



**LÍVIA VIANA DE CASTRO REIS**

**EFEITOS DA INOCULAÇÃO NAS  
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS,  
FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DA  
FERMENTAÇÃO DE CACAU**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**LÍVIA VIANA DE CASTRO REIS**

**EFEITOS DA INOCULAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS  
MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DA  
FERMENTAÇÃO DE CACAU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

Coorientadora

Dra. Maria Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Reis, Lívia Viana de Castro.

Efeitos da inoculação nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais da fermentação de cacau / Lívia Viana de Castro Reis. – Lavras : UFLA, 2014.

105 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. *Theobroma cacao* L. 2. Processo fermentativo. 3. MALDI-TOF. 4. PCR-DGGE. 5. TDS chocolate. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.024

**LÍVIA VIANA DE CASTRO REIS**

**EFEITOS DA INOCULAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS  
MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DA  
FERMENTAÇÃO DE CACAU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2014.

Dra. Cintia Lacerda Ramos UFLA

Dra. Karina Teixeira Magalhães Guedes UFLA

Dra. Priscilla Efraim UNICAMP

Dra. Rosane Freitas Schwan  
Orientadora

Dra. Maria Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel  
Coorientadora

**LAVRAS – MG**

**2014**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, fé e vitória alcançada.

Aos meus pais, Celma e Moisés e a toda minha família, pelos ensinamentos importantes, como o sentido do amor e a perseverança frente às dificuldades.

Ao meu namorado, Daniel, pelo carinho, paciência, incentivo e por estar ao meu lado em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade da realização do curso de mestrado, e a todos os professores, que contribuíram de alguma forma para a busca do conhecimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Rosane Freitas Schwan, pela orientação e oportunidade concedida.

À pós – doutoranda, Maria Gabriela Da Cruz Pedrozo Miguel, pelos ensinamentos e participação imprescindível nas diretrizes e execução deste trabalho.

À professora Priscilla Efraim e às pós – doutorandas, Cíntia Lacerda Ramos e Karina Teixeira Magalhães Guedes, pelas sugestões, colaboração e participação na banca examinadora.

A todos os pós-graduandos e estagiários, em especial à Roberta, Igor, Jessimara e William pela contribuição na pesquisa e troca de experiências.

A todos os amigos que me acompanharam, durante essa trajetória, em especial à Natálie, Juliana, Bárbara e Aline pelo apoio incondicional e, sobretudo, pela amizade.

E a todas as pessoas que estiveram presentes na minha vida e contribuíram para a elaboração e realização deste trabalho.

**Muito obrigada!**

## RESUMO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é a principal matéria-prima utilizada para a produção de chocolate. A fermentação é uma etapa essencial para a obtenção de amêndoas de boa qualidade e implica um processo microbiológico, de ação enzimática e melhoramento do *flavor*. Objetivou-se neste trabalho estudar a sucessão microbiana e a caracterização físico-química e sensorial na fermentação do clone de cacau PH16 e PH16 inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CHYC 7.04 and *Lactobacillus fermentum* UFLA CHBB 8.12, visando obter um produto final de melhor qualidade. A contagem populacional e as características físico-químicas foram mensuradas ao longo dos 7 dias de fermentação. Chocolates do tipo amargo foram produzidos e analisados pelo método Dominância Temporal de Sensações (TDS). O pH e a temperatura aumentaram, gradativamente, ao longo da fermentação, atingindo ao final de 144 horas valores máximos de 4.51 e 44.8°C no PH16, e 4.65 e 46.8°C no PH16 inoculado. As médias de populações de BAL encontradas foram 1.8 log UFC/mL na fermentação sem inoculação e 1.5 log UFC/mL na fermentação com inoculação, BAA (2.5 e 2.2 log UFC/mL no clone PH16 e PH16 inoculado, respectivamente); enquanto as médias de populações de leveduras foram 2.2 log UFC/mL na fermentação sem inoculação e 2.9 log UFC/mL na fermentação com inoculação e aeróbios mesófilos (2.7 e 3.2 log UFC/mL), também, foram maiores no PH16 inoculado. Um total de 873 microrganismos foi isolado e espécies dos gêneros *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Bacillus* e *Paenibacillus* foram identificadas por método dependente e independente de cultivo. Os gêneros *Candida*, *Pediococcus*, *Acinetobacter* e *Lysinibacillus* foram identificados apenas por plaqueamento utilizando a técnica de MALDI-TOF, enquanto *Torulasporea* e *Tatumella* foram detectados apenas por PCR-DGGE. Os açúcares (glicose e frutose) e ácido cítrico foram consumidos mais rapidamente no PH16 inoculado (108 horas), quando comparado ao PH16 (132 horas), e as concentrações produzidas dos metabólitos etanol, ácido láctico e ácido acético foram variáveis ao longo da fermentação. Um total de 38 compostos foram identificados e quantificados por GC-FID, sendo 15 álcoois, 13 ésteres, 4 ácidos, 4 aldeídos e 2 outros compostos. O chocolate produzido com o clone PH16 apresentou dominância do sabor amargo, enquanto o chocolate proveniente do PH16 inoculado apresentou os sabores amargo, adstringente e ácido como dominantes e a percepção do sabor de cacau foi ligeiramente suprimida. A inoculação do PH16 acelerou o processo fermentativo, mas afetou, negativamente, a qualidade sensorial do chocolate obtido.

Palavras-chave: *Theobroma cacao* L. Processo fermentativo. MALDI-TOF. PCR-DGGE. TDS chocolate.

## ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is the main raw material used for the production of chocolate. The fermentation implicates a microbiological process of enzyme activity and is an essential stage for obtaining good quality chocolate flavor. In this work, we studied the microbial succession and physical-chemical and sensorial characterization in the fermentation of cocoa hybrid PH16 and PH16 inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CHYC 7.04 and *Lactobacillus fermentum* UFLA CHBB 8.12, aiming at obtaining a final product with better quality. The population count and the physical-chemical characteristics were measured over the 7 days of fermentation. Chocolates of the dark type were produced and analyzed by the Temporal Dominance Sensation (TDS) method. The pH and temperature gradually increased along the fermentation, reaching, at the end of 144 hours, the maximum values of 4.51 and 44.8°C, for PH16, and 4.65 and 46.8°C, for inoculated PH16. The BAL population means were of 1.8 log CFU/mL in the fermentation without inoculation and 1.5 log CFU/mL in the fermentation with inoculation, BAA (2.5 and 2.2 log CFU/mL on hybrid PH16 and PH16 inoculated, respectively); while the yeast population means were of 2.2 log CFU/mL in the fermentation without inoculation and 2.9 log CFU/mL in the fermentation with inoculation and mesophilic aerobics (2.7 and 3.2 log CFU/mL), and were also higher than in the inoculated PH. A total of 873 microorganisms were isolated and species of the *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Bacillus* and *Paenibacillus* genera were identified by dependent and independent cultivation method. The *Candida*, *Pediococcus*, *Acinetobacter* and *Lysinibacillus* genera were identified only by plating using the MALDI-TOF technique, while *Torulasporea* and *Tatumella* were detected only by PCR-DGGE. The sugars (glucose and fructose) and citric acid were rapidly consumed in the inoculated PH16 (108 hours) when compared to the PH16 (132 hours), and the concentrations of ethanol, lactic acid and acetic acid metabolites were variable along the fermentation. A total of 38 compounds were identified and quantified by GC-FID, being them 15 alcohols, 13 esters, 4 acids, 4 aldehydes and 2 other compounds. The chocolate produced with the PH16 hybrid presented dominance of bitter taste, while the chocolate originated from the inoculated PH16 presented the bitter, astringent and acid tastes as dominant and the perception of the cocoa flavor was suppressed. The inoculation of the PH16 accelerated the fermentative process, but negatively affected the sensorial quality of the chocolate obtained.

Keywords: *Theobroma cacao* L. Fermentative process. MALDI-TOF. PCR-DGGE. TDS chocolate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção, área plantada e número de produtores.....	19
Figura 2	Os frutos do cacau têm aspectos e cores bem diferentes; podem ser redondos ou alongados, lisos ou com sulcos profundos e até mesmo cobertos de “verrugas” .....	22
Figura 3	Os tipos de cacau: <i>Criollo</i> e a semente oval (A), <i>Forastero</i> e a semente achatada (B), Trinitário (C).....	23
Figura 4	Fluxograma do beneficiamento do cacau.....	25
Figura 5	Sucessão microbiana durante período de fermentação de amêndoas de cacau.....	28
Figura 6	Reações observadas durante a fermentação do cacau .....	29
Figura 7	Fruto, polpa e amêndoa do clone de cacau PH16.....	58
Figura 8	Variação da temperatura e pH da massa de cacau durante a fermentação dos clones PH16 e PH16 inoculado. Clone PH 16 sem inoculação (◆), PH 16 com inoculação (■); Temperatura (°C) (símbolo fechado), pH (símbolo aberto) .....	60
Figura 9	Sucessão microbiana de leveduras (▲), BAL (■), BAA (●) e bactérias aeróbias mesófilas (◆) durante a fermentação do clone de cacau PH 16 (A) e PH 16 inoculado (B).....	62
Figura 10	Dendrograma obtido por análises de MALDI-TOF MS de isolados de leveduras do clone de cacau PH16 e PH16 inoculado...	66
Figura 11	Dendrogramas obtidos por análises de MALDI-TOF MS de isolados de bactérias do clone de cacau PH16. A) meio MRS, B) meio GYC, C) Ágar nutriente .....	69
Figura 12	Dendrogramas obtidos por análises de MALDI-TOF MS de isolados de bactérias do clone de cacau PH16 inoculado. A) meio MRS, B) meio GYC, C) Ágar nutriente.....	70

Figura 13 Perfis de eucariotos durante a fermentação de amêndoas de cacau do clone PH 16 (A) e PH 16 inoculado (B).....	72
Figura 14 Perfis de procariotos durante a fermentação de amêndoas de cacau do clone PH 16 (A) e PH 16 inoculado (B).....	76
Figura 15 Consumo de glicose (◆), frutose (■) e ácido cítrico (▲) durante a fermentação dos clones de cacau PH16 (A) e PH16 inoculado (B) nas amêndoas (símbolos fechado) e na polpa (símbolos aberto).....	79
Figura 16 Produção de etanol (◆) , ácido láctico (■) e ácido acético (▲) durante a fermentação dos clones de cacau PH16 (A) e PH16 inoculado (B) nas amêndoas (símbolos fechado) e na polpa (símbolos aberto).....	80
Figura 17 Representação gráfica do perfil de dominância temporal das sensações da amostra de chocolate do clone de cacau PH16. Os atributos avaliados foram: amargo (◆), ácido (■), doce (▲), adstringente (●), sabor de cacau (■), fruta (●), madeira/tabaco (▲) e ausência de sabor (◆) e as linhas representadas significam ‘nível do acaso’ (---) e ‘nível de significância’ (—).....	87
Figura 18 Representação gráfica do perfil de dominância temporal das sensações da amostra de chocolate do clone de cacau PH16 inoculado. Os atributos avaliados foram: amargo (◆), ácido (■), doce (▲), adstringente (●), sabor de cacau (■), fruta (●), madeira/tabaco (▲) e ausência de sabor (◆) e as linhas representadas significam ‘nível do acaso’ (---) e ‘nível de significância’ (—).....	89

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>O cacau e as civilizações pré-colombianas</b> .....	15
<b>2.1.1</b>	<b>A chegada do cacau na Europa e sua popularização mundial</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>Produção mundial e nacional de cacau</b> .....	17
<b>2.3</b>	<b>Desenvolvimento de cultivares clonais de cacau</b> .....	20
<b>2.4</b>	<b>O cacau e suas variedades</b> .....	21
<b>2.5</b>	<b>Pesquisas sobre a influência genética na qualidade do cacau</b> .....	23
<b>2.6</b>	<b>O processamento das sementes de cacau</b> .....	25
<b>2.6.1</b>	<b>Colheita e quebra dos frutos</b> .....	25
<b>2.6.2</b>	<b>Fermentação</b> .....	26
<b>2.6.3</b>	<b>Secagem</b> .....	33
<b>2.6.4</b>	<b>Armazenamento</b> .....	34
<b>2.7</b>	<b>Identificação e função de leveduras associadas à fermentação de cacau</b> .....	34
<b>2.8</b>	<b>Identificação e função de bactérias associadas à fermentação de cacau</b> .....	36
<b>2.9</b>	<b>Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE)</b> .....	38
<b>2.10</b>	<b>Métodos de avaliação sensorial: Dominância Temporal de Sensações (TDS)</b> .....	40
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>3.1</b>	<b>Material analisado</b> .....	42
<b>3.2</b>	<b>Fermentação</b> .....	42
<b>3.3</b>	<b>Análises microbiológicas</b> .....	43
<b>3.4</b>	<b>Agrupamento dos isolados por meio de suas características morfológicas e bioquímicas</b> .....	44
<b>3.4.1</b>	<b>Caracterização de leveduras</b> .....	45
<b>3.4.2</b>	<b>Caracterização de bactérias do ácido láctico (BAL)</b> .....	45
<b>3.4.3</b>	<b>Caracterização de bactérias do ácido acético (BAA)</b> .....	45
<b>3.4.4</b>	<b>Caracterização de Bacillus spp.</b> .....	46
<b>3.5</b>	<b>Identificações das espécies microbianas por método dependente de cultivo (MALDI-TOF)</b> .....	46
<b>3.5.1</b>	<b>Análise proteica das células bacterianas</b> .....	46
<b>3.5.2</b>	<b>Análise proteica das células leveduriformes</b> .....	47
<b>3.6</b>	<b>Identificações das espécies microbianas por métodos independentes de cultivo</b> .....	48
<b>3.6.1</b>	<b>Amplificação de fragmentos dos genes rRNA 16S e 26S</b> .....	48
<b>3.6.2</b>	<b>Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)</b> ..	49
<b>3.7</b>	<b>Extração de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos</b> .....	50

3.8	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	51
3.9	Extração dos compostos voláteis das amêndoas.....	51
3.10	Cromatografia Gasosa (GC).....	52
3.11	Análise sensorial dos chocolates.....	53
3.11.1	Seleção de provadores.....	53
3.11.2	Treinamento dos provadores.....	54
3.11.3	Definição dos atributos avaliados e condições da análise de Dominância Temporal das Sensações (TDS).....	55
3.11.4	Análise de Dominância Temporal das Sensações (TDS).....	56
3.12	Análise estatística.....	57
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
4.1	Aspectos gerais dos frutos de cacau.....	58
4.2	Monitoramento da temperatura e pH durante a fermentação.....	59
4.3	Sucessão microbiológica.....	61
4.4	Identificação das espécies microbianas por MALDI-TOF.....	64
4.5	Identificação das espécies microbianas por PCR-DGGE.....	71
4.6	Análise de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos.....	78
4.7	Análise de compostos voláteis.....	82
4.8	Análise sensorial dos chocolates.....	86
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	90
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie originária da América Tropical. O cultivo do cacau foi realizado pelos Maias e Astecas há, aproximadamente, dois mil anos, na cidade do México, onde estes povos utilizavam suas amêndoas como moeda e para o preparo de uma bebida muito apreciada na época, o tchocolath.

À medida que o cacau foi ganhando importância econômica com a expansão do consumo do chocolate, várias tentativas foram feitas visando à implantação da lavoura cacauieira em outras regiões com condições de clima e solo semelhantes às do seu habitat natural. Os maiores produtores de cacau são: Costa do Marfim, liderando desde a década de 60 a produção mundial, Indonésia, Gana, Nigéria, Camarões, Brasil, Malásia e Equador. Esta relação de oito países concentra mais de 90% da oferta mundial (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2012).

Na safra 1984/85 o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de cacau, produzindo, aproximadamente, 400.000 toneladas, e o cacau adaptou-se muito bem ao clima e solo da região Sul da Bahia (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2002). Porém, o setor cacauieiro no Brasil vem atravessando, desde o final da década de 80, uma grave crise ocasionada, entre outros fatores, pela introdução do fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença denominada vassoura-de-bruxa. Como consequência da introdução deste patógeno, houve uma queda expressiva na produção nacional (EFRAIM, 2009).

Além da vassoura-de-bruxa, outro problema recorrente para o escoamento do cacau é a baixa qualidade das amêndoas produzidas, em função do reduzido controle, associada aos tempos de fermentação e secagem, impossibilitando a ocorrência das alterações necessárias (principalmente a

acidificação e aumento da temperatura) para que as reações se processem de forma satisfatória. Como consequência, uma porção importante das amêndoas a serem torradas não irá desenvolver o sabor característico, o que leva à perda de qualidade do chocolate produzido (NASCIMENTO, 2010).

As pesquisas sobre cultivares de cacau resistentes e produtivos, que originem matérias-primas de qualidade para fabricação do chocolate, são alternativas encontradas para o controle da vassoura-de-bruxa e dos problemas ocasionados na produção de cacau no Brasil. A recuperação da lavoura cacauífera brasileira, por meio da seleção e utilização de clones de cacau, provenientes de cruzamentos genéticos das plantas, é um trabalho que tem sido realizado com o apoio de instituições de pesquisa, como o Centro de Pesquisa do Cacau – CEPEC e a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacauífera – CEPLAC.

As etapas de pré-processamento do cacau (colheita, quebra, fermentação e secagem) são muito importantes na garantia da qualidade das amêndoas. Para Lagunes-Galvez et al. (2007), a fermentação é uma das etapas da pós-colheita que mais afeta a qualidade dos produtos obtidos com base no cacau. Uma sucessão microbiana complexa está associada ao processo, contribuindo direta ou indiretamente para a redução da acidez, amargor e adstringência das amêndoas de cacau, sendo essenciais para a obtenção de um produto final de alta qualidade. Na secagem, as enzimas presentes promovem as reações químicas de cura, estabilizando o sabor e a cor característicos do chocolate (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

Na tentativa de contribuir com o entendimento dos impactos de melhoramento genético do cacauífera, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar as características fermentativas do clone de cacau PH16 sem inoculação e inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CHYC 7.04 e *Lactobacillus fermentum* UFLA CHBB 8.12, por meio do estudo da população microbiana, presente durante a fermentação das amêndoas de cacau e

caracterizar físico-quimicamente os compostos presentes durante este processo fermentativo. Análises sensoriais foram realizadas com os chocolates produzidos pelos dois diferentes processos (PH 16 com e sem inoculação), visando obter um produto final de melhor qualidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O cacau e as civilizações pré-colombianas

O cacauero pertence à ordem Malvales, família *Malvaceae*, gênero *Theobroma* e espécie *Theobroma cacao* L., única utilizada comercialmente para a produção de chocolate (EFRAIM, 2009). Em 1737, o gênero foi denominado *Theobroma*, que significa alimento dos deuses, em referência à origem divina atribuída ao cacauero pelos povos mesoamericanos (LOPES et al., 2011).

A história inicia-se há séculos com as civilizações asteca e maia. No México, os astecas veneravam o Deus Quetzalcoatl, que personificava a sabedoria e o conhecimento e foi quem lhes deu, entre outras coisas, o chocolate. Os astecas acreditavam que Quetzalcoatl trouxera do céu para o povo as sementes de cacau e que um dia ele iria voltar após ser destruído por um Deus rival. O povo festejava as colheitas com sacrifícios humanos, oferecendo às vítimas taças de chocolate chamadas na época de "tchocolath" (HERMÈ, 2006).

Por volta de 600 ac, os maias, que também conheciam o chocolate, estabeleceram as primeiras plantações de cacau em Yucatan e na Guatemala. Considerados importantes comerciantes na América Central, eles aumentaram ainda mais suas riquezas com a comercialização de cacau (FARROW, 2005).

O chocolate era consumido em várias culturas pré-colombianas. Os incas, que viviam há milhares de quilômetros de distância dos astecas, produziam cacau em quantidade suficiente para uso de toda a população. Entre os maias e os astecas, porém, só a nobreza podia dar-se ao luxo do uso habitual do chocolate. Houve tempo em que as sementes do cacau, símbolo de riqueza, eram usadas como dinheiro (FRANCO, 2001).

O cacau e o seu precioso produto, o chocolate, só circulavam pelos rituais, banquetes e no comércio na América Central. Passaram-se séculos, até

que em 30 de julho de 1502, o navegador Cristóvão Colombo, achando que tinha descoberto as Índias, chegou à ilha de Guajano, na América Central. Um chefe Asteca subiu a bordo e ofereceu, ao navegador e sua tripulação, armas, tecidos e, também, sementes de cacau (LIMA, 2008).

Em 1519, o explorador espanhol Hernán Cortés e os seus seiscentos soldados desembarcaram no México, pretendendo conquistá-lo. Segundo Hermé (2006), o povo acolheu Cortés com um grande banquete regado com taças de ouro cheias de "tchocolath". O "tchocolath" não era a bebida agradável de hoje. Era bastante amarga e apimentada. Naquela época, o chocolate era reservado apenas aos governadores e soldados, pois se acreditava que, além de possuir poderes afrodisíacos, ele dava força e vigor àqueles que o bebiam.

### **2.1.1 A chegada do cacau na Europa e sua popularização mundial**

Franco (2001) afirma que Cortés ficou muito impressionado com a mística que envolvia o chocolate e mais ainda com o seu uso corrente. Assim, com o intuito de gerar riquezas para o seu país, ele estabeleceu uma plantação de cacau para o rei Carlos V, da Espanha. Como bom negociante, começou a trocar as sementes de cacau por ouro, um metal indiferente àqueles povos. Os espanhóis, aos poucos, acostumavam-se ao chocolate e, para atenuar o seu sabor amargo, diminuía a proporção de especiarias e adoçavam-no com mel.

Rapidamente o chocolate espalhou-se entre a família real e os nobres da corte espanhola. Cortés levara para a Espanha todo o conhecimento daquelas tribos primitivas de como lidar com o cacau e preparar o chocolate. Sabia como colher, retirar as sementes dos frutos e depois espalhá-las ao sol para fermentar e secar (THAKERAR, 2007).

Quando os espanhóis perceberam que a produção do México e da Guatemala já não seria suficiente para satisfazer a crescente demanda dos nobres

européus, deu-se o início das plantações na Venezuela, que se converteu no principal fornecedor de cacau para a Europa, sobretudo porque o tipo *criollo*, lá produzido, era o de melhor qualidade (FRANCO, 2001).

A revolução industrial contribuiu imensamente para a mudança da mentalidade em relação ao chocolate: mantendo o prestígio, porém, já acessível ao povo, o divino chocolate tornou-se uma bebida comum, objeto de comercialização (HERMÉ, 2006).

A fabricação de chocolate foi aperfeiçoada pelos holandeses e suíços no início do século XIX. Com o aumento do consumo do chocolate, cresceu, também, o número de países que produziam cacau. Brasil, Equador, Gana, Nigéria, Camarões, Costa do Marfim tornaram-se os novos produtores e, no final do século XX, o chocolate já havia percorrido o globo terrestre, chegando ao Oriente Médio e ao Extremo Oriente. A China foi um dos últimos redutos do mundo a se render à receita à base de cacau (HERMÉ, 2006).

As primeiras sementes de cacau chegaram ao Brasil no século XVIII. Com o clima quente e úmido da região sul da Bahia, extensos cacauzeiros rapidamente se desenvolveram, transformando o sul do estado no principal produtor de cacau do país. Além da Bahia, outros estados brasileiros são produtores de cacau, entre eles Pará e Rondônia (LIMA, 2008).

## **2.2 Produção mundial e nacional de cacau**

De acordo com os dados da ICCO (International Cocoa Organization), os maiores produtores mundiais de cacau são a Costa do Marfim com 1.486 mil toneladas na safra 2011/12, seguida por Gana (879 mil toneladas), Indonésia (440 mil toneladas), Nigéria (235 mil toneladas), Brasil (220 mil toneladas), Camarões (207 mil toneladas), Equador (198 mil toneladas) e Papua Nova Guiné (39 mil toneladas). O continente africano detém 71,5% da produção mundial,

seguido das Américas, com 16% e Ásia e Oceania, com 12,5%. (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2012).

Em relação às importações, o destaque é para os Estados Unidos, país que mais importa amêndoas de cacau e seus derivados. No 1º trimestre de 2011, as importações norte-americanas de amêndoas de cacau somaram 156.732 t e as importações de manteiga de cacau alcançaram 17.942 t, 14,54% acima das 15.664 t do primeiro trimestre de 2010. Já as importações de pasta (*líquor*) caíram de 6.953 t em 2010 para apenas 80,4 t (BRASIL, 2011).

Na década de 1980, o Brasil se destacou como um dos principais produtores mundiais de cacau e ocupava o segundo lugar no ranking dos maiores produtores mundiais, caindo para o sexto lugar em virtude da progressiva redução da área plantada e do padrão tecnológico adotado, como resposta à queda dos preços internacionais e do alastramento da doença conhecida como vassoura-de-bruxa (PIRES, 2003).

A produção brasileira passou de 460 mil toneladas (1985/86) para apenas 170 mil (2003/04), representando uma importante queda de 63%. Como consequência, houve uma queda brusca do preço das amêndoas fermentadas e secas no mercado internacional (passou de US\$ 4 mil para apenas US\$ 650/t). As exportações, também, sofreram acentuado declínio de 70% (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2011). Como consequência, o Brasil passou de exportador a importador de amêndoas fermentadas e secas para suprir a demanda nacional.

Porém, nos últimos anos, a produção nacional de cacau começou a se recuperar e o Brasil, de um pico de baixa em 2003, de 170.000 toneladas, passou para 220.000 toneladas em 2011/2012, de acordo com as estimativas da International Cocoa Organization (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2012).

A Bahia, ainda, é o maior produtor de cacau no Brasil, com 64% do total produzido, seguido por Pará (25%), Rondônia (8%) e Espírito Santo (3%) (MARTINI, 2004; LOPES et al., 2011). A produção, área plantada e número de produtores dos estados brasileiros que cultivam cacau podem ser observados na figura 1.

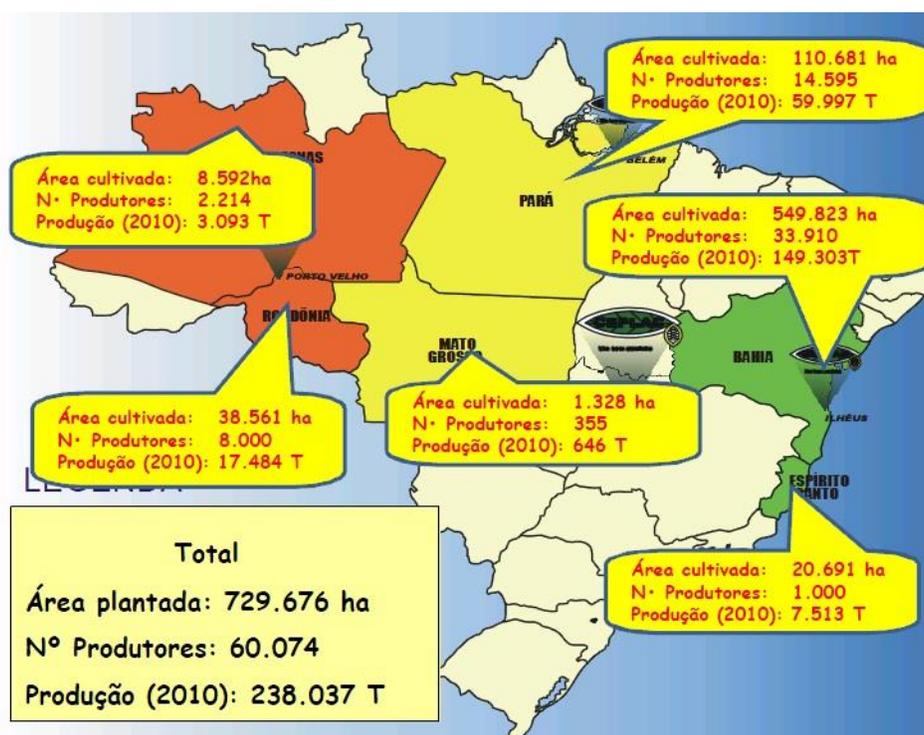


Figura 1 Produção, área plantada e número de produtores

Fonte: (BRASIL, 2011).

De acordo com Brasil (2011), a safra brasileira de maio/2010 a abril/2011 fechou com recebimentos acumulados de 200.964 t, dos quais 153.393 t foram produzidos pelo estado da Bahia e 47.571 t provenientes dos outros estados produtores, o que demonstra a importância da Bahia para a produção nacional de cacau.

A pressão exercida pelas indústrias processadoras aos cacauicultores, em busca da redução de preços, aliada à própria competição dos produtores entre si, leva-os a buscar cacauzeiros que apresentem maior produtividade e resistência às pragas e doenças. No Brasil, mais especificamente na região produtora de cacau da Bahia, a mais importante em nível nacional, a grande devastação dos cultivos pela vassoura-de-bruxa está promovendo mudanças entre os produtores de cacau, que buscam agregar maior valor às amêndoas por meio da produção de material orgânico, com fermentações e secagens especiais e utilização de genótipos de cacauzeiro com sabores/aromas diferenciados (GUITTARD, 2005).

### **2.3 Desenvolvimento de cultivares clonais de cacauzeiro**

De acordo com Pires (2003) apud Efraim (2009), duas linhas básicas têm sido utilizadas, tradicionalmente, no melhoramento do cacauzeiro: seleção de clones e seleção de variedades híbridas. Os primeiros trabalhos de seleção de clones foram conduzidos na cidade de Trinidad, na década de 30, resultando na série ICS. Alguns desses genótipos foram cruzados com clones resistentes à vassoura-de-bruxa: Scavina 6 e 12. A seleção dentro dessas progênies originou a série TSH. A série TSA surgiu do cruzamento de Scavinas com clones Amazônicos (FREEMAN, 1968; BARTLEY, 1994).

O trabalho que vem sendo desenvolvido pelo Centro de Pesquisas de Cacau – CEPEC e pela Comissão Executiva do Plano da lavoura Cacaueira – CEPLAC, na recuperação das lavouras cacaueiras da Bahia, tem como objetivo a obtenção de variedades clonais e de progênies híbridas que apresentem tanto resistência a pragas e doenças como elevada produtividade. Contudo, é importante ressaltar que o fungo causador da vassoura-de-bruxa apresenta elevada variabilidade genética e novas fontes de resistência vêm sendo estudadas

para a ampliação da estabilidade e durabilidade da resistência à doença (SILVA, 2009).

O programa de melhoramento genético do cacauero da forma como vem sendo conduzido no Brasil, certamente resultará no aumento da produtividade de amêndoas de cacau a médio e longo prazo. No entanto, cabe ressaltar a importância da avaliação das características químicas, físicas, físico-químicas e sensoriais, bem como o desempenho tecnológico de produtos finais elaborados baseados em clones desenvolvidos (EFRAIM, 2009).

#### **2.4 O cacauero e suas variedades**

O cacauero é uma árvore equatorial a tropical, frágil, delicada, sensível a extremos climáticos, além de muito vulnerável a pragas e fungos. Para cultivo do cacau, são necessárias chuvas regulares, temperatura média de 25°C, precipitação anual entre 1500 e 2000 mm e solo profundo e fértil. A árvore atinge de 5 a 10 metros de altura e os primeiros frutos são colhidos cerca de 5 anos após a plantação (HERMÈ, 2006).

O tamanho da fruta madura varia entre 15 a 30 centímetros de comprimento, por 8 a 13 de largura, com formato ovalado (Figura 2) e cada fruto contém entre 20 a 40 sementes. O cotilédone e um pequeno gérmen de planta embrionária são recobertos por uma película denominada testa, e a semente é revestida por uma polpa branca com tons rosados, mucilaginosos e adocicada. Na colheita o cacau é aberto, as sementes são separadas, fermentadas e secas. A fruta deve ser tratada imediatamente após a sua colheita para evitar o apodrecimento (BATALHA, 2009; BECKETT, 1994; MARTINI, 2004).

As sementes de cacau, como qualquer material biológico, apresentam variações em suas características físicas, químicas e físico-químicas, dependendo das condições edafoclimáticas, durante a maturação do fruto e,

também, pós-colheita, inclusive, nas etapas de fermentação e secagem (SHRIPAT et al., 1996).



Figura 2 Os frutos do cacauero têm aspectos e cores bem diferentes; podem ser redondos ou alongados, lisos ou com sulcos profundos e até mesmo cobertos de “verrugas”

O cacau é classificado sob três tipos: *Criollo*, *Forastero* e Trinitário (Figura 3). Os frutos de cacau *Criollo* (Figura 3A) são caracterizados pela forma alongada, com ponta proeminente. Sua superfície externa é enrugada e possui cinco sulcos longitudinais profundos e cinco menos pronunciados. As sementes são ovais e se encontram relativamente soltas na polpa. Os cotilédones não contêm células pigmentadas, sendo, portanto, de coloração branca. São encontrados, principalmente, na Venezuela, América Central, México, Java, Ceilão e Samoa (LAJUS, 1982; LOPES, 2000; MATTIETTO, 2001).

O tipo *Forastero* é caracterizado por frutos com forma mais arredondada, casca dura e superfície quase lisa. As sementes são achatadas, de forma quase triangular e se encontram firmemente alojadas à polpa (Figura 3B). Os cotilédones têm coloração violeta por possuírem células pigmentadas (LAJUS, 1982). Em comparação ao cacau *Criollo*, cujo aroma é considerado suave e de excelente qualidade, o cacau do tipo *Forastero* tem um sabor mais ácido e característica adstringente. É encontrado em todos os países produtores

de cacau do mundo. Possui frutos com cerca de 25 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro. Cada fruto contém entre 30 e 50 sementes que são envolvidas por uma mucilagem denominada de polpa, com coloração branca a levemente rosada, sabor doce e ácido. Nos frutos maduros, a placenta se encontra solta entre as sementes (EFRAIM, 2004).

Baseado na associação de caracteres dos grupos anteriores surgiu um terceiro tipo – Trinitário (Figura 3C), cuja designação foi utilizada inicialmente para materiais provenientes de Trinidad, que apresenta cotilédones das sementes com coloração variando de branca a violeta-pálida (PIRES, 2003).

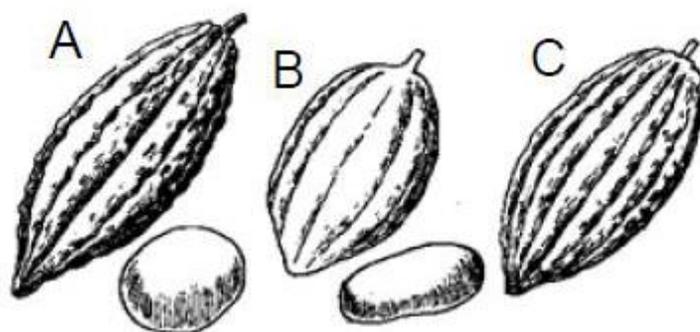


Figura 3 Os tipos de cacau: *Criollo* e a semente oval (A), *Forastero* e a semente achatada (B), Trinitário (C)

Fonte: (SOUZA, 2010).

## 2.5 Pesquisas sobre a influência genética na qualidade do cacau

O genótipo do cacau influencia na qualidade, sabor e intensidade do chocolate. Os três principais tipos de cacau, *Forastero*, *Criollo* e Trinitário, mostram grandes variações de sabor final (COUNET et al., 2004; LUNA et al., 2002.; TAYLOR, 2002; TAYLOR; ROBERTS, 2004).

Em estudo realizado por Zamalloa (1994) apud Efraim (2009), foram avaliadas as características químicas, físico-químicas e sensoriais de genótipos dos tipos *Forastero* e Trinitário cultivados no Estado de São Paulo, em condições climáticas distintas das quais o cacauveiro vem sendo cultivado no mundo em larga escala. Tucci (1997) e Efraim et al. (2006) avaliaram os mesmos genótipos, respectivamente, quanto à composição em ácidos graxos, triacilgliceróis e conteúdo de gordura e os teores de compostos fenólicos. Todos os estudos citados anteriormente encontraram diferenças entre os materiais em relação às características avaliadas.

Efeitos genéticos são considerados determinantes nas diferenças verificadas entre tipos de cacau denominados finos (cacau do Equador do tipo Nacional ou certos tipos de Trinitário e *Criollo*) e tipos denominados “bulk”, cultivados e utilizados comercialmente em maior escala e disponíveis no mercado convencional (FIGUEIRA et al., 1997).

O efeito de variabilidade genética na composição química do cotilédone, também, tem sido alvo de pesquisas. Os conteúdos de flavonoides, cafeína e teobromina, em grãos de cacau, demonstraram que podem afetar o amargor e adstringência do chocolate, e suas quantidades variam entre os clones de cacau (CAMU et al., 2008; CLAPPERTON et al., 1994; NOOR-SOFFALINA et al., 2009).

Sukha et al. (2008) avaliaram o sabor do chocolate produzido com base em sete clones de cacau fermentados e plantados em quatro regiões de Trinidad e Tobago e observaram que o efeito da variabilidade genética em atributos de sabor foi grande, até mesmo maior do que o efeito do meio ambiente.

Segundo Cross (1999), trabalhos que tenham utilizado materiais distintos, submetidos aos mesmos protocolos de fermentação, secagem e torração, ainda, são escassos, o que dificulta a avaliação comparativa entre as variedades de cacau.

## 2.6 O processamento das sementes de cacau

A fabricação do chocolate se inicia com o processamento das sementes de cacau. A cultura do cacau é considerada artesanal, pois necessita de mão-de-obra ao longo de toda a produção. A figura 4 representa o fluxograma das etapas envolvidas no beneficiamento do cacau.

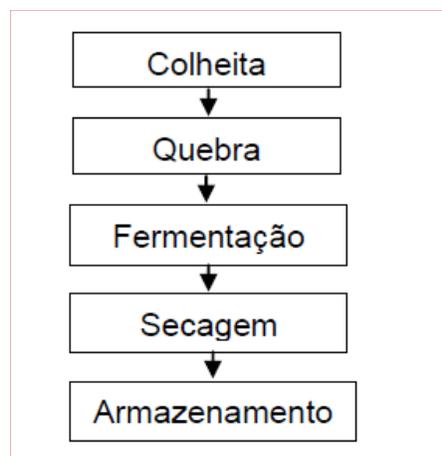


Figura 4 Fluxograma do beneficiamento do cacau

### 2.6.1 Colheita e quebra dos frutos

A colheita do cacau é a fase inicial no beneficiamento. Para fazer um bom chocolate, os frutos devem ser colhidos maduros, pois a colheita influenciará diretamente na fermentação e na qualidade do chocolate. Essa maturação é determinada pela cor e pelo ruído que o fruto faz ao ser levemente sacudido. Com um facão, o fruto é aberto, tomando-se cuidado para não atingir os cachos de sementes, que devem, então, ser debulhadas e selecionadas. O intervalo de tempo para se realizar a quebra dos frutos é em torno de 2 a 3 dias em relação à colheita, pois a separação das sementes da casca é facilitada. Caso

esse tempo seja estendido, acaba por comprometer a qualidade das sementes, ocasionando germinação no interior dos frutos, alterando todo o mecanismo do sabor e aroma do chocolate (SERRA, 2004)

A época de colheita depende das condições climáticas de cada região. No Brasil o cacau é colhido praticamente durante o ano inteiro, distinguindo-se dois períodos de safra: o principal de outubro a janeiro e o secundário de maio a agosto. O cacau colhido no segundo período da safra é conhecido como cacau temporão (CRUZ, 2002).

Após o procedimento de quebra dos frutos, sementes e polpa, são postas para fermentar amontoadas (Gana), em cestos (Nigéria), ou como ocorre na maioria das vezes, em caixas de madeira vazadas no fundo, dependendo do costume local e do tamanho das plantações. As caixas, que podem conter cerca de cem a mil quilos de sementes, são colocadas umas sobre as outras e dispostas em cascata, para que se possa misturá-la mais facilmente. Um hectare de cacaueteiro fornece 400 a 700 kilogramas de cacau (HERMÉ, 2006).

### **2.6.2 Fermentação**

A fermentação é uma etapa essencial para a obtenção de amêndoas de boa qualidade, em razão de complexas reações bioquímicas que provocam a morte do embrião, hidrólise de açúcares e proteínas, liberação de enzimas e substratos, difusão de compostos fenólicos que entram em contato com as enzimas, entre outras (SCHWAN; WHEALS, 2004). O tempo requerido para a fermentação das sementes é variável, segundo o material genético. Para a ocorrência das principais reações que levam à formação dos principais precursores de sabor do chocolate, as sementes de cacaueteiro do grupo *Forastero* (tipo predominante em todo o mundo, inclusive no Brasil), devem ser,

geralmente, fermentadas por períodos superiores a cinco dias (BECKETT, 1994).

A fermentação do cacau é uma mistura de processos microbiológicos externos, caracterizados, principalmente, pela produção de etanol e ácido acético com base em carboidratos e de processos internos autolíticos envolvendo as enzimas da amêndoa. O termo fermentação de cacau implica um processo microbiológico, de ação enzimática e de melhoramento do *flavor* (SCHWAN, 1998; SCHWAN; WHEALS, 2004). É nesta fase que o embrião perde sua viabilidade e várias mudanças na cor e nos constituintes químicos das amêndoas serão operadas. A importância da fermentação na contribuição de um chocolate de qualidade tem sido reconhecida há mais de 90 anos, e diversos estudos e pesquisas têm sido conduzidos em diferentes países a fim de determinar as espécies de microrganismos associadas a este processo (ARDHANA; FLEET, 2003; JESPERSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2005; SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995; SCHWAN; WHEALS, 2004).

Estudos microbiológicos da fermentação do cacau certificam desde o século passado a presença de várias espécies de microrganismos associados ao processo, como leveduras, bactérias do ácido láctico e acético, várias espécies de *Bacillus* e fungos filamentosos (ARDHANA; FLEET, 2003; JESPERSEN et al., 2004; LEHRMAN; PATTERSON, 1983; LOPEZ; MCDONALD, 1982; NIELSEN et al., 2005; ROHAN, 1958; SAMAH et al., 1993; SCHWAN; WHEALS, 2004). Esta diversidade de microrganismos presentes nas amêndoas de cacau provém do ar, do contato direto destas com as mãos e ferramentas dos operários, do contato com outras amêndoas de cacau, do próprio cocho de fermentação, dentre outras fontes.

A ação microbiana durante o processo fermentativo solubiliza o material da polpa que envolve as amêndoas e produz uma cadeia de metabólitos finais, tais como álcoois e ácidos orgânicos, os quais difundem para dentro das

amêndoas causando a morte do embrião. Estas mudanças induzem uma variedade de reações bioquímicas nas amêndoas, o que gera os precursores do *flavor* do chocolate (LEHRMAN; PATTERSON, 1983; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001).

A sucessão microbiana começa quando, em altas concentrações de açúcares, baixo pH e tensão de oxigênio favorecem o crescimento de leveduras que convertem os carboidratos da polpa em etanol, dominando o processo durante 48 horas (ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS, 2004) (Figura 5).

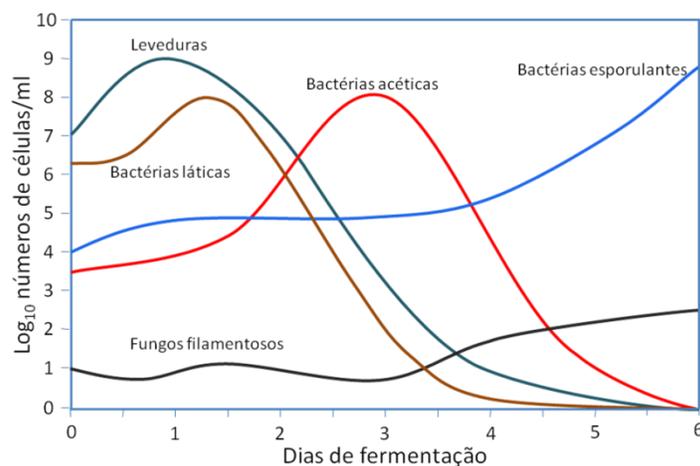


Figura 5 Sucessão microbiana durante período de fermentação de amêndoas de cacau

Fonte: (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Na Figura 6 descrevem-se as reações observadas por Beckett (1994) em sementes de cacau durante sua fermentação.

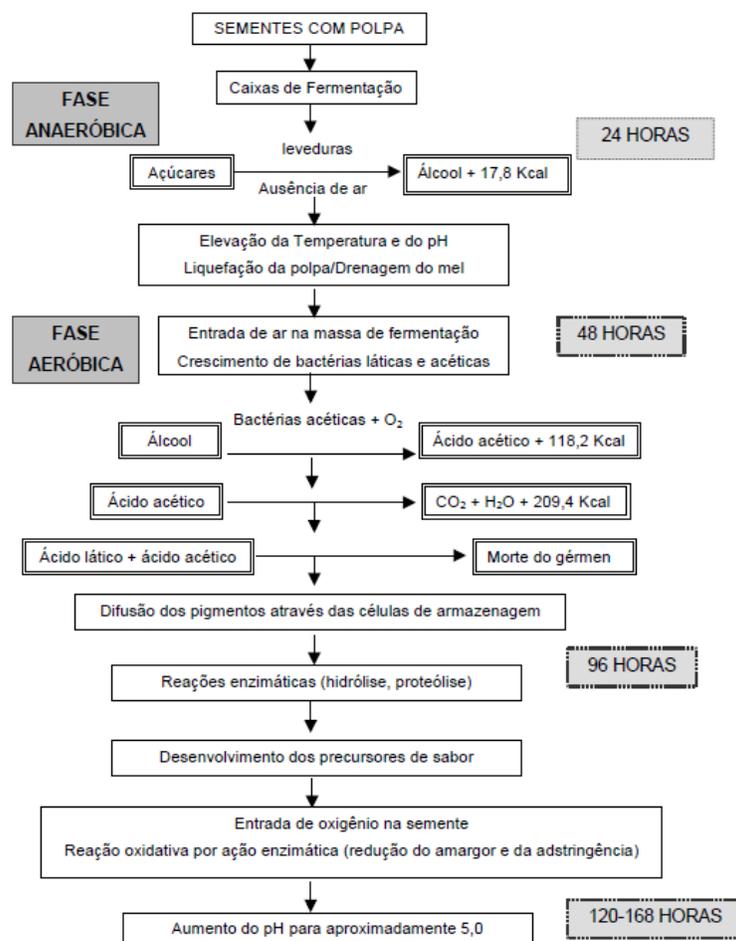


Figura 6 Reações observadas durante a fermentação do cacau  
 Fonte: (LOPEZ; QUESNEL, 1973).

A ampla variedade de condições presentes na fermentação de cacau em respeito à aeração, pH, concentração de etanol e substrato fornece nichos para muitas espécies de leveduras em cada processo fermentativo. Estudos realizados no Brasil identificaram diversas espécies associadas à fermentação do cacau, dentre elas: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida bombi*, *C. diversa*, *C. glabrata*, *C. michaelii*, *C. pelliculosa*, *C. quercitrusa*, *C. rugopelliculosa*, *C. tropicalis*, *C.*

*zemplinina*, *C. sake*, *C. carpophila*, *C. orthopsilosis*, *C. cylindracea*, *C. lactativorus*, *C. humicola*, *C. silvae*, *C. sorboxylosa*, *C. sorbisivorans*, *C. ethanolica*, *C. inconspícua*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides*, *C. humilis*, *C. intermedia*, *C. xylopsoci*, *Kloeckera ohmeri*, *K. corticis*, *K. apiculata*, *K. africana*, *K. apis*, *K. javanica*, *K. wickerhamii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *H. valbyensis*, *H. uvarum*, *Pichia kluyveri*, *P. pijperi*, *P. Mexicana*, *P. burtonii*, *P. anomala*, *P. fermentans*, *P. manshurica*, *P. caribbica*, *P. membranifaciens*, *Issatchenkia occidentalis*, *I. orientalis*, *I. hanoiensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sc. crataegensis*, *Sc. crataegensis*, *Sc. Ludwigii*, *Torulaspota delbreuckii*, *T. pretoriensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluy. thermotolerans*, *Rhodotorula glutinis*, *R. rubra*, *Lodderomyces elongisporus*, *Zygoascus hellenicus*, *Wickerhamomyces sp.*, *Debaromyces etchellsii* e *Yarrowia ipolytica* (DANIEL et al., 2009; DIRCKS, 2009; LAGUNES-GÁLVEZ et al., 2007; NIELSEN et al., 2007; PAPALEXANDRATOU et al., 2011a; PEREIRA et al., 2012; SANCHEZ et al., 1985; SCHWAN, 1998). Na Indonésia, as principais espécies identificadas foram: *Penicillium citrinum*, um basidiomiceto não cultivável, *Kloeckera apis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* (ARDHANA; FLEET, 2003).

Os dois grupos mais importantes de bactérias encontrados na fermentação do cacau constituem de bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético. Das bactérias isoladas da fermentação do cacau, *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus lactis* são as principais espécies encontradas nas primeiras 24 horas de fermentação (SCHWAN; WHEALS, 2004). As bactérias lácticas, também, fermentam os açúcares e utilizam o ácido cítrico da polpa, e seu crescimento é favorecido pela escassez de oxigênio e ligeiras elevações de pH e temperatura. Estas bactérias pertencem a dois grupos, homo e heterofermentativas, apresentando crescimento máximo em torno das 16-48h, considerando o início da fermentação

(ARDHANA; FLEET, 2003; ROELOFSEN, 1958; SCHWAN; WHEALS, 2004). Em geral, *Lactobacillus spp.* estão presentes no início da fermentação enquanto *Lactococcus spp.* aparecem nos estágios finais da fermentação. A principal função de bactérias do ácido láctico para a fermentação do cacau é a produção de ácido láctico e ácido cítrico (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Após a diminuição da população de leveduras e bactérias do ácido láctico ocorre o aumento da aeração dentro da massa fermentativa. Esta condição estimula o desenvolvimento de bactérias do ácido acético. Estas bactérias são responsáveis pela oxidação do etanol a ácido acético e, posteriormente, pela oxidação do ácido acético em água e dióxido de carbono. Esta reação é extremamente exotérmica, elevando a temperatura da massa fermentativa para patamares de 45 a 50°C. A alta temperatura é importante pelo seu efeito nas reações enzimáticas, necessárias para o desenvolvimento do aroma e sabor de chocolate. O ácido acético, ao penetrar nos cotilédones, promove a morte do embrião das amêndoas (48-72h) e, juntamente com o etanol, atuam sinergisticamente, causando a difusão de polifenóis, o que gera amêndoas de cacau bem fermentadas (ARDHANA; FLEET, 2003; NIELSEN et al., 2005; SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995; SCHWAN, 1998). Em geral, membros do gênero *Acetobacter* são mais frequentemente isolados do que *Gluconobacter* (SCHWAN; WHEALS, 2004). As espécies *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* são as mais encontradas.

As fases posteriores de fermentação são associadas ao desenvolvimento de bactérias aeróbias formadoras de esporos do gênero *Bacillus*. Muitos *Bacillus spp.* são termotolerantes e outros crescem bem a temperaturas elevadas. *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus circulans* foram isoladas com base em amêndoas de cacau submetidas à secagem e torrefação (150 °C). Bactérias aeróbias formadoras de esporos produzem uma variedade de compostos químicos em condições de fermentação. Estes contribuem para a

acidez e podem ocasionar sabor desagradável nas amêndoas de cacau. Os ácidos graxos livres C3-C5 desenvolvidos durante a fase aeróbia da fermentação, também, são responsáveis pela produção de sabores não desejáveis em chocolate, e estes são produzidos por *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus megaterium*. Outras substâncias, tais como os ácidos acético e láctico e 2,3-butanodiol, são, também, produzidos por *Bacillus* spp. (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Os efeitos favoráveis da fermentação do cacau são a produção de sabor e aromas típicos de cacau e chocolate, oxidação e condensação de polifenóis adstringentes em compostos solúveis, menos desagradáveis ao paladar, redução na concentração de proteínas que poderiam conferir sabor desagradável na torrefação das amêndoas, e pela redução na concentração de purinas que são muito amargas. Segundo Humphries (1944), entre as vantagens da fermentação estão a conversão do tanino em substâncias escuras, com melhoria do sabor e aroma e o enriquecimento da amêndoa com vitamina D. Como desvantagens são enumerados a perda de matéria seca; perda de gordura; e a perda de proteínas e açúcares solúveis e sais minerais. O desenvolvimento do *flavor*, característico do cacau e chocolate, é função do tempo que o embrião demanda para morrer e que os polifenóis são liberados de seus compartimentos celulares (ROHAN, 1958).

O cacau brasileiro tem apresentado uma acidez elevada, atribuída por Lopez e Mcdonald (1982), à insuficiência de aeração. Schwan, Rose e Board (1995) investigaram o efeito da frequência e do número de revolvimentos sobre a fermentação e a qualidade do produto final brasileiro e confirmaram os estudos de Lopez e Mcdonald (1982), sugerindo revolvimentos frequentes da massa fermentativa, a cada 12 horas, durante os sete dias do processo, gerando uma fermentação mais rápida (120 horas) das amêndoas com melhores características organolépticas e de acidez aceitável.

### 2.6.3 Secagem

A etapa de secagem deve ser iniciada logo após a fermentação. Na fase de desidratação, o cacau é espalhado ao sol e revolvido regularmente para manter as sementes arejadas e não permitir o crescimento de fungos filamentosos. A desidratação natural, ao sol, propicia um cacau de excelente qualidade. As sementes são expostas ao sol, espalhadas sobre barcaças, áreas cimentadas ou lonas, sendo frequentemente revolvidas com um rodo de madeira para que a secagem seja homogênea. Alguns secadores possuem tetos móveis que permitem cobrir o cacau em caso de chuva e ao anoitecer. Nas regiões mais úmidas (como Amazônia, México, Malásia e Indonésia, onde os cacauzeiros podem ficar com a parte inferior do caule na água), as amêndoas são postas em secadores artificiais de ar quente, e o processo dura de 24 a 28 horas. Qualquer que seja o modo de secagem adotado, ele deve ser suficiente para reduzir a taxa de umidade das sementes de 60% para 7%, para que possam ser armazenadas e não estraguem durante o transporte (LIMA et al., 2008).

Considera-se como fator essencial, durante a secagem, a velocidade de remoção da água. Uma secagem rápida ocasiona perda de umidade na superfície da amêndoa, deixando o interior úmido e depreciando o produto, em razão do aparecimento de fungos internos durante o período de armazenamento. Apenas 3% de amêndoas contaminadas já proporcionam sabor desagradável ao *liquor* ou massa de cacau, impossível de ser eliminado em processos posteriores. No caso da secagem excessiva, ocorre perda de peso, tornando as sementes quebradiças (SOARES, 2001; EFRAIM et al., 2006).

A secagem, também, desempenha um papel importante no aroma e no sabor do cacau. Durante esta etapa, as enzimas atuam no interior da amêndoa e promovem reações químicas estabilizando o sabor e a cor característicos do chocolate, com acidez reduzida. A temperatura da secagem é importante na

qualidade final das amêndoas. O ideal está na faixa de 35 a 40 °C, considerada temperatura ótima para as enzimas. O uso de temperaturas mais baixas ou mais altas leva à perda na qualidade, pois as enzimas agem mais lentamente ou são destruídas. Além disso, a secagem tem que durar tempo suficiente para que ocorra a ação enzimática e o período ótimo é de 4 a 5 dias (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

#### **2.6.4 Armazenamento**

A etapa de armazenamento é realizada em instalações com luminosidade e aeração adequadas (SERRA, 2004). Em locais onde a umidade relativa do ar é muito alta, como é o caso da região cacauceira da Bahia, no inverno, ainda que o cacau esteja bem seco (6% umidade), este rapidamente absorve umidade do ar até alcançar o ponto de equilíbrio com o ambiente. Nessas condições, a umidade das amêndoas ultrapassa o limite de 8%, ponto crítico onde fungos filamentosos começam a se desenvolver. Recomenda-se o armazenamento do cacau acondicionado em sacos de polietileno ou cobrindo totalmente as pilhas de saco de juta com lonas plásticas.

#### **2.7 Identificação e função de leveduras associadas à fermentação de cacau**

As leveduras são consideradas os agentes principais da fermentação do cacau em decorrência das seguintes funções: quebra do ácido cítrico da polpa, que leva a um aumento no pH de 3,5 a 4,2, possibilitando o crescimento de bactérias; produção de etanol sob condições de baixo teor de oxigênio e altas concentrações de açúcares, os quais são consumidos oxidativamente; produção de ácidos orgânicos (oxálico, fosfórico, succínico, málico e ácido acético), os quais penetram nas sementes e causam a morte do embrião; produção de alguns

compostos orgânicos voláteis que contribuem para o *flavor* do chocolate; e por fim, pela secreção de pectinases, que reduzem a viscosidade da polpa, levando a uma maior aeração da massa fermentativa (SCHWAN, 1998; SCHWAN; WHEALS, 2004).

As leveduras utilizam diversos carboidratos como fonte de carbono e, logo, suas características fisiológicas e bioquímicas podem ser avaliadas, de acordo com testes de assimilação de açúcares e fermentação (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Em virtude de sua ampla distribuição, em diversos ambientes, várias metodologias seletivas têm sido desenvolvidas para sua identificação, empregando meios de cultura que permitem seu crescimento e que, porém inibem o crescimento de outros fungos e bactérias.

Durante muitos anos, as técnicas de identificação e classificação de leveduras mais empregadas foram aquelas baseadas em características morfológicas e fisiológicas, denominadas técnicas tradicionais. Desta forma, são avaliadas as estruturas físicas, as características celulares, a formação de esporos, as formas de reprodução e apresentação das colônias em meios de cultura dos organismos testados (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Entretanto, os procedimentos taxonômicos convencionais, para classificar microrganismos são, ainda, muito lentos, exigem muito trabalho e não são, absolutamente, conclusivos (BERNARDI et al., 2008).

Atualmente, uma variedade de procedimentos laboratoriais pode ser utilizada na classificação taxonômica e na identificação de espécies microbianas. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) é uma técnica físico-química robusta para a análise de moléculas orgânicas e tem sido utilizada como uma abordagem fenotípica para a identificação rápida de microrganismos (SANTOS et al., 2010). Neste caso, o interesse em questão é a análise das células intactas, onde o espectro gerado é interpretado como um fingerprint celular. Esta abordagem é

designada por MALDI-TOF IC (Intact Cell) MS. Esta técnica tem dado uma grande contribuição para o conhecimento científico acerca da identificação de microrganismos e já tem sido utilizada como uma ferramenta eficaz para testes rápidos de análises clínicas, alimentar e ambiental (LIMA et al., 2008; PEREIRA et al., 2010).

Métodos moleculares, também, vêm sendo cada vez mais usados como importante ferramenta de identificação de leveduras. O rDNA é muito empregado em estudos taxonômicos de leveduras, em razão da presença de regiões codificadoras e não codificadoras, que evoluem em diferentes taxas e, também, pelo fato de estar presente em todos os organismos, com base em uma origem evolutiva comum.

Grandes progressos na taxonomia de leveduras vêm ocorrendo, em função do emprego de técnicas moleculares, que fornecem informações essenciais sobre a composição química da parede celular e sequências de ácidos nucleicos e proteínas (MEYER, 1991), o que tem resultado na descoberta de novas espécies e rearranjos de gêneros e espécies já conhecidas.

## **2.8 Identificação e função de bactérias associadas à fermentação de cacau**

Testes bioquímicos, nutricionais e fisiológicos são usados na taxonomia de bactérias desde a década de 20 (BUSSE; DENNER; LUBITZ, 1996). Esses métodos têm a capacidade de testar a utilização de diferentes fontes de carboidrato e a presença de determinadas enzimas. Até há alguns anos, a identificação bacteriana baseava-se somente nessas características e, como consequência, organismos não relacionados filogeneticamente podiam apresentar características semelhantes se ocupassem o mesmo ambiente.

Kirchoff et al. (1997) admitiram que a identificação de novos isolados torna-se difícil se for baseada em critérios puramente fenotípicos e fisiológicos

e, principalmente, se as características mostradas por um isolado em particular não são completamente idênticas às espécies já descritas. Por esse motivo, tem se recomendado uma abordagem polifásica para a identificação de bactérias. Isso inclui informação fenotípica, genotípica e filogenética (VANDAMME et al., 1996).

A utilização de MALDI-TOF é considerada revolucionária na identificação de microorganismos e tem apresentado grande aplicação, sendo amplamente utilizada na Europa e nos Estados Unidos. Esta metodologia apresenta inúmeras vantagens, como o baixo custo, necessita de quantidades muito pequenas de material biológico e pode ser aplicada em larga escala (SENG; DRANCOURT; GOURIET, 2009; CHERKAOUI; HIBBS; EMONET, 2010).

Um dos desafios da sistemática tem sido estabelecer uma classificação que reflita a filogenia dos organismos. Nesse contexto, surge a possibilidade de se usar marcadores moleculares que reflitam a sua origem evolutiva e auxiliem na sua classificação. O marco principal do uso de marcadores moleculares se iniciou com a utilização do gene rRNA 16S na filogenia de bactérias (WOESE, 1987). As sequências de rRNA contêm domínios altamente conservados, intercalados com regiões variáveis e a comparação de sequência de rRNA é uma ferramenta importante para deduzir relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos (WEISBURG; GIOVANNONI; WOESE, 1999).

O papel de algumas bactérias na fermentação do cacau, ainda, não foi completamente estabelecido, mas é possível atribuir claramente as mudanças químicas que ocorrem na polpa às leveduras, bactérias lácticas e acéticas. Verifica-se que várias espécies de microorganismos têm sido identificadas e envolvidas com a fermentação de cacau, porém nem todas são verdadeiramente essenciais para o processo (SCHWAN, 1998).

## 2.9 Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Grande parte dos microrganismos presentes em ambientes e processos não pode ser identificada por métodos de cultivo. Nesse âmbito, desenvolveram-se métodos moleculares e bioquímicos mais sensíveis, que tem permitido interpretar mais facilmente a diversidade genética e funcional dos microrganismos em alimentos (ERCOLINI, 2004). As técnicas moleculares, como a PCR-DGGE, são capazes de analisar amostras complexas (mistas) sem a necessidade de multiplicação prévia das células, o que tem contribuído para o avanço dos estudos de ecologia microbiana em diversos ambientes (CAMU et al., 2007; CHEN; WANG; CHEN, 2008; NIELSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2007; NIELSEN; SNITKJAER; VAN DEN BERG, 2008; MAGALHÃES et al.; 2010; RAMOS et al., 2010).

Para que o DGGE aconteça, é extremamente necessário que o DNA seja extraído de uma amostra complexa. Sucessivamente, esta amostra é usada como produto para ampliações por PCR de regiões variáveis de DNA de interesse taxonômico (como a região 26S), obtendo um produto que é a amplificação das espécies presentes, todos estes de mesmo tamanho, mas com sequências diferentes e que podem ser separados pelo DGGE (ERCOLINI, 2004; KIM et al., 2009).

O resultado final é um perfil de bandas que é específico da amostra analisada e que contém uma série de bandas relativas às espécies microbianas presentes na amostra. A identificação destas espécies pode ser obtida pela purificação e sequenciamento das bandas geradas pelo DGGE ou, ainda, como uma alternativa ao sequenciamento pode ser construído um marcador molecular (*ladder*), usando os amplificados dos genes marcadores das espécies isoladas, representativamente. Esta identificação é realizada pela comparação da distância

de migração dos amplificados no gel de DGGE com aquelas linhagens presentes na identificação *ladder* (ERCOLINI, 2004).

A PCR-DGGE é reconhecida como uma boa ferramenta e utilizada em muitos laboratórios que estudam ecologia microbiana. Esta técnica é bastante versátil e tem sido utilizada para estudar estrutura e evolução de diversas comunidades microbianas (ERCOLINI, 2004); comunidades complexas como biofilmes bacterianos; para avaliar a distribuição sazonal e de populações ao longo de um processo (VAN BEEK; PRIEST, 2002); diferenças entre bactérias habitadas no trato gastrintestinal de animais e humanos; e mais recentemente, na microbiologia de alimentos, no estudo da sucessão de espécies microbianas envolvidas na fermentação de alguns frutos, como o cacau (CAMU et al., 2007; ERCOLINI, 2004; NIELSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2007; NIELSEN; SNITKJAER; VAN DEN BERG, 2008).

Dentro deste propósito, a técnica molecular PCR-DGGE oferece uma alternativa eficaz para examinar a composição microbiana de fermentações espontâneas de cacau, oferecendo a possibilidade de examinar um grande número de amostras de uma só vez, em um tempo relativamente curto, aumentando a compreensão da dinâmica microbiana durante todo o processo, podendo, ainda, revelar a grande complexidade microbiana que envolve a fermentação de amêndoas de cacau, dando um importante passo para o desenvolvimento de medidas de controle de qualidade para a produção de cacau fino, de alta qualidade (ARDHANA; FLEET, 2003; NIELSEN et al., 2005).

## **2.10 Métodos de avaliação sensorial: Dominância Temporal de Sensações (TDS)**

A demanda por chocolates de alta qualidade tem aumentado nos últimos anos e os consumidores estão a cada dia se tornando mais exigentes e buscando novidades e sabores diferenciados. A procura por chocolates mais amargos, saudáveis, orgânicos, de origem está crescendo de forma que a qualidade das amêndoas de cacau é vista como pré-requisito de grande importância para a obtenção e comercialização desses novos tipos de chocolates com atributos diferenciados (THORTON, 2007).

A análise sensorial é um campo muito importante na indústria de alimentos, pois contribui direta ou indiretamente para inúmeras atividades, como desenvolvimento de novos produtos, controle de qualidade, reformulação e redução de custos na produção, relações entre condições de processo, ingredientes, aspectos analíticos e sensoriais. (PAL; SACHDEVA; SINGH, 1985).

Produtos alimentícios processados estão se tornando cada vez mais complexos e suas propriedades organolépticas podem mudar durante o consumo. A utilização de métodos sensoriais dinâmicos, tais como Dominância Temporal de Sensações (TDS), tem se mostrado útil para o estudo das percepções do consumidor em relação a um determinado produto ao longo do tempo. Com este método descritivo sensorial, os usuários avaliam quais sensações são dominantes e marcam sua intensidade ao longo do tempo até que a sensação termine ou outra apareça como dominante (LABBE et al., 2009). Investigar a qualidade do painel e, portanto, os dados são essenciais para avaliar a confiabilidade dos resultados e sua interpretação.

TDS foi desenvolvido a partir de 1999 no Centro de “Européen des Sciences du Goût” em Dijon, na França. Pesquisadores têm utilizado a

metodologia TDS para estudar a percepção de algumas bebidas, como vinhos (MEILLON et al., 2010), bebidas quentes (LE RÉVÉREND et al., 2008), produtos lácteos líquidos (Pineau et al., 2009) e alimentos sólidos, como flocos de trigo e chocolate (LENFANT et al., 2009).

Embora a análise da percepção de alimentos seja um processo complexo, por si só, alguns tipos de alimentos têm estruturas complexas que tornam este processo ainda mais árduo. Assim, a avaliação destes produtos por meio de técnicas sensoriais dinâmicas pode facilitar a compreensão destas percepções.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material analisado

Amêndoas de cacau maduras do clone PH16, provenientes da Fazenda Vale do Juliana (Igrapiúna – BA), foram colhidas durante os meses de Abril e Maio de 2011. O processo fermentativo foi conduzido na Fazenda Vale do Juliana e as análises subsequentes no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras. As amostras foram coletadas a cada 12 horas, por um período de 156 horas de fermentação e conduzidas até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras devidamente armazenadas a 4 °C.

#### 3.2 Fermentação

A fermentação do clone de cacau PH 16 foi realizada em caixas de madeira de 0,06 m<sup>3</sup> em quantidade de, aproximadamente, 50 kg. Amêndoas do clone PH 16 foram fermentadas na caixa 1 e amêndoas do clone PH 16 com adição dos inóculos *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CHYC 7.04 (10<sup>5</sup> células/ml água) e *Lactobacillus fermentum* UFLA CHBB 8.12 (10<sup>4</sup> células/ml água), foram fermentadas na caixa 2. Os inóculos foram diluídos em 500 mL de água e borrifados sob as amêndoas no início da fermentação. As cepas utilizadas como culturas iniciadoras foram inoculadas no início do processo fermentativo. Estas foram isoladas da fermentação de cacau e avaliadas quanto ao seu potencial como cultura iniciadora em estudos anteriores (PEREIRA et al., 2012). Durante o período de fermentação, a temperatura e o pH do mosto foram avaliados com auxílio de um termostato manual e um pHmetro digital, respectivamente.

### 3.3 Análises microbiológicas

As amêndoas de cacau foram coletadas assepticamente a cada 12 horas de fermentação para análises microbiológicas. Aproximadamente 15 amêndoas foram adicionadas em saco plástico, contendo 135 mL de água peptonada 0,1%, homogeneizadas por 10 min em stomacher (Mayo Homogenius HG 400, São Paulo, Brasil) e diluídas em série até a diluição de  $10^5$ . O plaqueamento foi realizado nos seguintes meios de cultura:

- a) A contagem de leveduras foi realizada, utilizando o meio YEPG (10 g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona de soja, 20 g/L de glicose e 13 g/L ágar) adicionado de cloranfenicol 0,01% (m/v) para inibir o crescimento bacteriano;
- b) O isolamento de bactérias do ácido láctico (BAL) foi realizado, utilizando o meio MRS (Man Rogosa Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha), contendo 0,4 % (v/v) de nistatina (Merck), para inibir o crescimento de leveduras;
- c) A contagem de bactérias do ácido acético (BAA) foi realizada, utilizando o meio GYC (50 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 30 g/l de carbonato de cálcio e 20 g/L de Agar, pH = 5,6), suplementado com 0,4 % de nistatina para inibir o crescimento de leveduras;
- d) O isolamento de bactérias mesofílicas totais e *Bacillus* spp foi realizado, utilizando o meio ágar nutriente (AN) (3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona de soja e 13 g/L de ágar) adicionado de 0,4% de nistatina para inibir o crescimento de leveduras.

O plaqueamento foi realizado em superfície para os meios de cultura ágar nutriente, YEPG e GYC e em profundidade para o meio de cultura MRS. As placas de ágar nutriente e MRS foram incubadas a 35 °C, durante 3-4 dias e as placas de GYC e YEPG a 28 °C durante 3-4 dias. Após o período de incubação, foi calculado o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e o cálculo do desvio-padrão foi realizado utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007. A caracterização morfológica foi realizada com observação dos seguintes parâmetros: tamanho da colônia, tipo e estrutura de borda, cor, textura, aparência, elevação, brilho e formato.

O número de isolados identificados foi determinado pelo cálculo da raiz quadrada do número total de isolados do mesmo morfotipo ('Bacteriological Manual for Foods' - FDA, 1972). Os isolados foram purificados, por meio de sucessivas repicagens nos mesmos meios de cultura onde foram isolados, com exceção dos isolados do meio GYC que foram repicados em YEPG.

Após certificação da pureza, os isolados foram transferidos para criotubos, contendo caldo nutriente, MRS e YEPG líquidos e incubados por 24 h. Após crescimento microbiano, foi adicionado glicerol na concentração final de 20% para armazenamento em freezer a -80°C e preservação dos mesmos.

### **3.4 Agrupamento dos isolados por meio de suas características morfológicas e bioquímicas**

Todas as colônias foram classificadas de acordo com as características macroscópicas e microscópicas. Os isolados bacterianos foram caracterizados morfolologicamente e agrupados por meio de testes de coloração de gram, KOH, reação de catalase, teste de motilidade, esporulação, oxidase e teste de fermentação com diferentes fontes de carbono (HOLT et al., 1994).

Os isolados leveduriformes foram caracterizados por determinação da sua morfologia, formação de esporos e agrupados por teste fermentativo com diferentes fontes de carbono de acordo com o método de Kurtzman, Fell e Boekhout (2011)

#### **3.4.1 Caracterização de leveduras**

Os isolados foram caracterizados morfológica e bioquimicamente, por meio do teste de fermentação, utilizando como fontes de carbono: glicose, frutose e sacarose. Foram analisados os seguintes aspectos: fermentação, crescimento celular, formação de anel, película e produção de ácido, durante um período de 21 dias.

#### **3.4.2 Caracterização de bactérias do ácido láctico (BAL)**

Os testes utilizados para isolados crescidos em meio MRS foram: coloração de gram, oxidase, catalase, esporulação, motilidade, teste fermentativo, utilizando glicose como fonte de carbono (diferenciar bactérias homo e heterofermentativas) e teste de fermentação em diferentes fontes de carbono tais como: maltose, manitol e sorbitol.

#### **3.4.3 Caracterização de bactérias do ácido acético (BAA)**

Os testes utilizados para caracterização de bactérias do ácido acético foram: coloração de gram, teste confirmativo de KOH 3%, oxidase, catalase, esporulação e motilidade (DE LEY; GILLIS; SWINGS, 1984; DRYSDALE; FLEET, 1988). As BAA gram negativas, oxidase negativa foram agrupadas por

meio dos kits Bactray I e II, e as BAA gram negativas, oxidase positiva, pelo kit Bactray III.

#### **3.4.4 Caracterização de *Bacillus* spp.**

Os isolados crescidos em meio ágar nutriente foram submetidos aos seguintes testes: coloração de gram, reação de catalase, oxidase, teste de motilidade e esporulação.

Todos os isolados foram submetidos ao programa SensoMaker (NUNES; PINHEIRO, 2012) para agrupamento por meio das suas características bioquímicas.

#### **3.5 Identificações das espécies microbianas por método dependente de cultivo (MALDI-TOF)**

Um total de 179 isolados foi identificado usando o sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™).

A cepa *Escherichia coli* K12 foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS seguindo metodologia descrita por Lima-Neto et al. (2014). As células foram cultivadas em meio ágar Luria-Bertani (LB) e incubadas a 35°C, durante 18h.

##### **3.5.1 Análise proteica das células bacterianas**

Uma colônia de bactéria crescida em até 18h foi transferida para um eppendorf, contendo 6 µL da solução orgânica (água/acetoneitrila/ácido trifluoroacético [50:47.5:2.5]) e homogeneizada em vórtex por 1 min. Em

seguida, 0,5 µl desta suspensão foi transferida para a placa aço inox do MALDI, e adicionado 1 µL da solução matriz de MALDI (75 mg/ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético). Essa mistura foi seca ao ar à temperatura ambiente e a análise foi realizada em um sistema Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), em triplicata para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. Por fim, os espectros no intervalo de massa  $m/z = 2000$  a  $20000$  Da foram obtidos e analisados no software Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics) (LIMA-NETO et al., 2014).

### 3.5.2 Análise proteica das células leveduriformes

Uma colônia de levedura crescida em até 18h foi transferida para um eppendorf contendo 6 µL da ácido fórmico/acetonitrila (25:75) e homogeneizada em vórtex por 1 min. Os procedimentos seguintes foram os mesmos mencionados anteriormente para análise de células bacterianas.

Após a aquisição dos resultados, os espectrogramas foram agrupados, estatisticamente, por meio do coeficiente de correlação de Pearson e do algoritmo UPGMA (PARKOUDA et al., 2010).

Os espectros obtidos foram comparados com espectros de cepas referências da coleção de cultura do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da Universidade Federal de Lavras. As cepas utilizadas como referência foram: *Candida orthopsilosis* (UFLA YCH 159), *Hanseniaspora uvarum* (UFLA YCH 202), *Hanseniaspora opuntiae* (UFLA YCH 292), *Pichia kluyveri* (UFLA YCH 192), *Pichia guilliermondii* (UFLA YCH 155), *Rodothorola mucilaginoso* (UFLA YCH 152), *Pichia carribica* (UFLA YCH 125), *Lactobacillus plantarum* (UFLA BCH 309), *Lactobacillus fermentum* (UFLA BCH 59), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (UFLA BCH 210),

*Acetobacter pasteurianus* (UFLA BCH 983), *Acetobacter aceti* (UFLA BCH 1063) e *Gluconobacter oxydans* (UFLA BCH 178).

### **3.6 Identificações das espécies microbianas por métodos independentes de cultivo**

Três amêndoas de cacau foram adicionadas em 10 mL água ultrapura, homogeneizadas por 10 min. e centrifugadas para obtenção de um pellet, onde 0,5 mg de cada uma das amostras (0, 12, 36, 60, 84, 108, 132 e 156 horas de fermentação) foram utilizadas para a extração de DNA total com base na polpa de cacau. A extração foi realizada, utilizando-se o kit 'DNA Purification from Tissues' (Qiaamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as instruções contidas no manual do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi observada em gel de agarose 1%.

#### **3.6.1 Amplificação de fragmentos dos genes rRNA 16S e 26S**

Primers universais para procarioto e eucarioto foram utilizados para a amplificação de fragmentos dos genes 16S e 26S rRNA, respectivamente. A região V3 do gene 16S rRNA foi amplificada com o par de primer 338fGC/518r (OVREAS et al., 1997). A amplificação do fragmento da região D-1 do gene 26S rDNA foi feita utilizando o par de primer NL1GC/LS2 (COCOLIN; BISSON; MILLS, 2000). A PCR foi realizada em um volume de reação final de 25 µL, contendo 12,5 µL de Mix Taq, 1 µL de cada primer, 7,5 µL de água e 3 µL de DNA. A amplificação foi realizada de acordo com Ramos et al. (2010) com pequenas modificações. Alíquotas (3 ul) do produto amplificado foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizadas em

transiluminador UV, para certificar a qualidade do produto da PCR antes de serem utilizadas para análises de PCR-DGGE.

### **3.6.2 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)**

A eletroforese em gel com gradiente de desnaturação foi realizada utilizando o aparelho DCode System (Bio-Rad, Hercules, EUA) . Para migração dos amplicons foi utilizado gel de poliacrilamida 8% (m/v) em TAE 0.5 x com gradiente desnaturante (7M ureia e 40% (v/v) de formamida) nas concentrações de 40% a 60% para comunidade procariótica e 30 a 60% para comunidade eucariótica. A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 160 V e temperatura constante de 60 °C, por 5 horas. O gel foi corado com SYBR-Green, visualizado em transiluminador UV e as bandas obtidas foram excisadas e colocadas em água ultrapura para reamplificação do DNA e sequenciamento.

A reamplificação do DNA das bandas foi realizada, utilizando uma PCR com um volume total de 50 µL, contendo 25 µL de Mix Taq, 2 µL de cada primer, 11 µL de água e 10 µL de DNA template. Os pares de primers universais utilizados foram 338fGC/518r e NL1GC/LS2 para bactérias e leveduras, respectivamente. Alíquotas (5µl) do produto amplificado, adicionadas de 1.5 µL de SYBR-Green e 1.5 µL de azul de bromofenol foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, a uma voltagem de 70 V por 20 minutos e o gel visualizado em transiluminador UV. Os produtos de PCR foram sequenciados pela Advanced Genetic Technologies Center (AGTC) e as seqüências obtidas alinhadas com o banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST (National Centre for Biotechnology Information, Maryland, USA).

### 3.7 Extração de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos

Carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos foram extraídos como descrito por Rodriguez-Campos et al. (2012) com modificações. Nos tempos de fermentação 0, 12, 36, 60, 84, 108, 132 e 156 horas, os compostos (açúcares, ácidos e álcoois) foram avaliados na polpa e no interior das amêndoas, para investigar as características fermentativas do processo.

Três amêndoas de cacau foram transferidas para tubos falcon de 50 mL adicionados de 10 mL de água ultrapura. Os tubos foram homogeneizados em um vórtex (2500 rpm) por 5 minutos, para que a polpa se desprendesse das amêndoas. A polpa diluída foi transferida para novo tubo e mais 10 mL de água ultrapura foi adicionada ao tubo falcon, que, novamente, foi homogeneizado em vórtex nas mesmas condições. A polpa diluída foi adicionada ao conteúdo da primeira etapa, tendo um volume final de, aproximadamente, 20 mL de polpa diluída. O tubo falcon contendo 20 mL de polpa diluída foi, então, centrifugado (7000 rpm, 10 min, 4°C) para que o precipitado e o sobrenadante fossem separados.

O sobrenadante foi filtrado em membrana ultrafiltrante (millipore) de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$  para detecção e quantificação de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Três amêndoas foram descascadas e trituradas de forma manual e, posteriormente, transferidas para um tubo falcon de 50 mL, adicionado de 10 mL de água ultrapura. As etapas seguintes foram as mesmas apresentadas anteriormente para a extração da polpa. O sobrenadante obtido, baseado na extração, foi filtrado em membrana ultrafiltrante (millipore) de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$  e, em seguida, destinado para análises por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência), para quantificação de açúcares, ácidos e álcoois das amêndoas.

### 3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Carboidratos (glicose e frutose), ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido láctico e ácido acético) e o álcool (etanol) foram analisados, utilizando um cromatógrafo de fase líquida Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japão), equipado com os detectores de índice de refração (modelo RID-10<sup>a</sup>) e de ultravioleta (modelo SPD-10Ai). A coluna utilizada foi de troca catiônica (poliestireno divinil-benzeno), Shim-pack SCR-101H (7,9 mm x 30 cm) (Shimadzu). As amostras (2 mL) microfiltradas foram injetadas diretamente na coluna cromatográfica.

Para a detecção e quantificação de carboidratos e álcool, a coluna operou a uma temperatura de 30 °C, tendo como fase móvel o ácido perclórico (pH 2,1) a um fluxo de 0,6 mL/min e os compostos foram detectados por meio do detector de índice de refração. Na determinação dos ácidos orgânicos, a coluna operou a uma temperatura de 50 °C e a fase móvel utilizada foi o ácido perclórico (pH 2,1) a um fluxo de 0,6 mL/min, sendo utilizado o detector de ultravioleta, com comprimento de onda de 210 nm (MIGUEL et al., 2012).

As amostras foram analisadas em duplicata nos tempos 0h, 12h, 36h, 60h, 84h, 108h, 132h e 156h de fermentação. Os compostos foram identificados com base no tempo de retenção dos padrões injetados utilizando as mesmas condições. A quantificação dos compostos foi realizada, utilizando as curvas de calibração, construídas com injeções (nas mesmas condições das amostras) de diferentes concentrações de compostos padrão.

### 3.9 Extração dos compostos voláteis das amêndoas

A determinação dos compostos voláteis presentes nas amêndoas de cacau fermentadas foi realizada por meio de Cromatografia Gasosa por

Microextração em Fase Sólida (GC – SPME). As amostras foram avaliadas no início e ao final de cada fermentação. A testa das amêndoas foi retirada e, posteriormente, 2 g das amêndoas foram pesadas e masseradas em nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se o masserado obtido em tubos head space, aquecendo-o, durante 15 minutos, a 60°C. Após o aquecimento, a fibra foi exposta sobre a amostra e deixada por mais 30 minutos a 60°C. Posteriormente, a fibra foi recolhida e injetada no cromatógrafo gasoso, para determinação e quantificação de compostos voláteis, segundo metodologia descrita por Duarte et al. (2010).

### **3.10 Cromatografia Gasosa (GC)**

O extrato contendo os compostos voláteis foi analisado em um cromatógrafo a gás, modelo Shimadzu GC 17A, equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica DB Wax (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm) (J & W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA). O programa de temperaturas iniciou com 5 minutos a 50°C, seguido de um gradiente de 50°C a 190°C a 3°C/min, e a temperatura foi, então, mantida a 190°C durante 10 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 230°C e 240°C, respectivamente. O gás de arraste (N<sub>2</sub>) foi utilizado a uma taxa de fluxo de 1,2 mL/min e injeções de 1 mL foram feitas no modo split (1:10). Os compostos voláteis foram identificados por comparação do tempo de retenção dos compostos com o dos compostos padrão injetados sob as mesmas condições (DUARTE et al., 2010). A porcentagem relativa de cada composto foi calculada baseada na área total do volátil sobre os cromatogramas (PETISCA et al., 2013).

### **3.11 Análise sensorial dos chocolates**

As amêndoas fermentadas e secas foram processadas pela empresa Sartori e Pedroso Alimentos Ltda. (São Roque – São Paulo) para obtenção do *liquor* de cada fermentação (figura 7); e chocolates do tipo amargo foram produzidos pelo método convencional, seguindo as etapas de mistura dos ingredientes, refino, conchagem (29 h, 80°C), temperagem, moldagem, resfriamento, desmoldagem e embalagem (EFRAIM, 2009).

#### **3.11.1 Seleção de provadores**

Foram recrutados 30 consumidores de chocolate interessados em participar das análises, com tempo disponível e sem restrições quanto ao consumo do produto.

O método sequencial de Wald, proposto por Amerine, Pangborn e Roessler (1965), foi utilizado para selecionar provadores com uma boa capacidade de discriminar as amostras (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). Para tanto, foram realizados testes triangulares utilizando-se duas amostras de chocolate: chocolate 53% de cacau Harald Melken Unique Brasil® e chocolate 63% de cacau Harald Melken Unique Brasil®, as quais apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de significância em um teste triangular previamente realizado, com 50 consumidores, para a definição destas amostras. Os testes foram conduzidos no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em cabines individuais, com utilização de luz vermelha. As amostras de chocolate (5g), no formato de pastilhas circulares, foram servidas em copos plásticos codificados com três dígitos e em ordem balanceada segundo Macfie et al.

(1989). Os provadores foram orientados a provar as amostras da esquerda para direita e identificar a amostra diferente.

Com base nos parâmetros definidos ( $p = 0,30$ ,  $p1 = 0,70$ ,  $\alpha = 0,10$  e  $\beta = 0,10$ ), o gráfico de Wald foi construído e os provadores foram selecionados ou rejeitados de acordo com o número de testes corretos em um número total de testes realizados (SOUZA et al., 2011).

Com oito testes triangulares, foram selecionados 20 provadores, com idades entre 18 e 25 anos.

### **3.11.2 Treinamento dos provadores**

Para o treinamento dos provadores quanto à temporalidade das sensações e para nova seleção dos provadores com melhor desempenho, foram conduzidos testes sensoriais de tempo-intensidade (TI), com três amostras de chocolate, em 4 repetições, onde se avaliou a intensidade do gosto amargo. Neste treinamento, utilizaram-se três amostras de chocolate com diferentes concentrações de cacau: chocolate 35% de cacau *Harald Melken Unique Brasil*®; chocolate 53% de cacau *Harald Melken Unique Brasil*®; chocolate 63% de cacau *Harald Melken Unique Brasil*®.

As amostras de chocolate (cerca de 5g) em formato de pastilha, foram servidas em copos plásticos codificados com três dígitos e em ordem balanceada segundo Macfie et al. (1989). Para a aquisição e análise de dados foi utilizado o programa SensoMaker (NUNES; PINHEIRO, 2012). O tempo total de análise foi de 40 s, com um “delay” (tempo de atraso) de 3s para que o provador iniciasse a mastigação da amostra (definidos em pré-testes). Após obtenção da curva de TI e seus parâmetros de intensidade máxima de amargor ( $Imáx.$ ) e área total sob a curva (AT), realizou-se análise de variância para os dois parâmetros, para cada provador, tendo como fonte de variação amostra e repetição.

Selecionaram -se os provadores com habilidade em discriminar as amostras e boa repetibilidade em Imáx e AT. Para tanto, baseou-se no nível de significância de amostra e repetição, estabelecendo-se, para a seleção, um valor menor ou igual a 0,3 para amostra e maior que 0,05 para repetição (STONE; BLEIBAUM; THOMAS, 2012).

Para análise dos resultados, foi utilizado o programa estatístico SensoMaker (NUNES; PINHEIRO, 2012).

### **3.11.3 Definição dos atributos avaliados e condições da análise de Dominância Temporal das Sensações (TDS)**

Os atributos envolvidos na análise de Dominância Temporal das Sensações foram estabelecidos pelo método tradicional (STONE; BLEIBAUM; THOMAS, 2012). Para isso amostras de chocolates, incluindo as próprias amostras as quais foram avaliadas, foram servidas aos 10 provadores selecionados e esses foram solicitados a descrever os atributos relacionados ao sabor presente nas amostras de chocolate. Após cada julgador ter gerado seus próprios termos, para descrever as características de sabor, procedeu-se a uma discussão em grupo com o objetivo de reunir os termos descritivos consensuais e, assim, foram determinados oito atributos mais relevantes em relação aos sabores percebidos nos chocolates.

Por meio de pré-testes, os provadores foram familiarizados com a utilização do programa computacional para a coleta dos dados de dominância temporal de sensações e, os parâmetros de tempo necessário para realização do TDS bem como o “delay”, foram estabelecidos em 40s e 3s, respectivamente.

#### **3.11.4 Análise de Dominância Temporal das Sensações (TDS)**

A análise de TDS foi realizada, segundo metodologia proposta por Pineau et al. (2012), com os 10 provadores selecionados e treinados, em três repetições, utilizando-se o programa SensoMaker (NUNES; PINHEIRO, 2012) para coleta e análise dos dados. Os atributos avaliados foram: amargo, ácido, doce, sabor de cacau, madeira/tabaco, adstringente, fruta e ausência de sabor. Os provadores foram familiarizados com os atributos definidos tendo em vista que tinham conhecimento pleno das características que seriam avaliadas. A ordem de apresentação dos atributos, no programa computacional, foi realizada segundo Pineau et al. (2012).

Os provadores foram solicitados a escolher o sabor dominante ao longo do tempo de análise e foi explicado que o sabor dominante é aquele percebido com maior clareza e intensidade entre os demais. Posteriormente, os participantes foram solicitados a colocar a amostra de chocolate (cerca de 5g) na boca, iniciar a mastigação e começar a avaliação, respeitando o “delay”.

As amostras de chocolate, aproximadamente 5 gramas, foram servidas raladas, em copos plásticos brancos descartáveis codificados com números de três dígitos e seguindo a forma balanceada de apresentação (MACFIE et al., 1989). Os avaliadores foram solicitados a enxaguar a boca com água entre cada amostra.

A metodologia de Pineau et al. (2009) foi utilizada no software SensoMaker para calcular as curvas de TDS de todas as análises. Com base nesta, duas linhas foram desenhadas nos gráficos de TDS: o "nível do acaso" e o "nível de significância". O "nível do acaso" é a taxa de dominância que um atributo pode obter ao acaso e o "nível de significância" é o valor mínimo dessa proporção para ser considerado significativo.

### **3.12 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada por delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando estatisticamente os processos de análise de variância, de acordo com o software SISVAR® versão 4.5 (FERREIRA, 2011) e Teste de Tukey (5% de probabilidade) para comparação das médias .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Aspectos gerais dos frutos de cacau

Os frutos de cacau do clone PH16 utilizados neste estudo apresentam porte médio, arquitetura apropriada (ereta e sem muita ramificação) e frutos vermelhos (Figura 7).



Figura 7 Fruto, polpa e amêndoa do clone de cacau PH16

O clone PH 16 possui em média frutos com 20.8 cm de comprimento e 9.8 cm de diâmetro, casca com uma espessura de 677.3 g e cada fruto possui 33-48 sementes com peso médio de 4.6 g. Um total de 16 a 18 frutos deste clone são necessários para produzir 1 kg de cacau fermentado e seco, e o início da sua produção ocorre em cerca de 18 meses. De acordo com Mandarino e Gomes (2009), o PH 16 apresentou boa produtividade de amêndoas secas em seus estudos, ocupando a terceira posição entre os nove diferentes clones de cacau analisados.

Outros clones estudados anteriormente, como PH 9 e PH 15, apresentaram tamanhos menores quando comparados ao PH 16, possuindo 16.32 cm e 14.75 cm de comprimento, e 9.75 cm e 9.55 cm de diâmetro, respectivamente. O PH 9 possui cor amarelada, enquanto o PH 15 possui frutos vermelhos e casca mais fina e lisa (MOREIRA et al., 2013). As diferentes

características físicas das variedades estudadas neste e em outros trabalhos, possivelmente, irão exercer influência durante a fermentação e secagem do cacau, já que o tamanho e o aspecto dos frutos foram variados (CRUZ, 2012). O genótipo, também, influencia tanto a qualidade do sabor quanto a intensidade do chocolate, pois, possivelmente, determina a quantidade de precursores e atividade das enzimas proteolíticas e, assim, contribui para a formação do sabor (TAYLOR, 2002; LUNA et al., 2002; COUNET et al., 2004; TAYLOR; ROBERTS, 2004).

#### **4.2 Monitoramento da temperatura e pH durante a fermentação**

A massa de cacau do clone PH 16 sem inoculação apresentou temperatura inicial de 22.2 °C, que aumentou gradativamente até alcançar o valor final (156 horas) de 44.8 °C, ao passo que o clone PH 16 inoculado apresentou temperatura inicial de 24.5 °C, estabilizando o processo em torno de 84 horas (44 °C), até atingir a temperatura final máxima de 46.8 °C (Figura 8). A inoculação contribuiu para que a temperatura final de fermentação se mantivesse estável em um menor tempo de fermentação.

Os resultados obtidos neste estudo são condizentes com os descritos na literatura, onde o aumento da temperatura até valores de 29 a 40°C, durante as primeiras 72 horas de fermentação, pode ter ocorrido em razão do crescimento de leveduras que converteram açúcares em etanol e do crescimento de bactérias do ácido acético que oxidaram o etanol em ácido acético (CAMU et al., 2007, SCHWAN; WHEALS, 2004). Esta oxidação é uma reação extremamente exotérmica, elevando a temperatura da massa fermentativa até patamares de 44 a 47°C (CAMU et al., 2007).

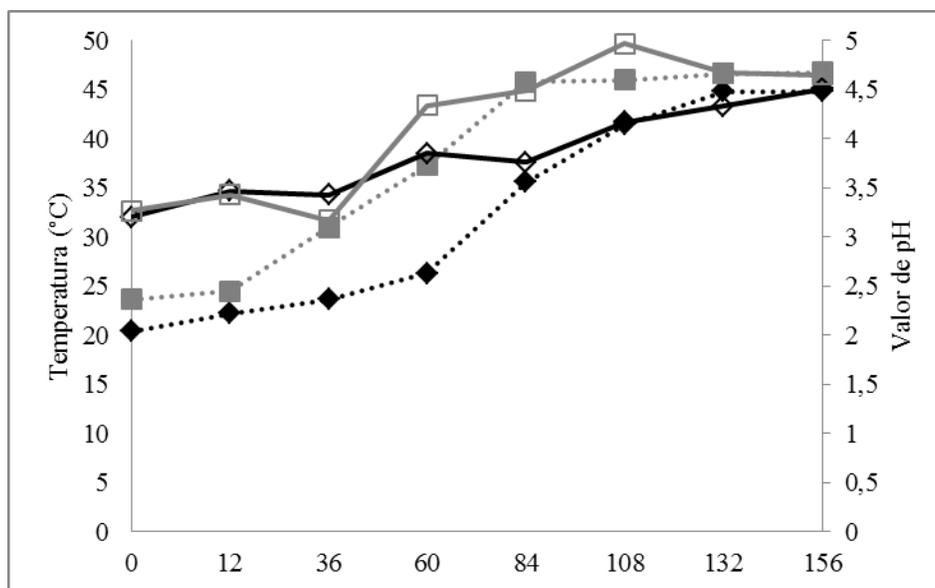


Figura 8 Variação da temperatura e pH da massa de cacau durante a fermentação dos clones PH16 e PH16 inoculado. Clone PH 16 sem inoculação (◇), PH 16 com inoculação (■); Temperatura (°C) (símbolo fechado), pH (símbolo aberto)

O pH inicial da polpa de cacau do clone PH 16 e PH 16 inoculado foi 3.51 e 3.43, respectivamente, e este baixo valor obtido ocorre, principalmente, em razão da presença de ácido cítrico na polpa (THOMPSON; FLEET, 2003). O pH inicial tem influência direta no processo fermentativo do cacau, pois o seu baixo valor, associado ao alto teor de açúcares e ausência de oxigênio no início da fermentação, permitem que leveduras proliferam rapidamente e transformem os açúcares em álcool e CO<sub>2</sub>, além de ativar enzimas pectinolíticas que hidrolisam os polissacarídeos presentes na polpa (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001).

À medida que os carboidratos (glicose e frutose) e ácido cítrico foram sendo metabolizados, o pH aumentou gradativamente, atingindo valores finais de 4.51 (PH16) e 4.65 (PH 16 inoculado), possivelmente, por cauda da

evaporação de ácidos voláteis, como o ácido acético (NIELSEN et al., 2007). Estas variações de pH são muito importantes, uma vez que reações que levam à formação de precursores de aroma são realizadas por enzimas endógenas das sementes de cacau e o pH desempenha um papel importante na fermentação para permitir a ação dessas enzimas (HANSEN; DEL OLMO; BURRI; 1998). Estudos mostraram que o elevado potencial de sabor pode ser correlacionado com menor acidificação (pH 5,5 a 5,0) durante a fermentação (AMIN et al., 2002).

### 4.3 Sucessão microbiológica

A fermentação do clone de cacau PH 16 e PH 16 inoculado resultaram em uma sucessão microbiana típica inicialmente realizada por leveduras, seguida por bactérias do ácido lático (BAL), bactérias do ácido acético (BAA) e finalizada com o desenvolvimento de bactérias aeróbias mesófilas, formadoras de esporos.

A população inicial de leveduras do clone PH 16 (Figura 9A) foi de 3.5 log UFC/mL e, ao longo do processo fermentativo, a contagem foi diminuindo até alcançar o valor de 1.52 log UFC/mL ao final da fermentação. No clone PH 16 inoculado (Figura 9B), a contagem inicial de leveduras foi de 3.71 log UFC/mL, apresentando maior contagem populacional em 60 horas de processo (3.95 log UFC/mL), mantendo-se, relativamente, estável até 108 horas de fermentação e diminuindo em 132 horas (1.52 log UFC/mL). A maior população de leveduras no clone PH 16 inoculado pode ser explicada pelo fato deste clone ter sido inoculado com *S. cerevisiae* e este microrganismo ter prevalecido sobre outras espécies durante o processo de fermentação. Ao final do processo fermentativo (156 horas), não houve contagem de leveduras no clone PH 16 inoculado.

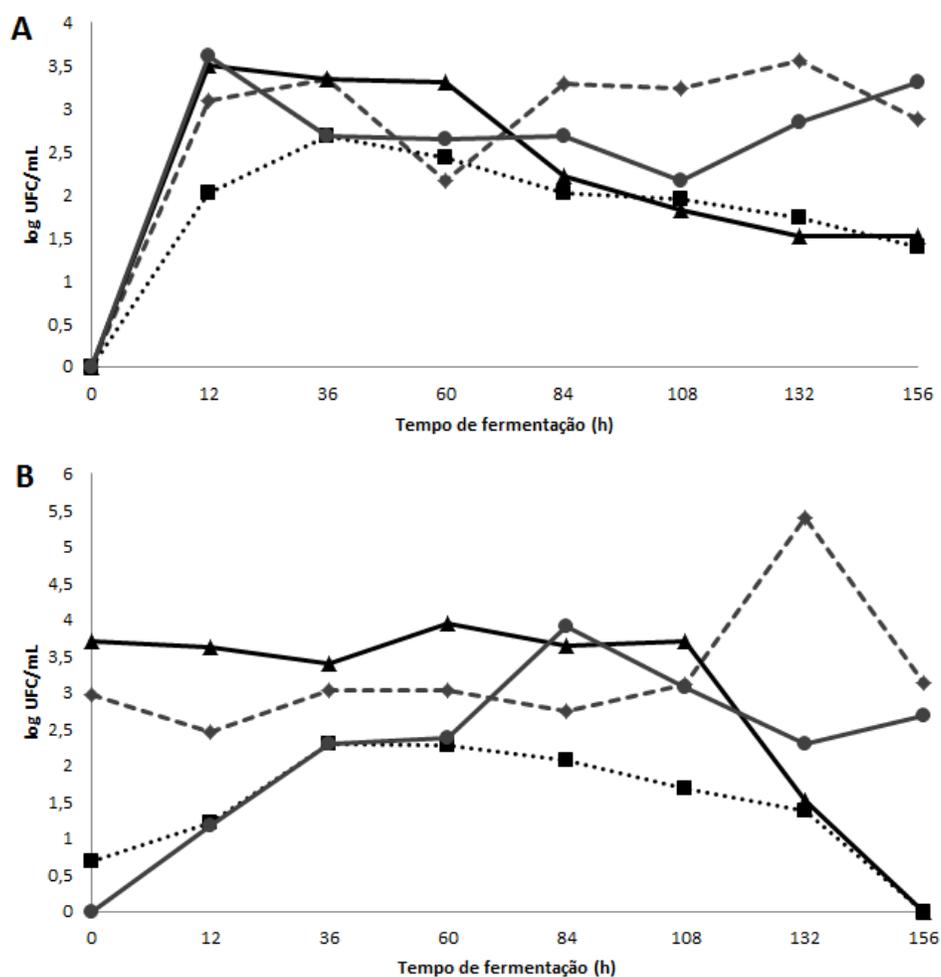


Figura 9 Sucessão microbiana de leveduras (▲), BAL (■), BAA (●) e bactérias aeróbias mesófilas (◆) durante a fermentação do clone de cacau PH 16 (A) e PH 16 inoculado (B)

A contagem microbiana inicial de bactérias do ácido lático (BAL) no clone PH 16 foi de 2.02 log UFC/mL, atingindo 2.69 log UFC/mL em 36 horas, e chegando ao final da fermentação (156 horas) com população de 1.39 log UFC/mL (Figura 9A). A população inicial de BAL do PH 16 inoculado foi menor (0.69 log UFC/mL), a maior contagem populacional foi observada em 36 horas (2.29 log UFC/mL), diminuindo, gradativamente, até o final da

fermentação, onde não houve contagem para este grupo de microorganismos (Figura 9B). Segundo Beckett (2009), as bactérias lácticas estão presentes desde o início da fermentação, mas só se tornam dominantes entre 48 e 96 h, convertendo açúcares em ácido láctico. Na figura 9A e B, pode-se observar que a maior contagem microbiana ocorreu em 36 horas no PH16 e PH16 inoculado, o que condiz com trabalhos realizados até o presente momento (ARDHANA; FLEET, 2003; LEFEBER et al., 2010; NIELSEN et al., 2007; PAPALEXANDRATOU et al., 2011b; SCHWAN, 1998).

A inoculação do microrganismo *L. fermentum* no início da fermentação não influenciou na contagem populacional deste grupo de microorganismos, pois houve uma maior população de BAL no clone PH 16 não inoculado do que no PH 16 inoculado com esta espécie. Dircks (2009) observou que o aumento do teor de etanol, durante uma inoculação controlada na fermentação de cacau, usando diferentes espécies de leveduras, inibiu o crescimento de *L. fermentum*, o que pode justificar o fato da população microbiana de BAL ter sido menor no PH 16 com inoculação (Figura 9B).

A população inicial de bactérias do ácido acético (BAA) na fermentação do PH 16 foi de 3.61 log UFC/mL, entre 36 e 132 horas, a população se manteve estável até alcançar um valor de 3.3 log UFC/mL ao final do processo (156 horas) (Figura 9A). Já a população inicial de BAA do clone PH 16 inoculado foi de 1.17 log UFC/mL, aumentando, gradativamente, até alcançar o valor de 3.91 log UFC/mL em 84 horas, e diminuindo em seguida até o valor final de 2.69 log UFC/mL (Figura 9B). Em geral, a contagem de BAA é maior após as primeiras 48 horas de fermentação, quando iniciam os revolvimentos da massa fermentativa, o que gera aeração do mosto (SCHWAN et al., 1990).

No presente estudo, observou-se maior população de BAA no PH 16 inoculado em torno de 84 horas de fermentação, porém, a maior contagem para o clone PH16 sem inóculo ocorreu em 12 horas de fermentação, o que

geralmente não acontece. Ardhana e Fleet (2003) relataram a existência de algumas espécies desse grupo que se desenvolveram em estágios iniciais, como *A. pasteurianus* e *A. aceti*, o que pode explicar a alta população inicial no PH16 não inoculado.

As bactérias mesófilas prevaleceram, durante todo o processo fermentativo, para ambos os clones (Figura 9A e B). O PH 16 apresentou população inicial de 3.09 log UFC/mL, mantendo valores próximos a esse ao longo da fermentação e população máxima em 132 horas (3.55 log UFC/mL), diminuindo para 2.87 log UFC/mL ao final do processo (156 horas) (Figura 9A). O PH 16 inoculado apresentou população inicial menor de 2.97 log UFC/mL e população máxima, também, foi observada em 132 horas (5.4 log UFC/mL), ao final do processo este valor diminuiu para 3.13 log UFC/mL (Figura 9B). A população máxima de bactérias mesófilas encontrada em 132 horas de fermentação está de acordo com dados da literatura, pois há uma grande população deste grupo de microrganismos, durante a fermentação de cacau, com significativo aumento nos estágios finais do processo (ARDHANA; FLEET, 2003; NIELSEN et al., 2007; SCHWAN, 1998; SCHWAN; WHEALS, 2004).

#### **4.4 Identificação das espécies microbianas por MALDI-TOF**

Um total de 873 colônias foi isolado, durante as 156 horas de fermentação das amêndoas de cacau, sendo 445 isolados da fermentação do PH 16 e 428 do PH 16 inoculado. O clone PH 16 inoculado obteve um menor número de isolados ao longo do processo fermentativo, e uma possível justificativa para esse fato seria a inibição que *S. cerevisiae* causaria no desenvolvimento de outros microrganismos. Uma população semelhante foi encontrada por Pereira et al. (2012), em que um total de 452 isolados foram analisados quanto à sua adaptação em diferentes condições de fermentação.

Os isolados encontrados, durante as fermentações do clone PH16 e PH16 inoculado, foram agrupados por diferentes testes bioquímicos e as espécies foram identificadas pela técnica de MALDI-TOF MS (Figura 10, 11 e 12).

As espécies identificadas durante a fermentação de cacau do PH 16 foram *Candida magnoliae*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum* e *Saccharomyces cerevisiae*, e estas espécies têm sido, frequentemente, detectadas em amêndoas de cacau fermentadas espontaneamente em outras áreas geográficas (SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995; ARDHANA; FLEET, 2003; JESPERSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2005; CAMU et al., 2007; PAPALEXANDRATOU et al., 2011b).

A contagem de leveduras foi relativamente elevada durante os dois processos fermentativos (Figura 9A e B) e diferentes espécies foram identificadas pela técnica de MALDI-TOF (Figura 10). As espécies dominantes em ambos os processos fermentativos foram *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida magnoliae*. A espécie *Pichia kluyveri* foi encontrada apenas no clone PH16, enquanto as espécies *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia guilliermondii* foram detectadas apenas no PH16 inoculado. Em estudos há relatos de que *S. cerevisiae* e *Hanseniaspora spp.* são as espécies mais abundantes na fermentação de cacau (SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995; PAPALEXANDRATOU et al., 2011b.; PEREIRA et al., 2012).

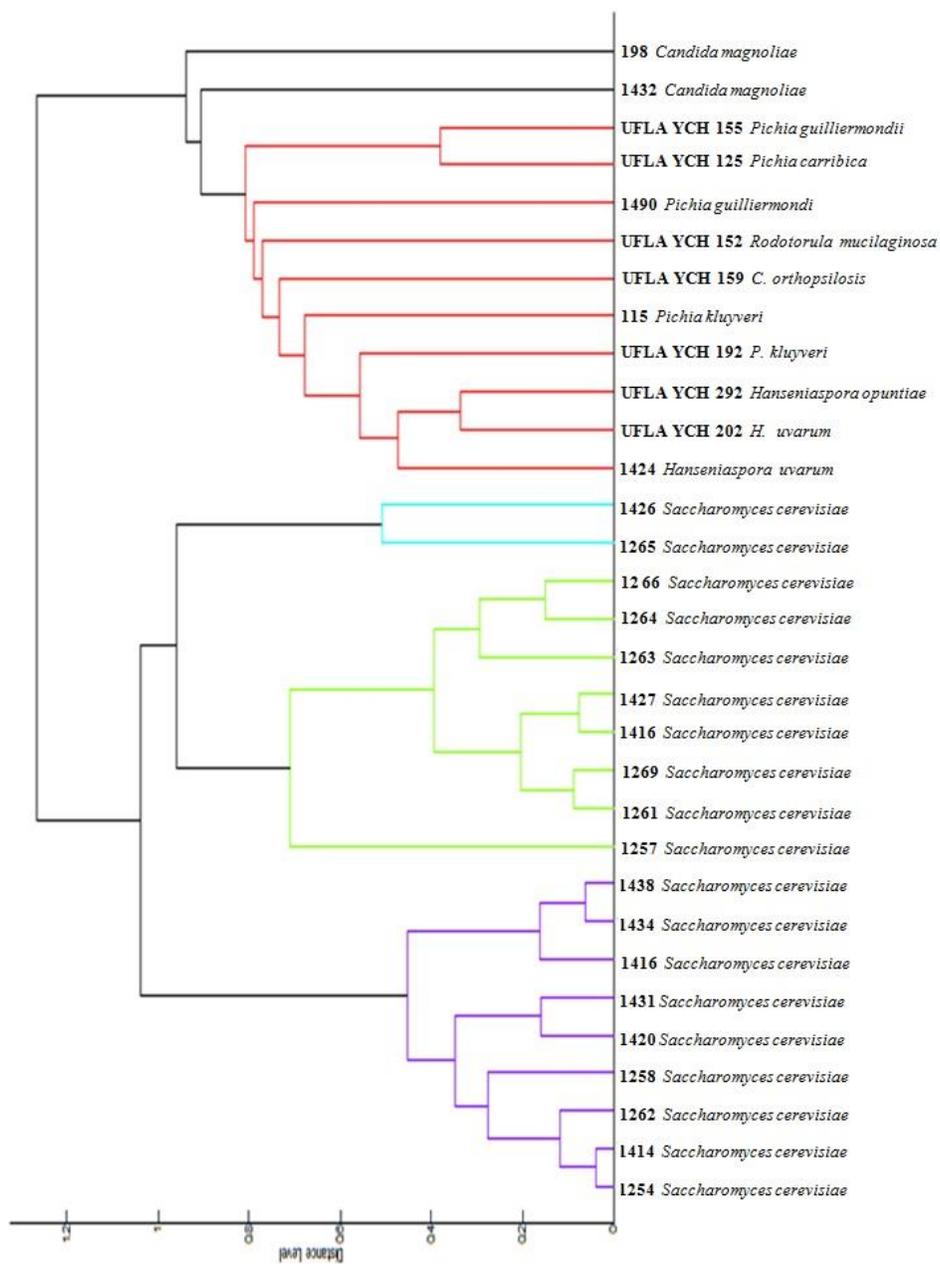


Figura 10 Dendrograma obtido por análises de MALDI-TOF MS de isolados de leveduras do clone de cacau PH16 e PH16 inoculado

A menor contagem populacional no clone PH 16 e PH16 inoculado ocorreu para BAL (Figura 9A e B), porém várias espécies foram identificadas durante a fermentação e uma maior diversidade de espécies foi encontrada no clone de cacau PH16 (Figuras 11A e 12A). As espécies *Lactobacillus fermentum* e *Pediococcus acidilactici* foram detectadas, em ambos os processos fermentativos, enquanto *L. mali*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. plantarum* foram encontradas apenas no clone de cacau PH16 e *L. hilgardii* apenas no PH16 inoculado. Algumas destas espécies já foram detectadas na fermentação de cacau de Gana, Indonésia e outros países (CARR; DAVIES; DOUGAN, 1979; ARDHANA; FLEET, 2003; NIELSEN et al., 2007). A identificação de *Pediococcus spp.* em fermentações de cacau não foi relatada anteriormente no oeste africano, porém tem sido encontrada em fermentações de cacau realizadas no Brasil (PASSOS et al., 1984; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001).

A maior contagem populacional de BAA (Figura 9B) foi na fermentação PH16 inoculado, porém apenas três espécies (*Acinetobacter sp.*, *Gluconobacter oxydans* e *Acetobacter pasteurianus*) foram identificadas pela técnica de MALDI-TOF em ambos os processos (Figuras 11B e 12B). A presença de *Acetobacter spp.* e *Gluconobacter spp.* já foi relatada anteriormente em fermentações de cacau realizadas em Gana, Indonésia e Brasil (CARR; DAVIES; DOUGAN, 1979; ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS, 2004) e espécie do gênero *Acinetobacter*, também, já foi encontrada em fermentação de cacau conduzida no Brasil (PEREIRA et al., 2013).

A maior contagem populacional de bactérias mesofílicas foi encontrada no clone PH16 (Figura 9A) e uma maior diversidade de espécies foi identificada neste processo fermentativo, o que mostra que a inoculação teve pouca influência no crescimento deste grupo de microrganismos (Figuras 11C e 12C). As espécies detectadas em ambas as fermentações pela técnica de MALDI-TOF

foram: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. Pseudomycooides*, *Lysinibacillus fusiformis*, *B. megaterium*, enquanto as espécies *B. mojavensis*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus chibensis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *B. patagoniensis* foram encontradas apenas no clone PH16 e *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. jeotgali*, *B. pycnus* e *B. altitudinis* apenas no PH16 inoculado.

Em fermentações realizadas na Indonésia, Gana e Brasil, espécies de *Bacillus spp.* foram predominantes nos estágios posteriores de fermentação, ultrapassando a contagem de outros microrganismos (CARR; DAVIES, 1980; SCHWAN; ROSE; BOARD, 1995;. ARDHANA; FLEET, 2003). O papel de *Bacillus spp.* na fermentação do cacau não foi completamente esclarecido, mas tem sido investigado que estas espécies podem provocar sabores indesejáveis, em razão de sua elevada atividade enzimática e produção de ácidos graxos livres de cadeia curta (SCHWAN et al., 1986;. SCHWAN; WHEALS, 2004).

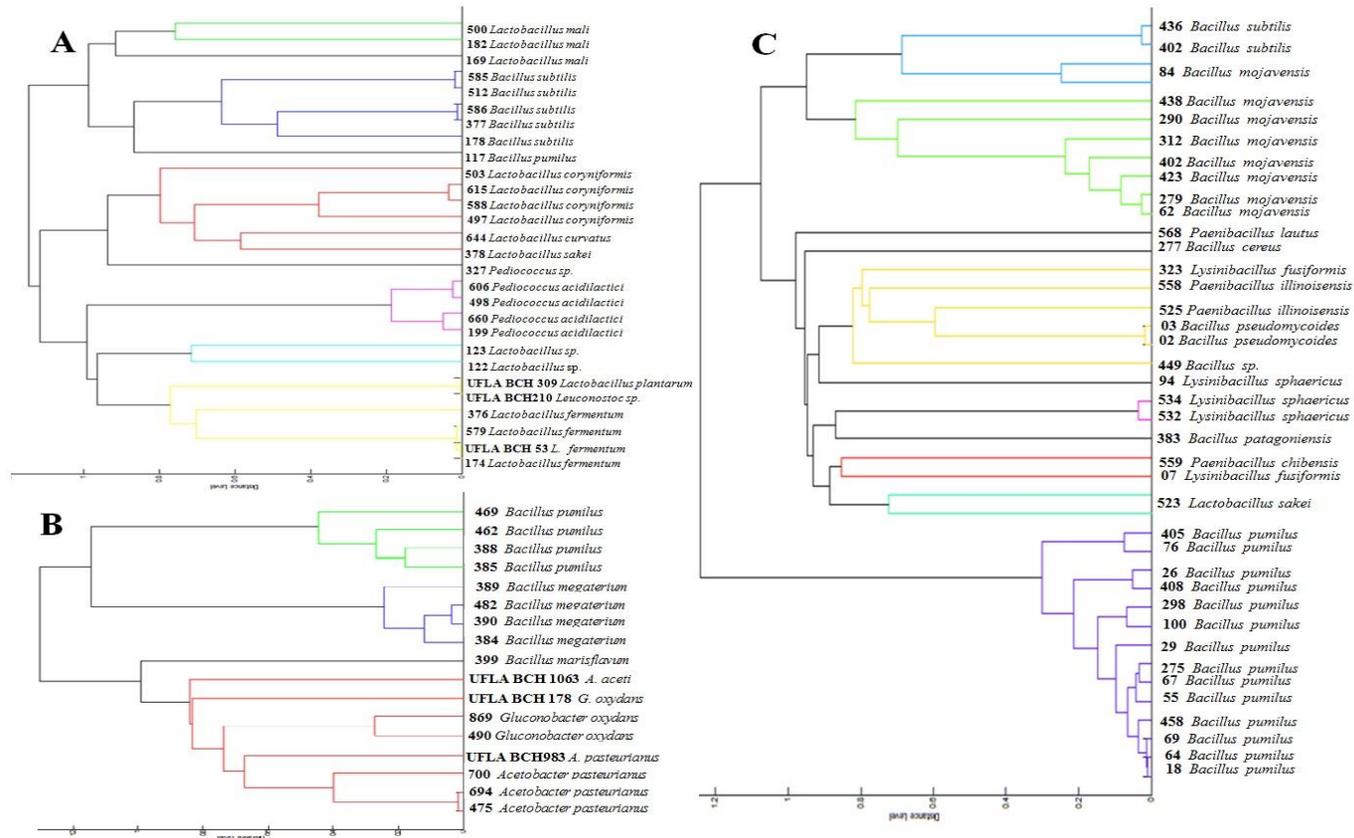


Figura 11 Dendrogramas obtidos por análises de MALDI-TOF MS de isolados de bactérias do clone de cacau PH16. A) meio MRS, B) meio GYC, C) Ágar nutriente

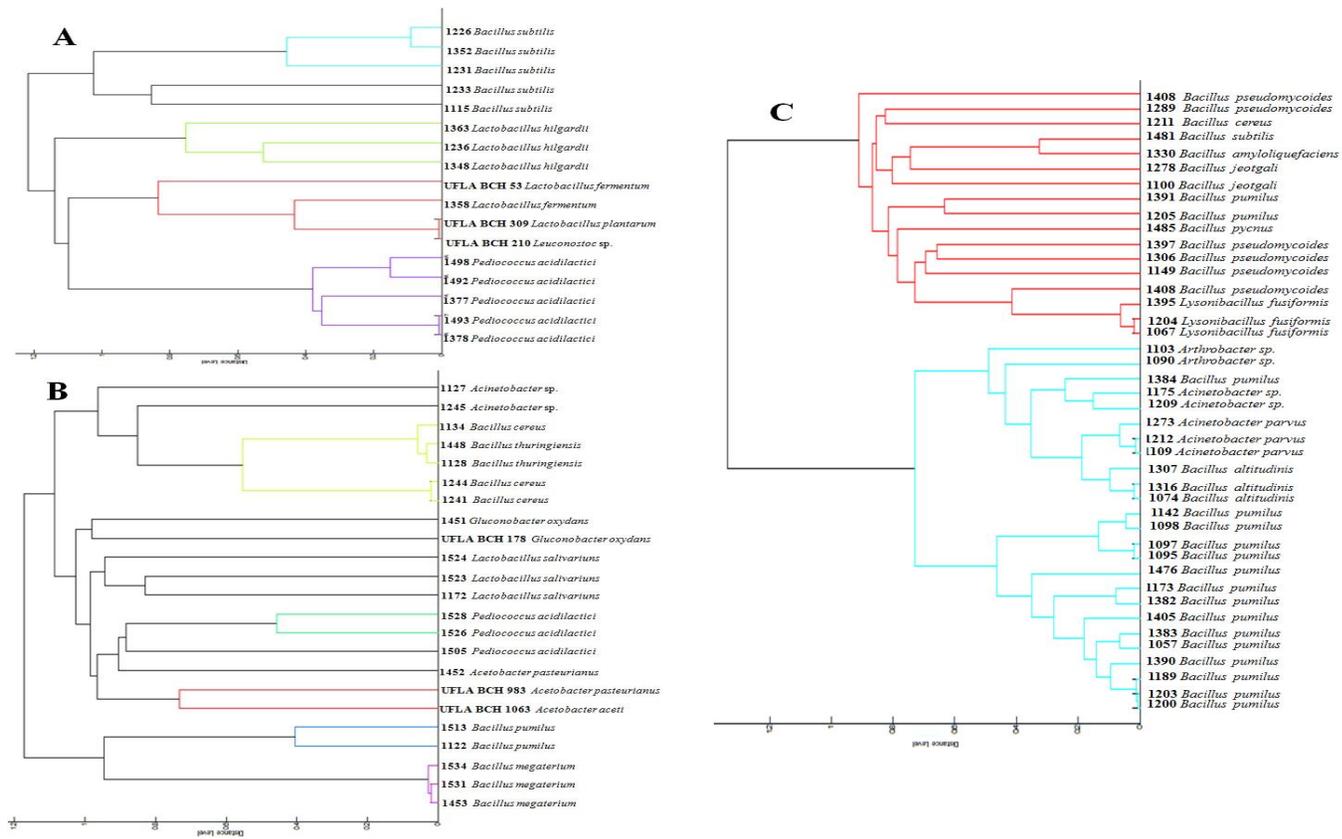


Figura 12 Dendrogramas obtidos por análises de MALDI-TOF MS de isolados de bactérias do clone de cacau PH16 inoculado. A) meio MRS, B) meio GYC, C) Ágar nutriente

#### 4.5 Identificação das espécies microbianas por PCR-DGGE

Os perfis de PCR-DGGE para as comunidades eucariota e procariota estão demonstrados nas figuras 13 e 14, respectivamente, e as espécies identificadas são apresentadas na tabela 1. Os microrganismos eucariotos dominantes, em ambos os processos fermentativos, foram *Saccharomyces cerevisiae* (bandas 5 e 9) e *Pichia kudriavzevii* (bandas 6 e 7), enquanto a espécie *Hanseniaspora uvarum* (bandas 1 e 2) foi detectada apenas em 60 horas de fermentação no PH16 e em 84 horas no PH16 inoculado (Figura 13A e B). Estes resultados estão de acordo com Daniel et al. (2009), que estudaram a diversidade de leveduras na fermentação de cacau em Gana, e *Hanseniaspora spp.* Cresceu, principalmente, durante a fase inicial da fermentação, enquanto *P. kudriavzevii* e *S. cerevisiae* não tiveram distribuição temporal específica.

A importância da espécie *S. cerevisiae* em um processo de fermentação de cacau bem sucedido torna-se evidente, uma vez que este microrganismo está envolvido em praticamente todas as fermentações de cacau estudadas até o presente momento e domina o processo fermentativo em poucas horas após o seu início (PAPALEXANDRATOU et al., 2013). A alta concentração inicial de carboidratos e o baixo teor de oxigênio na massa de cacau favoreceram o crescimento deste grupo microbiano, que é capaz de metabolizar rapidamente açúcares redutores e ácido cítrico para a produção de etanol. Schwan e Wheals (2004) e Pereira et al. (2012) sugeriram que *S. cerevisiae* e *Hanseniaspora spp.* podiam ser utilizadas na fermentação de cacau para melhorar o aroma e o sabor de chocolate.

A espécie *Torulaspota delbrueckii* foi encontrada somente no PH 16 inoculado em 84 horas de fermentação e *Theobroma cacao* foi detectada por causa da utilização de primers universais para eucarioto durante a reação de amplificação do DNA (MOREIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2012).

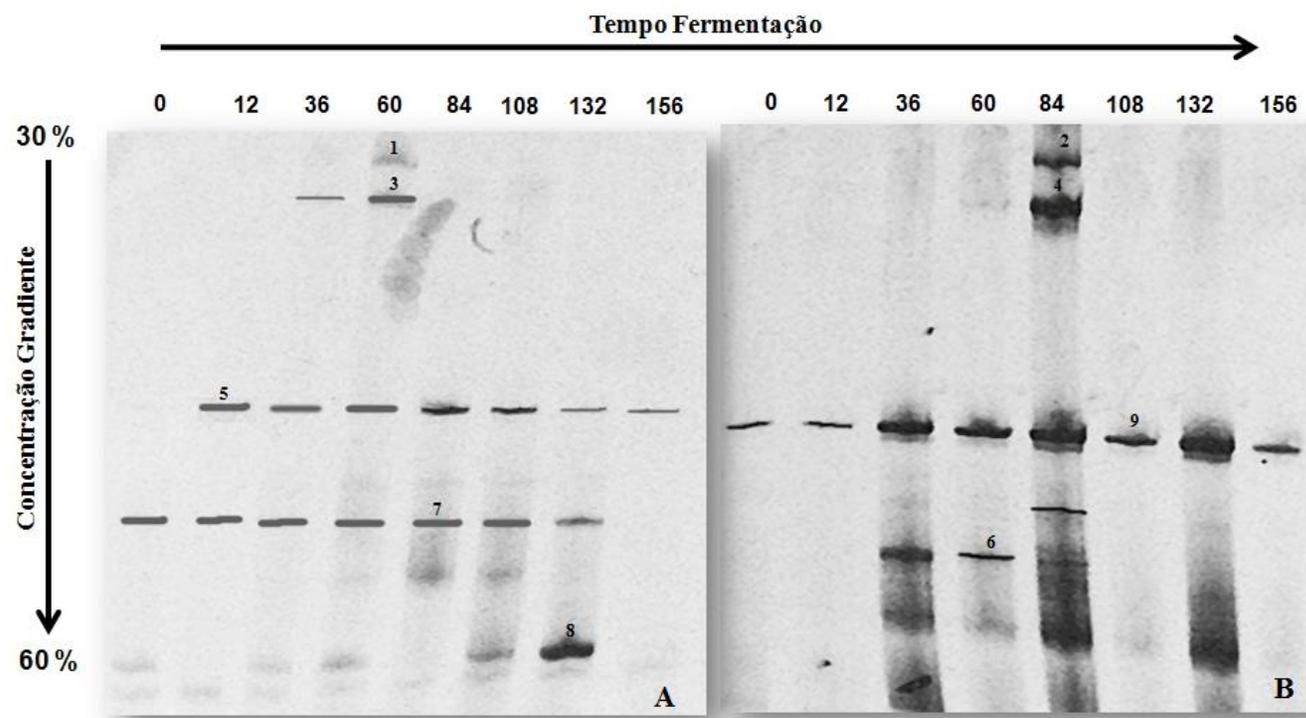


Figura 13 Perfis de eucariotos durante a fermentação de amêndoas de cacau do clone PH 16 (A) e PH 16 inoculado (B)

Pelos resultados dos métodos independentes de cultivo (PCR-DGGE) foi demonstrado que houve uma maior diversidade de bactérias durante o processo de fermentação. *Lactobacillus nagelli* (banda 3), *Tatumella saanichensis* (banda 4), *Acetobacter pasteurianus* (bandas 6 e 14), Uncultured *Lachnospiraceae* bacterium (banda 9), *Paenibacillus rhizosphaerae* (banda 10), *Lactobacillus plantarum* (banda 11), *Lactobacillus reuteri* (banda 12) e *Bacillus sp.* (banda 13) foram detectadas apenas durante a fermentação do PH 16 (Figura 14A). Outras espécies, como *Lactobacillus fermentum* (banda 17), *Acetobacter lovaniensis* (banda 22), *Acetobacter tropicalis* (banda 23), Uncultured *Acetobacteraceae* bacterium (banda 24) e *Acetobacter indonesiensis* (banda 25) foram encontradas apenas no PH16 inoculado (Figura 14B).

O perfil de DGGE bacteriano indicou que LAB estiveram presentes durante várias etapas de fermentação (Figura 14). *Lactobacillus nagelii* (banda 3), *Lactobacillus plantarum* (banda 11) e *Lactobacillus reuteri* (banda 12) foram encontradas no PH 16 (Figura 14A) e apenas a espécie *Lactobacillus fermentum* (banda 17) foi detectada no PH16 inoculado (Figura 14B). *L. fermentum* é comumente encontrada durante a fermentação de grãos de cacau em outros países (ARDHANA; FLEET, 2003; NIELSEN et al., 2007). Esta espécie é heterofermentativa e converte o ácido cítrico, fermenta glicose, oxida o etanol e utiliza frutose como aceptor de elétrons alternativo para convertê-la em manitol. Outra espécie, também, detectada neste estudo foi *L. plantarum*, e esta foi relatada em vários estudos de fermentação de cacau por todo o mundo (ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS, 2004; CAMU et al., 2007), porém, esta espécie é descrita como sendo menos adaptada do que *L. fermentum* no que diz respeito ao etanol e tolerância ao calor (CAMU et al., 2008). *L. reuteri* foi detectada no presente estudo na fermentação do clone PH 16, e de acordo com a literatura, *L. reuteri* não desempenha um papel importante no processo de fermentação de cacau (PAPALEXANDRATOU et al., 2011a).

Espécies do gênero *Acetobacter* foram detectadas por PCR-DGGE em ambos os processos (Tabela 1). Os perfis bacterianos indicaram que *Acetobacter pasteurianus* (banda 6), *Acetobacter lovaniensis* (banda 22), *Acetobacter tropicalis* (banda 23), Uncultured *Acetobacteraceae* bacterium (banda 24) e *Acetobacter indonesiensis* (banda 25) foram dominantes em 60 horas de fermentação, porém *Acetobacter pasteurianus* (banda 14), também, foi detectada em 156 horas, no clone PH16. As BAA, em particular *A. pasteurianus*, são desejáveis durante a fermentação de amêndoas de cacau, pois produzem ácido acético baseado em hidratos de carbono, ácido cítrico e etanol. Este processo de oxidação é responsável pelo aumento da temperatura no interior da massa de fermentação de cacau (SCHWAN; WHEALS, 2004).

*Acetobacter tropicalis*, também, já foi descrita anteriormente, durante fermentações de cacau na Austrália (DIRCKS, 2009). Esta espécie é associada, principalmente, com frutas e alimentos fermentados e tem sido selecionada para produzir vinagre artesanal. O domínio dessa espécie, durante a fermentação de cacau, pode ser explicado pela sua resistência ao calor e acidez (NDOYE et al., 2006).

As espécies *Paenibacillus rhizosphaerae* (banda 10) e *Bacillus* spp. (banda 13) foram detectadas com 156 horas de fermentação, no clone PH 16 por meio da técnica de PCR-DGGE. Esse resultado era esperado, pois bactérias aeróbias, formadoras de esporos, do gênero *Bacillus* são, geralmente, encontradas nas fases posteriores de fermentação. O seu papel na fermentação, ainda, não é bem conhecido, e estas bactérias nunca estiveram envolvidas no controle do processo de fermentação (OUATTARA et al., 2008). Estes microrganismos são comumente utilizados em indústrias de biotecnologia, porque produzem grandes quantidades de enzimas extracelulares (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004), ácidos graxos livres de cadeia curta e aromas, como pirazinas e 2,3- butanodiol (SCHWAN; WHEALS, 2004).

A espécie *Tatumella saanichensis* (banda 4), pertencente à família Enterobacteriaceae, foi detectada em 60 horas de fermentação no clone PH16, e já foi encontrada em estudos anteriores de fermentação de cacau (PEREIRA et al., 2012). Embora as condições da massa de cacau não favoreçam o desenvolvimento de espécies de enterobactérias e de estafilococos (baixo pH e altas temperaturas), sua presença foi relatada por métodos independentes de cultivo utilizados em fermentações de cacau no Brasil, Gana e Costa do Marfim (PAPALEXANDRATOU et al., 2011b). A espécie *Gluconobacter oxydans* (banda 5) foi detectada apenas no clone PH16 e parece não desempenhar um papel fundamental, durante a fermentação, uma vez que esteve presente apenas até 60 horas de fermentação, provavelmente, por contaminação ambiental inicial das amêndoas de cacau. Além disso, esta espécie não é competitiva suficiente para leveduras e bactérias lácticas sob a microaerofilia inicial de fermentação (PAPALEXANDRATOU et al., 2011b).

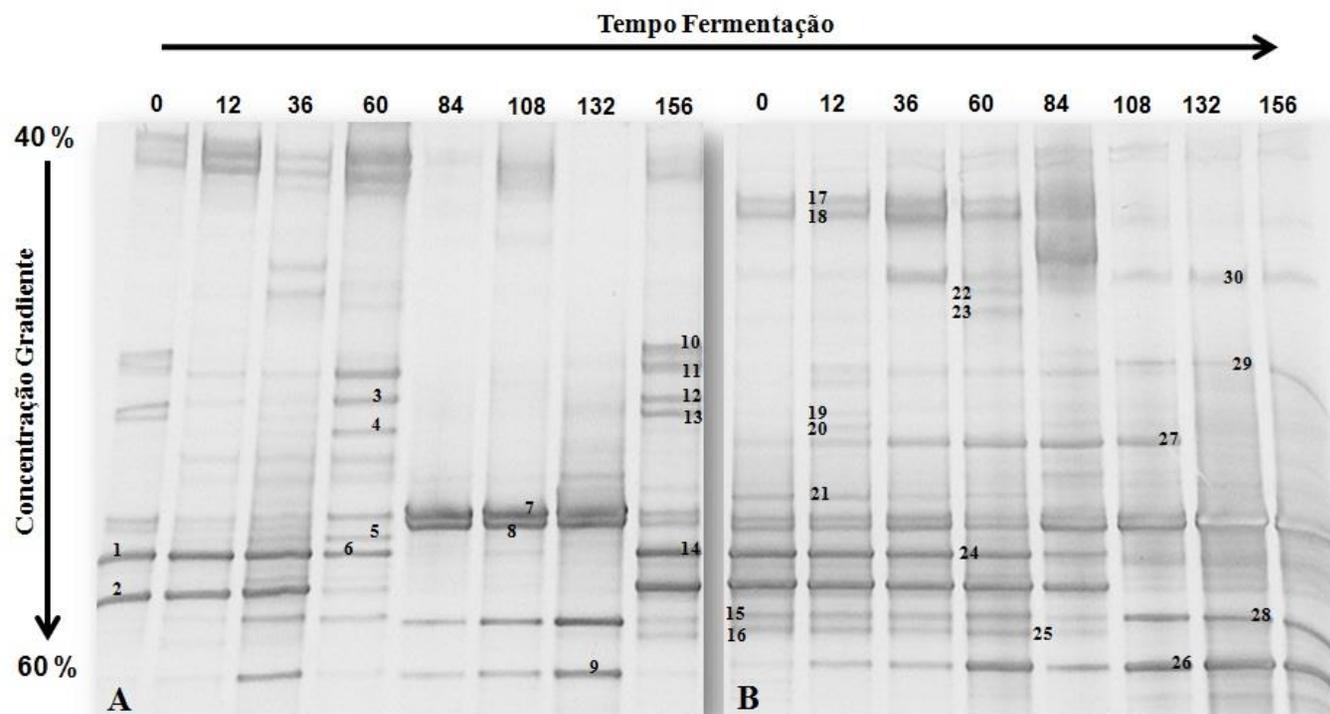


Figura 14 Perfis de procariotos durante a fermentação de amêndoas de cacau do clone PH 16 (A) e PH 16 inoculado (B)

Tabela 1 Identificação das bandas obtidas por PCR–DGGE, utilizando iniciadores universais, com base na comparação do BLAST no GenBank

<b>Bandas <sup>a</sup></b>	<b>Número de acesso</b>	<b>Similaridade (%)</b>	<b>Eucariotos</b>
1, 2	HM627056.2	97%	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
3			Não identificado
4	EU441895.1	97%	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
5, 9	HG532113.1	99%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
6, 7	JF715182.1	99%	<i>Pichia kudriavzevii</i>
8	JQ228377.1	97%	<i>Theobroma cacao</i>
			<b>Procariotos</b>
1, 15, 18, 20, 30			Não identificado
2, 7, 8, 16, 19, 21, 26, 27, 28, 29	HQ663963.1	100%	Uncultured bacterium
3	AB370876.1	100%	<i>Lactobacillus nagelii</i>
4	JQ726633.1	97%	<i>Tatumella saanichensis</i>
5	KC510038.1	99%	<i>Gluconobacter oxydans</i>
6, 14	KF030789.1	100%	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
9	KF506837.1	100%	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i> bacterium
10	HF566259.1	97%	<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i>
11	EF426263.1	100%	<i>Lactobacillus plantarum</i>
12	AB627842.1	100%	<i>Lactobacillus reuteri</i>
13	GU429248.1	97%	<i>Bacillus sp.</i>
17	FR873872.1	99%	<i>Lactobacillus fermentum</i>
22	HM217974.1	97%	<i>Acetobacter lovaniensis</i>
23	FN297839.1	99%	<i>Acetobacter tropicalis</i>
24	HM112155.1	97%	Uncultured <i>Acetobacteraceae</i> bacterium
25	FJ157232.1	97%	<i>Acetobacter indonesiensis</i>

<sup>a</sup>Bandas estão numeradas tal como indicado no gel DGGE.

#### 4.6 Análise de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos

O consumo de glicose, frutose e ácido cítrico e a formação de metabólitos, durante a fermentação do clone de cacau PH16 e PH16 inoculado, foram avaliados na polpa e no cotilédone das amêndoas (Figura 15 e 16).

No início da fermentação, o clone PH16 e PH16 inoculado continha na polpa concentrações de 19.43 e 19.26 g/kg de glicose, 17.97 e 16.66 g/kg de frutose, 2.6 e 2.46 g/kg de ácido cítrico (Figura 15A e B). Moreira et al. (2013) detectaram no início da fermentação do clone de cacau PH9 concentrações iniciais menores de glicose (10.10g/kg), frutose (12.64g/kg) e ácido cítrico (1.42g/kg), que foram praticamente esgotadas após 72 horas de fermentação. Em geral, as diferenças na composição do cacau são influenciadas por vários fatores, tais como: variedade, grau de maturação dos frutos, estado nutricional do cacaueiro, população microbiana presente, fermentação e processos de secagem, transporte e armazenamento (AMIN et al., 2002; HANSEN et al., 2000).

As concentrações iniciais de carboidratos e ácido cítrico na amêndoa foram: 4.92 e 2.03 g/kg de glicose, 3.49 e 5.32 g/kg de frutose, 2.67 e 2.39 g/kg de ácido cítrico, no PH 16 e PH 16 inoculado, respectivamente (Figura 15A e B). Valores semelhantes foram obtidos por Papalexandratou et al. (2013), em que a sacarose (8 a 10 mg/g), presente nas amêndoas de cacau, foi hidrolisada enzimaticamente em glicose (3 mg/g) e frutose (4 mg/g), e as concentrações de ácido cítrico foram menores (2 mg/g) e praticamente estáveis durante a fermentação.

Os açúcares e ácido cítrico, presentes na polpa e nas amêndoas de cacau, levaram em torno de 132 horas para serem consumidos no clone PH16 e mais rapidamente no PH16 inoculado (cerca de 108 horas) (Figura 15A e B). O metabolismo heterolático de *L. fermentum* leva à rápida conversão de ácido cítrico em ácido lático (AXELSSON, 2004), o que foi observado no PH 16

inoculado, pois a inoculação deste microrganismo acelerou o processo fermentativo e o consumo de carboidratos e ácido cítrico na polpa e nas amêndoas.

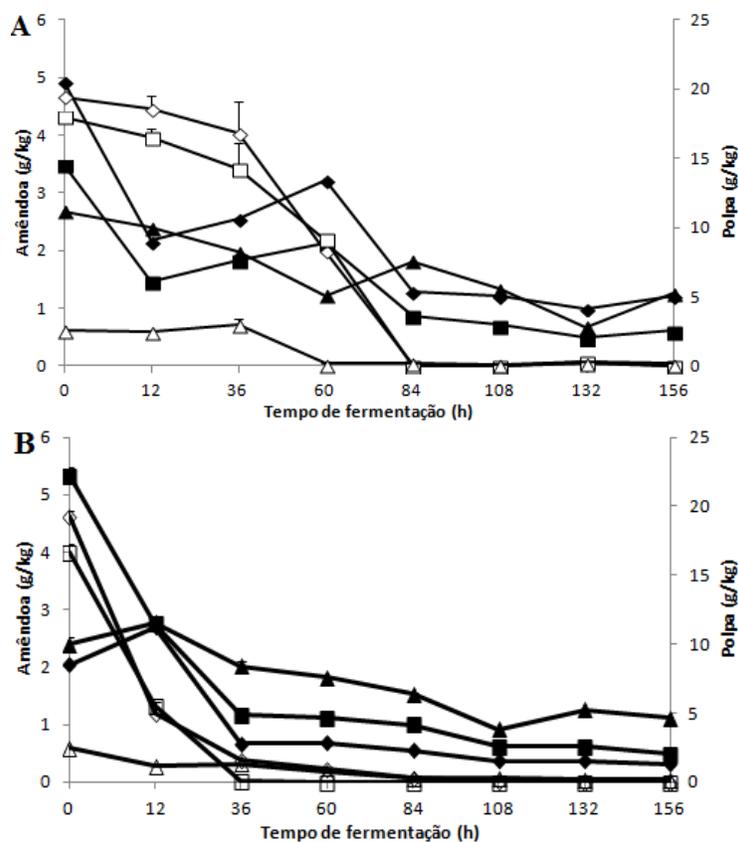


Figura 15 Consumo de glicose (◆), frutose (■) e ácido cítrico (▲) durante a fermentação dos clones de cacau PH16 (A) e PH16 inoculado (B) nas amêndoas (símbolos fechado) e na polpa (símbolos aberto)

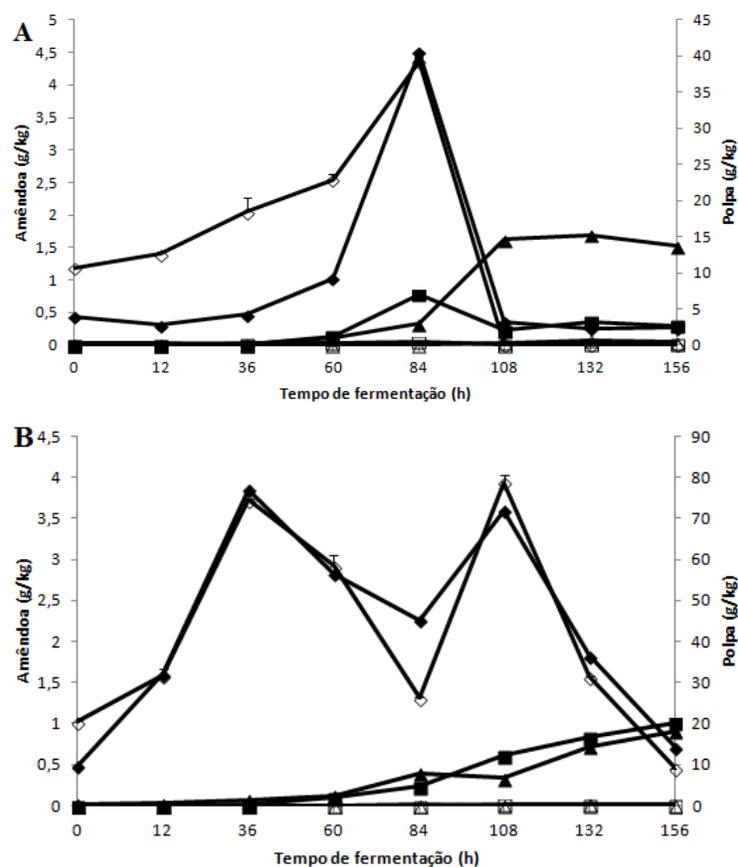


Figura 16 Produção de etanol (◆), ácido lático (■) e ácido acético (▲) durante a fermentação dos clones de cacau PH16 (A) e PH16 inoculado (B) nas amêndoas (símbolos fechado) e na polpa (símbolos aberto)

A produção de etanol aumentou no decorrer do processo fermentativo, até alcançar concentrações máximas de 4.50 g/kg na amêndoa e 39.24 g/kg na polpa do PH 16 (em 84 horas de fermentação) (Figura 16A). As concentrações máximas no PH 16 inoculado foram 3.84 g/kg na amêndoa, em 36 horas e 78.85 g/kg na polpa em 108 horas (Figura 16B). A inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no início do processo foi responsável pela produção deste metabólito em maiores concentrações na polpa, porém na amêndoa isto

não ocorreu, o que pode ser justificado em razão do fato do etanol não ter difundido completamente para o interior das amêndoas (PAPALEXANDRATOU et al., 2011a).

O clone PH16 e PH16 inoculado, após alcançarem as maiores concentrações de etanol, em 84 horas e 108 horas de fermentação, respectivamente, obtiveram uma diminuição na produção deste metabólito até valores finais de 0.26 g/kg (PH16) e 0.71 g/kg (PH16 inoculado) na amêndoa, 0 e 9.13 g/kg nas respectivas polpas dos diferentes processos analisados. A diminuição no teor de etanol pode ter ocorrido em função do consumo, evaporação e/ou conversão deste metabólito em ácido acético, por meio da ação de bactérias acéticas; havendo uma relação no crescimento deste grupo de microrganismos (BAA) com a queda da concentração de etanol na polpa e na amêndoa (MOREIRA et al., 2013).

O ácido láctico produzido durante a fermentação do clone PH 16 apresentou as maiores concentrações em 84 horas de fermentação, tanto na amêndoa (0.78 g/kg) como na polpa (0.47 g/kg) (Figura 16A), enquanto as maiores concentrações no PH16 inoculado foram 1.01 g/kg na amêndoa, em 156 horas e 0.45 g/kg na polpa, em 108 horas de fermentação (Figura 16B). A inoculação do microrganismo *Lactobacillus fermentum* no PH16 inoculado teve pouca influência na produção de ácido láctico durante o processo fermentativo. De acordo com os resultados obtidos por Papalexandratou et al. (2013), durante duas fermentações espontâneas de cacau conduzidas na Malásia, as concentrações máximas de ácido láctico encontradas na polpa foram de 8.7 mg/g e 11.9 mg/g e nas amêndoas de 2.0 mg/g e 2.5 mg/g, sendo estas concentrações maiores quando comparadas às do clone PH16 e PH16 inoculado. Esse fato pode ter ocorrido por causa das diferenças nas variedades estudadas e nas características do processo fermentativo (AMIN et al., 2002; HANSEN et al., 2000).

A atividade metabólica de leveduras e BAL no clone PH 16 e PH 16 inoculado pode ter ocasionado um aumento da temperatura (Figura 8) e nas concentrações de etanol e ácido láctico na polpa e nas amêndoas de cacau (Figura 16A e B), favorecendo o crescimento de BAA. Por sua vez, essas bactérias do ácido acético foram responsáveis pela oxidação do etanol em ácido acético ao longo da fermentação (Figura 16A e B).

As maiores concentrações de ácido acético encontradas no PH16 foram 1.68 g/kg na amêndoa e 0.66 g/kg na polpa, em 132 horas de fermentação. No PH16 inoculado, as maiores concentrações desse composto foram 0.90 g/kg no interior das amêndoas em 156 horas e 0.20 g/kg na polpa em 132 horas. Os níveis de ácido acético produzido na polpa e amêndoa da fermentação do PH 16 inoculado foram menores, quando comparados aos níveis produzidos durante a fermentação do PH16 (Figura 16A e B). Esta diferença pode ter ocorrido em virtude da baixa disponibilidade de oxigênio no interior do tanque e, conseqüentemente, menos etanol foi oxidado em ácido acético (PEREIRA et al., 2012).

#### **4.7 Análise de compostos voláteis**

Trinta e oito compostos foram identificados e quantificados por meio da cromatografia gasosa (GC) no clone de cacau PH16 e PH16 inoculado, como pode ser observado na tabela 2. Estes compostos foram separados em cinco principais grupos químicos: álcoois, ésteres, ácidos, aldeídos e outros compostos. Os álcoois (15) e ésteres (13) apresentaram um maior número de compostos individuais e os demais grupos apresentaram: ácidos (4), aldeídos (4) e outros compostos (2).

Tabela 2 Porcentagem relativa dos compostos voláteis presentes nas amêndoas de cacau, no tempo inicial (TI) e no tempo final (TF) da fermentação, no clone PH16 e PH16 inoculado

<b>Compostos (%)</b>	<b>PH16 (TI)</b>	<b>PH16 (TF)</b>	<b>PH16 Ino (TI)</b>	<b>PH16 Ino (TF)</b>
<b>Álcoois</b>				
<b>Methanol</b>	2,14	21,13	17,99	nd
<b>1-propanol</b>	0,26	1,77	0,12	4,16
<b>2-methyl-1-propanol</b>	7,93	0,33	nd	6,10
<b>1-butanol</b>	2,43	6,61	3,24	17,30
<b>2-methyl-1-butanol</b>	6,69	0,32	0,41	1,48
<b>3-methyl-1-butanol</b>	nd	0,75	nd	1,62
<b>1-pentanol</b>	0,47	0,49	nd	0,68
<b>3-methyl-1-pentanol</b>	nd	nd	0,59	nd
<b>Trans-3-hexen-1-ol</b>	1,66	nd	0,76	nd
<b>2,3-butanediol</b>	0,41	0,91	nd	1,24
<b>1,2-propanediol</b>	0,30	5,72	nd	nd
<b>Furfuryl alcohol</b>	0,32	0,67	nd	nd
<b>Geraniol</b>	2,92	nd	0,22	0,79
<b>Menthol</b>	0,39	nd	nd	6,75
<b>2-propanol</b>	nd	nd	nd	0,36
<b>Ésters</b>				
<b>Ethyl acetate</b>	nd	nd	1,77	23,65
<b>Propyl acetate</b>	0,41	nd	nd	nd
<b>Isobutyl acetate</b>	1,79	nd	0,36	nd
<b>Ethyl butyrate</b>	6,81	0,26	3,99	0,68
<b>Isoamyl acetate</b>	18,40	0,75	56,00	10,57
<b>Ethyl pyruvate</b>	nd	nd	0,14	nd
<b>Ethyl lactate</b>	0,98	nd	0,14	nd
<b>Ethyl octanoate</b>	20,91	nd	nd	1,55
<b>Furfuryl acetate</b>	1,87	nd	1,19	0,83
<b>Phenyl acetate</b>	nd	0,74	nd	0,61
<b>Propyl butyrate</b>	0,70	nd	nd	0,15
<b>Phenylethyl acetate</b>	0,89	nd	nd	0,87

“Tabela 2, conclusão”

<b>Compostos (%)</b>	<b>PH16 (TI)</b>	<b>PH16 (TF)</b>	<b>PH16 Ino (TI)</b>	<b>PH16 Ino (TF)</b>
<b>Diethylsuccinate</b>	6,44	nd	1,25	nd
<b>Aldeídos</b>				
<b>Acetaldehyde</b>	0,07	0,39	0,57	0,13
<b>Hexanal</b>	9,02	0,19	1,10	0,25
<b>Octanal</b>	nd	57,49	nd	7,94
<b>Furfural</b>	nd	nd	0,24	nd
<b>Ácidos</b>				
<b>Butyric acid</b>	3,52	nd	4,83	nd
<b>Hexanoic acid</b>	2,01	nd	0,47	nd
<b>Octanoic acid</b>	nd	0,70	nd	0,17
<b>Decanoic acid</b>	nd	nd	nd	0,50
<b>Outros</b>				
<b>1,1-dietoxyethane</b>	0,14	0,79	4,65	1,18
<b>b-Citronellol</b>	0,09	nd	nd	10,43

Nd - não detectado

O álcool encontrado em maior quantidade foi o metanol, apresentando valores de 21.13% ao final da fermentação do clone PH16 e 17.99% no início do processo do PH 16 inoculado. O composto 1-butanol, também, apresentou uma concentração alta de 17.3% ao final da fermentação do PH 16 inoculado. Álcoois são desejáveis para se obter produtos de cacau com notas florais e doces (ACULEY et al., 2010; FRAUENDORFER; SCHIEBERLE, 2008). Outros compostos, como 3-metil-1-butanol e 2,3-butanodiol foram encontrados em ambos os processos fermentativos e, também, são desejáveis para a obtenção de produtos de cacau de alta qualidade (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Em relação à produção de ésters, os compostos encontrados em maior concentração foram acetato de isoamilo, com porcentagem relativa de 56% no início da fermentação e o acetato de etilo 23.65% ao final do processo (156 horas), ambos no PH 16 inoculado. A produção destes compostos pode estar relacionada ao metabolismo de leveduras, durante a fermentação de cacau, o que

explica as maiores concentrações obtidas no PH 16 inoculado. A esterificação de amilo álcoois para acetatos de amilo pode ser utilizada como um índice de fermentação (OBERPARLEITER; ZIEGLEDER, 1997; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011) e produz notas de malte e de chocolate (AFOAKWA et al., 2008).

De acordo com Dajanta, Apichartsrangkoon e Chukeatirote (2011), compostos como acetato de etilo e acetato de isobutilo encontrados neste estudo, estão presentes na fermentação espontânea de alguns produtos e são correlacionados com aromas de frutas tais como maçã, banana e abacaxi. A produção do éster fenil-etil acetato produz aromas florais de cacau e notas com sabor de mel (ACULEY et al., 2010; FRAUENDORFER; SCHIEBERLE, 2008), sendo essas características benéficas para a qualidade do cacau.

As maiores concentrações de aldeído encontradas foram 57.49% de octanal ao final da fermentação e 9.02% de hexanal no início do processo, ambos presentes no clone PH16. Alguns aldeídos foram formados durante a fermentação do PH16 e PH16 inoculado, como o octanal e detectados no final do processo (156 horas), enquanto outros como o hexanal, foram consumidos e detectados em menor concentração no final da fermentação. O acetaldeído foi encontrado em ambos os processos, com porcentagens variando de 0,07 a 0,57%. De acordo com Blandino et al. (2003), este composto é normalmente formado durante a fermentação de alimentos e em bebidas à base de cereais. O aldeído furfural foi apenas detectado no PH 16 inoculado, no início da fermentação, na concentração de 0,24%. Furfurais estão praticamente onipresentes em alimentos e são formados baseados na hidrólise ácida ou aquecimento de polissacarídeos que contêm fragmentos de pentoses e hexoses (LAKE et al., 2011). Este composto é comum em alimentos, incluindo cacau, café, bebidas alcoólicas, frutas, legumes e pão (ADAMS et al., 1997). Aldeídos

são favoráveis para a qualidade do cacau, produzindo notas frutadas e florais (SERRA-BONVEHÍ, 2005).

Os ácidos quantificados, durante as duas fermentações, foram ácido butírico, ácido hexanoico e ácido octanoico, enquanto o ácido decanoico foi encontrado apenas no PH16 inoculado. O ácido predominante no processo foi o ácido butírico, apresentando concentrações máximas de 3.52% e 4.83% no início da fermentação do clone PH16 e PH16 inoculado, respectivamente (tabela 2). Este ácido produz sabores desagradáveis, de ranço e manteiga (SERRA-BONVEHÍ, 2005). O ácido isobutírico é produzido por *Bacillus* spp. no final do processo fermentativo, e o excesso de fermentação aumenta a concentração deste ácido e as suas notas de sabor indesejadas (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011).

Outros compostos, como o terpeno b-Citronellol, foi encontrado nas concentrações de 0,09% e 10,43% no PH 16 e PH 16 inoculado, respetivamente. Os terpenos podem ser liberados por  $\alpha$ -glicosidases de leveduras, durante o processo de fermentação (KING; DICKINSON, 2003) e são considerados fator de qualidade positiva, porque contribuem com o aroma floral em alimentos e bebidas (CALLEJA; FALQUE, 2005). Essa diferença encontrada pode ser explicada em razão do fato do PH 16 inoculado apresentar maior população de leveduras durante o processo fermentativo.

#### **4.8 Análise sensorial dos chocolates**

O perfil de dominância temporal das sensações (TDS) das duas amostras de chocolate em estudo está demonstrado nas figuras 17 e 18. O chocolate produzido com o clone de cacau PH16 apresentou, de forma significativa, somente o gosto amargo como dominante durante todo o tempo de ingestão (Figura 17). Observou-se um aumento crescente da percepção do amargor até

12s do teste, quando atingiu uma taxa de dominância de 0,28, permanecendo com um comportamento constante até aproximadamente 25s, quando se observou um novo aumento da taxa de dominância da percepção do amargor. Com 30s de ingestão do chocolate, ocorreu maior taxa de dominância (0,44), com ligeira queda até o final do teste sensorial.

Embora não significativo, a percepção da doçura, acidez, adstringência e sabor de cacau foram percebidos pelos provadores, situando-se acima da linha do acaso em determinados momentos da avaliação sensorial do chocolate.

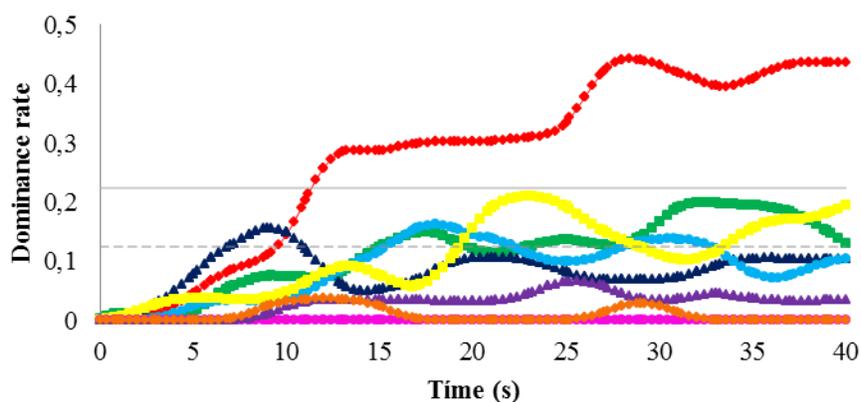


Figura 17 Representação gráfica do perfil de dominância temporal das sensações da amostra de chocolate do clone de cacau PH16. Os atributos avaliados foram: amargo (♦), ácido (■), doce (▲), adstringente (●), sabor de cacau (■), fruta (●), madeira/tabaco (▲) e ausência de sabor (♦) e as linhas representadas significam 'nível do acaso' (---) e 'nível de significância' (---)

Houve diferença no perfil sensorial temporal do chocolate PH16 inoculado quando comparado ao PH16. Nos chocolates produzidos com PH16 inoculado, observou-se, também, o amargor como percepção predominante, entretanto, outros atributos foram, também, percebidos, não só acima da linha do

acaso, mas, significativamente, como a acidez e a adstringência, os quais não foram significativos no perfil sensorial do chocolate PH16.

Observou-se no PH 16 inoculado uma ascensão na taxa de dominância do amargor ao longo do tempo de análise atingindo o valor máximo de 0,404 ao final do teste sensorial. A inoculação realçou a percepção de adstringência e acidez nos chocolates. No período de 18 a 22s, a adstringência foi percebida, significativamente, em conjunto com a percepção do amargor sendo a taxa máxima de percepção do gosto adstringente de 0,26. No período de 28 a 33s de ingestão, observou-se significativamente a percepção da acidez em conjunto à percepção do amargor sendo a taxa máxima de 0,24 (Figura 18).

A volatilização desejada de ácidos como o acético, formados durante a fermentação, pode não ter ocorrido satisfatoriamente no PH16 inoculado, afetando o sabor do chocolate obtido com base nesse material (EFRAIM et al., 2010). 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.

O atributo sabor de cacau não foi percebido, significativamente, nos chocolates PH16 e PH16 inoculado, mas no período próximo a 25s de ingestão foi percebido pelos provadores acima da linha do acaso. É interessante observar que a inoculação suprimiu ligeiramente a percepção do sabor de cacau, pois nos chocolates PH16 inoculado, a taxa máxima de dominância do sabor de cacau (0,18) foi inferior à percebida nos chocolates PH16 (0,21) (Figuras 17 e 18).

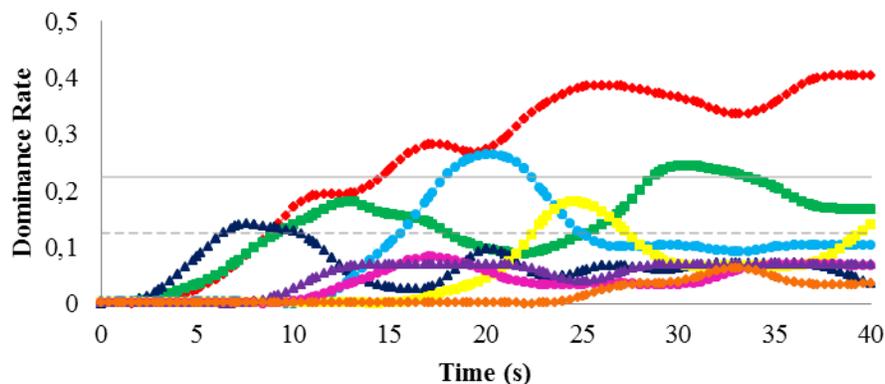


Figura 18 Representação gráfica do perfil de dominância temporal das sensações da amostra de chocolate do clone de cacau PH16 inoculado. Os atributos avaliados foram: amargo (♦), ácido (■), doce (▲), adstringente (●), sabor de cacau (■), fruta (●), madeira/tabaco (▲) e ausência de sabor (◆) e as linhas representadas significam ‘nível do acaso’ (---) e ‘nível de significância’ (—)

O sabor do chocolate é uma combinação única dos atributos aroma, gosto e textura (LAWLESS; HILDEGARDE, 1998). Para o completo desenvolvimento dessa combinação, as etapas de fermentação, torração e conchagem são de extrema importância (HOSKIN; DIMICK, 1994). A inoculação do clone de cacau PH 16 com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* acelerou a fermentação das amêndoas de cacau, em função do rápido metabolismo dos açúcares e ácido cítrico presentes na polpa e nas amêndoas, porém a qualidade sensorial dos chocolates foi afetada negativamente, por causa de uma menor taxa de dominância do sabor de cacau, associada às características indesejáveis de amargor, adstringência e acidez apresentadas no produto.

## 5 CONCLUSÕES

A inoculação do clone de cacau PH16 acelerou o processo fermentativo em 24 horas, mas afetou, negativamente, a qualidade sensorial do chocolate obtido. No presente trabalho sugere-se que, em estudos futuros, novas combinações entre diferentes cepas de leveduras e bactérias possam ser testadas com o intuito de melhorar não só o processo fermentativo, mas também a qualidade do produto final.

Diferentes espécies foram identificadas por métodos dependente e independente de cultivo, o que mostra a importância da combinação de ambas as técnicas para uma melhor compreensão da comunidade microbiana presente durante a fermentação de cacau. A técnica MALDI-TOF mostrou ser uma boa ferramenta para auxiliar na identificação de microrganismos de uma forma geral.

Um estudo detalhado das mudanças físico-químicas e sensoriais, durante a fermentação espontânea de híbridos de cacau, foi essencial para observar as possíveis diferenças encontradas com a inoculação, bem como estudar cepas que apresentem potencial para serem usadas como culturas iniciadoras na produção de cacau de alta qualidade.

## REFERÊNCIAS

- ACULEY, P. et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 6, p. 300–307, Aug. 2010.
- ADAMS, T. B. et al. The FEMA GRAS assessment of furfural used as a flavor ingredient. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 739–751, Aug. 1997.
- AFOAKWA, E. O. et al. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, n. 9, p. 1–18, Oct. 2008.
- AMERINE, M. A.; PANGBORN, R. M.; ROESSLER, E. B. **Principles of sensory evaluation of food**. New York: Academic Press, 1965.
- AMIN, I. et al. Analysis of vicilin (7S)- class globulin in cocoa cotyledons from various genetic origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 28-732, Jan. 2002.
- ARDHANA, M. M.; FLEET, H. G. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 87-99, Sept. 2003.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Ed.). **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 1–66.
- BARTLEY, B. G. A review of cacao improvement: fundamental methods and results. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL WORKSHOP ON COCOA BREEDING STRATEGIES, 1994, Malasyia. **Proceedings...** Malaysia: Kualla Lumpur, 1994. p. 16.
- BATALHA, P. G. **Caracterização do cacau catongo de São Tomé e Príncipe**. 2009. 106 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos – Tecnologia de Produtos Vegetais) - Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2009.
- BECKETT, S. T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate**. Zaragoza: Editorial Acribica, 1994.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4. ed. London: Chapman and Hall, 2009.

BERNARDI, T. L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaça: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 2405-2412, Nov. 2008.

BLANDINO, A. et al. Review: cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, Amsterdam, v. 36, p. 527–543, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cacau: informações de mercado**. Brasília: Mapa, 2011.

BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 3-38, June 1996.

CALLEJA, A.; FALQUÉ, E. Volatile composition of Mencía wines. **Food Chemistry**, London, v. 90, n. 3, p. 357–363, May 2005.

CAMU, N. et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 6, p. 1809-1824, Mar. 2007.

CAMU, N. et al. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 13, p. 2288–2297, Oct. 2008.

CARR, J. G.; DAVIES, P. A. **Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia (part 2): further microbiological methods and results**. Bristol: Long Ashton Research Station, 1980.

CARR, J. G.; DAVIES, P. A.; DOUGAN, J. **Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia**. London: Tropical Products Institute, 1979.

CHEN, H.- C.; WANG, S. Y.; CHEN, M.- J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 492-501, May 2008.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1169–1175, Apr. 2010.

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

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, n. 1, p. 81-87, Aug. 2000.

COUNET, C. et al. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 20, p. 6243- 6249, Jan. 2004.

CROSS, E. Cocoa flavor development. **The Manufacturing Confectioner**, Chicago, v. 79, n. 2, p. 70-77, 1999.

CRUZ, C. L. C. V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de microondas**. 2002. 101 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002.

CRUZ, J. F. M. **Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobromacacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem**. 2012. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

DAJANTA, K.; APICARTSRANGKON, A.; CHUKEATIROTE, E. Volatile profiles of thuanao, a Thai fermented soy product. **Food Chemistry**, London, v. 125, n. 2, p. 464–470, Mar. 2011.

DANIEL, H. M. et al. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 9, p. 774–783, May 2009.

DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J. Family VI. *Acetobacteraceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**: volume 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 267-278.

DIRCKS, H. D. **Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour**. 2009. 249 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - University of New South Wales, Sidney, 2009.

DRYSDALE, G. S.; FLEET, G. H. Acetic acid bacteria in winemaking: a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 2, p. 143–154, 1988.

DUARTE, W. F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jabuticaba and umbu. **Food Science and Technology**, Mysore, v. 43, n. 10, p. 1564–1572, Dec. 2010.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, por meio da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. 208 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. 126 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

EFRAIM, P. et al. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 142-150, 2010.

EFRAIM, P. et al. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacau de diferentes genótipos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 4, p. 229-236, out./dez. 2006.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 297-314. Mar. 2004.

FARROW, J. **Chocolate receitas doces e salgadas**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site>>. Acesso em: 10 set. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Production yearbook**: volume 54. Rome: FAO, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual for foods**. 3. ed. Washington: Department of Health Education and Welfare, 1972.

FRANCO, A. **De caçador a gourmet**: uma história da gastronomia. 3. ed. São Paulo: Senac, 2001.

FRAUENDORFER, F.; SCHIEBERLE, P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 21, p. 10244–10251, Oct. 2008.

FREEMAN, W. E. Some aspects of the cocoa breeding programme. **Proceedings of the Agricultural Society of Trinidad and Tobago**, Porto of Spain, v. 69, p. 1-15, Dec. 1968.

GUITTARD, G. W. Origin cocoa: vive la différence. **Manufacturing Confectioner**, Chicago, v. 85, n. 9, p. 81-84, 2005.

HANSEN, C. E. et al. Comparison of enzyme activities involved in flavour precursor formation in unfermented beans of different cocoa genotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 8, p. 1193-1198, June 2000.

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

HERME, P. **Larousse do chocolate**. São Paulo: Larousse, 2006.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HOSKIN, J. C.; DIMICK, P. S. Chemistry of flavour development in chocolate. In: BECKETT, S. T. (Ed.). **Industrial chocolate manufacture and use**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 102-116.

HUMPHRIES, E. C. Some problems of cacao fermentation. **Tropical Agriculture**, Surrey, v. 21, n. 9, p. 166-169, 1944.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **ICCO quarterly bulletin of cocoa statistics**. Disponível em: <[http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/30-related-documents/46-statistics-production.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html)>. Acesso em: 18 dez. 2012.

JESPERSEN, L. et al. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, n. 4-5, p. 441-453, Feb. 2005.

KIM, T. W. et al. Analysis of microbial communities in *doenjang*, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 2-3, p. 265-271, May 2009.

KING, A. J.; DICKINSON, J. R. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 53-62, Mar. 2003.

KIRCHOFF, G. et al. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, n. 5-6, p. 853-862, May 1997.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, J. **The yeasts, a taxonomic study**. 5. ed. New York: Elsevier, 2011.

LABBE, D. et al. Temporal dominance of sensations and sensory profiling: a comparative study. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 20, n. 3, p. 216-221, Apr. 2009.

LAGUNES-GALVEZ, S. et al. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 124–130, Feb. 2007.

LAJUS, B. **Estudo de alguns aspectos da tecnologia do cacau**. 1982. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

LAKE, B. G. et al. Lack of effect of furfural on unscheduled DNA synthesis in the in vivo rat and mouse hepatocyte DNA repair assays and in precision-cut human liver slices. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 999–1011, Oct. 2011.

LAWLESS, H. T.; HILDEGARDE, H. **Sensory evaluation of food principles and practices**. New York: Chapman & Hall, 1998.

LE RÉVÉREND, F. M. et al. Comparison between temporal dominance of sensations and time intensity results. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 19, n. 2, p. 174–178, Mar. 2008.

LEFEBER, T. et al. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 23, p. 7708–7716, Dec. 2010.

LEHRMAN, D. W.; PATTERSON, G. R. Cocoa fermentation. In: REED, G. (Ed.). **Biotechnology, a comprehensive treatise**: volume 5. Basel: Verlag Chemie, 1983. p. 529–575.

LENFANT, F. et al. Perception of oral food breakdown. The concept of sensory trajectory. **Appetite**, London, v. 52, n. 3, p. 659–667, June 2009.

LIMA, N. et al. Modern polyphasic methods that include MALDI-TOF analyses for fungal identifications and authentications. In: ANNUAL GENERAL MEETING OF THE EUROPEAN CULTURE COLLECTIONS ORGANISATION, 27., 2008, Belgium. **Proceedings...** Belgium: ECCO, 2008. p. 11.

LIMA, R. Gastronomia com pouco açúcar. **Revista Veja**, São Paulo, v. 4, n. 9, p. 82-84, jan. 2008.

LIMA-NETO, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 515-522, Aug. 2014.

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

LOPES, U. V. et al. Cacao breeding in Bahia, Brazil: strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 73-81, June 2011.

LOPEZ, A. Factors associated with cacao bean acidity and the possibility of its reduction by improved fermentation. **Revista Theobroma**, Itabuna, v. 13, n. 3, p. 233-248, 1983.

LOPEZ, A. S.; QUESNEL, V. C. Volatile fatty acid production in cação fermentation and the effect on chocolate flavour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 24, n. 3, p. 319-324, Mar. 1973.

LOPEZ, A. S.; MCDONALD, C. R. Preliminary test of a simple and inexpensive system for the mechanical aeration of box-type cacao fermentation. **Revista Theobroma**, Itabuna, v. 13, n. 3, p. 233-248, Mar. 1982.

LUNA, F. et al. Chemical composition and sabor of ecuadorian cocoa liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 12, p. 3527-3532, June 2002.

MACFIE, H. J. et al. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, Westport, v. 4, n. 2, p. 129-148, Sept. 1989.

MAGALHÃES, K. T. et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1241-1250, July 2010.

MANDARINO, E. P.; GOMES, A. R. S. **Produtividade do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) cultivados em blocos monoclonais, no sul da Bahia, Brasil**. Ilhéus: CEPLAC, 2009.

- MARTINI, M. H. **Caracterização das sementes de seis espécies de Theobroma em relação ao Theobromacacao L.** 2004. 98 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.
- MATTIETO, R. A. **Estudo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau (Theobroma cacao L.) e cupuaçu (TheobromagrandifloriumSchum).** 2001. 139 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2001.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques.** 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 1999.
- MEILLON, S. et al. Impact of partial alcohol reduction in Syrah wine on perceived complexity and temporality of sensations and link with preference. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 21, n. 7, p. 732–740, Oct. 2010.
- MEYER, S. A. DNA reassociation and protein electrophoresis useful tools to evaluated yeasts. In: KURTZMAN, C. P. et al. **Leveduras para biotecnologia:** Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1991. p. 01-49.
- MIGUEL, M. G. C. P. et al. Physico-chemical and microbiological characterization of corn and rice ‘calugi’ produced by Brazilian Amerindian people. **Food Research International**, Barking, v. 49, n. 1, p. 524–532, Nov. 2012.
- MOREIRA, I. M. V. et al. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (Theobroma cacao L.) hybrids. **Food Research International**, Barking, v. 54, n. 1, p. 9–17, Nov. 2013.
- NASCIMENTO, H. S. S. O. **Melhoria do aroma de chocolate, por tratamento enzimático, em amêndoas de cacau de baixa qualidade.** 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.
- NDOYE B, et al. Thermoresistant properties of acetic acid bacteria isolated from tropical products of sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 4, p. 916-923, Aug. 2006.

- NIELSEN, D. S. et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p.168–186, Mar. 2007.
- NIELSEN, D. S. et al. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analyzed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast**, Chichester, v. 22, n. 4, p. 271-284, Mar. 2005.
- NIELSEN, D. S.; SNITKJAER, P.; VAN DEN BERG, F. Investigating the fermentation of cocoa by correlating denaturing gradient gel electrophoresis profiles and near infrared spectra. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 133–140, July 2008.
- NOOR-SOFFALINA, S. S. et al. Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavor precursors in a lipidic model system. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 168-180, Jan. 2009.
- NUNES, C. A.; PINHEIRO, A. C. M. **SensoMaker**: version 1.0. Lavras: Editora da UFLA, 2012.
- OBERPARLEITER, S.; ZIEGLER, G. Amyl alcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 204, n. 2, p. 156–160, Feb. 1997.
- OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006.
- OUATTARA, H. G. et al. Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 9, p. 1753–1760, Sept. 2008.
- OVREAS, L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3367–3373, Sept. 1997.
- PAL, D.; SACHDEVA, S.; SINGH, S. Methods for determination of sensory quality of foods: a critical appraisal. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 32, n. 5, p. 357- 367, 1985.

PAPALEXANDRATOU, Z. et al. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 28, n. 5, p. 964-973, Aug. 2011a.

PAPALEXANDRATOU, Z. et al. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. **Food Microbiology**, London, v. 35, n. 2, p. 73-85, Sept. 2013.

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

PARKOUDA, C. et al. Microorganisms associated with Maari, a baobab seed fermented product. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 142, n. 3, p. 292-301, Sept. 2010.

PASSOS, F. M. L. et al. Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 1, p. 205–208, Jan. 1984.

PEREIRA, L. et al. MALDI-TOF ICMS: capability, potentiality and limits in the fast identification of *Trichophyton rubrum* from clinical cases occurrence in Portuguese Health Centres. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 16, Supl. 2, p. 530, 2010.

PEREIRA, G. V. M. et al. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 15, p. 5395–5405, Aug. 2012.

PEREIRA, G. V. M. et al. Multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, New York, v. 62, n. 2, p. 405-417, Feb. 2012a.

PEREIRA, G. V. M. et al. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 121–133, Feb. 2013.

PETISCA, C. et al. Impact of cooking and handling conditions on furanic compounds in breaded fish products. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 55, p. 222-228, May 2013.

PINEAU, N. et al. Temporal dominance of sensations: construction of the TDS curves and comparison with time–intensity. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 20, n. 6, p. 450-455, Sept. 2009.

PINEAU, N. et al. Temporal dominance of sensations: what is a good attribute list? **Food Quality and Preference**, Barking, v. 26, n. 2, p. 159-165, Dec. 2012.

PIRES, J. L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento de cacauero com ênfase na produtividade, qualidade dos frutos e resistência à doenças**. 2003. 226 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

RAMOS, C. L. et al. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 240, n. 2-3, p. 225-231, June 2010.

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

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

ROELOFSEN, P. A. Fermentation drying and storage of cocoa beans. **Advances in Food Research**, San Diego, v. 8; p. 226-229, 1958.

ROHAN, T. A. Processing of raw cocoa: II- uniformity in heap fermentation and development of methods for rapid fermentation of West Africa amelonado cocoa. **Journal of Food Agriculture**, Helsinki, v. 9, n. 9, p. 542-555, Sept. 1958.

SAMAH, A. O. et al. Fermentation studies of stored cocoa beans. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 603-604, Sept. 1993.

SANCHEZ, J. et al. A study of the yeast flora and the effect of pure culture seeding during the fermentation of cocoa beans. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, London, v. 18, n. 2, p. 69-76, 1985.

SANTOS, C. et al. Filamentous fungal characterisations by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 375-385, Feb. 2010.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 1, p. 1-17, Jan. 2004.

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

SCHWAN, R. F. et al. Characterization and distribution of aerobic, spore-forming bacteria from cacao fermentations in Bahia. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n. 6, p. 1583-1584, Nov. 1986.

SCHWAN, R. F. et al. Influência da frequência e intervalos de revolvimentos sobre a fermentação de cacau e qualidade do chocolate. **Revista Agrotrópica**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 22-31, jan./abr. 1990.

SCHWAN, R. F.; ROSE, A. H.; BOARD, R. G. Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 79, Supl. 1, p. 96-107, 1995.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 44, n. 4, p. 1-17, May 2004.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 543-551, Aug. 2009.

SERRA, W. S. **Manual do cacauicultor**: com perguntas e respostas. [S.l.: s.n], 2004.

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

SHRIPAT, C. et al. A preliminary evaluation of three fermentation regimes on the quality of Trinidad & Tobago cocoa assessed via the Cut Test. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Salvador: MALMR, 1996. p. 1-13.

SILVA, F. S. **Variabilidade patogênica de *Moniliophthora perniciosa* em três agrossistemas da região cacaueteira baiana**. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2009.

SOARES, M. S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacão (*Theobromacacao L.*) através da ação enzimática durante a fermentação**. 2001. 121 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

SOUZA, A. S. L. **Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de chocolates amargos**. 2010. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

SOUZA, V. R. et al. Analysis of various sweeteners in petit Suisse cheese: determination of the ideal and equivalent sweetness. **Journal of Sensory Studies**, Westport, v. 26, n. 5, p. 339-345, Oct. 2011.

STONE, H.; BLEIBAUM, R. N.; THOMAS, H. A. **Sensory evaluation practices**. 4. ed. New York: Academic Press, 2012.

SUKHA, D. A. et al. The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 226, n. 3, p. 405-413, Jan. 2008.

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

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

THAKERAR, D. O charme químico do chocolate. **Science in School**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 30-34, Fev. 2007.

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

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In: DOYLE, M. J.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p. 721-733.

THORTON, P. The U.S chocolate market: current and future. **Manufacturing Confectioner**, Chicago, v. 87, n. 9, p. 35-40, Sept. 2007.

TUCCI, M. L. S. **Seleção de genótipos para produção de manteiga de cacau no Vale do Ribeira**. 1997. 120 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

VAN BEEK, S.; PRIEST, F. G. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisk fermentation: a polyphasic study. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 1, p. 297-305, Jan. 2002.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 407-438, June 1996.

WEISBURG, W. G.; GIOVANNONI, S. J.; WOESE, C. R. The deinococcus-thermus phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 11, n. 2, p. 128-34, Mar. 1999.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221-271, June 1987.

ZAMALLOA, W. A. C. **Caracterização físico-química e avaliação de metilpirazinas no desenvolvimento do sabor, em dez cultivares de cacau (Theobromacacao L.) produzidos no Estado de São Paulo**. 1994. 123 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.