

A Fermentação do cacau e o uso de inóculos leveduriformes

Cocoa fermentation and the use of yeast inoculum

DOI:10.34117/bjdv8n4-245

Recebimento dos originais: 21/02/2022

Aceitação para publicação: 31/03/2022

Adriana Barros de Cerqueira e Silva

Doutora em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos

Instituição: Universidade Estadual de Santa Cruz

Endereço: Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus-BA

E-mail: adrianabarroscs@hotmail.com

Eric de Lima Silva Marques

Doutor em Genética e Biologia Molecular

Instituição: Universidade Estadual de Santa Cruz

Endereço: Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus-BA

E-mail: marques.ericls@gmail.com

Rachel Passos Rezende

Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Instituição: Universidade Estadual de Santa Cruz

Endereço: Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus-BA

E-mail: rachel@uesc.br

RESUMO

O interesse no cultivo do cacau está relacionado ao aproveitamento de suas sementes para produção de manteiga de cacau e de chocolate. Dentre as etapas do seu pré-processamento, a fermentação é crucial para a qualidade do produto final, por ser o período responsável pelo desenvolvimento dos precursores de inúmeros compostos de sabor, um importante passo para a diminuição da adstringência, acidez e amargor da amêndoa de cacau. As leveduras apresentam papel fundamental como iniciadoras desse processo; desde os primeiros relatos a respeito dos microrganismos serem iniciadores da fermentação espontânea do cacau, esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de uma cultura *starter*, na tentativa de melhor controlar o processo e, conseqüentemente, obter um produto final com maior qualidade. Diante do exposto, a presente revisão de literatura visou reunir trabalhos que utilizaram inóculo de leveduras combinadas ou não com outros microrganismos como iniciadoras da fermentação do cacau. De modo geral, notou-se uma falta de padronização na execução desse processo, especialmente no que tange a parâmetros como a quantidade de inóculo e o veículo de inoculação, bem como o tamanho do cocho. Além disso, observou-se também uma variação da eficiência do inóculo frente ao cultivar estudado. Por não se mostrar viável a criação um inóculo padrão para a fermentação do cacau, a tendência é que esses inóculos sejam regionais e potencialmente associados a uma variedade específica da planta, além de possivelmente apresentar resultados melhores de acordo com a época da colheita (safra principal ou safra

temporã). É possível ainda que sejam desenvolvidas estratégias para inoculação em *mix* de variedades, como por exemplo utilizando uma combinação de inóculos de leveduras (múltiplas espécies) ao invés de uma única linhagem.

Palavras-chave: cultura *starter*, leveduras, fermentação espontânea.

ABSTRACT

The interest in cocoa cultivation is related to the use of its seeds for the production of cocoa butter and chocolate. Among the stages of its pre-processing, fermentation is crucial for the quality of the final product, as it is the period responsible for the development of precursors of numerous flavor compounds, an important step to reduce the astringency, acidity, and bitterness of the cocoa almonds. Yeasts play a fundamental role as a starter of this process; since the first reports about microorganisms being initiators of spontaneous cocoa fermentation, efforts have been made to develop a starter culture, in an attempt to better control the process and, consequently, obtain a higher quality final product. In view of the above, the present literature review aimed to gather works that used yeast inoculum combined or not with other microorganisms as initiators of cocoa fermentation. In general, there was a lack of standardization in the execution of this process, especially with regard to parameters such as the amount of inoculum and the inoculation vehicle, as well as the size of the trough. In addition, there was also a variation in the inoculum efficiency against the cultivar studied. As it is not feasible to create a standard inoculum for cocoa fermentation, the tendency is that these inoculums are regional and potentially associated with a specific variety of the plant, in addition to possibly presenting better results according to the harvest season (Safrá Principal ou safrá temporã). It is also possible that strategies are developed for inoculation in a mix of varieties, such as using a combination of yeast inoculum (multiple species) instead of a single strain.

Keywords: starter culture, yeasts, spontaneous fermentation.

1 INTRODUÇÃO

O cacau é uma planta da família *Malvaceae*, da espécie *Theobroma cacao* L., e o interesse em seu cultivo está relacionado ao aproveitamento de suas sementes (amêndoas) para produção de manteiga de cacau e de chocolate (ALVES, 2002). Normalmente seu cultivo ocorre onde o clima apresenta pequenas variações durante o ano, chuvas regulares, precipitação anual entre 1500 e 2000 mm e temperatura média de 25°C. No Brasil o cacau possui duas safras: a temporã (março a agosto) e a principal (setembro a fevereiro) (PEREIRA et al., 1990; SILVA NETO, 2001).

As amêndoas de cacau são revestidas por uma película denominada testa e por uma polpa mucilaginosa adocicada (BECKETT, 1994; MARTINI, 2004; BATALHA, 2009). A polpa é constituída por um parênquima de células esponjosas mucilaginosas contendo água, frutose, glicose, sacarose, pentosanas, ácido cítrico, proteínas e vários sais

inorgânicos, enquanto a testa secreta a mucilagem e atua como via de transporte entre a polpa e o cotilédone, localizado no interior da semente. Este último apresenta células contendo reservas proteicas, lipídeos, amido e células polifenólicas. Além disso, as sementes apresentam também um grande e único vacúolo preenchido por polifenóis, responsáveis pela cor dos cotilédones (MARTINI, 2004); tal vacúolo é lisado durante a fermentação (URBANSKI, 1992). Quanto às proteínas, o principal destaque no cacau é para a fração globulina (VOIGT e BIEHL, 1995).

A qualidade das amêndoas de cacau está diretamente ligada a diversos fatores, tais como qualidade do solo, variedade do cacauzeiro, manejo da lavoura e cuidado pós-colheita. Desta forma, a maneira como o responsável técnico lida com o fruto será determinante para a formação de características sensoriais agradáveis ou não, e consequentemente determinará o valor agregado que esse produto terá no mercado. Por causa disso, é necessária a avaliação dos parâmetros físicos, químicos e organolépticos que permitem determinar a qualidade em relação à variedade e ao meio ambiente (BRUNETTO et al, 2007).

As etapas do pré-processamento do cacau incluem o plantio, a colheita, a quebra do fruto, a fermentação e a secagem. Dentre elas, a fermentação é crucial para a qualidade do produto final, por ser o período responsável pelo desenvolvimento dos precursores de inúmeros compostos de sabor (SCHWAN, 1998); aqui, o tipo de sistema, a temperatura do ambiente e da massa, o pH e a acidez da polpa e do cotilédone, o tempo de processo, o revolvimento da massa bem como a microbiota presente são fatores de grande importância (ROHAM e CONNEL, 1964; LOPEZ e QUESNEL, 1973). Huang e Barringer (2010) descrevem a fermentação como um importante passo para a diminuição da adstringência, acidez e amargor da amêndoa de cacau, além de ser a etapa formadora de açúcares redutores e aminoácidos, ambos precursores da reação de Maillard durante a posterior torração.

O tempo de fermentação também irá variar de acordo com a variedade genética do fruto, o peso da massa de cacau e a temperatura ambiente. Entretanto, em geral, para que ocorram as reações capazes de gerar compostos precursores de aroma e sabor característicos do chocolate, o processo espontâneo costuma levar mais de cinco dias (BECKETT, 1994), não devendo ultrapassar 8 dias devido à decomposição proteica e consequente liberação de amônia que leva à obtenção de um chocolate com odores e sabores estranhos (OETTERER, 2006). Tal processo é conhecido como sobrefermentação.

Segundo Schwan e Wheals (2004) o processo de fermentação pode ser dividido em três fases. Na primeira fase ocorre a ação de leveduras, que transformam o açúcar em álcool nas primeiras 24-36h, sob “condições anaeróbicas” em um pH abaixo de 4,0. Nesta fase começa a morte do embrião da semente, causada pela presença de ácido acético e álcool; é a partir deste momento que as sementes podem começar a ser chamadas de amêndoas de cacau. Normalmente a partir do segundo dia até o final do processo realiza-se o revolvimento da massa para que a temperatura não ultrapasse o intervalo de 45°C a 50°C e favoreça a ação das enzimas. Em relação aos revolvimentos, estes podem acontecer de um cocho para o outro ou de um local para o outro (quando o processo for efetuado em montes), e tem por finalidade uniformizar a temperatura e oxigenar a massa (OETERRER, 2006).

Na segunda fase ocorre a ação das bactérias lácticas, que estão presentes desde o início da fermentação mas só se tornam dominantes no período entre 48 e 96h. Este grupo microbiano converte açúcares e alguns ácidos orgânicos em ácido lático. Por volta do terceiro dia, a massa das amêndoas tem sua temperatura elevada entre 45 e 50°C; nessa fase há uma difusão dos conteúdos celulares, iniciando-se uma série de reações relacionadas com as alterações de sabor, aroma e cor da semente.

Na terceira fase ocorre a ação das bactérias acéticas responsáveis pela conversão do álcool em ácido acético. O tegumento se torna permeável, fazendo com que as amêndoas sofram a ação das enzimas. Ressalta-se aqui a oxidação dos polifenóis que podem ou não formar complexos com as proteínas e peptídeos, levando à redução da adstringência e do amargor.

O cacau pode ser fermentado de várias formas: empilhado, em cochos (caixas de madeira quadradas ou circulares), em caixas de materiais alternativos (isopor ou plástico) e até em bandejas. No sul da Bahia, tradicionalmente, utilizam-se cochos quadrados de madeira (FERREIRA, 2017) internamente forrados com folhas de bananeira. Ainda segundo a mesma autora, é importante observar as dimensões do cocho (que devem ser compatíveis com a produtividade da fazenda) e o tipo de madeira, que deve ser seca, não-porosa, e que não transfira odores desagradáveis para a massa de cacau.

Imediatamente após a fermentação deve-se iniciar o processo de secagem, que não deve ser lento ou malconduzido visando evitar o desenvolvimento de fungos que, quando presentes, conferem sabor desagradável ao produto final. Por outro lado, a secagem não deve ser efetuada de forma demasiadamente rápida através do emprego de temperaturas elevadas, para evitar problemas com a gordura (manteiga de cacau) e com o

desenvolvimento do sabor do chocolate (EFRAIM, 2004). A secagem pode ser conduzida de forma natural ou artificial; a natural, ao sol, é uma técnica simples e de fácil execução, onde o cacau é disposto em barcaças (bandejas fixas de madeira com tetos móveis) e é periodicamente revolvido. Caso o período de secagem coincida com período de chuva, a secagem pode ser feita então em estufas ou utilizando secadores artificiais, através do calor da queima de madeira ou outros combustíveis (CRUZ, 2002). Entretanto, é sabido que esse tipo de secagem pode gerar aromas indesejáveis, como o de fumaça.

Além da eliminação da água, a secagem do cacau dá continuidade às mudanças bioquímicas iniciadas na fermentação, que vão contribuir para o sabor e aroma característicos do chocolate, bem como reduzir a acidez das amêndoas. Tal processo deve ser conduzido de forma que se obtenha um teor de umidade em torno de 7%. A secagem excessiva torna a casca quebradiça, enquanto que o excesso de umidade favorece o desenvolvimento de fungos (LOPES, 2000).

2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FERMENTAÇÃO DO CACAU

A atividade enzimática em amêndoas de cacau durante a fermentação é conhecida e estudada pelo menos desde a segunda metade do século XX. A confiabilidade e comparação das atividades das enzimas do cacau são complicadas devido a variações causadas por diferentes genótipos, origem geográfica, métodos de fermentação utilizados e tipos de cochos empregados (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998). A ação de enzimas sobre os carboidratos, proteínas e polifenóis, aliados à ação de microrganismos presentes na polpa, são os precursores do aroma e sabor do cacau.

Diferente de outras matérias-primas fermentadas, aqui as enzimas endógenas desempenham um papel crucial nesse desenvolvimento (LEHRMAN e PATTERSON, 1983). A fermentação e consequente morte das sementes facilitam a atuação das referidas enzimas, principalmente pelo acesso ao substrato. Entretanto, embora a ação das enzimas endógenas durante a fermentação do cacau tenha sido evidenciada há muitos anos, existem ainda poucos estudos sistemáticos abordando o comportamento entre diferentes cultivares de cacau (HANSEN; DEL OLMO; BURRI, 1998).

As principais enzimas que atuam na fermentação do cacau compreendem as proteases, a polifenoloxidase, a invertase, a glicosidase e a β -galactosidase, cujos substratos preferenciais são, respectivamente, as proteínas, os polifenóis (epicatequina), a sacarose e os glicosídeos 3- β -galactosidilcianidina e 3- α -arabinosidilcianidina (LOPEZ, 1986). Ainda segundo o mesmo autor, de acordo com suas particularidades, cada enzima

pode atuar em locais distintos (semente, cotilédone ou testa), sob condições preferenciais de temperatura ou pH. Atualmente, estudos demonstram que as reações que possibilitam a formação de precursores de sabor do chocolate são induzidas por enzimas endógenas inerentes às sementes de cacau, que são ativadas após a ruptura da célula e acidificação durante a fermentação (AFOAKWA et al., 2008; BECKETT, 2009; CRUZ et al., 2013). Entretanto, outros pesquisadores em paralelo acreditam que enzimas provenientes de microrganismos também possuem importância no desenvolvimento dos precursores do *flavour* do chocolate (LEVANON e ROSSETINI, 2001).

3 INÓCULO DE LEVEDURAS NA FERMENTAÇÃO DO CACAU

3.1 LEVEDURAS

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, tipicamente esféricos ou ovais; da mesma forma que os fungos filamentosos, as leveduras são amplamente distribuídas na natureza. A palavra levedura em inglês (*yeast*) e seus equivalentes em muitas outras línguas são baseados em palavras que significam “espuma” e “subir”, fazendo referências diretas aos processos de fermentação mais antigos conhecidos pela humanidade (cerveja e pão). Por esse motivo, leveduras são frequentemente pensadas como sendo fungos fermentativos do filo *Ascomycota* semelhantes à *Saccharomyces cerevisiae*; entretanto, a descoberta posterior de que alguns táxons são na verdade membros do filo *Basidiomycota* ampliou a percepção acerca da natureza das leveduras, e estas passaram então a ser vistas como fungos com estágios vegetativos onde a reprodução ocorre por fissura ou brotamento, resultando em um crescimento predominantemente unicelular, e que não incluem um corpo de frutificação em seus estágios sexuais (KURTZMAN, C.; FELL, J.; BOEKHOUT, T., 2011).

3.2 LEVEDURAS NA FERMENTAÇÃO DO CACAU

Desde os primeiros relatos a respeito dos microrganismos serem iniciadores da fermentação espontânea do cacau, esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de uma cultura *starter*, na tentativa de melhor controlar o processo e, conseqüentemente, obter um produto final com maior qualidade (PREYER-BUITENZORG, 1901). O uso de tal inóculo inicial tem sido proposto por uma série de pesquisadores como Crafacck et al. (2013), Leal Jr. et al. (2008), Lefeber et al. (2012) e Schwan (1998), e têm demonstrado sucesso.

Dentre as características utilizadas como possíveis critérios para escolha dos microrganismos a serem inoculados, estão: predominância dos microrganismos na fermentação espontânea (HO et al., 2018; RUGGIRELLO et al., 2019), potencial para aceleração do processo fermentativo (ASSI-CLAIR et al., 2019), diversidade dos microrganismos (após estudos filogenéticos, o autor selecionou um microrganismo de cada gênero identificado) (OOI et al., 2020), e a capacidade de produção de determinadas enzimas (SANTOS et al., 2020). Além disso, podem ser levadas em consideração a resistência dos microrganismos a altas temperaturas, concentrações de etanol e ácidos e, por fim, a degradação da cadeia de pectina que envolve os açúcares da polpa (LEROY e DeVUYST, 2020).

As leveduras apresentam papel fundamental como iniciadoras do processo de fermentação espontânea do cacau. São responsáveis pela degradação do ácido cítrico na polpa, levando a um aumento do pH de 3,5 para 4,2, permitindo o crescimento de bactérias; pela produção de etanol sob condições de baixo teor de oxigênio e alto teor de açúcar, consumido oxidativamente; pela produção de ácidos orgânicos (oxálico, fosfórico, succínico, málico e acético), que penetram e matam o embrião da semente e pela produção de alguns compostos orgânicos voláteis, que podem contribuir como precursores dos compostos formadores do *flavour* do chocolate.

Algumas delas contribuem ainda com a degradação da pectina da polpa, o que facilita a posterior aeração da semente e o crescimento das bactérias ácido-acéticas (HO, 2014). Para melhor entendimento de como os grupos de microrganismos contribuem de forma individual para a fermentação e produção de chocolate, são necessários estudos envolvendo fermentação controlada que integrem análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais. De acordo com Schwan (1998), foram identificadas pelo menos 12 espécies diferentes de leveduras envolvidas na fermentação de cacau, e dentre elas a *Saccharomyces cerevisiae* é a mais abundante.

Durante a fermentação, aminoácidos livres e peptídeos são formados por reações enzimáticas proteolíticas da proteinase aspártica e da carboxipeptidase na proteína (VOIGT et al., 1993, 1994), enquanto os açúcares redutores, como frutose e glicose, são os produtos da hidrólise de sacarose pela invertase (LOPEZ et al. 1978). Rohan e Stewart (1967) sugerem ainda que o perfil de açúcares redutores durante o processo fermentativo está relacionado com o sabor e a qualidade do chocolate produzido. Já Moreira et al. (2013) relacionam mudanças de concentrações dos açúcares redutores na fermentação com mudanças no perfil metabólico dos microrganismos envolvidos no processo. Os

açúcares redutores, assim como os aminoácidos livres e peptídeos, são os principais precursores de aroma e sabor de chocolate que o cacau apresentará após a reação de Maillard decorrente do processo de torra (HASHIM et al., 1998).

Dentre as consequências esperadas da inoculação de microrganismos na fermentação de cacau, pode-se observar: possível aceleração da fermentação (ASSI-CLAIR et al., 2019; MOTA-GUTIERREZ et al., 2018), aumento dos níveis de compostos voláteis (MOTA-GUTIERREZ et al., 2018; SAUNSHIA et al., 2018), alteração nos níveis de compostos fenólicos (ASSI-CLAIR et al., 2019; SAUNSHIA et al., 2018), controle do crescimento de fungos filamentosos (ROMANENS et al., 2019; RUGGIRELLO et al., 2019), melhoramento da qualidade das amêndoas fermentadas (SAUNSHI et al., 2019), produtos com alto potencial antioxidante (OOI et al., 2020) e melhoramento de precursores do *flavour* no produto fermentado (SANTOS et al., 2020). Tudo isso visando o melhoramento de características sensoriais do chocolate e/ou maior controle do processo fermentativo.

A Tabela 1 traz uma série de trabalhos realizados ao redor do mundo com inóculo de diferentes microrganismos em diferentes variedades de cacau, sob condições distintas, bem como o tipo de análise realizada para avaliação da qualidade desse cacau inoculado, no período de 2013 a 2020. De maneira geral, esses estudos realizaram inoculação de leveduras ou combinados de leveduras e bactérias lácticas e/ou bactérias acéticas, seguidos de análises de precursores do *flavour*, análises sensoriais e/ou análises de índice de fermentação, comparando o cacau inoculado com um controle sem inóculo a fim de verificar a qualidade da fermentação. Um ponto importante a se observar é que não há uma padronização nesses estudos acerca de parâmetros como a quantidade de inóculo e o veículo de inoculação, bem como o tamanho do cocho, sendo alguns trabalhos realizados em frascos Erlenmeyer em laboratório (PEREIRA et al., 2017; OOI et al., 2020), por exemplo. Outro ponto importante é a variação da eficiência do inóculo frente à variedade do cacau (MENEZES et al., 2016); dessa forma, utilizar um *mix* de variedades, comum em muitas fazendas, pode diminuir a vantagem observada em relação à fermentação sem inoculação. Entretanto, mesmo acontecendo no referido *mix*, a inoculação também pode levar a uma padronização no processo, gerando índices de fermentação mais constantes dentro de uma mesma safra.

Tabela 1 – Inóculo de diferentes leveduras em diferentes variedades de cacau, sob condições distintas, e avaliação da qualidade do cacau inoculado, no período de 2013 a 2020.

Espécie inoculada	Ano da fermentação	Local	Variedade de cacau	Quantidade de cacau	Quantidade de inóculo	Diluyente	Tipo de fermentação	Avaliação da Qualidade	Referência
<i>R. mucilaginosa</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>P. galeiformis</i> <i>P. kluyveri</i> <i>I. orientalis</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>P. membranifaciens</i>	Não Informado	Bahia/Brazil	Scavina	45kg	3x10 ⁸ UFC	Caldo YEPD	Cocho de Madeira	Análise de Aminoácidos, Açúcares Redutores e Teste de Corte	SANTOS et al., 2020
<i>S. cerevisiae</i>	2013	Bahia/Brazil	PS1319	100kg	10 ⁵ /g de cacau	Água Peptonada	Cocho de Madeira	Análise de Compostos Voláteis, Açúcares Redutores e Sensorial	BATISTA et al., 2015
<i>S. cerevisiae</i>	2013	Bahia/Brazil	PS1319	100kg	10 ⁵ /g de cacau	Água Peptonada	Cocho de Madeira	Análise de Compostos Voláteis e Sensorial	BATISTA et al., 2016
<i>S. cerevisiae</i> <i>L. plantarum</i> <i>A. aceti</i>	2013	India	Forastero	10kg	10-60% (p/v)	Não Informado	Cocho de Madeira	Análise de Compostos Voláteis, Polifenóis, Açúcares Redutores, Sensorial e Teste de Corte	SANDHYA et al., 2016
<i>S. cerevisiae</i> <i>T. delbrueckii</i>	2014	Bahia/Brazil	PS1319 SJ02	0,06m ³	10 ⁵ e 10 ⁶ cél/g	Água Peptonada	Cocho de Madeira	Análise de Compostos Voláteis, Açúcares Redutores e Sensorial	VISINTIN et al., 2017
<i>S. cerevisiae</i>	2013	Bahia/Brazil	PS1030 FA13 CEPEC 2004	100kg	10 ⁷ cél./g	Água Peptonada	Cocho de Madeira	Análise de Compostos	MENEZES et al., 2016

CCN51								Voláteis e Sensorial	
<i>S. cerevisiae</i> <i>P. kudriavzevii</i>	2005	Pará/ Brasil	Forastero	50kg	10 ⁶ UFC	Água Peptonada	Não Informado	Análise de Polifenóis e Aminas Bioativas	CHAGAS JUNIOR et al., 2021
<i>S. cerevisiae</i>	2012	Bahia/B rasil	PS1319 FA13 PH16 PS1030	60kg	10 ⁶ cél./kg	Água Peptonada	Cocho de Madeira	Análise de Compostos Voláteis e Açúcares Redutores	RAMOS et al., 2014
<i>P. kudriavzevii</i>	Não Informado	Bahia/B rasil	Não Informado	400g	Não Informado	Não Informado	Erlenmeyer	Análise de Compostos Voláteis	PEREIRA et al., 2017
<i>S. cerevisiae</i> <i>P. kluyveri</i>	2014	Bahia/B rasil	CEPEC2002 FA13	100kg	10 ⁵ cél./g de cacau	Água Peptonada	Cocho de Madeira	Análise de Compostos Voláteis e Sensorial	MOREIRA et al., 2020
<i>L. fermentum</i> <i>A. pasterianus</i> <i>P. kluyveri</i> <i>K. marxianus</i>	2011/ 2012	Gana	Forastero	20kg	5x10 ⁵ UFC de bactéria/g 10 ⁶ UFC de levedura/g	Não Informado	Bandejas Plásticas	Análise de Compostos Voláteis e Sensorial	CRAFACK et al., 2013
<i>S. cerevisiae</i>	2015	Costa do Marfim	Trinitário Amelonado	30kg	0,5g/kg	Água Destilada	Caixas Plásticas	Análise de Compostos Voláteis e Sensorial	ASSI-CLAIR et al., 2019
<i>L. fermentum</i> <i>A. aceti</i> <i>S. cerevisiae</i>	Não Informado	Indoné- sia	Não Informado	Não Informado	10 ⁸ UFC/g	Não Informado	Não Informado		APRIYANTO et al., 2019
<i>P. kudriavzevii</i> <i>H. thailandica</i> <i>H. opuntiae</i> <i>Hanseniaspora</i> sp. <i>S. cerevisiae</i> <i>C. quercitrusa</i> <i>Wickerhamomyces</i>	Não Informado	Malásia	Não Informado	Não Informado	10 ⁶ UFC/mL	Não Informado	Erlenmeyer	Análise de Polifenóis	OOI et al., 2020

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há vários gêneros de leveduras que ocorrem espontaneamente na fermentação do cacau, dentre eles os gêneros *Pichia*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida* e *Rhodotorula*, cujas linhagens já demonstraram seu potencial biotecnológico ao serem utilizadas com sucesso como inóculos de cultura *starter*. Entretanto, por não se mostrar viável a criação um inóculo padrão para a fermentação do cacau, a tendência é que esses inóculos sejam regionais e potencialmente associados a uma variedade específica da planta, além de possivelmente apresentar resultados melhores de acordo com a época do ano (safra principal ou safra temporã). É possível que sejam desenvolvidas ainda estratégias para inoculação em *mix* de variedades, como por exemplo utilizando uma combinação de inóculos de leveduras (múltiplas espécies) ao invés de uma única linhagem.

Além disso, estudos recentes têm utilizado inóculos bacterianos (principalmente de bactérias lácticas e acéticas) em conjunto com leveduras (CRAFACK et al., 2013; APRIYANTO et al. 2019, ROMANENS et al., 2020); esses estudos ainda estão em fase inicial quando comparados à inoculação de apenas leveduras na fermentação do cacau e, apesar de alguns resultados promissores, outros trabalhos têm demonstrado resultados relativamente negativos com a inoculação de bactérias (HO et al., 2018). Entretanto, as bactérias lácticas oriundas do cacau têm demonstrado potencial probiótico interessante (MELO et al., 2017; PESSOA et al., 2017) e podem ser, inclusive, “inoculadas” no chocolate, visando o preparo de um chocolate probiótico conforme já demonstrado com outras linhagens (POSSEMIERS et al., 2010). Vale salientar que esse tipo de estudo ainda não foi explorado para as leveduras da fermentação do cacau.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. A. M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso* (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Urucuá, Ba.** 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP, 2002.
- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical Review of Food Science Nutrition.** v 48, 9 ed. 2008.
- APRIYANTO, M.; UMANALLO, M. C. B. Decrease Polyphenols, Ethanol, Lactic Acid, and Acetic Acid during Fermentation with Addition of Cocoa Beans Inoculum. **International Journal of Scientific & Technology Research,** v. 8, 2019.
- ASSI-CLAIR, B. J.; KONÉ, M. K.; KOUAMÉ, K. et al. Effect of aroma potential of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on the volatile profile of raw cocoa and sensory attributes of chocolate produced thereof. **Eur Food Res Technol.** 2019.
- BATALHA, P. G. **Caracterização do cacau catongo de São Tomé e Príncipe.** Lisboa. Mestrado (Mestre em Engenharia de Alimentos – Tecnologia de Produtos vegetais) Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa – Portugal. 2009.
- BATISTA, N. N.; RAMOS, C. L.; RIBEIRO, D. D.; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. **LWT – Food Science and Technology.** v 63. 2015.
- BATISTA, N. N.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. **Journal of Food Science and Technology,** v. 2, n. 53, p. 1101 – 1110. 2016.
- BECKETT, S. T. **Fabricación y utilización industrial del chocolate.** Zaragoza: Editorial Acribica, p 432. 1994.
- BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use.** 4 ed. London: Edited by Stephen T. Beckett, Blackwell Publishing Ltd., 732p. 2009.
- BRUNETTO, M. R.; GUTIÉRREZ, L.; DELGADO, Y.; GALLIGNANI, M.; ZAMBRANO, A.; GÓMEZ, A.; RAMOS, G.; ROMERO, C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. **Food Chemistry.** v 100, p 459–467. 2007.
- CHAGAS JUNIOR, G. C. A.; FERREIRA, N. R.; GLORIA, M. B. A.; MARTINS, L. H. S.; LOPES, A. S. Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. **Food Chemistry,** n. 338. 2021.
- CRAFACK, M.; MIKKELSEN, M. B.; SAERENS, S.; KNUDSEN, M.; BLENNOW, A.; LOWOR, S.; TAKRAMA, J.; SWIEGERS, J. H.; PETERSEN, G. B.; HEIMDAL, H.; NIELSEN, D. S.

Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. 14 p. 2013.

CRUZ, C. L. C. V. **Melhoramento do sabor de amêndoas de cacau através de tratamento térmico em forno convencional e de microondas**. Campinas. 101p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2002

CRUZ, J. F. M.; LEITE, P. B.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Assessment of the fermentative process from different cocoa cultivars produced in Southern Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**. v 12, p 5218-5225. 2013.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas. 2004.

FERREIRA, A.C.R. **Beneficiamento de cacau de qualidade superior**. PTCSB: Ilhéus, 2017. 76p.

HANSEN, C. E.; DEL OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v 77, p 273-81. 1998.

HASHIM, P.; SELMAT, J.; MUHAMMAD, S. K. S.; ALI, A. Changes in free amino acid, Peptide-N, Sugar and Pyrazine concentration during cocoa fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 78. 1998.

HO, V. T. T., FLEET, G. H.; ZHAO, J. Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. **International Journal of Food Microbiology**. 2018.

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

KURTZMAN, C.; FELL, J.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A taxonomy study**. 5 ed. Elsevier: 2011.

LEAL JR, G. A.; GOMES, L. H.; EFRAIM, P.; ALMEIDA TAVARES, F. C.; FIGUEIRA, A. Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. **FEMS Yeast Research**. v. 5, p. 788-98. 2008.

LEFEBER, T. et al. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced there of. **Food Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 379–392, 2012.

LEHRIAN, D. W.; PATTERSON G. R. **Cocoa fermentation**, In: *Biotechnology, a Comprehensive Treatise*. v 5, p 529–575. 1983.

LEROY, F.; DeVUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**. v 15. 2020.

LEVANON, Y.; ROSSETINI, S. M. O. Cacau. In E. Aquarone, W. Borzani, W. Schmidell & U. A. Lima. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. V. 4. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

LOPES, A. S. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao L.*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum*) em função do processamento**. Campinas. 130p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 2000.

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

LOPEZ, A. S.; LEHRIAN, D. W.; LEHRIAN L. V. Optimum temperature and pH of invertase of the seeds of *Theobroma cacao L.* **Revista Theobroma**, v 8, p 105–112. 1978.

LOPEZ, A. S. Chemical changes occurring during the processing of cacao. In: **Symposium Cacao Biotechnology**. Proceedings University Park: The Pennsylvania State University. Pennsylvania, p.19-54. 1986.

MARTINI, M. H. **Caracterização das sementes de seis espécies de *Theobroma* em relação ao *Theobroma cacao L.*** Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2004.

MELO, T. A.; SANTOS, T. F.; PEREIRA, L. R.; PASSOS, H. M.; REZENDE, R. P.; ROMANO, C. C. Functional Profile Evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: A New Potential Probiotic Strain Isolated during Cocoa Fermentation. **BioMed Research International**, 2017.

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

MOREIRA, I. M. V.; MIGUEL, M. G. C. P.; DUARTE, W. F.; DIAS, D.M.; SCHWAN, R. F. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao L.*) hybrids. **Food Research International**, v. 54, p. 9-17. 2013.

MOREIRA, I.; COSTA, J.; VILELA, L.; LIMA, N.; SANTOS, C.; SCHWAN, R. Influence of *S. cerevisiae* and *P. kluyveri* as starters on chocolate flavor. **J Sci Food Agric**, n. 101, p. 4409–4419, 2021.

MOTA-GUTIERREZ, J.; BOTTA, C.; FERROCINO, I.; GIORDANO, M.; BERTOLINO, M.; DOLCI, P.; CANNONI, M.; COCOLIN, L. Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during fermentation of cocoa beans. **Applied and Environmental Microbiology**, 2018.

OETTERER, M. **Tecnologias de obtenção do cacau, produtos do cacau e do chocolate**. In: OETTERER, M; M., REGITANO D'ARCE A.; SPOTO, M.H.F. (Org.). **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, v 1, p 1-50. 2006.

OOI, T. S.; TING, A. S. Y.; SIOW, L. F. Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. **LWT - Food Science and Technology**. 2020.

PEREIRA, J. L. et al. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growing region of Brazil. **Tropical Agriculture**. v 67, n 2, p.188-189. 1990.

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

PESSOA, W. F. B.; MELGAÇO, A. C. C.; ALMEIDA, M. E.; RAMOS, L. P.; REZENDE, R. P.; ROMANO, C. C. In Vitro Activity of *Lactobacilli* with Probiotic Potential Isolated from Cocoa Fermentation against *Gardnerella vaginalis*. **BioMed Research International**, n. 4, p. 1-10, 2017.

POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, n. 141, v. 1-2, 2010.

PREYER-BUITENZORG, A. Über Kakaofermentation [in German]. **Tropenpflanzer** 5: 157–173. 1901.

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

ROHAN, T. A.; CONNELL, M. The precursors of chocolate aroma: a study of the flavonoids and phenolic acids. **Journal of Food Science**, v 29, n 4, p 460-463. 1964.

ROHAN, T. A.; STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. **Journal of Food Science**, v. 32. 1967.

ROMANENS, E.; FREIMÜLLER LEISCHTFELD, S.; VOLLAND, A.; STEVENS, M.; KRÄHENMANN, U.; ISELE, D.; FISCHER, B.; MEILE, L.; MIESCHER SCHWENNINGER, S. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. 2019.

RUGGIRELLO, M.; NUCERA, D.; CANNONI, M.; PERAINO, A.; ROSSO, F.; FONTANA, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. **Food Research International**. 2019.

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

SANTOS, D. S.; REZENDE, R. P.; SANTOS, T. F.; MARQUES, E. L. S.; FERREIRA, A. C. R.; SILVA, A. B. C.; ROMANO, C. C.; SANTOS, D. W. C.; DIAS, J. C. T.; TAVARES BISNETO, J. D.

Fermentation in fine cocoa type Scavina: Change in standard quality as the effect of use of starters yeast in fermentation. **Food Chemistry**. 2020.

SAUNSHIA, Y.; SANDHYA, M. K. V. S.; LINGAMALLU, J. M. R.; PADELA, J.; MURTHY, P. Improved Fermentation of Cocoa Beans with Enhanced Aroma Profiles. **Food Biotechnology**. 2018.

SCHWAN, R. F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. **Applied and environmental microbiology**. Lavras – MG. V 64, p 1477-1483. 1998.

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

SILVA NETO, P. J. **Sistema de Produção de cacau para a Amazônia brasileira**. CEPLAC. Belém: 2001.

URBANSKI, J. J. Chocolate flavor/origins and descriptions. The effects of process and bean source. **The Manufacturing Confectioner**, v. 72, p.69-82. 1992.

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

VOIGT, J.; BIEHL, B. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**, Oxford, v. 47, p. 145-151, 1993.

VOIGT, J.; BIEHL, B.; HEINRICHS, H.; KAMARUDDIN, S.; MARSONER, G. C. AND HUGI, A. (1994a), In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxipeptidase. **Food Chemistry**, 49, 173-80. 1994.

VOIGT, J.; BIEHL, B. Developmental stage-dependent variation of the levels of globular storage protein and aspartic endoprotease during ripening and germination of *Theobroma cacao* L. seeds. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v 145, p. 299-307. 1995.