtos secundários do metabolismo de leveduras, como ácido orgânico, aldeídos, cetonas, álcoois superiores e ésteres e a produção da glicosidases, provavelmente exercem papel importante na qualidade das amêndoas de cacau fermentados (ARDHANA e FLEET, 2003).

A compartimentalização no interior dos cotilédones é um dos indicadores de uma fermentação e secagem bem-sucedidas, pois indica que as reações bioquímicas importantes aconteceram, como a ruptura das membranas celulares e o contato com substâncias que antes encontravam-se separadas (BRASIL, 2008; EFRAIM, 2010).

O tempo necessário para a fermentação das sementes de cacau varia de acordo com o material genético do fruto. As sementes *Forastero*, predominante em todo o mundo, devem ser fermentadas por mais de cinco dias para que ocorram as principais reações que formam os precursores de sabor do chocolate (BECKETT, 1994).

Durante a fermentação, alguns fatores como temperatura e condições ambientais são responsáveis pelo declínio no número e tipo de leveduras atuantes durante o processo fermentativo (JAMILI et al., 2016). Por isso, as sementes de cacau devem ser fermentadas em locais cobertos, protegidos dos ventos, afastados das paredes e do piso para proporcionar uma temperatura constante durante a fermentação. Os cochos devem ser de madeira, com dimensões de acordo com a capacidade produtiva e com, no mínimo, duas divisórias para facilitar o revolvimento da massa de cacau (MARTINS et al., 2011). A prática de revolvimentos durante toda a fermentação é uma forma de controlar a elevação de temperatura e níveis de ácidos, fatores diretamente relacionados com a atividade enzimática que irá desenvolver precursores sensoriais do chocolate (SCHWAN et al., 1990).

Arana-Sanchez et al. (2015) afirmam que além dos fatores como matéria-prima, carga microbiana, métodos de fermentação e duração do processo, a qualidade do cacau é

influenciada também pelo momento em que o agricultor decide encerrar a etapa de fermentação. Leal et al. (2008) sugerem que a aeração no início da fermentação foi mais importante para melhorar a qualidade das amêndoas de cacau do que a população de microrganismos presente.

O sabor e aroma característico do chocolate dependem de uma série de fatores, alguns são intrínsecos do cacau, outros são gerados a partir do metabolismo das espécies de microrganismos atuantes nesta fermentação, alguns causados após a morte do embrião, porém a maioria dos atributos sensoriais do produto final advém da reação de Maillard, reação química que acontece entre aminoácidos e açúcares redutores da amêndoa, ocorrendo na etapa de torração, subsequente a fermentação e secagem das amêndoas de cacau (HO et al., 2014).

Os açúcares presentes na polpa mucilaginosa fornecem substratos para a fermentação microbiana e os encontrados em maior quantidade são frutose (aproximadamente 70 mg/g) e glicose (aproximadamente 50 mg/g) (HO et al., 2014).

Quando a massa de cacau não estiver mais apresentando aromas característicos, as amêndoas apresentarem uma cor acinzentada e temperatura não superior a 40 °C (normalmente no quinto ou sexto dia de fermentação) é um indicativo de que as amêndoas devem ser retiradas do cocho de fermentação, para evitar a sobrefermentação (putrefação das amêndoas). Esta etapa pode ser verificada através do corte longitudinal das amêndoas. Aquelas que apresentarem uma cor ligeiramente marrom, com um anel de contorno de cor marrom escuro, com a formação de sulcos, é indicador de que a massa foi bem fermentada (MARTINS et al., 2011).

A secagem é a etapa subsequente à fermentação e tem como objetivo reduzir a umidade das amêndoas, para que se tornem estáveis ao armazenamento. Nesta etapa observa-se a continuidade das reações de oxidação que foram iniciadas na fermentação, reduzindo o amargor, acidez e adstringência das amêndoas de cacau, além de favorecer o escurecimento interno, colaborando com a formação dos precursores de sabor desejáveis de chocolate (BECKETT, 1994).

### 3.2 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NA FERMENTAÇÃO DE CACAU

As leveduras são microrganismos unicelulares eucariontes que apresentam grande diversidade fisiológica, podendo crescer e se desenvolver em diferentes habitats. Esta diversidade foi explorada e desenvolvida para obtenção de uma gama de produtos alimentícios, além de produzir vários metabólitos industriais e ser utilizada em muitos processos

biotecnológicos são frequentemente encontradas em alimentos manufaturados que apresentam gorduras ou grandes quantidade de açúcares (JACQUES e CASAREGOLA, 2008).

Em decorrência da sua capacidade de fermentar açúcares para a produção de etanol e dióxido de carbono, as leveduras são reconhecidas devido ao seu importante papel na fabricação de alimentos e bebidas. São utilizadas há milênios para produção de vinho, cidra, cerveja, pão e produtos lácteos. A espécie mais conhecida e empregada pela indústria de alimentos é a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo o primeiro microrganismo eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado em 1996, e possivelmente o organismo mais documentado (JACQUES e CASAREGOLA, 2008).

A variação da população de microrganismos entre diferentes processos fermentativos e a sua importância no beneficiamento das amêndoas de cacau é clara. As mudanças nas populações de leveduras afetam de várias maneiras a qualidade do produto final. Como por exemplo, as leveduras pectinolíticas exercem um impacto no tempo de fermentação, consumindo em mais ou menos tempo a polpa mucilaginosa, já que as populações de leveduras produtoras de etanol podem interferir com a produção de ácido acético por bactérias. Então, essas variações populacionais são responsáveis pela produção de compostos aromáticos que podem permanecer no produto final, interferindo diretamente no aroma e sabor do chocolate (ARANA-SANCHEZ et al., 2015).

O conhecimento das comunidades de microrganismos que afetam os parâmetros químicos da fermentação de cacau é de suma importância para melhorar a gestão do cacau e do processo produtivo de chocolate (BATISTA et al., 2016). Estudos realizados por Ho et al. (2014) concluíram que a atividade das leveduras no processo fermentativo de cacau é essencial para o desenvolvimento de precursores do sabor do chocolate e que estes microrganismos apresentam diversas funções e efeitos, apresentados na Tabela 1 a seguir:

**Tabela 1.** Funções e efeitos de leveduras na fermentação do cacau.

<b>Propriedade funcional</b>	<b>Efeito na fermentação do cacau</b>
Produção de etanol	Contribui para desorganização celular e morte do embrião, inicia reações bioquímicas dentro da semente, levando à formação de precursores de sabor de chocolate, determina a sucessão microbiana ao longo da fermentação, restringe o crescimento de bolores e produz substrato para o crescimento de bactérias do ácido acético
Produção de dióxido de carbono	Favorece o crescimento de bactérias do ácido láctico criando um ambiente microaeróbico na massa fermentativa e restringe o crescimento de bolores
Produção de voláteis (álcoois superiores, ésteres, aldeídos, cetonas)	Fornecer precursores exclusivos que se difundem no interior da semente de cacau para desenvolvimento de sabor no processamento subsequente
Produção de enzimas pectinolíticas	Degrada a pectina na polpa de cacau, causando a liquefação e a drenagem da polpa para estimular o crescimento de bactérias do ácido acético e facilitar a secagem eficiente das amêndoas
Consumo e produção de ácidos orgânicos	Contribui para uma modulação do pH da polpa e da semente que afeta a ecologia da fermentação e atividade enzimática na semente de cacau
Produção de produtos de degradação de proteínas celulares, ácidos nucléicos e lipídios pela autólise de células de levedura	Contribui para o crescimento de bactérias do ácido láctico e acético e atuação nas reações de Maillard pela produção de aminoácidos

**Fonte:** De Vuyst et al. (2010).

De acordo com identificação populacional microbiana da fermentação de cacau, algumas espécies são geralmente encontradas em vários países produtores. Dentre as leveduras, as espécies *Hanseniaspora guilliermondii* e *Hanseniaspora opuntiae* normalmente estão presentes nos estágios iniciais da fermentação, em seguida há predominância de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* e *Candida*

spp. (ARDHANA e FLEET, 2003; DANIEL et al., 2009; GALVEZ et al., 2007; JESPERSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2005; HO et al., 2014).

No início da fermentação encontram-se espécies de leveduras de rápida fermentação de glicose, como *Hanseniaspora* spp. Em um segundo momento da fermentação encontram-se espécies mais resistentes a eventos proporcionadores de stress fermentativo, principalmente as dos gêneros *Saccharomyces* spp. e *Pichia* spp. A composição exata de espécies varia expressivamente de acordo com fatores edafoclimáticos (NIELSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2007; DANIEL et al., 2009; MEERSMAN et al., 2013, MEERSMAN et al., 2015).

De Melo Pereira et al. (2013) estabeleceram que o intervalo ideal de temperatura geralmente encontrado para o crescimento de leveduras é de 25 °C a 35 °C. Ardhana e Fleet (2003) também verificaram que apenas algumas leveduras são capazes de sobreviver em temperaturas acima de 40 °C, sendo elas *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis*.

Segundo Ho et al. (2014) algumas espécies de leveduras como *H. guilliermondii*, *P. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* e *K. marxianus* são constantemente encontradas nas fermentações de cacau em todo o mundo. Alguns microrganismos como *Pichia kudriavzevii*, *Candida tropicalis*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Saccharomyces cerevisiae* são as espécies de leveduras de maior ocorrência nas fermentações de cacau, com destaque para a *Saccharomyces cerevisiae* que é encontrada com maior frequência, independente do país produtor. Segundo Sampaio e Gonçalves (2008) as leveduras do gênero *Saccharomyces*, especialmente a *Saccharomyces cerevisiae*, são utilizadas no mundo todo como agentes fermentativos para diversas finalidades, como produção de vinhos, cervejas, queijos e pães. Apesar de alguns estudos terem sido conduzidos no Brasil, nenhum foi realizado na Amazônia brasileira, floresta que abriga a maior biodiversidade do mundo (DIRZO e RAVEN, 2003).

Após a atuação das leveduras, as bactérias lácticas tornam-se mais dominantes na fermentação, através da metabolização dos açúcares remanescentes, evidenciando a degradação da polpa e originando, entre outros metabólicos, o ácido láctico que irá propiciar condições de pH e aeração favoráveis para o crescimento de bactérias acéticas (SCHWAN e WHEALS, 2004; KOSTINEK et al., 2008).

Das bactérias do ácido láctico, são relatadas com mais frequência *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*, e também *Pediococcus* e *Leuconostoc* são relatadas (CAMU et al., 2008, KOSTINEK et al., 2008; NIELSEN et al., 2007; HO et al., 2014). As

espécies *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc* são descritas como metabolizadoras de açúcares e ácido cítrico para a produção de ácido láctico, ácido acético e etanol (SALMINEN e VON WRIGHT, 2004; MEERSMAN, 2013).

Estudos sugerem que a razão pela qual *Lactobacillus fermentum* é dominante na fermentação do cacau é devido à sua grande tolerância à presença de ácidos, etanol e temperaturas elevadas, além da sua capacidade de metabolização do ácido cítrico, presente em grandes quantidades na polpa mucilagínosa (CAMU et al., 2007, 2008; NIELSEN et al., 2007; PAPALEXANDRATOU et al., (2011a); PAPALEXANDRATOU et al., (2011b); PAPALEXANDRATOU et al., (2011c); MEERSMAN et al., 2013).

No Brasil, Papalexandratou et al. (2011c) obtiveram através da fermentação do cacau ocorrida na Bahia as espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus durianis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus pseudomesenteroides*, *Pediococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*. Camu et al. (2007) em Gana encontraram as espécies lácticas *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Enterococcus casseliflavus* e *Weissella sp.*, onde a fermentação ocorreu em duas fazendas, utilizando o método típico na região (fermentação em montes) sem utilização da técnica de revolvimento. O processo fermentativo durou seis dias em ambas fazendas. As espécies *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* foram dominantes durante toda a fermentação por serem adaptáveis as condições da fermentação e desempenharam papel importante neste processo. A espécie *Leuconostoc pseudomesenteroides*, normalmente é encontrada durante as primeiras sessenta horas de fermentação (CAMU et al., 2007).

De Vuyst et al. (2010) reuniram as funções das bactérias do ácido láctico na fermentação do cacau e o seu efeito, apresentados na Tabela 2 a seguir:

**Tabela 2.** Funções e efeitos de bactérias do ácido lático na fermentação do cacau

<b>Propriedade funcional</b>	<b>Efeito na fermentação do cacau</b>
Consumo de ácido cítrico	Acelera o processo de fermentação em condições de baixo pH, aumenta o pH, controlando desta forma o crescimento bacteriano, auxilia a produção de metabólitos do piruvato e estimula conversões de aminoácidos
Produção de ácido lático	Regula o pH, controla a contaminação microbiana do ambiente fermentativo e estimula o crescimento de bactérias do ácido acético
Produção de manitol	Favorece a produção de ácido acético a partir de frutose e estimula o crescimento de bactérias do ácido acético
Produção de precursores de sabor (acetato, catabólitos de piruvato e produtos de conversão de aminoácidos)	Desenvolve de cor e sabor característico de cacau
Condições adequadas para proteólise	Forma precursores de sabor e desenvolvimento de cor e sabor dentro das sementes

**Fonte:** De Vuyst et al. (2010).

As espécies de bactérias que dominam o final da fermentação são as bactérias acéticas, que encontram um ambiente favorável para desenvolvimento pela presença do álcool resultante de reações anteriores. São responsáveis por oxidar o etanol a ácido acético (FERRÃO, 2008). Esta é uma reação fortemente exotérmica, responsável pelo aumento da temperatura da massa fermentativa, que pode chegar a valores acima de 50 °C (BECKETT, 2009). A espécie *Acetobacter pasteurianus* é a espécie das bactérias do ácido acético de maior importância, seguida das espécies *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacter lovaniensis* e *Acetobacter syzygii* (ARDHANA e FLEET, 2003; CAMU et al., 2007; LEFEBER et al., 2011; NIELSEN et al., 2007).

As bactérias acéticas estão associadas aos estágios intermediários e finais da fermentação quando há drenagem da polpa mucilaginosa, que irá causar maior aeração ao meio fermentativo e conseqüentemente, maior disponibilidade de oxigênio (HO, 2014). Schwan e Wheals (2004) ratificam que as bactérias acéticas desempenham um papel crítico na fermentação e contribuem para o desenvolvimento de cacau de qualidade.

Moens et al. (2014) descreve a espécie *Acetobacter pasteurianus* sendo comumente presente na fermentação de cacau espontânea e com atividade propícia para rápida oxidação de etanol e ácido láctico presentes no ambiente fermentativo de sementes de cacau. Segundo Bartowsky (2008) e Gullo e Giudici (2008) a espécie *Acetobacter pasteurians* apresenta temperatura e pH ótimos de crescimento entre 40-45° C e 5-6, respectivamente.

A bactéria *Acetobacter ghanaensis* é capaz de oxidar o etanol em ácido acético e prolifera-se em ambientes estritamente aeróbicos (CLEENWERCK et al., 2007) e a *Acetobacter senegalensis* que também se prolifera em ambientes aeróbicos e é capaz de oxidar etanol (NDOYE et al., 2007). Almeida (2019) realizou um estudo na Amazônia brasileira e encontrou as espécies de bactérias *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurians*. A fermentação espontânea foi conduzida no estado do Pará em caixas de madeira por sete dias e com revolvimentos diários. Estudos de Sandhya et al. (2016) sugerem que a espécie *Acetobacter aceti* pode ser utilizada para acelerar o processo fermentativo do cacau.

A Tabela 3 abaixo apresenta as funções das bactérias do ácido acético na fermentação do cacau e o seu efeito:

**Tabela 3.** Funções e efeitos de bactérias do ácido acético na fermentação do cacau

<b>Propriedade funcional</b>	<b>Efeito na fermentação do cacau</b>
Utilização de açúcares e ácidos da polpa	Produz compostos (aldeídos, cetonas e outros voláteis) que podem influenciar o sabor de chocolate
Oxidação de etanol em ácido acético	Contribui para a morte do embrião e o rompimento da integridade celular, contribui para a acidez da amêndoa, diminui o pH da semente que estimula reações bioquímicas endógenas que impactam na formação de precursores de sabor e controla o crescimento microbiano durante a fermentação e secagem
Aumento da temperatura do ambiente fermentativo	Contribui para a morte do embrião e hidrólise de proteínas e desencadeia reações bioquímicas endógenas dentro da semente do cacau que impactam na formação de precursores de sabor

**Fonte:** De Vuyst et al. (2010).

A fermentação do cacau também conta com a participação de fungos filamentosos, porém, seu efeito ainda não é totalmente compreendido. A presença de fungos filamentosos nas

amêndoas de cacau é motivo de preocupação de segurança alimentar, devido a produção de micotoxinas a partir de alguns destes microrganismos (ROELOFSEN, 1958). Estudos realizados por Mounjouenpou et al. (2008) em Camarões detectaram em cacau níveis elevados de ocratoxina (OTA), metabólito secundário tóxico produzido por diversas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Além disso, estes fungos filamentosos influenciam a qualidade da fermentação do cacau, pois apresentam ações pectinolíticas, amilolíticas, proteolíticas e lipolíticas que contribuem para a acidez indesejada das amêndoas fermentadas e sabores estranhos e não característicos de cacau (ARDHANA e FLEET, 2003).

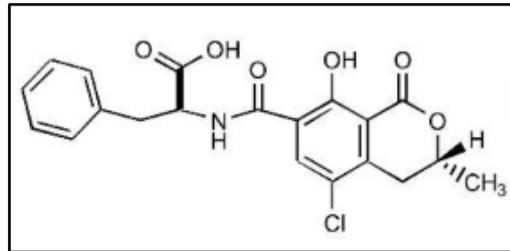


Figura 1: Estrutura Ocratoxina. **Fonte:** Mounjouenpou et al. (2008)

### 3.3 INFLUÊNCIA DOS FATORES CLIMÁTICOS NA QUALIDADE DO CACAU

Diferentes variedades do fruto apresentam características e potenciais de sabor exclusivos, porém as condições de crescimento do cacauzeiro como o clima, quantidade e tempo de sol e chuva, condições de solo, amadurecimento, método de fermentação, tempo de colheita e o tempo entre a colheita e a fermentação das amêndoas de cacau também contribuem fortemente para variações nas características e formação do sabor final, por isso que condições diferentes podem resultar em diferenças significativas de uma mesma variedade de cacau (AFOAKWA et al., 2008).

O cacauzeiro se desenvolve preferencialmente em áreas com altas precipitações (faixa de entre 1500 e 2500 mm) ao longo do ano, sendo necessária irrigação caso apresente estações de seca superior a três meses com chuvas de menos de 100 mm. Esta árvore apresenta também preferência por altas umidades, entre 70-80% durante o dia e até 100% durante a noite. As exigências quanto a temperatura ambiente é de no mínimo médio mensal de 18 °C e no máximo médio mensal de 32 °C. O mínimo absoluto é de cerca de 10 °C. Os requisitos quanto ao solo é de que ele seja profundo, de preferência 1,5m ou mais, com boa drenagem e um pH neutro para ácido (intervalo 5-7,5) (BECKETT, 2011). O cacau da variedade *Criollo*, cultivado na Venezuela apresenta sabor frutado e de noz. No Equador essa variedade apresenta característica

sensorial ácida, áspera e de pouco sabor de cacau, enquanto que no Congo exhibe sabor intenso de cacau e ácido. Já a variedade *Forastero* na Venezuela exprime características frutadas, de passas e de caramelo. Em Gana o cacau *Forastero* apresenta sabor forte de cacau e notas frutadas, ao mesmo tempo que esta variedade na Malásia apresenta perfil ácido e amargo (AFOAKWA et al., 2008). De acordo com Afoakwa et al. (2008), as condições climáticas e do solo são dois fatores que influenciam diretamente os constituintes das sementes de cacau, sendo que somente as condições do clima influenciam na etapa de colheita.

A temperatura ambiente em dias chuvosos influenciou na temperatura de fermentação no estudo de Camu et al. (2007), havendo uma redução discreta entre 1 a 4 °C no cocho de fermentação. Em países de clima tropical, como no oeste africano, temperaturas ambientes entre 25-35 °C permitem o desenvolvimento de bactérias do ácido láctico em fermentação natural (NOUT e SARKAR, 1999). A importância da adaptação a temperatura por leveduras foi estudada por Sampaio e Gonçalves (2008), que verificaram que *Saccharomyces kudriavzevii* e *Saccharomyces uvarum* apresentam temperaturas máximas de crescimento de 32-42°C.

Explorar a capacidade dos organismos a se adaptarem em seu *habitat* é de extrema importância para que se possa determinar o efeito das mudanças climáticas. Leducq et al. (2014) em estudo com leveduras sugeriram que as mudanças climáticas podem levar à adaptação da população microbiana, sendo então essas mudanças fatores determinantes.

É difícil fazer uma ligação direta entre as mudanças climáticas e os impactos que podem gerar em sistemas biológicos, porém, têm sido crescentes os estudos evidenciando esta ligação, sugerindo que os eventos climáticos afetam diretamente espécies vivas, através de respostas fisiológicas individuais diferentes a diferentes climas (EASTERLING et al., 2000).

Estudos realizados por Ofori-Boateng e Insaah (2014) na África Ocidental indicam que as duas variáveis mais importantes que determinam a mudança climática são a temperatura e precipitação e que o aumento da temperatura e a diminuição da precipitação que vem ocorrendo, pode causar danos para a produção de cacau no futuro. Por isso faz-se necessário o entendimento desses fatores e como irão impactar na qualidade das amêndoas de cacau fermentadas.

### 3.4 VARIÁVEIS DA PRODUÇÃO DE CACAU

O beneficiamento do cacau apresenta como objetivo o fornecimento de amêndoas de excelente qualidade, com teor de umidade no máximo 8%, livre de agentes contaminantes físicos, químicos e biológicos, com boa apresentação externa e aroma natural de cacau.

Apresenta cinco etapas, sendo elas: colheita, quebra, fermentação, secagem e armazenamento, que quando realizadas corretamente resultam em excelente qualidade, com eliminação de perdas e redução de custos (MARTINS et al., 2011).

Muitas variáveis influenciam na qualidade das sementes de cacau fermentadas, como: I) agricultura: sofrendo interferência do cultivar, safra e país de origem; II) armazenamento das sementes: dependendo da duração e da temperatura deste armazenamento; III) fermentação: o método, a duração, os revolvimentos e a microflora influenciam diretamente nesta etapa; IV) secagem: sofrendo interferência do método, duração e temperaturas utilizadas na secagem; V) transporte: sendo a duração e as condições do transporte as variáveis refletidas nas características do produto final (SALTINI et al., 2013).

Para Afoakwa (2016) o manejo do cacau também é responsável por gerar variáveis na produção e se feitos da maneira correta, irão assegurar maior produtividade, rentabilidade e produção sustentável. Os cuidados no manejo da cacauicultura englobam: uso ou não de fertilizantes, poda das árvores, reconhecimento ao ataque de pragas e outras doenças, idade das árvores e rejuvenescimento da plantação, qualidade do solo, reconhecimento do fruto maduro para colheita, métodos de fermentação e secagem, além de armazenamento correto das amêndoas fermentadas e secas. Os métodos de fermentação variam de região para região, podendo ser realizada em montes ou bandejas, ambas realizadas em Gana e Costa do Marfim; caixas de fermentação, no Brasil e Malásia; cestas, na Costa do Marfim e plataformas, no Equador (WOOD e LASS, 2008).

Ardhana e Fleet (2013) afirmam que outro fator que dificulta o estudo mais aprofundado dos eventos que ocorrem durante a fermentação é a localização geográfica dos produtores de cacau, visto que a maioria dos agricultores estão localizados em áreas remotas de países em desenvolvimento, e possuem poucas instalações para análises científicas, sendo necessário coletar amostras e levá-las a centros de pesquisas.

### 3.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E INDICAÇÃO GEOGRÁFICA

O cacau ocupa a terceira colocação no ranking das *commodities* globais de exportação, ficando atrás somente do café e do açúcar, sendo importante comercialmente para diversos países (ADJALOO et al., 2012). É uma cultura realizada por pequenos produtores, trabalhadores e até empregados em fábricas de processamento, fornecendo subsistência para mais de 40 milhões de pessoas em todo mundo. O cacau é produzido em mais de 7,5 milhões de hectares em partes da América Latina, África Ocidental e Indonésia (FRANZEN e

MULDER, 2007; ADJALOO et al., 2012). Ainda que a indústria de chocolates seja estimada com um valor global de cerca de US \$ 95 bi (PIPITONE, 2012), seu pós-colheita ainda é um processo tradicional e descontrolado (DE MELO PEREIRA et al., 2013) conduzido por espécies de microrganismos naturais e espontâneos (SCHWAN e WHEALS, 2004; LIMA et al., 2011; HO et al., 2014).

O cacau produzido no Brasil reúne as características essenciais para adotar uma estratégia de diferenciação e se posicionar estrategicamente no mercado. A Amazônia brasileira apresenta cacau de alto padrão de qualidade que poderia estar sendo beneficiada pela produção e exportação do fruto, pois atende às exigências de indústrias internacionais para a produção de um ótimo chocolate. (CEPLAC/SUEPA, 2013). É possível ainda agregar valor às amêndoas fermentadas na Amazônia através do registro de Indicação Geográfica (IG), o que lhes atribui reputação, valor intrínseco e identidade própria, além de os distinguir em relação aos seus similares disponíveis no mercado. São produtos que apresentam uma qualidade única em função de recursos naturais como solo, vegetação, clima e o saber fazer (MAPA, 2009).

Apesar de o Brasil ser o quinto maior produtor de cacau do mundo e os estados da Bahia e Pará serem os principais responsáveis por essa produção, é no estado do Espírito Santo a única indicação geográfica referente a cacau existente no país (IBGE/INPI, 2017).

Com o sistema de rastreabilidade de produtos a partir da sua origem, as práticas agrícolas poderiam ser padronizadas de acordo com os requisitos qualitativos dos fabricantes de chocolate, ou informações sobre as atividades dos agricultores poderiam ser incluídas no processo de tomada de decisão operacional da indústria de chocolates (SALTINI, et al., 2013).

Devido à falta de padronização das práticas agrícolas nas etapas de pós colheita, os fabricantes de chocolate têm apenas expectativas aproximadas dos parâmetros qualitativos por país de origem. Para evitar a dependência de fornecedor ou país de origem, os fabricantes misturam diferentes lotes de cacau com o objetivo de uniformizar as matérias-primas e a partir desta mistura os parâmetros de qualidade são ajustados (SALTINI et al., 2013).

De acordo com a *International Cocoa Organization* (ICCO, 2017) a produção mundial de cacau reduziu 6,6% na safra de 2014/2015 em comparação com a safra de 2015/2016. Na América a redução foi de 36 mil toneladas, na África de 157 mil toneladas e na Ásia e Oceania de 3 mil toneladas. Esta redução pode estar ligada as mudanças climáticas drásticas que o mundo está passando, como por exemplo, as mudanças provocadas pelo fenômeno *El Niño*.

Gateau-Rey et al. (2018) através de estudos sobre o efeito do *El Niño* na Bahia, comprovaram que devido à seca severa a produção de cacau reduziu em 89% nas principais safras de abril de 2016 e 2017 e destruiu 15% dos cacauzeiros

A África continua sendo a maior produtora de cacau, seguida das Américas e da Ásia e Oceania. Os países que mais se destacam nesta produção de acordo com o continente são Costa do Marfim, Equador e Indonésia, com 55%, 33% e 83% respectivamente. O Brasil apesar de ser o segundo país de maior importância em produtividade e ter apresentado uma baixa na temporada de 2015-2016, espera-se uma recuperação para esta última temporada, com aumento de 50 mil toneladas.

Em comparação com a temporada anterior, os preços médios do cacau internacional registraram um aumento de 10% na temporada 2014/2015 e uma redução de 34% na temporada 2015/2016, conforme medido pelo preço diário da ICCO. Os preços do cacau foram em média de US\$ 3,28 por tonelada no ano 2015/2016. Após um período de movimentos irregulares dos preços, o valor do cacau seguiu uma tendência ascendente de abril a meados de julho de 2015, apesar das preocupações persistentes relacionadas ao impacto do *El Niño*. No entanto, a partir de meados de julho até meados de agosto de 2015, os preços do cacau sofreram abalo, devido a perspectiva de um aumento nas taxas de juros dos EUA. Eles retomaram sua tendência ascendente em setembro em meio a preocupações com o impacto das condições climáticas de secas prevalentes na África Ocidental (ICCO, 2016).

O *Fairtrade* apresenta-se como uma abordagem alternativa ao comércio internacional, garantindo que um preço justo seja pago diretamente aos agricultores, assegurando um preço mínimo acima do custo de produção, independentemente do preço mundial. A Organização Internacional do Cacau (ICCO) e vários fabricantes de chocolate têm projetos em andamento com o objetivo de alcançar o desenvolvimento sustentável. Estes envolvem treinamento de agricultores, apoio a cooperativas e eficiência aprimorada da cadeia de suprimentos, garantindo que uma maior proporção do preço mundial atinja os agricultores. Além disso, a rastreabilidade dos suprimentos de amêndoas de cacau é assegurada para os fabricantes (BECKETT, 2011).

### 3.6 ÍNDICE DE QUALIDADE DO CACAU (*COCOA QUALITY INDEX*)

As etapas de pré colheita, colheita e pós colheita do cacau são primordiais para obtenção de amêndoas de cacau de qualidade. Para Fowler e Coutel (2017), a qualidade apresenta diversos aspectos como: segurança alimentar, fatores econômicos e aspectos qualitativos. A segurança alimentar diz respeito aos padrões de contaminação biológica e química encontrados

no cacau. Cada país apresenta limites para evitar surtos alimentares e os países produtores devem se enquadrar nas legislações do seu país e dos países aos quais pretendem exportar. As principais preocupações neste aspecto estão relacionadas a amêndoas mofadas, infestadas e com danos por insetos, presença de micotoxinas, contaminadas com metais pesados, hidrocarbonetos minerais e pesticidas. A perspectiva da qualidade econômica se refere ao rendimento do material útil, que determina o preço que o cacau será vendido. A avaliação qualitativa do cacau está relacionada também à presença de sabores indesejáveis e estranhos (*Off-flavors*), além de propriedades físicas como dureza da manteiga de cacau. Esses fatores qualitativos irão determinar o tipo de cacau e sua utilização na indústria de alimentos.

Um parâmetro muito utilizado por produtores e compradores de cacau para classificar amêndoas de qualidade (bem fermentadas) é o teste de corte (*Cut test*). Neste teste, as sementes são cortadas longitudinalmente para que a cor interna seja analisada. Aquelas sementes com coloração acinzentada, não estão fermentadas. As que apresentam coloração violácea são caracterizadas como parcialmente fermentada, enquanto que as que se apresentam com coloração marrom, são consideradas fermentadas. Porém, por ser um método baseado na avaliação visual, torna-se subjetivo. Portanto, métodos alternativos para a determinação da qualidade das amêndoas de cacau fermentadas são necessários (ROHAN, 1964; LOPEZ, 1984; LOPEZ e DIMICK, 1995; ARANA-SANCHEZ et al., 2015).

Araújo et al. (2014) propuseram um índice de qualidade para o cacau (*Cocoa Quality Index*), que se refere às propriedades, processos e características deste alimento, para auxiliar na determinação da qualidade, já que o mercado atual enfrenta questões de como avaliar, identificar e fornecer este alimento as indústrias de chocolate. São utilizados como indicadores de qualidade para este tipo de indústria os parâmetros: gordura total, pH, acidez total, fenólicos totais, substâncias fenólicas como catequina e epicatequina, ácidos orgânicos como láctico e acético e metais pesados como bário, cádmio, chumbo e cobre.

### 3.7 PERFIL AROMÁTICO DAS SEMENTES E AMÊNDOAS DE CACAU

Indicadores como tamanho, cor e acidez das sementes de cacau são utilizados para avaliar a qualidade, no entanto, a quantidade e qualidade de compostos voláteis é o mais importante indicador, pois o sabor e aroma de chocolate são os principais responsáveis pela aceitabilidade do produto final (MAGI et al., 2012; KRÄHMER et al., 2015).

Existem dois tipos importantes de células dentro dos cotilédones: células de armazenamento contendo gordura e proteínas, e as células de pigmentos contendo compostos

polifenólicos (catequina e epicatequina) e metilxantinas (teobromina, teofilina e cafeína). Na fermentação, no processo de germinação da semente, há absorção de água dentro das células de armazenamento. Quando ocorre a morte do gérmen, as paredes celulares e membranas se quebram permitindo que compostos e enzimas entrem e contato e reajam. Essas reações que ocorrem são causadoras dos precursores (aminoácidos livres e açúcares redutores) do sabor e aroma de chocolate. As taxas com que essas reações vão ocorrer são definidas pelas condições de temperatura e nível de acidez (BECKETT, 2011).

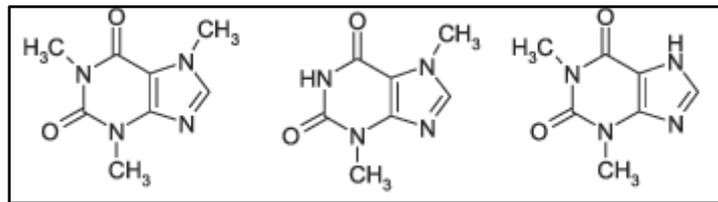


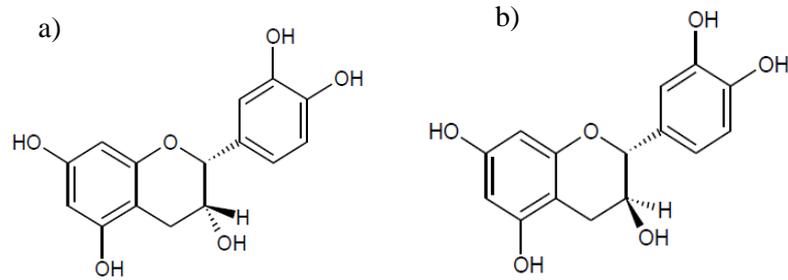
Figura 2: Estrutura da cafeína, teobromina e teofilina. **Fonte:** Beckett (2011).

Craack et al. (2013) afirmam que uma fermentação conduzida corretamente é um pré-requisito para a produção de cacau de alta qualidade, visto que as amêndoas que não passam por uma fermentação adequada não irão produzir aromas específicos. As leveduras apresentam um papel crucial nesta etapa, pois produzem ésteres e álcoois superiores que têm sido sugeridos na contribuição da complexa mistura de compostos aromáticos voláteis.

A elevação da temperatura e os vários metabólitos, como os ácidos orgânicos, produzidos durante a fermentação de cacau causam a morte do gérmen, reduzindo assim os compostos de sabor amargo e fornecendo precursores para a formação de aroma e sabor característico de chocolate nas etapas subsequentes (MAURA et al., 2016).

As metilxantinas, responsáveis pelo amargor característico, durante a fermentação tem seu teor reduzido cerca de 30%, provavelmente devido à difusão dos cotilédones. Os compostos fenólicos são responsáveis pela cor e adstringência na boca, seu teor também é reduzido durante a fermentação e secagem, sendo as antocianinas rapidamente hidrolisadas para cianidinas e açúcares pela enzima glicosidases. Esta hidrólise está relacionada com a perda da cor roxa dos cotilédones do cacau *Forastero*. O escurecimento das amêndoas fermentadas também é causado pela reação catalisadora da enzima polifenoloxidase, que converte os flavonóis (principalmente epicatequina) em quinonas (BECKETT, 2011).

Figura 3: Estrutura Epicatequina (a) e da catequina (b)



Fonte: Beckett (2011).

O sabor característico do chocolate é gerado como resultado de várias etapas do processamento. Dependendo da variedade de cacau utilizada, condições de fermentação e torração das amêndoas de cacau e o processo de concha irão acarretar diferenciações do sabor e aroma. Schnermann e Schieberle (1997) isolaram compostos voláteis da massa de cacau através de cromatografia gasosa capilar (HRGC) acoplada a espectrometria de massa e caracterizaram o perfil aromático apresentado na Tabela 4 abaixo:

**Tabela 4.** Compostos voláteis de massa de cacau e suas referências sensoriais.

Compostos voláteis	Referência sensorial
3-metilbutanal	Maltado
2-metilpropanoato de etila	Frutado
2,3-butanodiona	Amanteigado
2-metilbutanoato de etila	Frutado
hexanal	Verde
1-hexen-3-ona	Óleo de linhaça
trans-4-heptenal	Doce, biscoito
trisulfito de dimetila	Sulfuroso
nonanal	Ensaboado
trimetilpirazina	Terra, batata
2-metoxi-3-isopropilpirazina	Terra
cis-2-octenal	Gorduroso, cera
2-etil-3,6-dimetilpirazina	Noz, terra
2-etil-3,5-dimetilpirazina	Batata frita
2,3-dietil-5-etilpirazina	Batata frita
trans-2-nonenal	Sebo, verde

cis-2-nonenal	Verde, gorduroso
ácido butanoico	Manteiga, ranço
(E) -2-decenal	Gorduroso, verde
fenilacetaldéido	Mel, doce
ácido 2,3-metilbutanóico	Azedo
2-metil-3- (metiltio) furano	Carne cozida
(E, E) -2,4-nonadienal	Gorduroso, cera
2-feniletanol	Floral, doce
$\delta$ -octenolactona	Doce, coco
$\gamma$ -nonalactona	Doce, pêssego
cinamato de etila	Doce, canela
$\gamma$ -decalactona	Doce, pêssego
3-hidroxi-4,5-dimetil-2 (5H) -furanona (sotolon)	Picante
3-hidroxi-5-etil-4-metil-2 (5H) -furanona (abhexona)	Picante

**Fonte:** Schnermann e Schieberle (1997).

Os diferentes métodos de fermentação proporcionam diferenças na aceitabilidade e sabor de chocolate e no perfil aromático do produto final, pois cada produtor estabelece um tempo de fermentação e armazenamento e adoção ou não da prática de revolvimento (BAKER, TOMLINS, GAY; 1994). Reed (2010) caracterizou o perfil aromático de cacau dos diferentes países produtores, observa-se que o cacau da variedade *Forastero* da Costa do Marfim apresentou notas frutadas e de nozes, além de baixo amargor e acidez, já o cacau da mesma variedade produzido no Peru é ligeiramente amargo e com notas frutadas, enquanto que o cacau produzido no Brasil apresenta notas amargas, adstringente, ácida e frutada.

As leveduras apresentam papel crucial na formação dos precursores dos aromas envolvidos na fermentação do cacau, pois as reações bioquímicas endógenas propiciadas por elas levam a uma alteração do perfil aromático das amêndoas fermentadas (HO et al., 2014). Devido sua capacidade de converter de forma eficiente concentrações relativamente altas de açúcares em etanol e dióxido de carbono, além de produzir uma vasta gama de outros compostos, incluindo vários álcoois superiores, compostos de carbonila, compostos fenólicos e derivados de ácidos graxos, sendo muitos desses metabólitos voláteis com aromas específicos, esses microrganismos são constantemente estudados para que este mecanismo seja completamente entendido e controlado (DZIALO et al., 2017). Crafacck et al. (2013) estudaram

o potencial das leveduras aromáticas e pectinolíticas sobre o sabor do cacau através da inoculação de culturas das espécies *Pichia kluyveri* e *Kluyveromyces marxianus* em fermentação do cacau e revelou que as duas espécies foram capazes de melhorar o perfil aromático do chocolate produzido a partir desta fermentação controlada.

Lefeber et al. (2012) adicionaram leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) à fermentação de cacau e foi possível produzir cacau fermentado de alta qualidade e obtiveram chocolates com atributos sensoriais superiores. Meersman et al. (2015) utilizando esta mesma espécie de levedura na fermentação de cacau, melhoraram a produção de chocolate devido ao aumento da produção de ésteres de acetato produzido pela *Saccharomyces cerevisiae*.

Saez et al. (2011) comprovaram pela primeira vez a capacidade das espécies *Pichia manshurica* e *Pichia membranifaciens* de produzir compostos fenólicos voláteis a partir da produção de vinhos na Argentina. Segundo Pereira et al. (2017) a levedura *Pichia kudriavzevii* é uma espécie que exibe uma grande diversidade genética e metabólica e a inoculação deste microrganismo em fermentação de cacau pode melhorar a cor e composição de aroma das amêndoas fermentadas. Em estudo realizado por Ramos et al. (2014), observou-se que a inoculação de culturas híbridas e *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação de cacau altera o perfil dos compostos voláteis das amêndoas fermentadas.

### 3.8 COMPOSTOS FENÓLICOS E METILXANTINAS DAS SEMENTES DE CACAU

Os compostos fenólicos estão presentes no reino vegetal e são metabólitos secundários, ou seja, não apresentam ação direta nas atividades bioquímicas primárias de crescimento, desenvolvimento e reprodução, mas agem na adaptação vegetal a condições de estresse ambiental, como agressão de patógenos e radiação ultravioleta (CLIFFORD, 1989; FARAH e DONANGELO, 2006).

A rota biogenética dos compostos fenólicos surge a partir de dois caminhos primários de síntese, o caminho do acetato e do chiquimato, ambos, derivados do metabolismo da glicose. A via do acetato é responsável por 40% dos compostos fenólicos e são derivados da condensação da unidade iniciadora, o acetil-CoA, com a unidade propagadora, o malonil-CoA. Já a via do chiquimato, responsável por 60% dos compostos fenólicos, representa o caminho primário para a produção de aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e tirosina. A origem biogenética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante e sua biossíntese é mais intensa durante as fases de diferenciação celular e crescimento vegetal (BRUNETON, 1991; SIQUEIRA, 1991).

Somente os vegetais e microrganismos são capazes de sintetizar os compostos fenólicos (SIQUEIRA, 1991) e são classificados de acordo com o tipo e número de anéis fenólicos e em subclasses de acordo com substituições que podem ocorrer na sua estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas (FARAH e DONANGELO, 2006). Estes compostos são considerados complexos do ponto de vista estrutural, porém, muitos compostos apresentam suas unidades fenólicas relativamente simples, arranjados em formas repetidas com grande número de grupos substituintes e isômeros estruturais (ZUMBÉ, 1998).

Historicamente, os compostos fenólicos sempre estiveram presentes na medicina tradicional devido aos seus benefícios diuréticos e antiinflamatórios e para tratamento de diversas doenças, como doenças circulatórias e cardíacas, digestivas e renais. Atualmente, estes compostos tem sido foco de estudo de diversos autores que conseguem comprovar seus efeitos anticarcinogénico, antiaterogênico, antitrombótico, antiinflamatório, antialérgico, imunomodulador, antimicrobiano, vasodilatador e analgésico (ZUMBÉ, 1998, WOLLGAST e ANKLAM, 2000). Alimentos como vinho tinto e chás sempre foram consumidos por apresentarem propriedades antioxidantes, porém, Lee et al. (2003) comprovaram que o cacau contém maiores teores de compostos fenólicos totais (611 mg de equivalentes de ácido gálico, EG) e flavonóides (564 mg de equivalentes de epicatequina, ECAT) por porção do que o chá preto (124 mg de EG e 34 mg de ECAT, respectivamente), chá verde (165 mg de EG e 47 mg de ECAT) e vinho tinto (340 mg de EG e 163 mg de ECAT).

Seu modo de ação em sistemas biológicos que são responsáveis por efeitos benéficos a saúde estão relacionados a capacidade de complexar íons metálicos, eliminar espécies de radicais livres e complexar proteínas e polissacarídeos. Estas características são muito derivadas da existência de fenol e grupos aromáticos na molécula de polifenol (HASLAM et al., 1989; HASLAM, 1996). Andújar et al. (2012) compilaram os principais efeitos benéficos que os polifenóis do cacau podem gerara a saúde humana, normalmente ligados a doenças cardiovasculares e inflamatórias, distúrbios metabólicos e prevenção do câncer, onde o estresse oxidativo é uma das principais causas para a doença. Esta propriedade antioxidante favorece a inibição da peroxidase lipídica e a proteção do LDL-colesterol, também podem agir modificando a resposta glicêmica e modular a inflamação intestinal através da redução da filtração de neutrófilos e expressão de diferentes fatores de transcrição, o que leva a diminuições na produção de enzimas pró-inflamatórias e citocinas. Além disso, apresentam efeitos antiproliferativos, antimutagênicos e quimioprotetores.

Os principais compostos fenólicos encontrados no cacau são os taninos e os flavonoides. Os taninos são compostos que apresentam desde intermediário a elevado peso molecular e são altamente hidroxilados e tem capacidade de formar complexos insolúveis quando em contato com carboidratos e proteínas, e podem ser classificados como taninos hidrolisáveis e condensáveis (WOLLGAST e ANKLAN, 2000). Já os flavonoides são classificados em 14 tipos de acordo com Seigler (1995), sendo que a maioria dos compostos identificados pertence a apenas seis tipos: flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanóis (também chamada de flavan-3-óis), isoflavonas e antocianinas. Com destaque para os flavanóis, que são os mais abundantes, representados pela (+) catequina e (-) epicatequina, sendo esta última o flavanol principal do cacau, responsável por 35% do conteúdo total de compostos fenólicos.

De acordo com Zumbé (1998) os compostos fenólicos presentes no cacau não são distribuídos uniformemente na semente, sendo a maioria encontrada nas células pigmentares que compreendem 2% a 10% da semente. As células de pigmento contêm aproximadamente 65% a 70% de polifenóis e 3% de antocianinas. O saldo é explicado pela teobromina, cafeína, açúcar; componentes de amido e parede celular

Durante o processo de fermentação as reações bioquímicas, que ocorrem dentro das sementes, são responsáveis pela difusão dos compostos fenólicos, que posteriormente entram em contato com enzimas como a polifenoloxidase e glicosidase, fazendo com que essas reações enzimáticas ocorram e conseqüentemente, o teor de compostos fenólicos seja reduzido ao longo da fermentação (FORSTHY e QUESNEL, 1958). Segundo Brito (2000), o teor de compostos fenólicos diminui cerca de 70%, sendo a epicatequina o composto que mais decai, em cerca de 90%, devido este ser o principal substrato da polifenoloxidase. Já na etapa de secagem, posterior a fermentação do cacau, a redução do teor de compostos fenólicos é atribuída ao escurecimento enzimático causado também pela polifenoloxidase e pelo escurecimento não enzimático causado pela polimerização das quinonas, resultantes da acumulação de compostos insolúveis.

Para Afoakwa (2008) os compostos fenólicos nas sementes de cacau são indicativos de qualidade pois proporcionam cor marrom e sabor característico de cacau e conseqüentemente, dos produtos processados a partir dele. Além disso, fornecem também o amargor e adstringência, presente em chocolates com maiores teores de cacau.

O desenvolvimento de sabor de cacau é inversamente proporcional ao teor de compostos fenólicos nas sementes, pois sementes com alto teor de compostos fenólicos apresentam sabor prejudicado pela elevada adstringência e amargor, enquanto que sementes com sabor apreciado pelo mercado internacional têm baixos teores de compostos fenólicos, pelo mesmo motivo.

Quando a fermentação é conduzida de maneira inadequada, com tempo menor do que o recomendado que é de cerca de sete dias, o teor de compostos fenólicos é mantido por não haver tempo suficiente para sua degradação (EFRAIM, 2004).

O teor de compostos fenólicos presentes no cacau sofre variação por uma série de fatores, como variedade genética do fruto, clima em que o cacauzeiro é cultivado, propriedades químicas do solo, região de cultivo e métodos de fermentação (JALIL e ISMAIL, 2008). Segundo Wang et al. (2016) é durante a fase de amadurecimento das sementes de cacau que esses compostos se acumulam de maneira mais pronunciada. Carrillo et al. (2014) sugerem que quanto menor a altitude do local de desenvolvimento do cacauzeiro, mais compostos fenólicos são produzidos no cacau e que para Niemenak et al. (2006) outro fator que deve ser levado em consideração é o estresse abiótico sofrido pelo cacauzeiro, pois condições de baixo aporte hídrico, excessiva incidência solar e baixa umidade irão impactar diretamente na quantidade de compostos fenólicos produzidos pela planta.

No Brasil, de acordo com Sanbongi et al. (1998), a variedade de cacau *Forastero*, que é a mais utilizada no mundo todo para a fabricação de chocolate, possui elevada concentração de compostos fenólicos quando comparadas a sementes da mesma variedade em outros países produtores de cacau. Do Carmo Brito et al. (2017) avaliaram os compostos fenólicos do cacau da variedade *Forastero* cultivados na Amazônia Brasileira, que apresentou 53,26 (mg ECAT/g) ao final da fermentação, enquanto que Suazo, Davidov-Pardo e Arozarena (2014) encontraram valores de 43,0 (mg ECAT/g) em estudo realizado na Nicarágua com cacau da variedade *Trinitario*.

Embora a maioria dos estudos façam referência aos efeitos benéficos do consumo do cacau atribuíveis aos compostos fenólicos, existem também as metilxantinas, nomeadamente cafeína, teobromina e teofilina. A teobromina é a principal metilxantina do cacau e representam cerca de 3,2% da sua composição, enquanto que a cafeína representa 0,2% e a teofilina presente em baixíssimas quantidades (SCHULTZ, PRINSEN e PATER, 1970; TIMBIE, SECHRIST, e KENNEY, 1978).

As metilxantinas que são compostos inodoros e incolores, são semelhantes quimicamente e apresentam diferenças nas estruturas no grupo NH das moléculas. A teobromina é responsável pelo amargor nas sementes de cacau, que se dá através do efeito combinado da teobromina com as dicetopiperazinas que ocorrem como resultado do processo de torrefação. Já a teofilina, também conhecida como dimetilxantina, pode ser encontrada em

cacau e chás e possui similaridade estrutural e farmacológica a cafeína e teobromina. A cafeína encontrada no cacau, apesar de em baixas quantidades, apresenta efeito psicoestimulante no ser humano e age como um pesticida natural no cacau, pois paralisa e mata certos insetos que se alimentam das plantas. Essas substâncias, assim como os compostos fenólicos, são compulsivamente estudadas pelos efeitos benéficos a saúde, com efeitos nos sistemas nervoso central, cardiovascular, gastrointestinal, respiratório e renal (MATISSEK, 1997, BÜYÜKTUNCEL, 2010; XIA, NI, KOKOT, 2013).

As metilxantinas podem ser utilizadas como parâmetros analíticos importantes na avaliação da qualidade de produtos de cacau, sendo seu teor fortemente influenciado pelo método de fermentação e secagem, genótipo e origem geográfica do cacau (MATISSEK, 1997; PELÁEZ, BARDÓN, CAMASCA, 2016). Para Del Rosario Brunetto (2007) é importante avaliar a cafeína, teobromina e teofilina, visto que esses compostos estão correlacionados com notas amargas e seus níveis afetam o sabor dos subprodutos do cacau, e conseqüentemente, a qualidade.

Menguy et al. (2009) relatam que o cacau fresco tem teor de teobromina e cafeína de 27 e 6,1 mg/g, respectivamente, enquanto o cacau fermentado tem 21 e 4 mg/g, respectivamente. Embora os alcalóides não sofram transformações químicas durante a fermentação, cerca de 30% são eliminados por difusão e migração para o exterior das sementes (CAMU et al., 2008) e essas quantidades de metilxantinas que ficam no interior das sementes não apresentam efeito negativo na saúde humana por representarem uma porcentagem baixa na ingestão diária recomendada (MATISSEK, 1997).

Diversos autores comprovam a eficácia do consumo de metilxantinas. Estudos em mamíferos concluíram que as metilxantinas atuam através de uma variedade de mecanismos moleculares diferentes: mobilização de cálcio intracelular, inibição de fosfodiesterases (PDEs), modulação de receptores do ácido gama-amino-butírico (GABA), inibição de antagonistas de nucleotídeos cíclicos dependentes de ATP de alta afinidade e antagonismo de receptores de adenosina (ARONSEN et al., 2014, FRANCO, OÑATIBIA-ASTIBIA e MARTÍNEZ-PINILLA, 2013). Cerasi e Luft (1969) comprovaram que a presença de metilxantinas pode afetar positivamente o metabolismo da glicose.

A teobromina e teofilina são usadas para fins farmacêuticos como broncodilatadores e vasodilatadores e também como relaxantes musculares (BISPO et al., 2002). Já a cafeína estimula o sistema nervoso central, o músculo cardíaco, o sistema respiratório e a secreção

gástrica (GENNARO e ABRIGO, 1992). Eteng e Etarh demonstraram que doses únicas de teobromina (700 mg/kg de peso corporal) reduziram significativamente os perfis lipídicos em ratos hiperlipidêmicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 FERMENTAÇÃO DAS SEMENTES DE CACAU

Os frutos de cacau da variedade *Forastero* foram colhidos nos meses de outubro de 2017 (temporada menos chuvosa) e fevereiro de 2018 (temporada mais chuvosa) no município de Inhangapi, Pará (1° 25' 48" S, 47° 55' 1" W) e a fermentação foi realizada conforme método já estabelecido na fazenda produtora. Os frutos foram colhidos e empilhados em determinadas áreas de fazenda para a abertura dos frutos no próprio local em 48 h (tempo padrão). Os frutos foram abertos manualmente com auxílio de facas para a separação da polpa e casca. As cascas foram despejadas no próprio terreno da fazenda para servir de adubo e as polpas com as sementes foram acondicionadas em basquetas para serem transportadas para área de fermentação. Aproximadamente 200 kg de polpa de cacau foram transferidos para os cochos de fermentação de madeira com área de 0,4 m<sup>3</sup>. As sementes foram cobertas com sacos de aniagem para manter a temperatura da fermentação. Foram realizados revolvimentos diários após 48 h do início da fermentação. O tempo total do processo fermentativo ocorreu em seis dias (144 h).

### 4.2 AMOSTRAGEM

Amostras de 400 g de sementes de cacau foram coletadas durante a fermentação nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144h, armazenadas em sacos de polietileno estéreis e mantidos sob congelamento (-18 °C). A temperatura da massa de fermentação foi medida na superfície, meio e fundo em cinco pontos aleatórios de cada tempo. A temperatura da massa de fermentação foi medida com termo higrômetro digital (Incoterm®, modelo 7663.02.0.00) e a umidade relativa do ar (%), temperatura ambiente foram obtidas através do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). O tempo total do processo fermentativo ocorreu em 6 dias no cocho de fermentação. Após esse período, as amêndoas foram transportadas ao laboratório de microbiologia da UFPA e foram secas em estufa de circulação de ar a 35-40 °C até atingir umidade entre 5 a 6%. Optou-se pela secagem em laboratório para evitar a proliferação de fungos. As amostras foram mantidas sob congelamento (-18 °C) até a realização das análises.

### 4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras foram descongeladas para realização das análises (n = 3). Retirou-se a testa e o embrião das amêndoas de cacau e os cotilédones foram moídos em moinho analítico (Ika® modelo A11B).

As análises foram realizadas segundo os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2006) para amêndoas de cacau e seus derivados: acidez total titulável (31.06.06, AOAC), pH (970.21, AOAC), umidade (931.04, AOAC), cinzas (972.15, AOAC), lipídios (963.15, AOAC) e proteínas (970.22, AOAC).

Os carboidratos foram calculados por diferença (100 g - gramas totais de umidade, proteínas, lipídeos, fibras e cinzas), segundo a Resolução RDC n° 360, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003).

#### 4.4.1 Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada nas sementes de cacau coletadas em outubro e fevereiro nos tempos de fermentação de 0, 96, 144 e seco conforme o método descrito por Singleton e Rossi (1965). Os valores obtidos foram expressos em miligramas de equivalentes em catequina por grama de amêndoa seca (mgEC/g). Para a análise utilizou-se 0,1 g de cacau seco, triturado em moinho (Ika® modelo A11B) e desengordurado e adicionou-se 5 mL da solução extratora (acetona/água/ácido acético 70/29.5/05). Os tubos foram então homogeneizados por 5 min. e centrifugados a  $18000 \times g$  por 15 min. O sobrenadante foi transferido para balão de 10 mL e aferido com solução extratora e então, retirou-se 1 mL desse extrato para outro balão de 10 mL e aferiu-se com água destilada. Em novos tubos, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  do extrato diluído e 1250  $\mu\text{L}$  da solução Folin-Ciocalteu (10%) para homogeneização por 2 min em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 7,5% e a solução foi homogeneizada em vórtex. Após 90 min de espera e protegidas da luz, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific modelo EVO 60) a 760 nm ( $y = 0,0087x + 0,0349$ ,  $R^2 = 0,9909$ ).

#### 4.4.2 Perfil de compostos fenólicos e metilxantinas

A extração dos compostos fenólicos e das metilxantinas e o procedimento analítico foram realizadas de acordo com He et al. (2010). Para o preparo dos extratos, pesou-se 250 mg de cacau seco desengordurado dos tempos 0, 96, 144 e seco (outubro e fevereiro) em 2,5 mL de solução aquosa etanol:água (1:1, v/v) e centrifugou-se a  $18000 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo. Esta extração foi realizada novamente e os sobrenadantes foram unidos em novo tubo. O conteúdo foi então filtrado (filtro de membrana 0,22 mm) e armazenado sob congelamento ( $-18^\circ\text{C}$ ). Os extratos foram analisados em HPLC (Agilent Technologies modelo 1260 Infinity) e os padrões catequina, epicatequina, teobromina, cafeína e teofilina (Sigma-Aldrich) foram utilizados para a construção das curvas padrão.

Utilizou-se um sistema cromatográfico equipado com coluna (Zorbax Eclipse XDB-C18. 4,6 x 150 mm, 5µm) C18 a 25 °C e detector de arranjo de diodos. Solução aquosa de acetonitrila a 0,2% (eluyente 1) e metanol (eluyente 2) foram degaseificados em banho ultrassom (Ultronique modelo Q3.0/40A) e filtradas (0,45 mm) para serem utilizadas como fases móveis. Utilizou-se como gradiente o eluyente dois aumentando de 0 a 50% durante 0-12 min e, em seguida, aumentando-se de 50% para 100% durante 13-20 min. A taxa de fluxo e o volume de amostra injetada foi de 1,2 mL por min e 20 µL, respectivamente. A identificação dos picos cromatográficos foi realizada a 280 nm e comparados os seus tempos de retenção com os dos padrões.

#### 4.4.4 Metais pesados: bário, cádmio, chumbo e cobre

Foram pesadas diretamente nos vasos de digestão 0,25 g de amostras de cacau fermentado e seco das diferentes temporadas do ano e em seguida 4 mL de HNO<sub>3</sub> 14 mol L<sup>-1</sup>, 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% m/m e 2 mL de H<sub>2</sub>O foram adicionados. A programação de aquecimento do forno de micro-ondas (tempo[min]/ potência[W]/ temperatura[°C]) foi 15/800/180 (rampa) e 15/800/180 (patamar) e 50 min de ventilação. Após a digestão, as amostras foram filtradas e aferidas para 40 mL.

As amostras foram digeridas em um forno de micro-ondas com cavidade (Start E, Milestone). Para a análise de Ba, Cd, Cu e Pb foi usado um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (modelo 4100, Agilent Technologies, Melbourne, Austrália). Para alimentar o plasma foi utilizado N<sub>2</sub> produzido a partir de um gerador de nitrogênio.

#### 4.5 Extração dos compostos voláteis das sementes de cacau fermentadas

As amêndoas de cacau dos tempos 0, 96, 144 e seco foram moídas em moinho (Ika® modelo A11B) para serem submetidas à destilação/extração simultânea por duas horas utilizando 4 mL de pentano como solvente, no Laboratório Adolpho Ducke (LAD) no Museu Emílio Goeldi. O concentrado volátil (CV) obtido foi armazenado a uma temperatura de 5 °C.

#### 4.6 Identificação dos compostos voláteis por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM)

A análise de composição química dos constituintes voláteis das amêndoas de cacau foi realizada no Laboratório Adolpho Ducke (LAD) no Museu Paraense Emílio Goeldi. injetou-se 2µL de concentrado pentânico e injetada sem divisão de fluxo 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). Utilizou-se o gás hélio como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL/min. A temperatura do injetor e da interface foi de 250 °C e a temperatura do forno ajustada de 60-250 °C, utilizando-se uma rampa de 3°C/min. Utilizou-se espectrômetro de massa por impacto eletrônico a 70 eV e a temperatura da fonte de íons a 220 °C. A identificação química foi realizada através da comparação dos espectros de massas e índices de retenção (IR) com os de substâncias padrão existentes nas bibliotecas do sistema e com dados da literatura (ADAMS, 2007). Os IRs foram obtidos utilizando uma série homóloga dos n-alcenos (C8-C24).

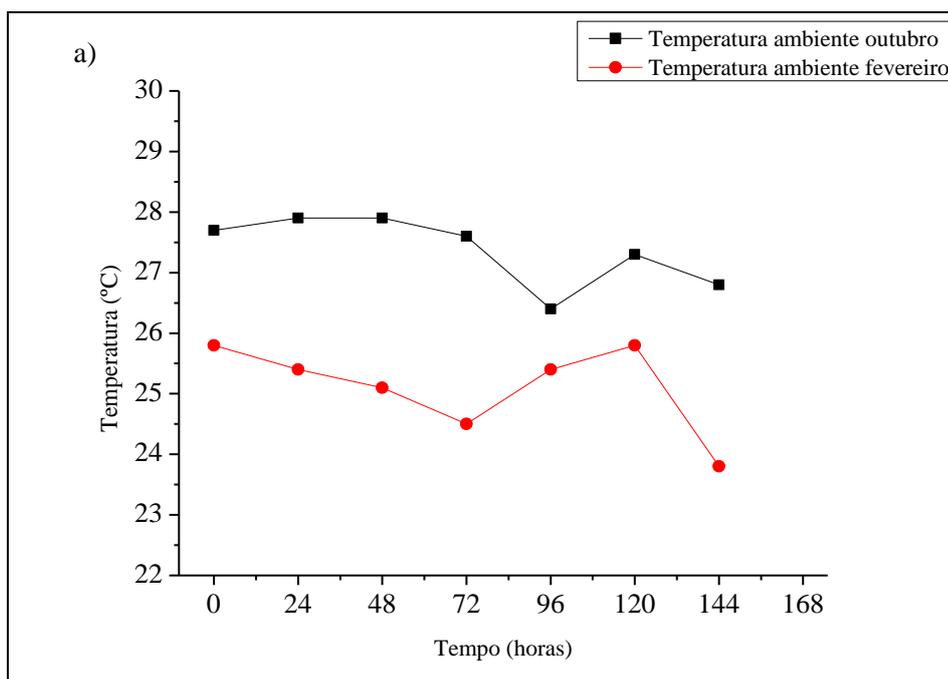
#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

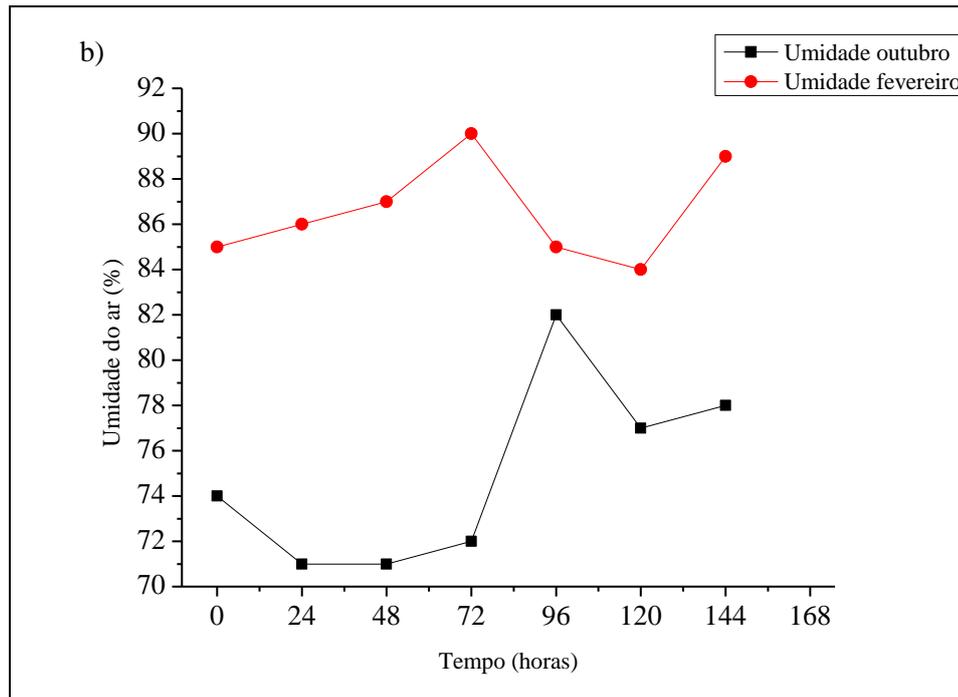
Os resultados foram analisados através do software Statistica para obtenção de médias, desvio padrão, análise de variância (ANOVA), teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Utilizou-se também o software Past para realização da análise do componente principal (ACP) e hierárquica (ACH).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TEMPERATURA AMBIENTE, UMIDADE DO AR E TEMPERATURA DA MASSA DE FERMENTAÇÃO DE CACAU

A temperatura e umidade ambiente durante a fermentação são apresentadas nas Figura 4a e 4b e na Tabela 5.





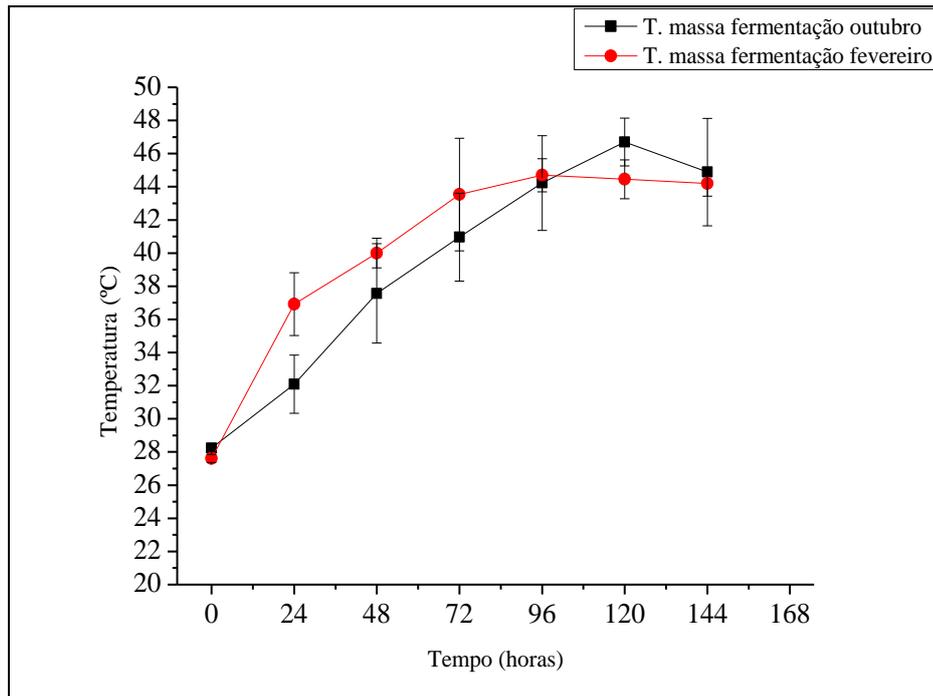
**Figura 4.** Comportamento da temperatura ambiente no verão em outubro e em fevereiro (a) e umidade relativa do ar (%) em outubro e em fevereiro (b).

O estudo da temperatura ambiente nas áreas em que o cacau se desenvolve é de suma importância para entender como esta variável poderá influenciar o desenvolvimento das árvores de cacau e seus frutos. End et al. (1988) e Dircks (2009) relatam que a temperatura ambiente além de afetar o desenvolvimento do cacau, afeta também o tamanho final e composição do fruto, e conseqüentemente, a população microbiana existente na fermentação, já que a polpa serve como substrato para esses microrganismos. Em relação à precipitação pluviométrica, estudos de Adjaloo e Banful (2012) indicam que o cacau apresenta seu auge de floração nas estações chuvosas e que a precipitação é um dos fatores mais críticos na produção de cacau, que irão ser utilizadas na produção do chocolate, devido às requisições hídricas do cacau.

As temperaturas ambientes encontradas neste estudo, variaram de 26,4 a 27,9 °C e de 23,8 a 25,8 °C em outubro e em fevereiro, respectivamente, onde observa-se que a temperatura média do outubro foi 2,26 °C acima da temperatura média do fevereiro. Já a umidade variou entre 71 e 82% em outubro e 84 a 90% em fevereiro. Camu et al. (2007) que realizaram fermentações em dois períodos diferentes, uma na safra média (junho a julho) e outra na safra principal (outubro a novembro), pode concluir que nos dias chuvosos, a temperatura ambiente influenciou discretamente a temperatura do cocho de fermentação, com redução de 1 a 4 °C, porém, no geral, não foram observadas diferenças pronunciadas entre as estações do ano para temperatura durante a fermentação.

Mais estudos que correlacionem os fatores externos (temperatura ambiente e umidade do ar) com os fatores internos (temperatura do cocho de fermentação e propriedades químicas das sementes) da fermentação do cacau precisam ser conduzidos para que seja possível entender e até controlar esses fatores internos e externos para a obtenção de amêndoas de cacau de melhor qualidade.

As médias da temperatura da massa fermentativa em outubro e em fevereiro são apresentadas na Figura 5 e Tabela 5.



**Figura 5.** Comportamento da temperatura da massa fermentativa em outubro e em fevereiro

**Tabela 5.** Valores médios da temperatura da massa de fermentação de cacau, temperatura ambiente e umidade do ar em outubro e fevereiro.

Tempo (h)	TEMPERATURA DA MASSA DE FERMENTAÇÃO (°C)		TEMPERATURA AMBIENTE (°C)**		UMIDADE DO AR (%)**	
	Outubro	Fevereiro	Outubro	Fevereiro	Outubro	Fevereiro
0	28,23±0,20 <sup>dA</sup>	27,61±0,24 <sup>cB</sup>	27,7	25,8	74	85
24	32,09±1,76 <sup>dB</sup>	36,92±1,89 <sup>bA</sup>	27,9	25,4	71	86
48	37,57±2,99 <sup>cA</sup>	40,00±0,89 <sup>abA</sup>	27,9	25,1	71	87
72	40,96±2,65 <sup>bcA</sup>	43,53±3,40 <sup>abA</sup>	27,6	24,5	72	90
96	44,23±2,86 <sup>abA</sup>	44,70±1,00 <sup>aA</sup>	26,4	25,4	82	85
120	46,70±1,44 <sup>aA</sup>	44,45±1,17 <sup>abA</sup>	27,3	25,8	77	84
144	44,89±3,24 <sup>abA</sup>	44,20±0,76 <sup>abA</sup>	26,8	23,8	78	89

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

\*\* Fonte: INMET (2018)

De acordo com Wood e Lass (2008) a temperatura da massa fermentativa é um importante parâmetro para avaliar o progresso do processo. Em outubro, a temperatura máxima atingida na massa fermentativa foi de 46,7 °C no tempo 120 h, enquanto que em fevereiro a máxima encontrada foi de 44,7 °C no tempo 96 h. As temperaturas ambientes nestes tempos foram de 27,3 °C e 25,4 °C, respectivamente. Este resultado indica que esta faixa de temperatura ambiente foi favorável para alcançar as temperaturas máximas na massa de fermentação. A umidade relativa do ar nestes dois tempos de fermentação (120 h outubro e 96 h fevereiro) apresentou diferença de 8%.

O aumento da temperatura da massa de fermentação é explicado através da forte atuação das bactérias acéticas que metabolizam o etanol e ácido láctico por meio de reações exotérmicas com a produção de ácido acético (SCHWAN e WHEALS, 2004).

Saltini et al. (2013) relata que outro fator que influencia na temperatura da massa fermentativa é a quantidade de sementes despejadas no cocho de fermentação, onde grandes quantidades de massa são capazes de atingir maiores temperaturas devido à retenção do calor (energia) gerado durante a fermentação quando comparados a pequenas quantidades de massa no cocho de fermentação. De Melo Pereira et al. (2013) mostraram que em fermentações realizadas em caixas de madeira com capacidade para 600 kg de polpa foi atingida temperatura de 51,1 °C em 70 h de fermentação, enquanto que em caixa com capacidade de 40 kg a temperatura de 50,3 °C foi alcançada em 137 h de fermentação.

Faixas de temperaturas da massa fermentativa de cacau entre 45 °C e 50 °C são requisitos para uma fermentação que irá gerar os precursores necessários para formação do sabor de chocolate após a torração, enquanto que temperaturas de fermentação acerca de 35 °C estão associadas a cacau mal fermentado (FORSYTH e QUESNEL, 1963). Ambas fermentações realizadas atingiram temperaturas médias na faixa recomendada a partir do tempo 96 h (outubro - 44,23 °C, fevereiro - 44,70 °C) e mantendo-se até o final da fermentação em 144 h (outubro - 44,89 °C, fevereiro - 44,20 °C).

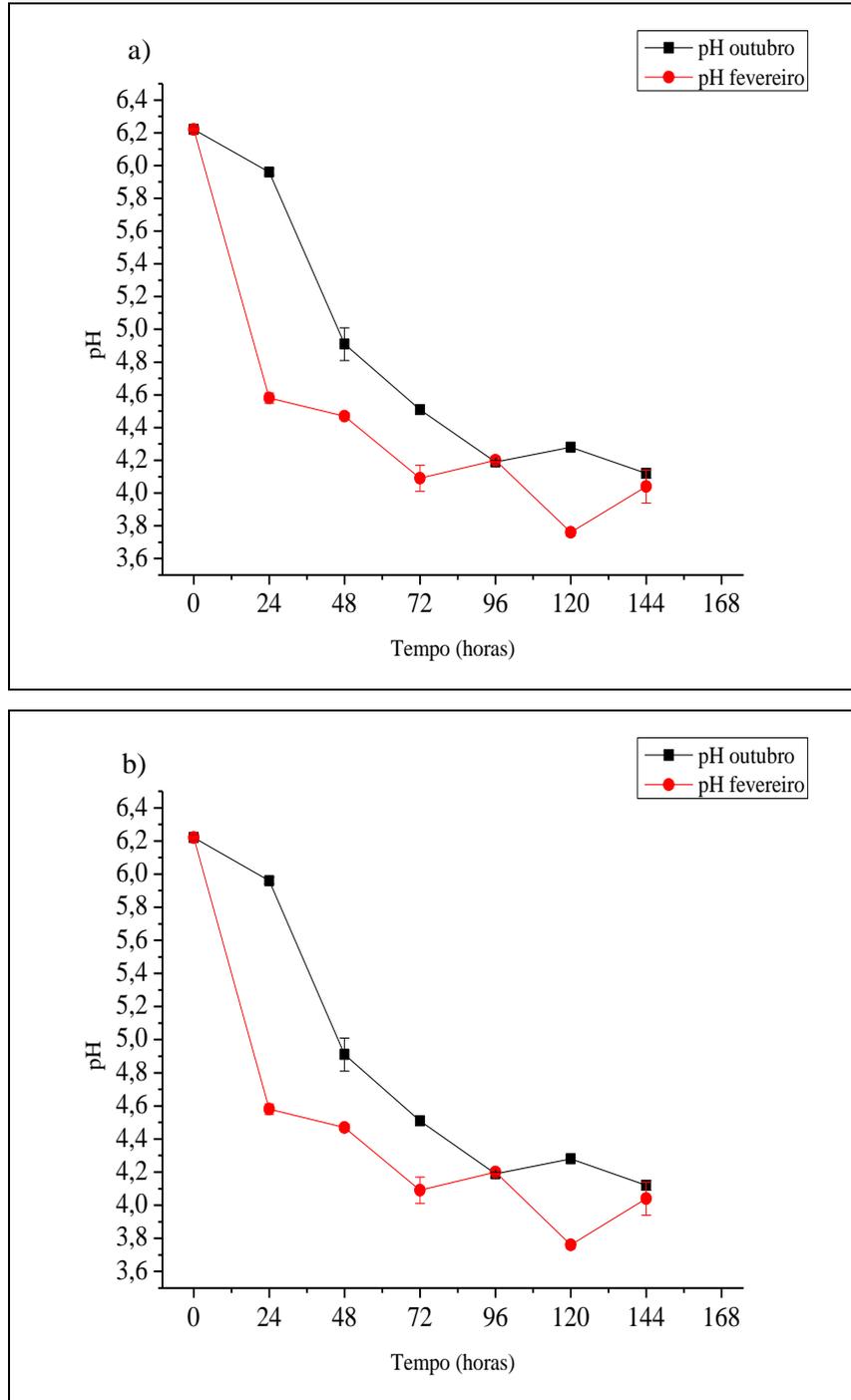
Na Figura 5 observa-se que a médias das temperaturas dos cochos de fermentação em fevereiro nos tempos 24, 48, 72 e 96 h foi superior à média das temperaturas do cocho de fermentação conduzida em outubro, porém, somente no tempo 24 que essa diferença é estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). Nos tempos 0, 120 e 144 h essa a temperatura média em outubro ultrapassou a do fevereiro, entretanto, somente o tempo 0 h e 24 h sendo estatisticamente diferente ( $p \leq 0,05$ ). Este fenômeno pode ser elucidado por Schwan e Wheals

(2004) que atribuem o aumento de temperatura a atuação das bactérias acéticas nos últimos dias de fermentação. Tal comportamento pode ser explicado pelo fato de que em temporadas mais quentes, como em outubro, (com temperaturas médias mais próximas de 30°C) as leveduras tiveram melhor adaptação ao meio fermentativo e conseqüentemente, sustentaram a produção de etanol em maior nível e por maior tempo e por isso a temperatura máxima atingida (46,70°C) foi mais elevada que em temporadas menos quentes (44,70°C).

Sandhya et al. (2016) em Puttur na Índia avaliaram a qualidade das fermentações de cacau utilizando diferentes inóculos e observaram temperaturas de 23 a 41 °C na fermentação espontânea. Papalexandratou e De Vuyst (2011) através do acompanhamento de fermentações de cacau realizadas em diversos países analisaram a temperatura das fermentações em caixas de madeira, na Costa do Marfim, as temperaturas variaram de 24 a 43,3 °C, na Malásia, através de duas fermentações, foram encontradas temperaturas variando de 28,5 a 43,9 °C e 31,8 a 42,7 °C, no Brasil, foram dirigidas quatro fermentações diferentes e obteve-se temperaturas de 26,9 a 42,2 °C, 30,4 a 48,2 °C, 25,5 a 48,5 °C e 25,6 a 47,6 °C, enquanto que no Equador observou-se 28,7 °C de temperatura inicial e 46,5 °C de temperatura final.

## 5.2 pH E ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL

Na Figura 6 é apresentado o comportamento do pH e da acidez total titulável (mEq NaOH/100g) das sementes de cacau durante a fermentação em outubro e em fevereiro e os valores médios são apresentados na Tabela 6.



**Figura 6.** Comportamento do pH em diferentes temporadas do ano (a) e da acidez total titulável (mEq NaOH/100g) (b) das sementes de cacau durante a fermentação.

**Tabela 6.** Valores médios de pH e acidez total titulável (mEq NaOH/100g)

Tempo (h)	pH		ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL mEq NaOH/100g	
	Outubro	Fevereiro	Outubro	Fevereiro
0	6,22±0,02 <sup>aA</sup>	6,22±0,02 <sup>aA</sup>	4,82±0,12 <sup>fA</sup>	3,19±0,10 <sup>eB</sup>
24	5,96±0,02 <sup>aA</sup>	4,58±0,03 <sup>bB</sup>	6,56±0,11 <sup>eB</sup>	11,46±0,6 <sup>dA</sup>
48	4,91±0,10 <sup>bA</sup>	4,47±0,02 <sup>bB</sup>	13,18±0,51 <sup>dA</sup>	13,05±0,37 <sup>cA</sup>
72	4,51±0,00 <sup>bA</sup>	4,09±0,08 <sup>cdB</sup>	19,84±0,63 <sup>cA</sup>	20,01±0,77 <sup>bA</sup>
96	4,19±0,01 <sup>cA</sup>	4,20±0,02 <sup>cA</sup>	24,77±0,70 <sup>aA</sup>	14,46±0,30 <sup>cB</sup>
120	4,28±0,01 <sup>cA</sup>	3,76±0,02 <sup>eB</sup>	23,00±0,49 <sup>bA</sup>	22,20±0,82 <sup>aA</sup>
144	4,12±0,03 <sup>cA</sup>	4,04±0,10 <sup>dA</sup>	24,05±0,65 <sup>abA</sup>	18,97±0,33 <sup>bB</sup>
Seco	4,09±0,01 <sup>cA</sup>	4,07±0,01 <sup>cdA</sup>	18,72±0,11 <sup>cB</sup>	20,01±0,38 <sup>bA</sup>

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

No início da fermentação, o pH das sementes de cacau apresentou valor de 6,22 em ambos os períodos e reduziu a 4,12 (outubro) e 4,04 (fevereiro) ao final da fermentação (144 h). Observa-se que houve diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos valores de pH nos tempos 24, 48, 72 e 120 h. Quando se compara as médias das amêndoas fermentadas secas entre as temporadas do ano se verifica que as médias encontradas são iguais estatisticamente ( $p > 0,05$ ), ou seja, temporada do ano em que o cacau é fermentado não exerce influência neste parâmetro. A variação estatística encontrada ao longo do tempo de fermentação em cada período era esperada devido a ação dos microrganismos e reações bioquímicas que levam à redução do pH dos cotilédones durante a fermentação.

Em outubro, o pH teve decréscimo significativo ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos 24 e 48 h e também entre os tempos 72 e 96 h enquanto que em fevereiro as reduções ocorreram de maneira mais pronunciada nas primeiras 24 h. Schwan e Wheals (2004) explicam esse comportamento pela atuação microbiana presente nos primeiros dias de fermentação, onde o pH é reduzido em função da produção de ácidos orgânicos pelas leveduras e pelas bactérias lácticas através da produção de ácido lático.

As bactérias do ácido acético são as últimas espécies a serem encontradas durante a fermentação do cacau e segundo Ho (2014) uma de suas funções é oxidar o etanol produzidos pelas leveduras em ácido acético, aumentando a acidez do cacau. O pH entre o tempo 120 e 144 h em fevereiro aumentou de 3,76 para 4,04, sugerindo que pode ter havido uma menor atuação das bactérias acéticas que deixaram de acidificar o meio através da produção de ácido acético

ou que o etanol já poderia estar em baixa quantidade no meio, fazendo com que a atuação das bactérias acéticas não estivesse tão intensa quanto nos tempos anteriores.

O pH é um importante parâmetro de qualidade do cacau. Afoakwa et al. (2008) estabelecem que valores de pH mais altos do cacau no final da fermentação, entre 5,5 a 5,8, são considerados não fermentados, ou seja, fermentação conduzida de maneira insatisfatória, e que valores de pH entre 4,75 e 5,19 asseguram uma fermentação e amêndoas de cacau de qualidade. De acordo com este parâmetro, os valores de pH neste estudo nos últimos dias de fermentação em outubro e em fevereiro foram 4,12 e 4,04 respectivamente, indicando que as amêndoas foram bem fermentadas, porém, com uma acidez elevada. Este comportamento pode ser explicado pelo método de fermentação realizado neste estudo, pois Saltini et al. (2013) afirmam que fermentações conduzidas em caixas de madeira tendem a reduzir o pH da massa fermentativa. Schwan e Wheals (2004) destacam que as amêndoas de cacau provenientes do Brasil tentem a ser mais ácidas (pH 4,2) o que afeta seu posicionamento no mercado internacional. Uma estratégia que pode ser adotada é a remoção de parte da polpa antes da fermentação, fazendo com que a acidez do cotilédone seja reduzida ao final da fermentação.

Na literatura encontram-se resultados de pH distintos e controversos, pois além de muitos fatores alterarem o pH da fermentação do cacau, alguns estudos mostram o pH da polpa do cacau e outros da semente, trazendo resultados distintos e que podem causar confusão. Para a indústria de cacau, o que importa é o pH da semente. Este começa a sofrer modificação quando os microrganismos presentes na fermentação causam a morte do gérmen por meio da penetração de etanol e ácido acético nos cotilédones, reduzindo o pH de 6,5 a 4,5 nas primeiras 96 h. Após esta redução, o pH sofre um ligeiro aumento até atingir o valor de 5,0 ao final da fermentação. Essas alterações nos valores de pH e a velocidade com que essas reações ocorrem impactam diretamente no sabor, onde observa-se que uma redução do pH para valores abaixo de 4,5 e de maneira rápida, pode reduzir os precursores de sabor do produto final (SALTINI et al., 2013).

Em estudos de Rodriguez-Campos et al. (2011) encontraram na fermentação de cacau no México valores de pH variando entre 6,4 a 4,5 durante oito dias de processo fermentativo, enquanto que Brito (2017) encontrou valores de 6,56 e 5,13 durante os sete dias de fermentação na Amazônia brasileira. Na Índia, a fermentação de cacau realizada em caixas de madeira por Sandhya et al. (2016) relevou valores de pH de 3,8 inicialmente e no último dia de fermentação de 5,4. A fermentação de cacau em caixas conduzida na Costa do marfim da variedade *Forastero* por Visintin et al. (2016) revelou valores de pH de 4,3 no início da fermentação e 3,7

no final da fermentação, exibindo acidez desde o início da fermentação, até o final. Brito et al., (2000) explica que o genótipo do cacau é um dos fatores que influencia no pH dos cotilédones e Afoakwa (2016) relata que a variedade *Forastero* tipicamente apresenta baixos valores de pH e sabor intenso.

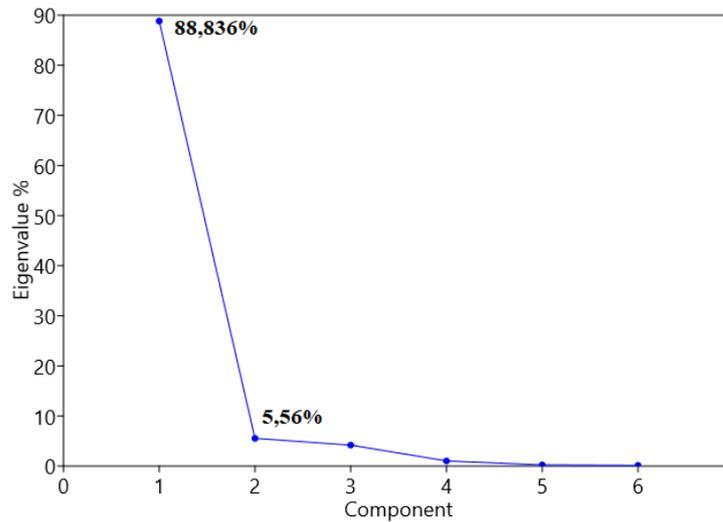
A acidez total titulável apresentou comportamento corroborativo com o pH, em que a redução do pH durante a fermentação aumentou a acidez em ambas fermentações, sendo em outubro a acidez inicial de 4,82 mEqNaOH 100/g e em fevereiro de 3,19 mEqNaOH 100/g. Estes valores de acidez aumentaram a medida que as reações bioquímicas foram ocorrendo no interior dos cotilédones, chegando em 24,05 mEqNaOH 100/g em outubro e 18,97 mEqNaOH 100/g no em fevereiro no último dia de fermentação. Ambos valores de acidez (início e final da fermentação) são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ). Para Lopez (1983) os valores de 12 a 15 mEq NaOH 100/g são os valores requeridos pela indústria de alimentos para amêndoas fermentadas e secas de cacau de qualidade superior. Para as amêndoas fermentadas secas neste trabalho os valores encontrados foram superiores a faixa indicada pela indústria e estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ), com valores médios de 18,72 mEq NaOH e 20,01 mEq NaOH. Segundo Lopez (1983), a acidez do cacau não é própria das sementes, mas sim adquirida durante a fermentação quando os tecidos dos cotilédones absorvem ácidos e outras substâncias produzidas por microrganismos envolvidos no processo. De acordo com Jinap, Thien e Yap (1994), a secagem artificial de amêndoas de cacau em regiões produtoras como a Malásia tem levado à obtenção de produtos com elevada acidez e menor desenvolvimento de sabor, devido ao curto período necessário até que a redução de umidade requerida seja obtida. A acidez total titulável, que mede a concentração total de ácidos no alimento, é um ótimo preditor para o sabor (AFOAKWA, 2010). Araújo et al. (2014) encontraram valores de acidez em cacau de 18,71 mEq NaOH, semelhante aos resultados encontrados neste trabalho em outubro.

### 5.2.1 Análise do componente principal (ACP) da temperatura da massa de fermentação, pH e acidez total titulável

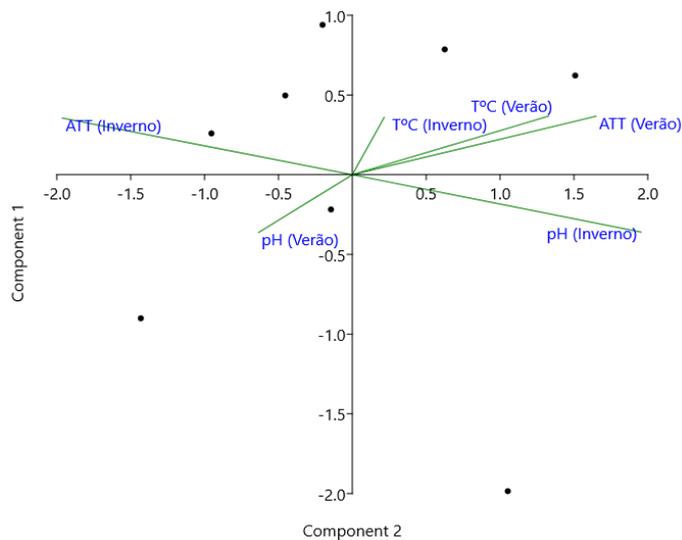
A análise do componente principal foi realizada para determinar a influência da temporada do ano nos parâmetros temperatura da massa de fermentação, pH e acidez total titulável durante a fermentação e secagem de cacau.

Na Figura 7 verifica-se que os dois primeiros CPs explicaram 94,37% da variação, mostrando que o tempo 0 da fermentação apresentou maior influência na variação (88,87%) e o tempo 24 a segunda maior variação (5,56%) dos parâmetros analisados.

De acordo com a Figura 8, observa-se que a temperatura ambiente não sofreu influência da temporada do ano pois em outubro e em fevereiro estas temperaturas se mantiveram no eixo positivo, enquanto que para os parâmetros pH e acidez total titulável a temporada exerceu influencia, já que o pH e a acidez total titulável se mantiveram em quadrantes opostos.



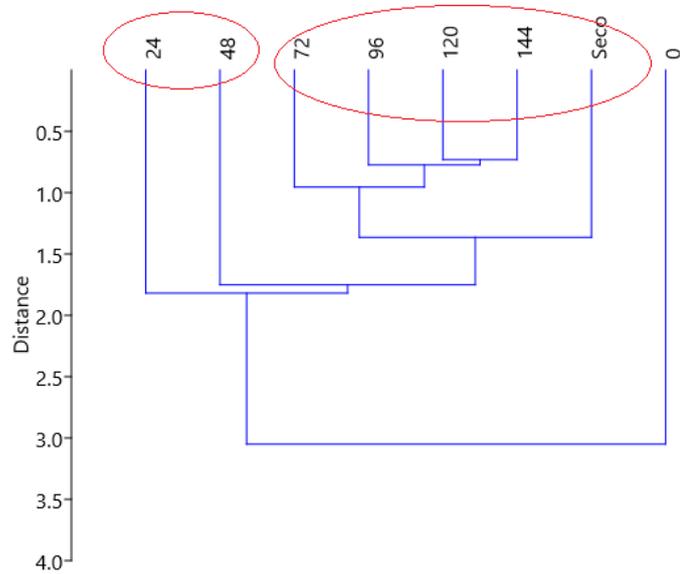
**Figura 7.** Eigenvalue para análise de componentes principais da temperatura da massa de fermentação, pH e acidez total titulável



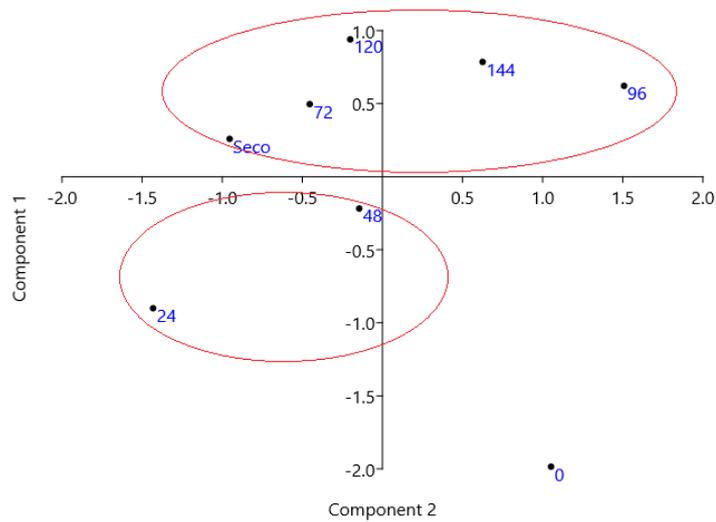
**Figura 8.** Score para as componentes principais CP1 (88,87%) e CP2 (5,56%)

A análise de similaridade foi realizada por meio de um dendrograma para representar a aglomeração e similaridades entre os ensaios. Utilizou-se também escala abaixo de 20 para a formação dos grupos e observa-se que na Figura 9a que os tempos 24 e 48 h apresentaram

maiores similaridades formando o grupo I, assim como os tempos 72 , 96, 120, 144 h e o cacau seco, que formaram o grupo II de acordo com as suas similaridades nos parâmetros (temperatura da massa de fermentação, pH e acidez total titulável) e que são confirmados na Figura 9b.



(a)



(b)

**Figura 9.**(a) Dendrograma utilizando a distância euclidiana para todos os ensaios (b) *Score* com os grupos formados após análise do dendrograma.

Observa-se com base no dendograma, que a distância euclidiana comprovou a formação de dois grupos distintos, o grupo I com os tempos 24 e 48 h e o grupo II com os tempos 72, 96, 120, 144 h. o tempo 0 h não apresentou similaridade com os outros tempos de fermentação e por isso não formou grupos ou se agrupou nos grupos já formados.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO CACAU AMAZÔNICO EM OUTUBRO E EM FEVEREIRO

Na Tabela 8 são apresentados os valores médios caracterização física e química das amêndoas fermentadas e secas de cacau em outubro e em fevereiro.

**Tabela 7.** Valores médios da caracterização física e química das amêndoas fermentadas e secas de cacau em outubro e em fevereiro.

PERÍODO	UMIDADE (%)	LIPÍDIOS (%)	PROTEÍNAS (%)	CINZAS (%)	CARBOIDRATOS TOTAIS (%)
<b>OUTUBRO</b>	4,22±0,14 <sup>a</sup>	51,49±1,73 <sup>a</sup>	18,88±0,46 <sup>a</sup>	2,68±0,04 <sup>a</sup>	22,71±1,52 <sup>b</sup>
<b>FEVEREIRO</b>	4,20±0,08 <sup>a</sup>	49,68±0,59 <sup>a</sup>	17,96±0,56 <sup>a</sup>	2,60±0,04 <sup>a</sup>	25,54±0,54 <sup>a</sup>

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

Os teores de lipídios médios em outubro e fevereiro foram 51,49% e 49,68% respectivamente, e representam o principal macronutriente da composição centesimal em 100 g de cacau seco e fermentado. As proteínas presentes nas amêndoas em outubro e fevereiro apresentaram cerca de 18% da composição da amêndoa. Todos os parâmetros (com exceção de carboidratos totais), não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparados em relação a temporada do ano, indicando que as condições climáticas não exerceram influência significativa sobre a síntese desses componentes das amêndoas de cacau durante o desenvolvimento dos frutos.

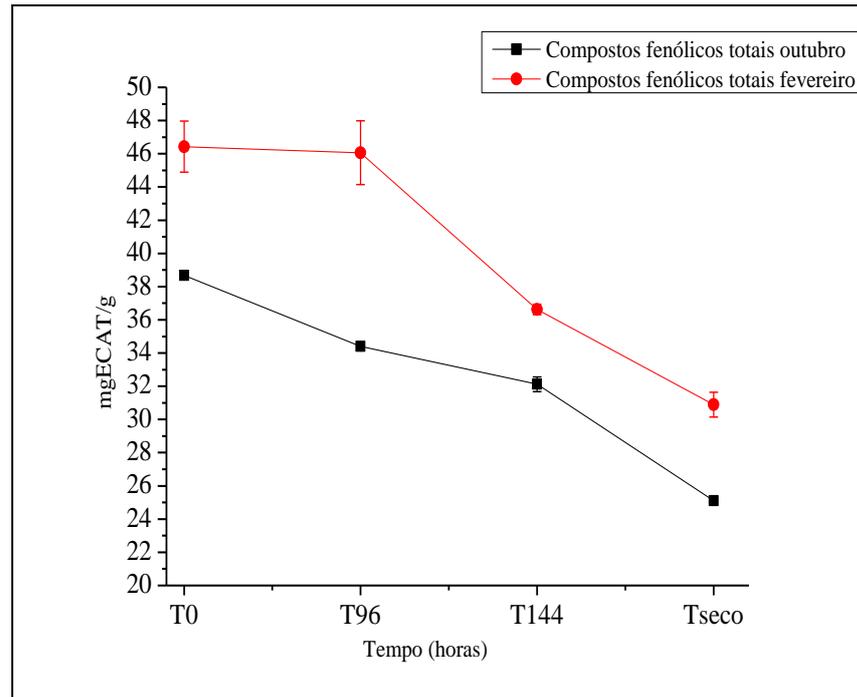
A diferença estatística significativa observada no conteúdo de carboidrato nas amêndoas, pode ser explicada por Niether et al. (2017), que explica que o estresse abiótico sofrido pelo cacaueiro em diferentes períodos do ano, como o aumento na incidência solar e redução da disponibilidade de água, é responsável por respostas fisiológicas que podem gerar diferença na composição química dos frutos.

A quantidade de gordura é um parâmetro avaliado no Índice de Qualidade do Cacau (ARAÚJO et al., 2014) e declara que a quantidade mínima de lipídios em 100 g de amostra deve ser de 30,77 g/100g. De acordo com este parâmetro, as amêndoas de cacau fermentadas

nos dois períodos atendem a este critério visto que ultrapassam cerca de 60% da quantidade mínima indicada.

#### 5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Na Figura 10 são apresentados os teores médios de fenólicos totais nas amêndoas de cacau nos tempos 0, 96 e 144 h de fermentação e seco após a fermentação nos períodos em outubro e em fevereiro.



**Figura 10:** Teores médios de fenólicos (mg ECAT/g) totais em amêndoas de cacau nos períodos em outubro e fevereiro

**Tabela 8.** Valores médios dos compostos fenólicos totais mgECAT/g:

Tempo (h)	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS mg ECAT/g	
	OUTUBRO	FEVEREIRO
<b>0</b>	38,68±0,02 <sup>aB</sup>	46,43±1,53 <sup>aA</sup>
<b>96</b>	34,40±0,07 <sup>bB</sup>	46,06±1,92 <sup>aA</sup>
<b>144</b>	32,12±0,44 <sup>cB</sup>	36,63±0,31 <sup>bA</sup>
<b>Seco</b>	25,10±0,12 <sup>dB</sup>	30,89±0,75 <sup>cA</sup>

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

Observa-se que o teor de compostos fenólicos em outubro e em fevereiro decaiu ao longo da fermentação em 16,96% e 21,11% respectivamente e entre o tempo 144 h e o cacau

seco esta redução foi de 21,87% em outubro e 15,87% em fevereiro. Do Carmo Brito et al. (2017) também observaram redução de 31% no teor de compostos fenólicos do cacau ao longo de fermentação realizada na Amazônia brasileira. Já estudos de Efraim et al. (2010) na Bahia verificaram redução de 60% no conteúdo fenólico ao final do processo fermentativo, valor semelhante ao encontrado por Suazo, Davidov-Pardo e Arozarena (2013) (63%) na Nicarágua. Esse comportamento de redução dos compostos fenólicos ao longo da fermentação é explicado por Forsthy e Quesnel (1958) através das reações de oxidação enzimática dos compostos fenólicos no interior da semente aliada também à difusão de partes destes compostos através da testa.

Tomas-Barberán et al. (2007) estudaram os compostos fenólicos do cacau de diferentes variedades e localidades de produção (Costa do Marfim, Colômbia, Guiné Equatorial, Equador, Venezuela, Peru e República Dominicana) e conseqüentemente, diferentes condições ambientais, e observaram que o cacau proveniente de Equador apresentou maior teor de compostos fenólicos, enquanto que o cacau da República Dominicana apresentou o menor teor deste composto. Para os autores, a diferença no teor de compostos fenólicos de cacau em distintas áreas de produção está relacionada com fatores genéticos do cacau e a fatores de processamento que ocorrem na fermentação e secagem.

Neste estudo, em todos os tempos o teor de compostos fenólicos em fevereiro foi superior ao teor encontrado em outubro, entretanto, comportamento distinto foi relatado por Niether et al. (2017) que estudaram indicadores de estresse abiótico em diferentes sistemas de produção de cacau (monocultura e agroflorestais) em dois períodos do ano e perceberam que o teor de compostos fenólicos foi maior na época mais seca (7,15 mg EG/g) do que na época mais úmida (5,97 mg EG/g) e encontraram comportamentos semelhantes aos de Carrillo et al. (2013) que avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos em diferentes altitudes, e conseqüentemente, diferentes temperaturas ambientes, na Colômbia, onde em temperaturas mais elevadas, o conteúdo de compostos fenólicos foi maior (61,93 EG/g) quando comparado a localidades em que as temperaturas são mais baixas (70,09 EG/g).

Bae et al. (2008) indicam que a elevação da incidência solar é proporcional ao aumento dos teores de metabolitos secundários de proteção da planta, como os compostos fenólicos. Kongor et al. (2016) apontam que outros fatores como a idade do cacau e as composições químicas do solo podem influenciar na concentração de metabolitos secundários.

Este comportamento divergente ao encontrado na literatura (Niether et al., 2017; Carrillo et al., 2013), pode ser explicado também pela diminuição na síntese da enzima polifenoloxidase nas amêndoas de cacau em fevereiro, quando comparado com em outubro. Desta forma na etapa de final da fermentação, onde os compostos fenólicos são oxidados parcialmente pela polifenoloxidase, as amêndoas de cacau fermentadas em fevereiro sofreriam menor influência da degradação enzimática de compostos fenólicos que em outubro. Hansen et al. (1998) afirmam que enzimas podem exibir diferentes comportamentos e estabilidades durante a fermentação e podem ser inativadas por diversos fatores, como calor e acidez. Além disso, Biehl (1982) alega que reações entre compostos de diferentes compartimentos, como a que acontece entre a polifenoloxidase com os polifenóis, podem ser impedidas pela fusão de vacúolos de lipídeos, que desta maneira, impossibilita o contato entre enzima e substrato. Outro fator que também deve ser levado em consideração é que no inverno Amazônico ocorre incidência solar e temperaturas ambientes relativamente altas (somente 2,26 °C a menos que em outubro), ou seja, mesmo neste período o cacau recebe 92% de incidência solar do verão e pode produzir esses compostos secundários de proteção a planta. Com isso, é possível considerar que os compostos fenólicos no verão (outubro) podem ser menores do que no inverno (fevereiro), como encontrado nesta pesquisa.

Diversos autores (PAYNE et al., 2010; DA SILVA OLIVEIRA et al., 2011; DO CARMO BRITO et al., 2017) acompanharam o conteúdo de compostos fenólicos durante a fermentação e perceberam que este diminui consideravelmente ao chegar no final do processo fermentativo. A pequena quantidade de polifenóis encontrados no cacau ao final da fermentação e secagem se deve ao fato das complexas reações enzimáticas que ocorrem a partir da quebra das membranas celulares, fazendo com que ocorra a oxidação dos polifenóis pela polifenoloxidase. Esta reação causa a mudança da cor das sementes do cacau, de violeta a marrom (MISNAWI et al., 2003). A coloração das amêndoas de cacau fermentadas e secas é o principal parâmetro de qualidade utilizado pelas indústrias de chocolate, que buscam cacau bem fermentados, com coloração marrom e rejeitam cacau de cor violeta, pois indicam que a fermentação não foi conduzida de maneira adequada, resultando em amêndoas com sabor amargo (HASHIM et al., 1998).

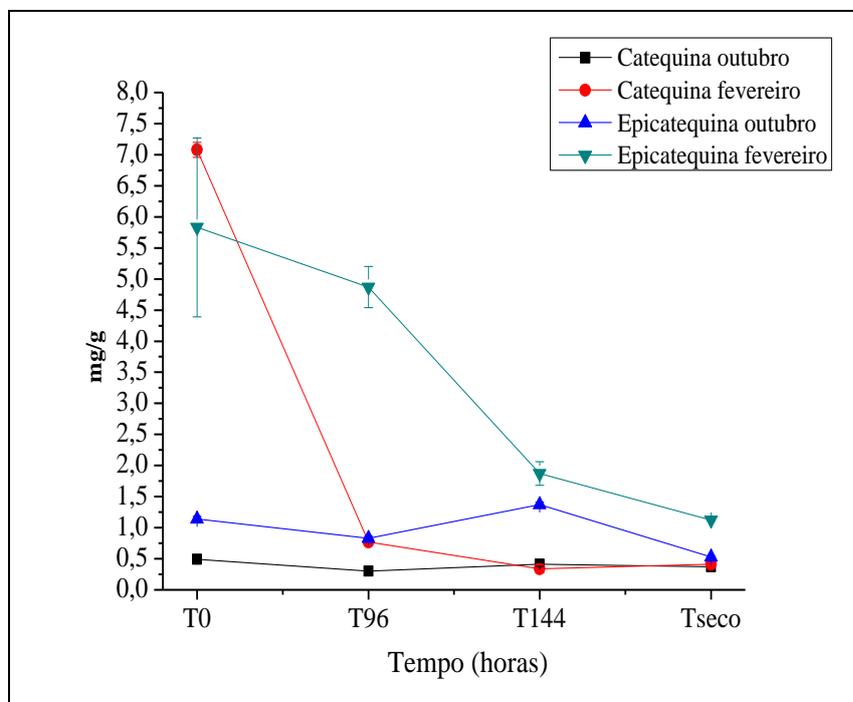
Mesmo que a quantidade de polifenóis reduza drasticamente na amêndoa que irá ser beneficiada na indústria e reduza mais ainda quando são feitos os sub produtos do cacau (chocolate em barra, cacau em pó e outros derivados), esses alimentos são vistos como uma boa fonte de antioxidantes fenólicos para algumas populações e é possível controlar o processo

produtivo de chocolates e preservar até 70% dos compostos fenólicos (JALIL e ISMAIL, 2008, WOLLGAST e ANKLAM 2000). Além disso, Lee et al., (2003) provou que o cacau tem mais compostos fenólicos e uma maior capacidade antioxidante do que produtos reconhecidos por estas propriedades, como chás e vinho tinto.

Pode-se inferir também que as temporadas do ano apresentam influência no teor de compostos fenólicos, pois estes foram distintos estatisticamente si ( $p \leq 0,05$ ) em todos os tempos de fermentação para os dois períodos analisados.

### 5.5 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os teores médios de catequina e epicatequina são apresentados na Figura 11 e Tabela 9.



**Figura 11:** Teores médios de catequina e epicatequina em amêndoas de cacau em outubro e em fevereiro

**Tabela 9.** Valores médios de catequina (mg/g) e epicatequina (mg/g):

Tempo (h)	CATEQUINA mg/g		EPICATEQUINA mg/g	
	OUTUBRO	FEVEREIRO	OUTUBRO	FEVEREIRO
<b>0</b>	0,49±0,04 <sup>ab</sup>	7,08±0,12 <sup>aA</sup>	1,14±0,04 <sup>bB</sup>	5,83±1,44 <sup>aA</sup>
<b>96</b>	0,30±0,02 <sup>cB</sup>	0,77±0,00 <sup>bA</sup>	0,83±0,03 <sup>cB</sup>	4,87±0,33 <sup>abA</sup>
<b>144</b>	0,41±0,03 <sup>abA</sup>	0,34±0,06 <sup>cA</sup>	1,37±0,04 <sup>aA</sup>	1,87±0,19 <sup>bcA</sup>
<b>Seco</b>	0,37±0,00 <sup>bcA</sup>	0,41±0,01 <sup>cA</sup>	0,53±0,01 <sup>dB</sup>	1,12±0,01 <sup>cA</sup>

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

Os compostos fenólicos catequina e epicatequina decresceram ao longo da fermentação. Em outubro o teor de catequina reduziu 24% e em fevereiro 94%, a epicatequina reduziu em 54% em outubro e 81% em fevereiro. Apesar da diferença na redução destes compostos nas temporadas analisadas, não foi observada diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre os teores de catequina em ambas temporadas para as amostras fermentadas (144 h) e secas. Houve diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) no teor de epicatequina para as amêndoas fermentadas secas, sendo possível então indicar que o comportamento de decréscimo de cada fenólico é diferenciado e pode sofrer variação em função da temporada do ano.

Outro aspecto importante é a diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) destes compostos no cacau *in natura* (0 h), pois foi observado que a catequina em fevereiro é 14 vezes superior que em outubro, enquanto que a epicatequina encontrada em fevereiro é 5 vezes maior do que em outubro.

A redução do teor de epicatequina tem comportamento similar ao encontrado por Brito (2000), que reportou que esse é o substrato que mais decai durante a fermentação, por ser o principal substrato da polifenoloxidase.

Essa redução no teor de catequina e epicatequina é comumente reportada (PORTER e CHAN, 1991; ORTEGA et al., 2008; ALBERTINI et al., 2015; DWIJATMOKO et al., 2018) por diversos autores. Kim e Keeney (1984) explicam que essa redução no teor de catequina e epicatequina durante a fermentação ocorre não somente ao processo oxidativo, mas também pela difusão dos polifenóis através da testa (casca da semente) pelo exsudado durante a fermentação.

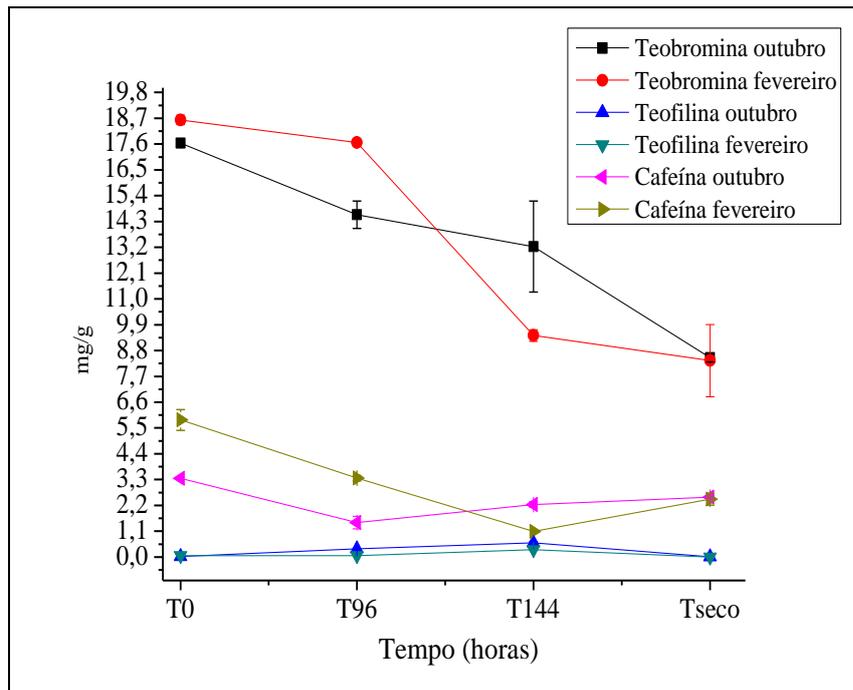
De maneira geral (com exceção da epicatequina em outubro) foi observado que não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos 144 e seco em ambas temporadas para os compostos analisados. Esse fenômeno pode ser explicado pela baixa atuação enzimática durante a secagem, indicando que as enzimas responsáveis pela degradação dos compostos fenólicos são sensíveis ao calor em que as amêndoas de cacau são submetidas durante o processo de secagem (HANSEN et al., 1998).

Estudo realizado por Payane et al. (2010) encontraram redução de catequina e epicatequina em 25% e 15% respectivamente, quando comparado o conteúdo desses compostos fenólicos do cacau não fermentado e fermentado enquanto que Dwijatmoko et al., (2018)

encontraram redução de 47% e 52% de catequina e epicatequina, respectivamente. É possível observar unanimidade na redução dos compostos fenólicos durante a fermentação de cacau, porém, o comportamento deste decréscimo para cada fenólico é diferente.

## 5.6 PERFIL DE METILXANTINAS

Os teores médios de teobromina, teofilina e cafeína são apresentados na Figura 12 e Tabela 10.



**Figura 12.** Teores médios de teobromina, teofilina e cafeína em amêndoas de cacau em outubro e em fevereiro

**Tabela 10.** Valores médios (mg/g) de teobromina, teofilina e cafeína:

Tempo (h)	TEOBROMINA		TEOFILINA		CAFEÍNA	
	OUTUBRO	FEVEREIRO	OUTUBRO	FEVEREIRO	OUTUBRO	FEVEREIRO
<b>0</b>	17,64±0,18 <sup>aB</sup>	18,63±0,20 <sup>aA</sup>	0,02±0,00 <sup>cB</sup>	0,06±0,00 <sup>bA</sup>	3,35±0,00 <sup>aB</sup>	5,84±0,44 <sup>aA</sup>
<b>96</b>	14,59±0,58 <sup>abB</sup>	17,67±0,10 <sup>aA</sup>	0,35±0,01 <sup>bA</sup>	0,06±0,00 <sup>bB</sup>	1,47±0,27 <sup>cB</sup>	3,36±0,12 <sup>bA</sup>
<b>144</b>	13,23±1,94 <sup>bA</sup>	9,44±0,25 <sup>bA</sup>	0,60±0,07 <sup>aA</sup>	0,31±0,02 <sup>aB</sup>	2,24±0,13 <sup>bA</sup>	1,09±0,00 <sup>cB</sup>
<b>Seco</b>	8,50±0,18 <sup>cA</sup>	8,37±1,54 <sup>bA</sup>	0,01±0,00 <sup>cA</sup>	0,00±0,00 <sup>cB</sup>	2,55±0,05 <sup>bA</sup>	2,46±0,25 <sup>bA</sup>

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

Os teores médios de todas as metilxantinas reduziram ao longo da fermentação em ambos os períodos analisados. A cafeína em fevereiro foi o parâmetro analisado que mais sofreu

redução durante a fermentação (58%), enquanto que em outubro essa redução foi de 24%. Em relação a teobromina, a maior redução ocorreu em fevereiro (55%) e em outubro essa redução foi de 52%. As metilxantinas não sofrem transformações químicas durante a fermentação, porém, seu teor é reduzido por difusão através da testa para o exterior das sementes (Camu et al., 2008).

Não houve diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ) no teor de teobromina e cafeína nas amêndoas de cacau fermentado (144 h) e seco, indicando que a temporada do ano em que o cacau é cultivado e fermentado não exerce influência nesses parâmetros.

Dados desse estudo estão de acordo com Matissek (1997), que relata que a teobromina e a cafeína são responsáveis por aproximadamente 99% das metilxantinas e que a teobromina é a principal metilxantina do cacau, enquanto que a cafeína está presente em pequenas quantidades e a teofilina em quantidades muito baixas ou simplesmente não se encontram nas sementes de cacau. Para Zheng et al. (2004) a teobromina está presente em maiores concentrações no cacau devido ela ser um dos precursores da via da cafeína (através de um processo de metilação) e essa conversão de teobromina em cafeína é um processo lento. Já a razão pela qual a teofilina aparece em quantidades menores ainda é devido a conversão de cafeína em teofilina através de uma reação catalisada por uma desmetilase.

Neste estudo encontrou-se resultados semelhantes de teobromina e cafeína aos estudos realizados por Cuellar et al. (2018), enquanto que em comparação com estudos de Carrillo et al. (2014) somente o conteúdo de teobromina foi semelhante, pois o conteúdo de cafeína deste estudo foi maior do que encontrado por Carrillo e colaboradores, fato que pode ser explicado pela diferença de espécie de cacau utilizada na fermentação e o método de fermentação estabelecido na fazenda.

## 5.7 METAIS PESADOS

Na Tabela 11 são apresentados os teores de Bário, Cádmiio, Cobre e Chumbo nas amostras de cacau fermentado e seco nos em outubro e em fevereiro na Amazônia.

**Tabela 11.** Teores médios de metais (mg/kg) de cacau fermentado e seco dos períodos verão e inverno

METAL (mg/kg)	OUTUBRO	FEVEREIRO
<b>Bário (Ba)</b>	3,42±0,67	<LD
<b>Cádmiio (Cd)</b>	<LD	<LD
<b>Cobre (Cu)</b>	11,99 ± 0,34 <sup>A</sup>	8,21 ± 0,45 <sup>B</sup>
<b>Chumbo (Pb)</b>	<LD	<LD

\*Médias±desvio-padrão com diferentes letras em uma mesma linha (maiúsculas) diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ , Teste de Tukey), base seca. LD – limite de detecção (Ba: 0,005; Cd: 0,064; Cu: 0,099; Pb: 0,257).

O cacau é majoritariamente produzido por países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos e consumido principalmente em países desenvolvidos (AFOAKWA et al., 2011) por isso, faz-se necessário o estudo e identificação dos metais pesados que podem estar presentes neste alimento consumido no mundo todo. A Agência Americana para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças classifica os elementos químicos bário, cádmio, cobre e chumbo como potencialmente causadores de doenças e que oferecem risco à saúde humana (ATSDR, 2004).

Foram analisadas amostras de cacau fermentado e seco (que irá ser processado na indústria de alimentos) nas temporadas do ano nos meses de outubro e fevereiro e observou-se que o bário só foi detectado em outubro (3,42 mg/kg), o cádmio e chumbo estavam abaixo do limite de detecção. O cobre apresentou teor de 11,99 mg/kg em outubro e 8,21 mg/kg em fevereiro estes resultados apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) o que indica que a temporada do ano exerce influência no teor de cobre no cacau.

A Portaria n ° 685, de 27 de agosto de 1998, que estabelece os limites máximos de tolerância dos contaminantes inorgânicos, determina que o limite de tolerância para o cobre é de 10 mg/kg para este tipo de alimento (BRASIL, 1998). O cacau fermentado em outubro apresentou limite deste metal acima do estabelecido. Esta lei não estabelece valores para bário nos alimentos.

Aikpokpodion et al. (2013) em estudo realizado na Nigéria avaliaram os níveis de metais presentes em semente de cacau *Forastero*, de diferentes estados produtores de cacau, devido à larga utilização de pesticida a base de cobre e detectaram limites entre 18-26 mg/kg de cobre, abaixo do estabelecido pela União Europeia (50 mg/kg) e não encontraram contaminação por bário em nenhuma localidade estudada. De acordo com Loureiro et al. (2017) o limite máximo de bário em cacau deve ser de 11,70 mg/kg, indicando que o cacau fermentado em outubro não excedeu os limites deste metal.

## 5.8 COMPOSTOS VOLÁTEIS DAS SEMENTES DE CACAU DURANTE A FERMENTAÇÃO

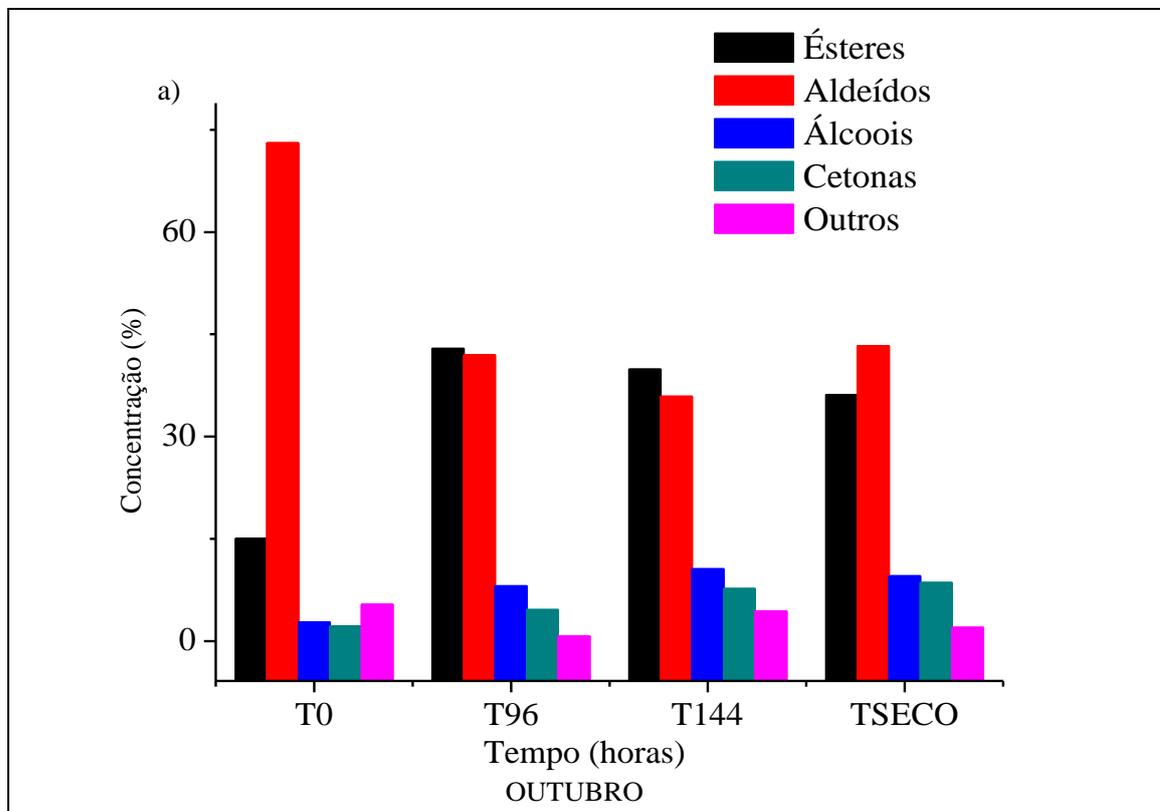
Na Tabela 12 são apresentadas as concentrações (%) dos compostos voláteis de acordo com o tempo de fermentação (0, 96, 144 h e seco) e temporadas do ano (outubro e fevereiro) e

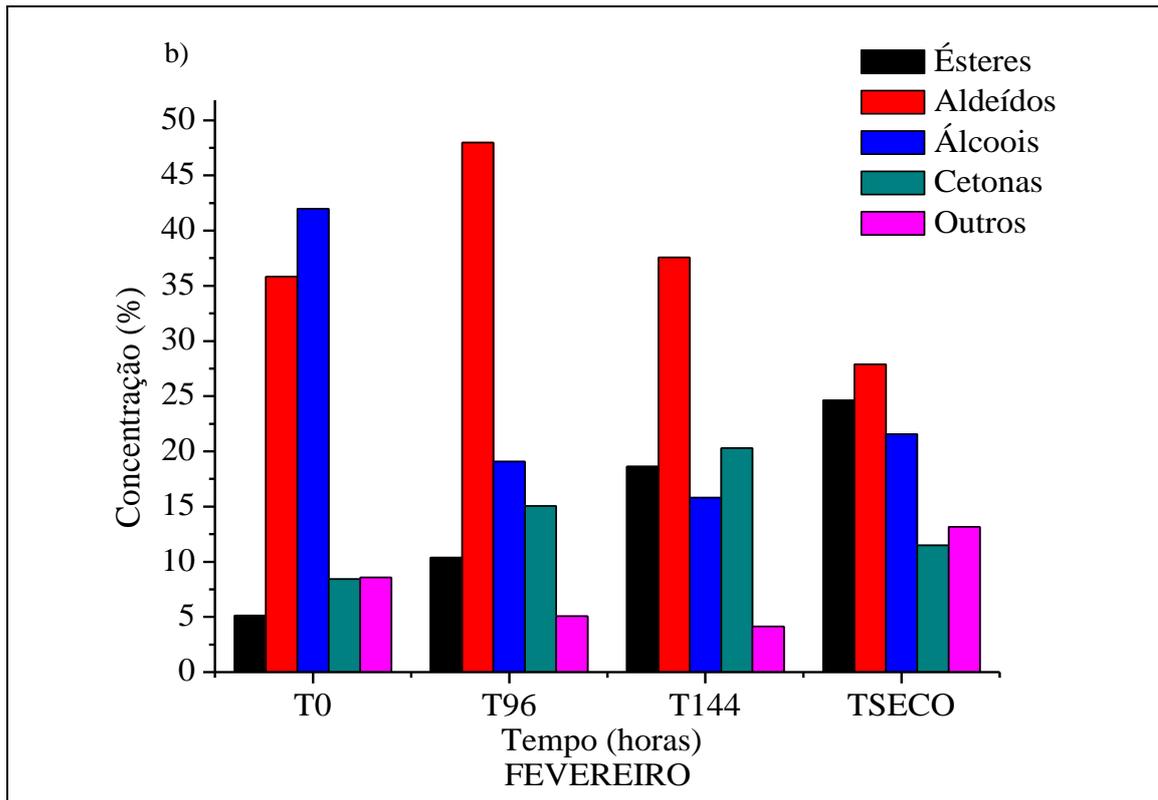
na Figura 13 são apresentados os comportamentos dos compostos voláteis de acordo com sua classe química.

**Tabela 12.** Concentração (%) dos compostos voláteis de acordo com o tempo de fermentação e período climático.

IR	Constituintes	OUTUBRO (%)				FEVEREIRO (%)			
		0h	96h	144h	Seco	0h	96h	144h	Seco
761	acetato de isobutila	1,42							
<b>801</b>	<b>hexanal</b>	<b>54,73</b>				<b>27,16</b>			
837	acetato de 2-pentanol	6,61 4,8 5,89				3,89 9,8 9,63			
<b>870</b>	<b>acetato de isoamila</b>	<b>16,34 10,38 9,41</b>				<b>0,96 4,25 4,62</b>			
889	2-heptanona	1,93 2,95 3,88				3,21 4,48 6,15 5,14			
<b>894</b>	<b>2-heptanol</b>	<b>2,34 2,41 1,8 3,52</b>				<b>11,35 9,39 10,28 6,78</b>			
952	benzaldeído	2,75 6,34				0,19 3,29 1,09 2,44			
986	2-pentilfurano	5,39							
988	mirceno	0,6 2,44 0,93				6,24 3,09 2,4 6,75			
997	hexanoato de etila	0,5							
1032	(Z)- $\beta$ -ocimeno	0,15 1,45 0,37				1,56 1,09 0,95 3,3			
<b>1036</b>	<b>fenilacetaldéido</b>	<b>11,62 39,07 35,92 36,73</b>				<b>7,71 44,69 36,49 25,45</b>			
1059	acetofenona	2,21 2,16 3,16 2,29				3,78 2,0 2,0 2,18			
1067	cis-óxido de linalol	0,44 1,19 2,08 1,71				0,31 1,48			
1084	trans-óxido de linalol	0,84 1,08				1,85			
<b>1087</b>	<b>2-nonanone</b>	<b>0,52 1,57 2,4</b>				<b>1,45 8,58 12,16 4,16</b>			
<b>1095</b>	<b>linalol</b>	<b>2,18 3,9 3,99</b>				<b>30,64 5 2,76 11,14</b>			
1097	2-nananol	0,72 1,24				4,2 2,76			
1100	nonanal	0,99							
1106	álcool feniletílico	0,75 0,47 0,35				0,16 0,3			
1128	allo-ocimeno	0,51 0,23				0,78 0,8 0,7 2,47			
1169	benzoato de etila	0,73 0,76 0,46				0,16 0,21			
1196	octanoato de etila	1,05 0,64 0,4				0,16 0,3			
1200	dodecano	0,22				0,24			
1243	fenilacetato de etila	2,08 2,03 1,5				0,49 0,7 0,81			
<b>1251</b>	<b>acetato de 2-fenetila</b>	<b>6,64 8,09 15,38</b>				<b>0,34 1,22 4,68</b>			
1260	(2E)-decenal	0,64							
1264	(E)-2-fenilbut-2-enal	0,17 0,22							
1290	indol					0,1 0,09			
1300	(8Z)-undecenal	0,77							
1315	(2E,4E)-decadienal	4,32				0,79			
1389	benzoato de butila	4,55							
1400	tetradecano	0,26				0,39			
1433	benzoato isoamílico	3,03				5,14 4,39 2,66 4,15			
<b>1476</b>	<b>benzoato de 2-pentila</b>	<b>15,05 12,41</b>							

1395	decanoato de etila	0,4							
1594	dodecanoato de etila	1,08	0,54	0,06	0,23				
1795	tetradecanoato de etila	0,33	0,22						
1992	hexadecanoato de etila	1,19							
<b>Classe</b>									
Ésteres		15,05	42,92	39,87	36,13	5,14	10,39	18,63	24,63
Aldeídos		73,07	41,99	35,92	43,29	35,85	47,98	37,58	27,89
Álcoois		2,78	8,09	10,57	9,57	41,99	19,06	15,8	21,55
Cetonas		2,21	4,61	7,68	8,57	8,44	15,06	20,31	11,48
Outros		5,39	0,75	4,4	2,01	8,58	5,08	4,14	13,15
Total		98,5	98,36	98,44	99,57	100	97,57	96,46	98,7





**Figura 13.** Comportamento dos compostos voláteis de acordo com a sua classe em outubro (a) e em fevereiro (b)

Nesta pesquisa foram encontrados na fermentação espontânea de cacau em dois períodos distintos um total de 39 compostos agrupados em seis classes (Tabela 13). Os ésteres estiveram em maior quantidade em número de compostos (15), seguido da classe dos aldeídos (8), outros (7), álcoois (6) e cetonas (3). Quando se trata de concentração, os aldeídos estiveram em maior concentração (188,15% em outubro e 148,51% em fevereiro), seguido dos ésteres (133,97% em outubro e 59,09% em fevereiro), álcoois (31,01% em outubro e 98,4% em fevereiro), cetonas (23,07% em outubro e 55,29 em fevereiro), e outros compostos (12,55% em outubro e 30,95% em fevereiro). Um número similar de compostos foi encontrado por Rodriguez-Campos et al. (2011) através da fermentação espontânea de cacau *Forastero* no México.

Na Figura 13 são apresentados os teores de aldeídos e ésteres, que foram os voláteis majoritários na fermentação em outubro, enquanto que aldeídos e álcoois em fevereiro são os principais componentes da fração volátil. Esse resultado indica que o perfil aromático do cacau é influenciado pela temporada do ano já que apresentam comportamentos distintos. Os aldeídos estão presentes durante toda a fermentação, independente da temporada, já os ésteres aparecem também desde o início da fermentação e tem sua presença crescente ao longo do processo

fermentativo. Os álcoois presentes na fermentação em outubro apesar de estarem em pequenas quantidades, apresentam comportamento também crescente, enquanto que em fevereiro o comportamento é inverso, pois no início da fermentação estes estão em teores mais elevados, depois reduzem e ocorrem flutuações ao longo da fermentação. As cetonas apresentam comportamentos distintos nos dois períodos analisados, em outubro sua concentração inicia baixa e é aumentada ao longo da fermentação, enquanto que em fevereiro ocorrem flutuações dos seus teores. Quando se trata de outros compostos, como monoterpenos, hidrocarbonetos etc, observa-se que estão presentes em maiores quantidades em fevereiro do que em outubro e apresentam flutuações em ambos os períodos.

Observa-se então a partir dos compostos majoritários presentes no cacau fermentado e seco (em negrito na Tabela 12), o cacau que é utilizado na indústria de alimentos em outubro apresentou características sensoriais mais frutadas, floral e de mel, provenientes dos componentes majoritários dos aldeídos e ésteres, que estiveram em maiores concentrações nesta temporada, enquanto que a fermentação conduzida em fevereiro apresentou características mais doce/cítrica, floral e de mel, provenientes dos componentes majoritários dos aldeídos e álcoois.

Os aldeídos são encontrados com bastante frequência nos alimentos e apresentam limiar muito baixo de aroma. Os aldeídos C3-C5, como propanal, butanal e pentanal, apresentam característica maltada/verde. Os C-5 de cadeia ramificada são encontrados na maioria dos alimentos cozidos, além de frutas e legumes frescos, com notas de cacau maltado e amargo que são utilizados em aromas de malte e chocolate. Características verdes são encontradas em C-6 e a medida que o comprimento da cadeia aumenta, os aldeídos apresentem característica frutada, flora e gordurosa, dependendo da sua concentração no alimento (PARKER, 2015). De acordo com Surburg et al. (2006) os álcoois de baixo peso molecular são precursores para a síntese de aldeídos e ésteres. O aldeído majoritário na fermentação de cacau deste estudo foi o fenilacetaldéido, presente em grandes concentrações em quase todos os tempos e períodos, com exceção do tempo zero em fevereiro. Afoakwa et al. (2008) relata que o fenilacetaldéido é um derivado do catabolismo de aminoácidos realizado durante a fermentação de cacau. Outro aldeído que esteve presente na fermentação do cacau em grandes concentrações foi o hexanal, porém, só foi encontrado no tempo zero, dos dois períodos. Ozcan e Barringer (2011) relatam que o hexanal, dependendo da sua concentração, apresenta odor verde-gorduroso ou de fruta verde quando em baixas concentrações e que sua síntese é a partir da oxidação lipídica via decomposição do ácido linoleico.

Os ésteres são formados a partir de álcoois e ácidos e apresentam papel significativo na formação do sabor dos alimentos e seu aroma irá depender da sua estrutura molecular e da sua conformação. Aqueles com baixo peso molecular, podem ser encontrados facilmente em frutas, flores e bebidas fermentadas e apresentam como característica aroma frutado, porém, a medida que a cadeia aumenta, o odor pode ficar mais adocicado, metálico ou semelhante a sabão (GUICHARD, 2017). Os ésteres encontrados a partir da fermentação de cacau espontânea deste estudo foram observados mais em outubro do que em fevereiro, e foram o benzoato de 2-pentila, acetato de 2-fenetila e acetato de isoamila que apresentam odores de bálsamo, rosa e frutado, respectivamente.

Os álcoois são compostos que apresentam grande importância na formação de sabor de um alimento e estão amplamente distribuídos na natureza e quase todos tem aromas desejáveis e agradáveis. O seu grupo hidroxila determina a maioria de suas propriedades, mudando completamente o odor quando ocorrem modificações neste grupo. Os álcoois de cadeia linear são abundantes nos frutos, aumentando frequentemente com a maturidade (PARKER, 2015). Os álcoois de amila são encontrados no processo de fermentação do cacau e alguns deles são usados para avaliar o sabor e a fermentação do cacau (OBERPARLEITER e ZIEGLEDER, 1997). Nesta pesquisa, os principais álcoois encontrados foram o linalol e o 2-heptanol, com característica floral e doce/cítrico, respectivamente.

As cetonas formadas através de oxidação e descarboxilação de ácidos graxos, são bem conhecidas como odorantes de alimentos devido ao seu aroma semelhante a frutos secos (GUICHARD, 2017) porém, segundo Surburg e Panten (2006) estas não apresentam grandes interferências na formação do sabor final dos alimentos. O composto 2-nonanone foi o majoritário deste grupo e esteve presente nos estágios finais da fermentação, somente em fevereiro e apresenta característica floral. Ramli et al. (2005) confirma que este composto está presente nas etapas finais da fermentação e que pode ser utilizado como indicador de qualidade no processo posterior a fermentação e secagem.

Cevallos-Cevallos et al. (2018) reportam a correlação do linalol e 2-nonanone com cacau fino, pois estes compostos foram encontrados em cacau *Criollo*, que é utilizado para confecção de subprodutos de cacau de maior valor comercial e esses compostos foram encontrados em altas concentrações na fermentação de cacau em outubro (linalol 2,4% e 2-nonanone 3,99%) e em fevereiro (linalol 4,16% e 2-nonanone 11,14% deste estudo).

O sabor do cacau e de seus subprodutos é fortemente influenciado não somente pelo genótipo do cacau, mas também pelas reações químicas e microbianas que ocorrem durante a fermentação e o processamento industrial. É durante a fermentação e secagem das amêndoas de cacau que são formados os precursores de sabor e aroma. A torração, etapa subsequente da secagem e que ocorre nas indústrias, também é essencial para formação do cacau de qualidade (SCHMARR e ENGEL, 2012) e para Kongor et al., (2016) os compostos voláteis das amêndoas de cacau são considerados os indicadores mais importantes para avaliação da qualidade do cacau e são influenciados também por fatores como condições climáticas de crescimento do cacau e composição do solo.

Aprosoaie, Luca e Miron (2016) classificam as amêndoas em cacau fino e cacau a granel. O cacau fino apresenta percepções aromáticas mais refinadas e bem definidas e são utilizadas em subprodutos mais caros. Já o cacau a granel, são amêndoas que vão ser utilizadas industrialmente em produção de larga escala, que apresentam o valor de venda mais baixo devido não apresentarem características sensoriais superiores.

O cacau fino é proveniente das variedades *Criollo*, *Trinitario* e *Nacional* e é produzido principalmente nos países da América Latina e apresenta notas aromáticas suaves, enquanto que o cacau a granel é da variedade *Forastero* e produzido por países da África, responsável pela maior parte da produção de cacau no mundo, e apresenta característica sensorial mais forte (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2018).

Cevallos-Cevallos et al. (2018) avaliaram as mudanças dos compostos voláteis durante a fermentação do cacau fino e a granel e observaram que o perfil aromático muda de acordo com a variedade do cacau utilizado. O cacau *Criollo* foi caracterizado com aromas florais, frutados e amadeirados devido aos componentes majoritários linalol, epoxilinalol, benzenetanol, acetato de pentanol, germacreno, copaeno, aromadendreno, 3,6-heptanodiona, butanal, 1-fenil etenona, 2-nonanona e 2-pentanona. Já o cacau *Nacional* produziu voláteis com os aromas frutados, verdes e amadeirados característicos, por ação dos compostos 2-nonanona, 3-octen-1-ol, 2-octanol acetato, 2-undecanona, valenceno e aromadendreno. Enquanto que o cacau *Forastero* produziu voláteis aromáticos com notas florais e doces, devido aos compostos epoxilinalol, ácido pentanóico, benzeneacetaldeído e benzaldeído estarem presentes de forma majoritária. Neste estudo citado, estabeleceu-se os compostos valenceno, aromadendreno, germacreno, 1,3 ciclohexadieno e octacosano como os responsáveis pela caracterização do

cacau fino e a fermentação conduzida com cacau *Forastero* apresentou níveis insignificantes destes compostos.

Para Schwan e Wheals (2004) é de suma importância controlar o tempo de fermentação de cacau para evitar a formação de compostos voláteis desagradáveis (*off flavors*) que podem ser encontrados caso a fermentação ultrapasse o tempo necessário, pois o excesso de fermentação pode levar a um aumento significativo de bacilos e fungos filamentosos que produzem os *off flavors*. Lopez e Quesnel (1971) relacionam bactérias aeróbicas formadoras de esporos como uma das responsáveis pela acidificação da fermentação e conseqüentemente, a formação de *off flavors*. Além disso, outras substâncias como o ácido acético e lático, 2,3-butanodiol e tetrametilpirazina são prejudiciais para o sabor de chocolate e são produzidas por *Bacillus spp.*

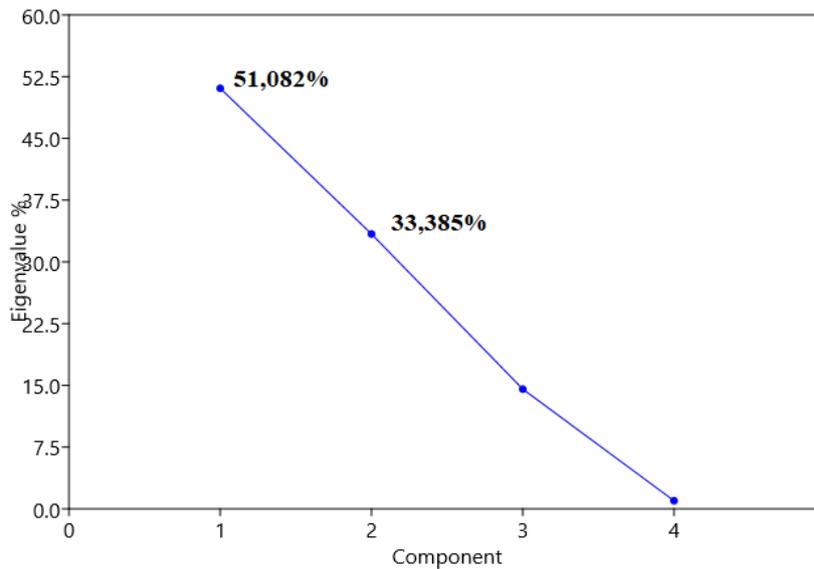
Aromas rançosos, cerosos ou sulfurosos são potencialmente prejudiciais ao aroma do cacau e são provenientes de ácido propanóico, ciclohexanol e tiobis-metano, relatado por Cevallos-Cevallos et al. (2018) como resultado do excesso de fermentação do cacau *Criollo*. Já a variedade *Nacional* produziu as substâncias tiobis-metano e naftaleno relatados como aroma de enxofre e pungente, e o cacau *Forastero* produziu ácido butanóico, ácido hexanoico, piridina, ácido heptanóico e ácido peracético, que são relatados como indesejáveis por apresentarem aromas de gordura e ranço. Neste estudo, não foram encontrados esses compostos considerados *off-flavors*.

Durante as últimas quatro décadas, muito se estudou para a obtenção de substâncias com sabores naturais via processos microbianos e enzimáticos. Porém, apenas uma parte desses processos são utilizados em escalas industriais por não serem economicamente viáveis, pois os produtos resultantes são muito caros para as aplicações de sabor e aroma. Espera-se que com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, como a metabolômica, que reúne a química e a biologia celular, incluindo a genética, a fabricação de substâncias naturais de sabor por fermentação de uma fonte de açúcar usando microorganismos geneticamente modificados possa ser uma promissora maneira de obtenção de produtos acessíveis e sustentáveis (TAYLOR, 2002).

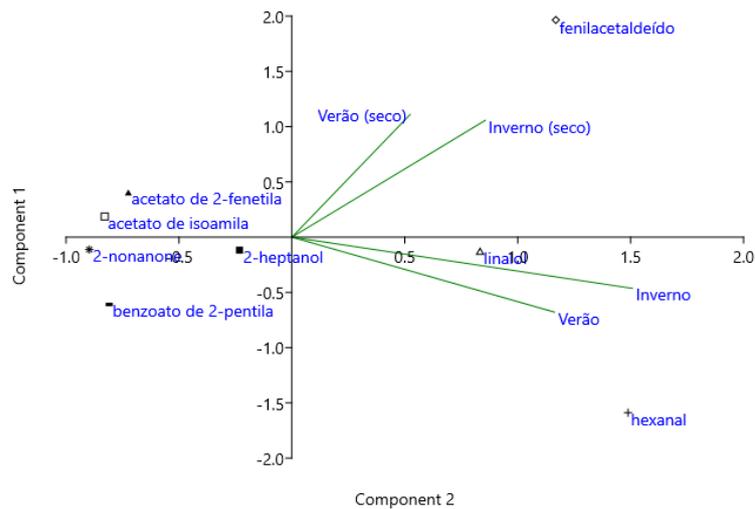
#### 5.8.1 Análise do componente principal (ACP) dos compostos voláteis majoritários

Na Figura 14 observa-se que os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) continham informações importantes e explicaram 84,47% da variância total. Os compostos hexanal e fenilacetaldeído são duas respostas representativas da variação da temporada do ano

na fermentação do cacau (Figura 15). O hexanal está no eixo negativo do gráfico do PC1 (Figura 15), isso pode ser explicado pela redução da concentração deste composto no final da fermentação tanto em outubro (de 54,73% a 0%) como em fevereiro (de 27,16% a 0). Já o fenilacetaldéido está no eixo positivo do gráfico pois seu teor aumentou em outubro (de 11,62% para 36,73%) em fevereiro (de 7,71% a 25,45%).



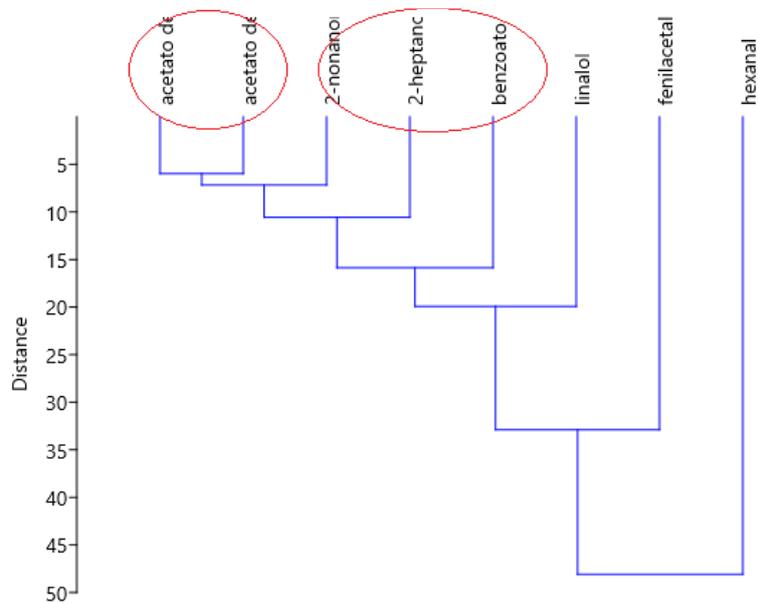
**Figura 14.** Eigenvalue para análise de componentes principais.



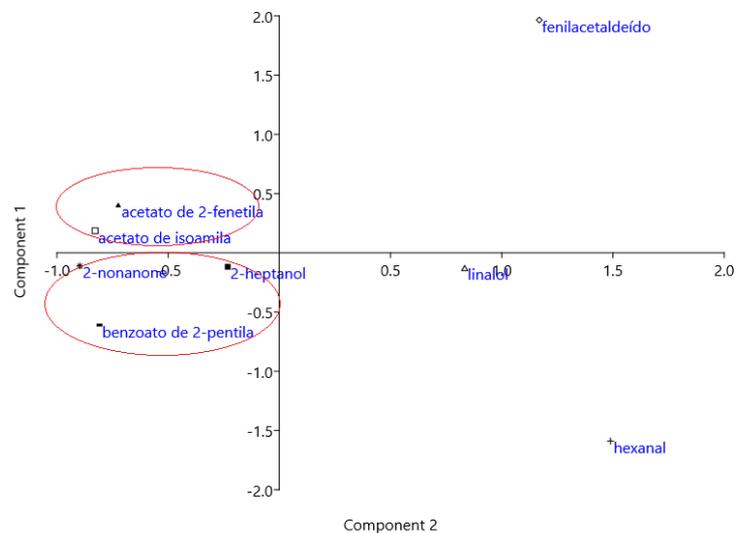
**Figura 15.** Score para as componentes principais PC1 (51,082%) e PC2 (33,385%).

O dendrograma reforça a análise dos componentes principais (ACP), o qual utiliza a distância euclidiana que se define como a análise hierárquica (ACH) para representar a

aglomeração feita em uma escala de 5 a 50 e mostrar as similaridades entre os ensaios que estão na base do dendrograma (abaixo de 20 foi considerada o ideal para a formação destes grupos). Dessa forma, o dendrograma (Figura 16a) mostra a formação dos grupos que apresentam as maiores similaridades dentre as amostras estudadas, a saber: o grupo I (acetato de 2-fenetila e acetato de 2-isoamila) e o grupo II (2-nanone, 2-hepanol e benzoato de 2-pentila) que são confirmados na Figura 16 b.



(a)



(b)

**Figura 16** – (a) Dendrograma utilizando a distância euclidiana para todos os ensaios (b) Score com os grupos formados após análise do dendrograma.

## 6 CONCLUSÕES

Estudar a fermentação de cacau em diferentes temporadas do ano é de suma importância para entender como esses fatores influenciam na composição físico-química e sensorial do cacau fermentado na Amazônia, e, a partir dessas informações, buscar reconhecimento e valorização pela sua qualidade.

A temporada do ano exerceu influência sobre a temperatura, pH e acidez da massa fermentativa, especialmente nos tempos iniciais. Esses resultados encontrados podem indicar diferença populacional microbiana nos períodos estudados, já que se sabe que os microrganismos também interferem na temperatura da fermentação, pH e acidez das sementes.

Os teores de catequina, epicatequina e metilxantinas reduziram ao longo da fermentação, no entanto de forma distinta ao relatado na literatura as concentrações de catequina e epicatequina nas sementes não fermentadas apresentaram valores superiores em fevereiro.

A temporada do ano também exerce influência no perfil aromático, pois em outubro as sementes apresentaram maiores concentrações de aldeídos e ésteres, resultando em notas sensoriais mais frutadas, florais e de mel, enquanto que em fevereiro por influência de aldeídos e álcoois que estiveram em maiores concentrações, apresentaram notas sensoriais doce/cítrica, florais e de mel. Foram encontrados compostos relacionados com cacau fino, como 2-nonanone e fenilacetaldéido em ambas as temporadas, porém, em concentrações maiores em fevereiro, indicando que este período é mais propício ao fornecimento de cacau com compostos aromáticos superiores. Não foram encontrados *off-flavors* neste estudo.

Sugere-se que a indústria concentre esforços para entender melhor como os fatores ambientais influenciam na fermentação do cacau para melhorar as etapas que ocorrem nas fazendas produtoras, assim como a identificação através de técnicas moleculares para identificar os microrganismos presentes na fermentação de cacau amazônico, para que sejam produzidos chocolates com cepas de microrganismos específicas da nossa região.

## REFERÊNCIAS DA LITERATURA

- ADAMS, Robert P. et al. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Waco: Allured publishing corporation, 2007.
- ADJALOO, M. K.; ODURO, W.; BANFUL, B. K. Floral phenology of Upper Amazon cocoa trees: Implications for reproduction and productivity of cocoa. **ISRN Agronomy**, Kumasi, v. 2012, p. 9, 2012.
- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Glasgow, v. 48, n. 9, p. 840-857, 2008.
- AFOAKWA, E. O.; QUAO, J.; TAKRAMA, J.; BUDU, S. A.; SAALIA, F. K. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, Acra, v. 50, n. 6, p. 1097-1105, 2011.
- AFOAKWA, E. O. **Chocolate science and technology**. Accra: John Wiley e Sons, 2016.
- AIKPOKPODION, P. E.; ATEWOLARA-ODULE, O. C.; OSOBAMIRO, T.; ODUWOLE, O. O.; ADEMOLA, S. M. A survey of copper, lead, cadmium and zinc residues in cocoa beans obtained from selected plantations in Nigeria. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Ibadan, v. 5, p. 88-98, 2013.
- ALBERTINI, B.; SCHOBEN, D. G.; PINELLI, F.; VECCHIA, M. D.; RICCI, M.; DI RENZO, G. C.; BLASI, P. Effect of fermentation and drying on cocoa polyphenols. **Journal of agricultural and food chemistry**, Perugia, v. 63, n. 45, p. 9948-9953, 2015.
- ALMEIDA, S. F.; SILVA, L. R.; JUNIOR, G. C. A. C.; OLIVEIRA, G.; SILVA, S. H. M.; VASCONCELOS, S.; LOPES, A. S. Diversity of yeasts during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon. **Acta Amazonica**, Belém, v. 49, n. 1, p. 64-70, 2019.
- ANDÚJAR, I.; RECIO, M. C.; GINER M. R.; RÍOS, J. L. Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, Valencia, v. 2012, p. 24, 2012.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16 ed. Arlington, 2006.

APROTOSOAIE, A. C.; LUCA, S. V.; MIRON, A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Iasi, v. 15, n. 1, p. 73-91, 2016.

ARANA-SÁNCHEZ, A.; SEGURA-GARCIA, L. E.; KIRCHMAYR, M.; OROZCO-ÁVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; GSCHAEDLER-MATHIS, A. Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Guadalajara, v. 31, n. 2, p. 359-369, 2015.

ARAUJO, Q. R.; FERNANDES, C. A. F.; RIBEIRO, D. O.; EFRAIM, P.; STEINMACHER, D.; LIEBEREI, R.; BASTIDE, P.; ARAUJO, T. G. Cocoa Quality Index—A proposal. **Food Control**, Bahia, 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**, Sidney, v. 86, n. 1, p. 87-99, 2003.

ARONSEN, L.; ORVOLL, EL.; LYSAA, R.; RAVNA, A. W.; SAGER, G. Modulation of high affinity ATP-dependent cyclic nucleotide transporters by specific and non-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. **European journal of pharmacology**, Tromsø, v. 745, p. 249-253, 2014.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological Profile for Copper. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR: U.S., 2004.

BAE, H.; KIM, S.H.; KIM, M. S.; SICHER, R. C.; LARY, D.; STREM, M. D.; NATARAJAN, S.; BAILEY, B. A. The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Beltsville, v. 46, n. 2, p. 174-188, 2008.

BAKER, D. M.; TOMLINS, K. I.; GAY, C. Survey of Ghanaian cocoa farmer fermentation practices and their influence on cocoa flavour. **Food Chemistry**, Kent, v. 51, n. 4, p. 425-431, 1994.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine - A review. **International Journal of Food Microbiology**. Adelaide, n. 125, p. 60-70, 2008.

BATISTA, N. N.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in

cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. **Journal of Food Science and Technology**, Lavras, v. 53, n. 2, p. 1101-1110, 2016.

BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 2 ed. Londres: Chapman and Hall, 1994.

BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 4 ed. Londres: John Wiley and Sons, 2011.

BIEHL, B.; BRUNNER, E.; PASSERN, D.; QUESNEL, V. C.; ADOMAKO, D. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Tafo, v. 36, n. 7, p. 583-598, 1985.

BISPO, M.; VELOSO, M. C. C.; PINHEIRO, H. L. C.; DE OLIVEIRA, R. F. S.; REIS, J. O. N. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatographic science**, Bahia, v. 40, n. 1, p. 45-48, 2002.

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

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos.

BRASIL. Resolução RDC n.360, de 23 de dezembro de 2003. A Diretoria Colegiada da ANVISA/MS aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). 2018.

BRUNETON, J. *Fitoquímica y farmacognosia*. 1ª ed. Zaragoza: Acribia, 1991.

BÜYÜKTUNCEL, Ebru. Simultaneous Determination of Theobromine, Paraxanthine, Theophylline, and Caffeine in Urine by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array UV Detection. **Analytical Letters**, Londres, v. 43, n. 16, p. 2518-2524, 2010.

CAMU, N.; WINTER, T. D.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, Bruxelles, v. 73, n. 6, p. 1809-1824, 2007.

CAMU, N.; GONZÁLEZ, A.; WINTER, T. D.; SCHOOR, A. V.; DE BRUYNE, K.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; ADDO, S. K.; DE VUYST, L. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, Bruxelles, v. 74, n. 1, p. 86-98, 2008.

CARRILLO, L. C.; LONDOÑO-LONDOÑO, J.; GIL, A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. **Food Research International**, Medellin, v. 60, p. 273-280, 2014.

CEPLAC/SUEPA. **Manual técnico do cacauero para a Amazônia brasileira**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental (CPATU), 2013.

CERASI, E.; LUFT, R. The effect of an adenosine-3', 5'-monophosphate diesterase inhibitor (aminophylline) on the insulin response to glucose infusion in prediabetic and diabetic subjects. **Hormone and Metabolic Research**, Estocolmo, v. 1, n. 04, p. 162-168, 1969.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; GYSEL, L.; MARIDUEÑA-ZAVALA, M. G.; MOLINA-MIRANDA, M. J. Time-related changes in volatile compounds during fermentation of bulk and fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **Journal of Food Quality**, Guayaquil, v. 2018, 2018.

CLEENWERCK, I.; CAMU, N.; ENGELBEEN, K.; WINTER, T. D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; VOS, P. D.; DE VUYST, L. *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Gante, v. 57, n. 7, p. 1647-1652, 2007.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.) *Coffee chemistry*, v. 1, Londres: Elsevier Applied Science, 1989.

CRAFACK, M.; MIKKELSEN, M. B.; SAERENS, S.; KNUDSEN, M.; BLENNOW, A.; LOWOR, S.; TAKRAMA, J.; SWIEGERS, J. H.; PETERSEN, GERT, B. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v. 167, n. 1, p. 103-116, 2013.

CUELLAR, L. M.; ESPINOSA, C. M. O.; SÁNCHEZ, Y. K. A.; CRUZ, L. G.; SALAZAR, J. C. S. Organoleptic quality assessment of *Theobroma cacao* L. in cocoa farms in northern Huila, Colombia. **Acta Agronómica**, Caquetá, v. 67, n. 1, p. 46-52, 2018.

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

DA SILVA OLIVEIRA, C.; MACIEL, L. F.; MIRANDA, M. S.; BISPO, E. S. Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional cultivation. **British Food Journal**, Bahia, v. 113, n. 9, p. 1094-1102, 2011.

DEL ROSARIO BRUNETTO, M.; GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A.; GÓMEZ, A.; RAMOS, G.; ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry**, Mérida, v. 100, n. 2, p. 459-467, 2007.

DE MELO PEREIRA, G. V.; MAGALHÃES, K. T.; DE ALMEIDA, E. G.; COELHO, I. S.; SCHWAN, R. F. 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**, Lavras, v. 161, n. 2, p. 121-133, 2013.

DE VUYST, L.; WECKX, S. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**, Bruxelles, p. 301-325, 2010.

DE VUYST, L.; WECKX, S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. **Journal of Applied Microbiology**, Bruxelles, v. 121, n. 1, p. 5-17, 2016.

DIRCKS, H. D. **Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour**. 2010. 418 p. Tese (Doutorado em Filosofia) - Universidade de Nova Gales do Sul Sydney, Austrália, 2010.

DIRZO, R.; RAVEN, P. H. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment and Resources**, Cidade do México, v. 28, n. 1, p. 137-167, 2003.

DO CARMO BRITO, B. N.; CHSITÉ, R. C.; PENA, R. DA S.; GLORIA, M. B. A.; LOPES, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chemistry**, Belém, v. 228, p. 484-490, 2017.

DWIJATMOKO, M. I.; NURTAMA, B.; YULIANA, N. D.; MISNAWI. Characterization of Polyphenols from Various Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Clones During Fermentation. **Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)**, Java Ocidental, v. 34, n. 2, p. 104-112, 2018.

DZIALO, M. C.; PARK, R.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, Lovaina, v. 41, n. Supp 1, p. S95-S128, 2017.

EASTERLING, D. R.; MEEHL, G. A.; PARMESAN, C.; CHANGNON, S. A.; KARL, T. R.; MEARNS, L. O. Climate extremes: observations, modeling, and impacts. **Science**, Asheville, v. 289, n. 5487, p. 2068-2074, 2000.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonoides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – faculdade de engenharia de alimentos da Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

END, M. J.; HADLEY, P.; PETTIPHER, G. L. Long and shortterm studies of the growth of cocoa (*Theobroma cacao* L.) pods in relation to photo-thermal environment. In: **Proceedings of the 10th International Cocoa Research Conference, Santo Domingo, Dominican Republic**. Cocoa Producers' Alliance, 1988. p. 219-223.

ETENG, M. U.; ETTARH, R. R. Comparative effects of theobromine and cocoa extract on lipid profile in rats. **Nutrition research**, Calabar v. 20, n. 10, p. 1513-1517, 2000.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FERRÃO, J. E. M. The death of the seed. Its importance in post-of cocoa seeds, **Revista De Ciências Agrárias**, Lisboa, p. 262-267, 2008.

FORSYTH, W.G.C; QUESNEL, V.C. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 8, p. 505-509, 1958.

FORSYTH, W. G. C.; QUESNEL, V.C. **The Mecanism of Cacao Curing**. Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry. n. 25. Nova York: John Wiley e Sons, 1963.

FOWLER, M. S.; COUTEL, F. Cocoa beans: from tree to factory. **Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use**. ed. 4. Chichester: John Wiley e Sons, 2009.

FOWLER, M. S.; COUTEL, F. Cocoa beans: from tree to factory. **Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use**. ed. 5. Chichester: John Wiley e Sons, 2017.

FRANCO, R.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. **Nutrients**, Pamplona, v. 5, n. 10, p. 4159-4173, 2013.

FRANZEN, M.; MULDER, M. B. Ecological, economic and social perspectives on cocoa production worldwide. **Biodiversity and Conservation**, Davis, v. 16, n. 13, p. 3835-3849, 2007.

GÁLVEZ, S. L.; LOISEAU, G.; PAREDES, J. L.; BAREL, M.; GUIRAUD, J-P. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, Montpellier, v. 114, n. 1, p. 124-130, 2007.

GATEAU-REY, L.; TANNER, E. V. J.; RAPIDEL, B.; MARELLI, J-P.; ROYAERT, S. Climate change could threaten cocoa production: Effects of 2015-16 El Niño-related drought on cocoa agroforests in Bahia, Brazil. **PLOS ONE**, Bahia, v. 13, n. 7, 2018.

GENNARO, M. C.; ABRIGO, C. Caffeine and theobromine in coffee, tea and cola-beverages. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 343, n. 6, p. 523-525, 1992.

GUICHARD, E.; CHRISTIAN, S.; MARTINE, M.; BON, L.; MARIE, A. **Flavour: from food to perception**. John Wiley e Sons: Chichester, 2017.

GULLO, M.; GIUDICI, P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection **International Journal of Food Microbiology**, Emília, v. 125 p.46–53, 2008.

HANSEN, C. E.; DEL OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Lausana, v. 77, n. 2, p. 273-281, 1998.

HASHIM, P.; SELAMAT, J.; MUHAMMAD, S. K. S.; ALI, A. Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Serdang, v. 78, n. 4, p. 535-542, 1998.

HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; CAI, Y.; MARTIN, R.; MANGNOLATO, D. Traditional herbal medicines-the role of polyphenols. **Planta medica**, Lausana, v. 55, n. 01, p. 1-8, 1989.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of natural products**, Lausana, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HE, Q.; LV, Y.; ZHOU, L.; SHI, B. Simultaneous determination of caffeine and catechins in tea extracts by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Chengdu, v. 33, n. 4, p. 491-498, 2010.

HO, V. T. T. **Investigation into the roles of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa bean fermentation**. 2014. Tese (Doutorado em filisofia) - Universidade de Nova Gales do Sul Sydney, 2004.

HO, V. T. T.; ZHAO, J.; FLEET, G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Nova Gales do Sul, v. 174, p. 72-87, 2014.

IBGE/INPI. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/Instituto Nacional da Propriedade Industrial. **Mapa das indicações geográficas 2017**. Brasília, 2017. 1p.

ICCO. World Cocoa Economy-Present and Future. Cocoa Year 2016.

ICCO. World Cocoa Economy-Present and Future. Cocoa Year 2017.

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, Thiverval-Grignon, v. 126, n. 3, p. 321-326, 2008.

JALIL, A. M. M.; ISMAIL, A. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health?. **Molecules**, Selangor, v. 13, n. 9, p. 2190-2219, 2008.

JAMILI, N. A. Y.; SUSILOWATI, P. E. Diversity and the role of yeast in spontaneous cocoa bean fermentation from Southeast Sulawesi, Indonesia. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, Celebes do Sudeste, v. 17, n. 1, 2016.

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

JINAP, S.; THIEN, J.; YAP, T. N. Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Selangor, v. 65, n. 1, p. 67-75, 1994.

KIM, H.; KEENEY, P. G. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **Journal of Food Science**, Seul, v. 49, n. 4, p. 1090-1092, 1984.

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

KOSTINEK, M.; BAN-KOFFI, L.; OTTAH-ATIK'P, M.; TENIOLA, D.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W.; FRANZ, C. M. A. P. Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. **Current Microbiology**, Karlsruhe, v. 56, n. 4, p. 306-314, 2008.

KRÄHMER, A.; ENGEL, A.; KADOW, D.; ALI, N.; UMAHARAN, P.; KROH, L. W.; SCULZ, H. Fast and neat-determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. **Food chemistry**, Berlim, v. 181, p. 152-159, 2015.

LEAL JR, G. A.; GOMES, L. H.; EFRAIM, P.; TAVARES, F. C. A.; FIGUEIRA, A. Fermentation of cacao (*Theobroma cacao L.*) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. **FEMS Yeast Research**, Campinas v. 8, n. 5, p. 788-798, 2008.

LEDUCQ, J.-B.; CHARRON, G.; SAMANI, P.; DUBÉ, A. K.; SYLVESTER, K.; JAMES, B.; ALMEIDA, O.; SAMPAIO, J. P.; HITTINGER, T.; BELL, G.; LANDRY, C.R. Local climatic adaptation in a widespread microorganism. **Proceedings of the Royal Society of London**, Londres, v. 281, n. 1777, p. 20132472, 2014.

LEE, K. W.; KIM, Y. J.; LEE, H. J. LEE, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of agricultural and food chemistry**, Seul, v. 51, n. 25, p. 7292-7295, 2003.

LEFEBER, T.; GOBERT, W.; VRANCKEN, G.; CAMU, N.; DE VUYST, L. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. **Food Microbiology**, Bruxelas, v. 28, n. 3, p. 457-464, 2011.

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

LIMA, L. J.; ALMEIDA, M. H.; NOUT, M. J.; ZWIETERING, M. H.. *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**, Wageningen, v. 51, n. 8, p. 731-761, 2011.

LOPEZ, A. S. F. Factors associated with cacao bean acidity and the possibility of its reduction by improved fermentation. **Revista Theobroma (Brasil)**, Bahia, v. 13 (3) p. 233-248, 1983.

LOPEZ, A.S. Limitação de prova de corte no controle de qualidade do cacau comercial. **Revista Theobroma (Brasil)**, Bahia, v. 14 (3) p. 199-207, 1984.

LOPEZ, A.S., DIMICK, P.S. **Cocoa Fermentation**. In: Reed, G., Nagodawithana, T.W. (Eds.), *Enzymes, Biomass, Food and Feed*. Weinheim: VCH, 1995.

LOPEZ, A.; QUESNEL, V. C. An assessment of some claims relating to the production and composition of chocolate aroma. **International Chocolate Review**, Suíça, v. 26 (1) p. 19-20, 22, 1971.

LOUREIRO, G. A. H. A.; ARAUJO, Q. R.; SODRÉ, G. A.; VALLE, R. R.; SOUZA JR, J. O.; RAMOS, E. M. L.; COMERFORD, N. B.; GRIERSON, P. F. Cacao quality: Highlighting selected attributes. **Food Reviews International**, Ilhéus, v. 33, n. 4, p. 382-405, 2017.

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

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia para solicitação de registro de indicação geográfica para produtos agropecuários**. Brasília, 2009.

MARTINS, J. M. et al. **Melhoria da Qualidade de Cacau**. Ilhéus: CEPLAC/CENEX, 2011.

MATISSEK, Reinhard. Evaluation of xanthine derivatives in chocolate—nutritional and chemical aspects. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, Köln, v. 205, n. 3, p. 175-184, 1997.

MAURA, Y. F.; BALZARINI, T.; BORGES, P. C.; EVRARD, P.; DE VUYST, L.; DANIEL, H-M. The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Guantánamo, v. 233, p. 34-43, 2016.

MEERSMAN, E.; STEENSELS, J.; MATHAWAN, M.; WITTOCX, P-J.; SAELS, V.; VERSTREPEN, K. J. Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81559, 2013.

MEERSMAN, E.; STEENSELS, J.; PAULUS, T.; STRUYF, N.; SAELS, V.; MATHAWAN, M.; KOFFI, J.; VRANCKEN, G.; VERSTREPEN, K. J. Breeding strategy to generate robust yeast starter cultures for cocoa pulp fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Loviana, v. 81, n. 18, p. 6166-6176, 2015.

MENGUY, L.; PRIM, D.; CARLIN-SINCLAIR, A.; MARC, I. The determination of methylxanthines in chocolate and cocoa by different separation techniques: HPLC, instrumental TLC, and MECC. **Journal of Chemical Education**, Versailles, v. 86, n. 11, p. 1307, 2009.

MISNAWI J, S.; JINAP, S.; NAZAMID, S. Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. **International Journal of Food Science & Technology**, Selangor, v. 38, n. 3, p. 285-295, 2003.

MOENS, F.; LEFEBER, T.; DE VUYST, L. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Bruxelles, v. 80, n. 6, p. 1848-1857, 2014.

MOUNJOUENPOU, P.; GUEULE, D.; FONTANA-TACHON, A.; GUYOT, B; TONDJE, P. R.; GUIRAUD, J-P. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, Iaundé, v. 121, n. 2, p. 234-241, 2008.

NDOYE, B.; CLEENWERCK, I.; ENGELBEEN, K.; DUBOIS-DAUPHIN, R.; GUIRO, A. T.; TRAPPEN, S. V.; WILLEMS, A.; THONART. *Acetobacter senegalensis* sp. nov, a thermotolerant acetic acid bacterium isolated in Senegal (sub-Saharan Africa) from mango fruit (*Mangifera indica* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Gembloux, v. 57, n. 7, p. 1576-1581, 2007.

NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast**, Frederiksberg, v. 22, n. 4, p. 271-284, 2005.

NIELSEN, D. S.; TENIOLA, O. D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T. S.; HOLZAPFEL, W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Frederiksberg v. 114, n. 2, p. 168-186, 2007.

NIELSEN, D.S.; JESPERSEN, L.; CRAFTACK, M.; JAKOBSEN, M. The microbiology of cocoa fermentation. **Chocolate in Health and Nutrition**, p. 39–60, Springer. 2013.

NIEMENAK, N.; ROHSIUS, C.; ELWERS, S.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, Yaounde, v. 19, n. 6-7, p. 612-619, 2006.

NIETHER, W.; SMIT, I.; ARMENGOT, L.; SCHNEIDER, M.; GEROLD, G.; PAWELZIK, E. Environmental Growing Conditions in Five Production Systems Induce Stress Response and Affect Chemical Composition of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Gotinga, v. 65, n. 47, p. 10165-10173, 2017.

NOUT, M. J. R.; SARKAR, P. K. Lactic acid food fermentation in tropical climates. **Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications**, Wageningen, p. 395-401, 1999.

OBERPARLEITER, S.; ZIEGLEDER, G. Amyl alcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, Munique, v. 204, n. 2, p. 156-160, 1997.

OFORI-BOATENG, K.; INSAH, B. The impact of climate change on cocoa production in West Africa. **International Journal of Climate Change Strategies and Management**, Accra, v. 6, n. 3, p. 296-314, 2014.

OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; FRANCO, R.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. Health benefits of methylxanthines in neurodegenerative diseases. **Molecular nutrition & food research**, San Sebastian, v. 61, n. 6, p. 1600670, 2017.

ORTEGA, N.; ROMERO, M-P.; MACAÀ, A.; REGUANT, J.; ANGLÈS, N.; MORELLÓ, J-R.; MOTILVA, M. J. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. **Journal of agricultural and food chemistry**, Lleida, v. 56, n. 20, p. 9621-9627, 2008.

OZCAN, G.; BARRINGER, S. Effect of enzymes on strawberry volatiles during storage, at different ripeness level, in different cultivars, and during eating. **Journal of food science**, Ohio, v. 76, n. 2, p. C324-C333, 2011.

PAPALEXANDRATOU, Z.; DE VUYST, L. Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS Yeast Research**, Bruxelles, v. 11, n. 7, p. 564-574, 2011.

PAPALEXANDRATOU Z.; VRANCKEN, G.; DE BRUYNE, K.; VANDAMME, P.; DE VUYST, L. 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**. Bruxelles, v. 28, p. 1326–1338. (2011)a.

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

PAPALEXANDRATOU Z.; CAMU, N.; FALONY, G.; DE VUYST, L. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. **Food Microbiology**, Bruxelles, v. 28, p. 964–973, (2011)c.

PAPALEXANDRATOU, Z.; NIELSEN, D. S. It's Gettin'Hot in Here: Breeding Robust Yeast Starter Cultures for Cocoa Fermentation. **Trends in Microbiology**, Bruxelles, v. 24, n. 3, p. 168-170, 2016.

PARKER, J. K. Introduction to aroma compounds in foods. In: **Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages**, Reading, p. 3-30, 2015.

PAYNE, M. J.; HURST, J.; MILLER, K. B.; RANK, C.; STURART, D. 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**, Hershey, v. 58, n. 19, p. 10518-10527, 2010.

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

PELÁEZ, P. P.; BARDÓN, I.; CAMASCA, P. Methylxanthine and catechin content of fresh and fermented cocoa beans, dried cocoa beans, and cocoa liquor. **Scientia Agropecuaria**, Trujillo, v. 7, n. 4, p. 355-365, 2016.

PIPITONE, L. **Situation and Prospects for Cocoa Supply & Demand**. In: World Cocoa Conference. International Cocoa Organization, Costa do Marfim, 2012.

PORTER, L. J.; MA, Z.; CHAN, B. G. Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, Lower Hutt, v. 30, n. 5, p. 1657-1663, 1991.

- RAMLI, N.; HASSAN, O.; SAID, M.; SAMSUDIN, W.; IDRIS, N. A. Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. **Journal of Food Processing and Preservation**, Bangi, v. 30, n. 3, p. 280-298, 2006.
- RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; MIGUEL, M G. C. P.; SCHWAN, R. F. 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**, Lavras, v. 64, p. 908-918, 2014.
- REED, Stacy. Sensory analysis of chocolate liquor. **Manufacturing Confectioner**, v. 90, 2010.
- RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; OROZCO-AVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao L.*) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Research International**, Cidade do México, v. 44, n. 1, p. 250-258, 2011.
- ROELOFSEN, P. A. Fermentation, Drying, and Storage of Cacao Beans. **Advances in food research**, v. 8, p. 225-296, 1958.
- ROHAN, T. A; CONNELL, M. The precursors of chocolate aroma: A study of the flavonoids and phenolic acids. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 29, p. 460- 463, 1964.
- SAEZ, J. S.; LOPES, C. A.; KIRS, V. E.; SANGORRÍN, M. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. **Food Microbiology**, Buenos Aires, v. 28, n. 3, p. 503-509, 2011.
- SALMINEN, S. VON WRIGHT A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. Ed. 3. Nova York: CRC Press, 2004.
- SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCH, S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 167-187, 2013.
- SAMPAIO, J. P.; GONÇALVES, P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Caparica, v. 74, n. 7, p. 2144-2152, 2008.

SANBONGI, C.; OSAKEBE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S.; OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of agricultural and food chemistry**, Nagoya, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.

SANDHYA, M. V. S.; YALLA´A, B. S.; VARADARAJ, M. C.; PURANAIAK, J.; RAO, L.; JANARDHAN, P.; MURTHY, P. S. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. **LWT-Food Science and Technology**, Mysore, v. 65, p. 731-738, 2016.

SCHMARR, H-G; ENGEL, K-H. Analysis and stereodifferentiation of linalool in *Theobroma cacao* and cocoa products using enantioselective multidimensional gas chromatography. **European Food Research and Technology**, Neustadt, v. 235, n. 5, p. 827-834, 2012.

SCHNERMANN, P.; SCHIEBERLE, P. Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Garching, v. 45, n. 3, p. 867-872, 1997.

SCHULTZ, G. P.; PRINSEN, A. J.; PATER, A. The spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in cacao products. **International Chocolate Review**, v. 25, n. 7, 1970.

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

SCHWAN, R. F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied and Environmental Microbiology**, Itabuna, v. 64, n. 4, p. 1477-1483, 1998.

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

SEIGLER, D. S. Overview of functional foods: Emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 5, p. 341-347, 1995.

SIQUEIRA, José O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G. R.; PUTNAM, A. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, East Lansing, v. 10, n. 1, p. 63-121, 1991.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, 16:144-158, 1965.

TOMLINS, K. I.; BAKER, D. M.; DAPLYN, P. Effect of fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. **Food chemistry**, Kent, v. 46, n. 3, p. 257-263, 1993.

SUAZO, Y.; DAVIDOV-PARDO, G.; AROZARENA, I. Effect of Fermentation and Roasting on the Phenolic Concentration and Antioxidant Activity of Cocoa from Nicaragua. **Journal of Food Quality**, Pamplona, v. 37, n. 1, p. 50-56, 2014.

SURBURG, H., PANTEN, J., BAUER, K. **Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses**, Weinheim: John Wiley, 2006.

TAYLOR, A. J. **Food Flavour Technology**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2002.

TIMBIE, D. J.; SECHRIST, L.; KEENEY, P. G. Application of high-pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. **Journal of Food Science**, Pennsylvania, v. 43, n. 2, p. 560-565, 1978.

TOMAS-BARBERÁN, F. A.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E.; MARÍN, A.; MUGUERZA, B.; GIL-IZQUIERDO, A.; CERDÁ, B.; ZAFRILLA, P.; MORILLA, J.; MULERO, J.; IBARRA, A.; PASAMAR, M. A.; RAMÓN, D.; ESPÍN, J. C. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Murcia, v. 55, n. 10, p. 3926-3935, 2007.

VISINTIN, S.; ALESSANDRIA, V.; VALENTE, A.; DOLCI, P.; COCOLIN, L. Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. **International journal of food microbiology**, Grugliasco, v. 216, p. 69-78, 2016.

WANG, L.; NAGELE, T.; DOERFLER, H.; FRAGNER, L.; CHATURVEDI, P.; NUKARINEN, E.; BELLAIRE, A.; HUBER, W.; WEISZMANN, J.; ENGELMEIER, D.; RAMSAK, Z.; GRUDEN, K.; WECKWERTH, W. System level analysis of cacao seed ripening reveals a sequential interplay of primary and secondary metabolism leading to polyphenol accumulation and preparation of stress resistance. **The Plant Journal**, Viena, v. 87, n. 3, p. 318-332, 2016.

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**, Ispra, v. 33, n. 6, p. 423-447, 2000.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4 ed. Londres: John Wiley and Sons, 2008.

XIA, Z.; NI, Y.; KOKOT, S. Simultaneous determination of caffeine, theophylline and theobromine in food samples by a kinetic spectrophotometric method. **Food chemistry**, Nanchang, v. 141, n. 4, p. 4087-4093, 2013.

ZHENG, X-Q.; KOYAMA, Y.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing Theobroma cacao fruits. **Journal of plant physiology**, Tokyo, v. 161, n. 4, p. 363-369, 2004.

ZIEGLEDER, G. Linalool contents as characteristic of some flavor grade cocoas. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Munique, v. 191, n. 4-5, p. 306-309, 1990.

ZUMBÉ, A. Polyphenols in cocoa: are there health benefits? **Nutrition Bulletin**, v. 23, n. 1, p. 94-102, 1998.

## ANEXO I

## CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CGEM

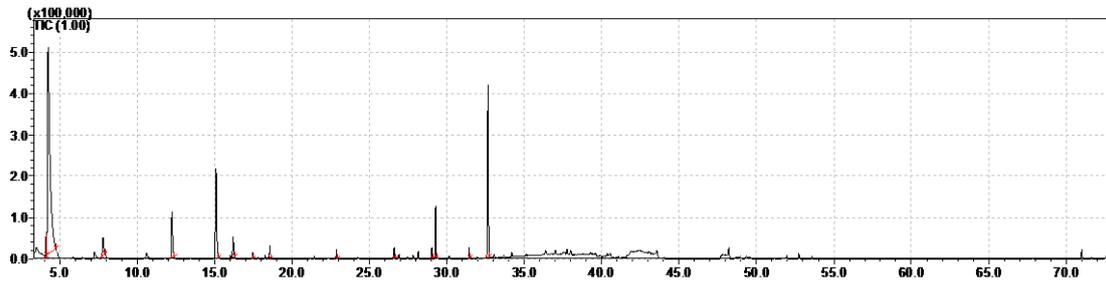


Figura 17: Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 0 h em outubro

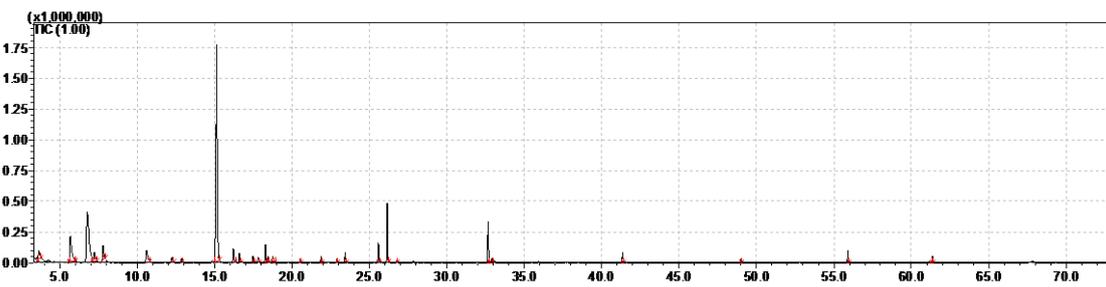


Figura 18: Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 96 h em outubro

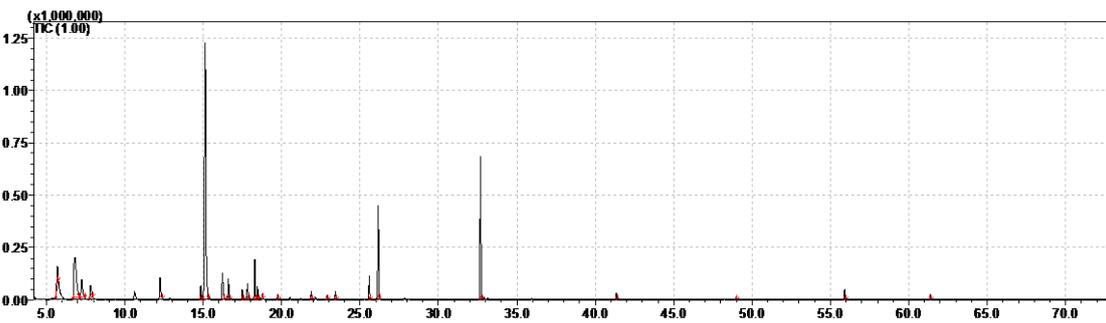


Figura 19: Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 144 h em outubro

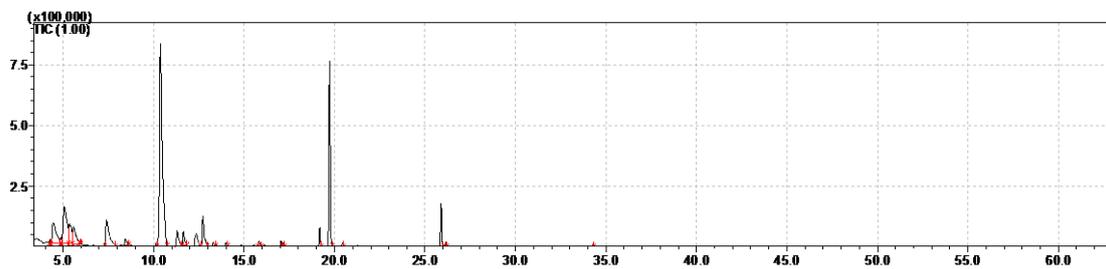
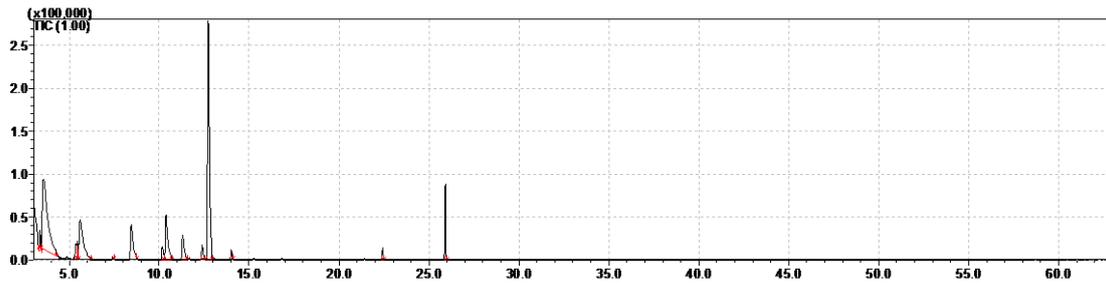
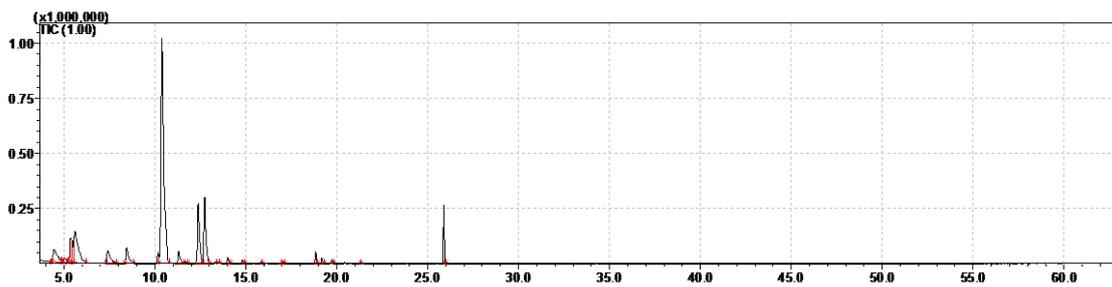


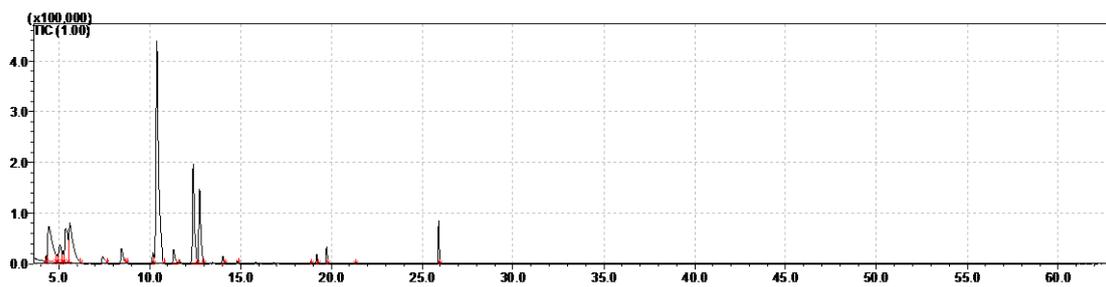
Figura 20: Cromatograma de amostras de semente de cacau fermentado e seco em outubro



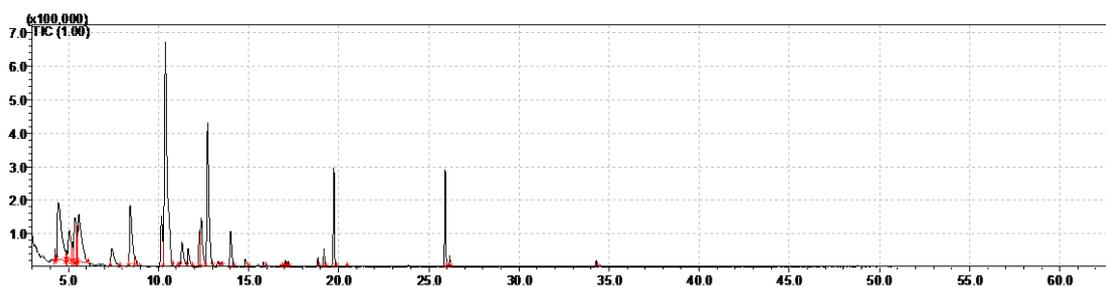
**Figura 21:** Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 0 h em fevereiro



**Figura 22:** Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 96 h em fevereiro



**Figura 23:** Cromatograma de amostras de sementes de cacau do tempo 144 h em fevereiro



**Figura 24:** Cromatograma de amostras de semente de cacau fermentado e seco em fevereiro