**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação de culturas *starters* de leveduras na fermentação de sementes
de jaca e seus efeitos no aroma de chocolate**

Amanda Cristina Marabesi

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2018**

Amanda Cristina Marabesi
Bacharela em Ciências dos Alimentos

Avaliação de culturas starters de leveduras na fermentação de sementes de jaca e seus efeitos no aroma de chocolate

Orientadora:
Profa. Dra. **SOLANGE GUIDOLIN CANNIATTI BRAZACA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Marabesi, Amanda Cristina

Avaliação de culturas *starters* de leveduras na fermentação de sementes de jaca e seus efeitos no aroma de chocolate / Amanda Cristina Marabesi. - - Piracicaba, 2018.

104 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Substituto de cacau 2.Jaca dura 3.Compostos voláteis 4.Fermentação
5.Culturas *starters* I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e minhas irmãs, por todo amor, apoio e suporte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a oportunidade de realizar esse trabalho, por me capacitar, e me amparar.

A minha família: Sérgio, Marta, Juliana e Gabrielle por todo amor, incentivo, apoio e por serem minha força.

A minha orientadora, Solange, pelo auxílio, confiança, ensinamentos, e por me direcionar na realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório que caminharam comigo na realização deste trabalho, especialmente a Fernanda, Patrícia, Erika e os técnicos Regina e Jair que atuaram diretamente nas etapas deste trabalho. Ao Beto e Felipe, do Departamento de Química, por todo auxílio nas análises.

A todos os amigos que acompanharam minha trajetória até aqui, e são minha segunda família, especialmente a Alana, Bruna, Gustavo, Jaque, Lais, Luana, Elóra, Patrícia, Renato, Stephanie, Tamara e Thaís. Obrigada por todo amor, carinho, incentivo e momentos de descontração.

Aos professores e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, e à Universidade de São Paulo. Agradeço também a Unicamp e Unimep, por permitirem a realização de algumas etapas deste trabalho.

E a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedendo a bolsa de mestrado (2016/09594-9).

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
REFERÊNCIAS.....	11
2. OBJETIVO.....	15
2.1. GERAL	15
2.2. ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 CENÁRIO DA PRODUÇÃO DO CACAU E SUBSTITUTOS	17
3.2 JACA (<i>ARTOCARPUS HETEROPHYLLUS</i> LAM.).....	18
3.3 FORMAÇÃO DO AROMA DO CHOCOLATE	19
3.4 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS	20
3.5 <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> E <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	22
3.6 DEGRADAÇÃO PROTÉICA	23
3.7 PROCESSOS DURANTE A TORRAÇÃO	24
REFERÊNCIAS.....	25
4 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE UTILIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE SEMENTES DE JACA POR MEIO DO EMPREGO DE CULTURAS <i>STARTERS</i> DE LEVEDURAS	33
RESUMO	33
4.1 INTRODUÇÃO.....	34
4.2. OBJETIVO.....	36
4.2.1. GERAL	36
4.2.2. ESPECÍFICOS	36
4.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.3.1 FERMENTAÇÕES	36
4.3.2 PREPARO DOS LOTES FERMENTATIVOS	37
4.3.3 FERMENTAÇÃO	38
4.3.4 DETERMINAÇÃO DE PH	39
4.3.5 TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX)	40
4.3.6 ACIDEZ TITULÁVEL.....	40
4.3.7 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DURANTE A FERMENTAÇÃO NATURAL DE SEMENTES DE JACA.....	40
4.3.7.1 LEVEDURAS	41
4.3.7.2 BACTÉRIAS LÁTICAS	42
4.3.7.3 BACTÉRIAS ACÉTICAS	42
4.3.8 AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS LIVRES.....	42
4.3.9 DETERMINAÇÃO DE ETANOL	43
4.3.10 DETERMINAÇÃO ÁCIDO LÁTICO E ACÉTICO	44
4.3.11 ANÁLISE DE PROTEÍNAS	44
4.3.11.1 EXTRAÇÃO PROTÉICA	45
4.3.11.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	45
4.3.12 ANÁLISE DE MINERAIS DA MASSA FERMENTATIVA	45
4.3.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	47

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.4.1 FERMENTAÇÕES.....	47
4.4.1.1 CONTROLE DE TEMPERATURA	48
4.4.1.2 EXSUDADO	51
4.4.1.3 TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX).....	52
4.4.1.4 PH	54
4.4.1.5 ACIDEZ TITULÁVEL	56
4.4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA	57
4.4.3 SECAGEM	60
4.4.4 AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS LIVRES	61
4.4.5 ETANOL	63
4.4.6 ÁCIDOS ORGÂNICOS (ÁCIDO ACÉTICO E LÁTICO).	65
4.4.6.1 ÁCIDO ACÉTICO	66
4.4.6.2 ÁCIDO LÁTICO	68
4.4.7 DEGRADAÇÃO PROTÉICA	70
4.4.8 MINERAIS	73
4.5. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL VOLÁTIL DE SEMENTES DE JACA SECAS, FERMENTADAS E TORRADAS.....	87
RESUMO	87
5.1 INTRODUÇÃO	88
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	89
5.2.1 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	89
5.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	90
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.3.1 COMPOSTOS VOLÁTEIS	90
5.4. CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	99
6. CONCLUSÃO GERAL	103

RESUMO

Avaliação de culturas starters de leveduras na fermentação de sementes de jaca e seus efeitos no aroma de chocolate

Atualmente a demanda mundial por cacau é superior à sua oferta, impulsionando a pesquisa e desenvolvimento de substitutos. Pesquisa conduzida recentemente evidenciou um potencial substituto ao submeter sementes de jaca dura a processos de fermentação, secagem e torração, resultando na produção de compostos voláteis similares aos do cacau. No entanto, o processo fermentativo foi realizado com a microbiota natural, o que impossibilita o direcionamento da produção de compostos de interesse. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi utilizar cultura *starter* de dois microrganismos isolados da fermentação da semente do cacau (*Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*) no processo fermentativo da semente de jaca dura, acompanhar as características da massa fermentativa, caracterizar microbiologicamente e avaliar os compostos voláteis produzidos. No primeiro capítulo são apresentados os dados referentes à primeira etapa do projeto, que envolveu a realização das fermentações em três lotes, contendo um tratamento sem inoculação de leveduras (controle) e dois tratamentos inoculados, sendo o KM, com *K. marxianus*, e o mix, com *K. marxianus* e *S. cerevisiae*. Neste capítulo também foram avaliadas as características da massa fermentativa ao longo do processo fermentativo (pH, exsudação, sólidos solúveis, acidez titulável e temperatura), o consumo de nutrientes (açúcares e proteínas), a produção de etanol e ácidos orgânicos (ácido acético e ácido láctico) e a caracterização do conteúdo mineral. Observaram-se diferenças nos parâmetros para os tratamentos, principalmente devido à aceleração da fermentação no tratamento mix, que influenciaram na produção de compostos voláteis. Também foi evidenciada a presença de leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas ao longo do processo. No capítulo 2 estão apresentados os resultados obtidos na segunda etapa do projeto, que envolveu a análise dos compostos voláteis produzidos com perfil aromático semelhante ao do cacau, evidenciando a maximização da produção de alguns compostos voláteis que conferem aroma de chocolate, na presença de mix de culturas *starters*, indicando o potencial uso das mesmas na fermentação de jaca dura.

Palavras-chave: Substituto de cacau; Subproduto; Jaca dura; Compostos voláteis; Fermentação; Culturas *starters*

ABSTRACT

Evaluation of starters cultures of yeasts in jackfruit seeds fermentation and their effects on chocolate aroma

Currently the world demand of cocoa exceeds its supply, leading the research and development of substitutes. Study recently conducted evidenced a potential substitute by subjecting hard jackfruit seeds to fermentation, drying and roasting processes, resulting in the production of volatile compounds to those of cocoa. However, the fermentative process was carried out with the natural microbiota, which makes it impossible to direct the production of interests compounds. Thus, the aim of the present work was the application of starter cultures of two microorganisms isolated from the cocoa beans fermentation (*Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*) in the fermentative process of hard jackfruit seeds, the monitoring of the fermentative mass characteristics, the microbiological characterization, and evaluation of volatile compounds produced. In the first chapter are presented the data referring to the first stage of the project, which involved the fermentation in three lots, containing a treatment without yeast inoculation (control) and two inoculated treatments, KM with *K.marxianus*, and MIX with *K.marxianus* and *S. cerevisiae*. In this chapter it was also evaluated the fermentative mass characteristics throughout the fermentation process (pH, exsudation, soluble solids, titratable acidity and temperature), the nutrients consumption (sugars and proteins), the production of ethanol and organic acids (acetic acid and lactic acid) and the characterization of mineral content. Differences were observed in the parameters for the treatments, mainly due to the acceleration of the fermentation in the MIX treatment, which influenced in the volatile compounds production. Also it was evidenced the presence of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria throughout the process. In chapter two are presented the results obtained in the second stage of the project, which involved the analysis of volatile compounds production and the aromatic profile similar to cocoa, evidencing the maximization of some volatile compounds production that confer chocolate aroma, in the presence of MIX of starters cultures, indicating their potential use in the hard jackfruit fermentation.

Keywords: Cocoa substitute; By-product; Jackfruit of hard pulp; Volatile compounds; Fermentation; Starter cultures

1. INTRODUÇÃO

Considerando o cenário mundial da produção de cacau, é possível evidenciar que há uma demanda crescente por chocolate, enquanto a oferta não progride nas mesmas proporções, gerando um déficit no fornecimento (-2,1% em 2015), viabilizando o investimento, desenvolvimento e aplicação de substitutos naturais para o cacau (FADEL et al., 2006; FAIRTRADE FOUNDATION, 2011; FERDMAN, 2014; LMC, 2016; AQUARIUM INVESTMENTS, 2017; GOLDSTREIN RESEARCH, 2017). Em vista disso e da possibilidade de obtenção de produtos inovadores e diferenciados, os substitutos consolidam-se no mercado, a fim de fornecer maneiras viáveis de obtenção de alimentos de qualidade durante todos os períodos do ano, fornecendo opções, inclusive, para redução de custo de produção de alguns produtos (MEDEIROS, LANNES, 2009). Com o desenvolvimento desses substitutos, como alfarroba e cupuaçu, torna-se viável a obtenção de produtos inovadores, reduzindo a dependência exclusiva do cacau, possibilitando alternativas para atender a demandas diferenciadas, com preço competitivo (YOUSIF, ALGHZAWI, 2000; FADEL et al., 2006; CARVALHO, GARCÍA, FARFÁN, 2008; MEDEIROS, LANNES, 2009; SROUR et al., 2015; RAMOS et al., 2016; AYDIN, OZDEMIR, 2017). Recentemente, Spada et al. (2017) mostraram que as sementes de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) podem ser utilizadas como substituto aromático de chocolate. Suas sementes constituem aproximadamente 18 a 25% do fruto e, embora sejam consideradas subprodutos, possuem uso industrial, amplamente explorado em países asiáticos devido à acentuada concentração de amidos. As sementes são comercializadas cozidas em molhos de tomate, em conservas enlatadas ou ainda torradas (MAHANTA, KALITA, 2015). Durante o desenvolvimento da pesquisa conduzida por Spada et al. (2017), foi observado que a etapa de fermentação da semente de jaca dura contribuiu significativamente para o desenvolvimento de aroma diferenciado, através da formação de pirazinas, principais compostos aromáticos do cacau, e ésteres, que contribuem na obtenção de aroma frutado (PARKER, 2015a). Esses atributos são desejados na produção de chocolates nobres, pois os populares são geralmente associados a aroma e sabor adocicado e caramelo (CRAFAK et al., 2014). Contudo, existe a necessidade de aprimoramento dessa etapa, a fim de potencializar a produção de compostos voláteis específicos utilizando técnicas fermentativas, as quais são empregadas no cacau, com o intuito de se obter resultados promissores para as sementes de jaca.

Na fermentação do cacau e também da semente de jaca, ocorrem diversos processos bioquímicos que culminam na produção de compostos voláteis responsáveis pelo sabor e aroma aos produtos finais. Dentre os compostos produzidos, estão as pirazinas, que constituem um importante grupo de compostos voláteis no cacau e na jaca fermentada e torrada. As pirazinas são formadas na reação de Maillard, juntamente com a degradação de Strecker. Para a formação desses voláteis há ação prévia dos microrganismos presentes na massa fermentativa, os quais são capazes de produzir enzimas e modificar o meio, permitindo a degradação de carboidratos e proteínas, respectivamente, em açúcares redutores e aminoácidos (PARKER, 2015b). Desse modo, é possível potencializar a produção de compostos desejados, dependendo da concentração do aminoácido e do açúcar que será modificada através da seleção de microrganismos.

Diversas classes e gêneros de microrganismos atuam no processo fermentativo do cacau e da semente de jaca, incluindo leveduras, bactérias lácticas e acéticas. A ausência de seleção dos mesmos reduz o nível de padronização, inviabilizando o direcionamento da produção de compostos desejados, e torna o processo mais susceptível a contaminações (SCHWAN, WHEALS, 2004; ILLEGHEMS et al., 2012; NIGAM, SINGH, 2014; RAMOS et al., 2014).

As espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* foram identificadas como uma das principais envolvidas no processo de fermentação do cacau (ILLEGHEMS et al., 2012; HO, ZHAO, FLEET, 2015), e exercem importante papel na mesma devido à rapidez em transformar açúcar em etanol, além da vantagem competitiva entre espécies, da tolerância aos produtos formados, e da produção de enzimas pectinolíticas, as quais interferem na integridade da parede celular dos tecidos vegetais, permitindo a aeração da massa fermentativa, importante para a velocidade do processo, e a permeabilidade de compostos para o interior das sementes, modulando a obtenção de precursores aromáticos (SCHWAN, COOPER, WHEALS, 1997; ILLEGHEMS et al., 2012; PIEMOLINI-BARRETO et al., 2013; ANDRIETTA, STECKELBERG, ANDRIETTA, 2006). Assim, a aplicação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* pode propiciar um perfil volátil semelhante ao do cacau.

REFERÊNCIAS

- ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, São Carlos, v. 7, p. 1-16, 2006.
- AQUARIUM INVESTMENTS. Cocoa Market Outlook And COT Data Review For Softs And Grains. 2017. Disponível em: <<https://seekingalpha.com/article/4131321-cocoa-market-outlook-cot-data-review-softs-grains?page=1>>, acesso em 05/04/2018
- AYDIN, S.; OZDEMIR, Y. Development and Characterization of Carob Flour Based Functional Spread for Increasing Use as Nutritious Snack for Children. **Journal of Food Quality**, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5028150>
- CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; FARFÁN, J. A. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, 2008. p. 986-993.
- CRAFACK, M.; KEUL, H.; ESKILDSENA, C. E.; PETERSEN, M. A.; SAERENS, S.; BLENNOW, A.; SKOVMAND-LARSEN, M.; SWIEGERS, J. H.; PETERSEND, G. B.; HEIMDAL, H.; NIELSENA, D. S. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, v. 63, 2014. p. 306–316.
- FADEL, H. H. M.; MAGEED, M. A. A.; SAMAD, A. K. M. E. A.; LOTFY, S. N. Cocoa substitute: Evaluation of sensory qualities and flavor stability. **European Food Research and Technology**, v. 223, 2006. p. 125-131.
- FAIRTRADE FOUNDATION. Fairtrade and Cocoa – Commodity Briefing, p.1–17. 2011. Disponível em: <<http://curtisresearch.org/wp-content/uploads/Cocoa-Briefing-FINAL-8Sept11.pdf>>, acesso em 08/03/18
- FERDMAN, R. A. **The world's biggest chocolate-maker says we're running out of chocolate.** The Washington Post, 2014. Disponível em: <<https://www.washingtonpost.com/news/wonk/wp/2014/11/15/the-worlds-biggest-chocolate-maker-says-were-running-out-of-chocolate/>>, acesso em 14/12/2017.
- Goldstrein Research. Global Cocoa Beans Market Outlook 2024: Global Opportunity And Demand Analysis, Market Forecast, 2016-2024. Publicado em 2017. Disponível em: <<https://www.goldsteinresearch.com/report/global-cocoa-beans-market-outlook-2024-global-opportunity-and-demand-analysis-market-forecast-2016-2024>>, acesso em 05/04/2018.
- HO, V. T. T.; ZHAO, J.; FLEET, G. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, 2015. p. 54-67.
- ILLEGHEMS, K.; DE VUYST, L.; PAPALEXANDRATOU, Z.; WECKX, S. Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity, **Plos one**, v. 7, p. 1-11, 2012.

LMC International. Cocoa: The Global Market. 2016. Disponível em: <http://www.lmc.co.uk/Cocoa-Cocoa_The_Global_Market>, acesso em 10/04/2018.

MAHANTA, C. L.; KALITA, D. Processing and utilization of Jackfruit Seeds. 2015. In: **Processing and Impact on Active Components in Food**. Elsevier, United States of America, First Edition, 2015.

MEDEIROS, M. L.; LANNES, S. C. S. Avaliação química de substitutos de cacau e estudo sensorial de achocolatados formulados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.2, p.247-253, 2009.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Cocoa and Coffee fermentations. **Encyclopedia of Food Microbiology** (Second Edition), p. 485-492, 2014.

PARKER, J. K. Introduction to aroma compounds in foods. In: *Flavor* development, analysis and perception in food and beverages. **Food Science, Technology and Nutrition**, p. 151-185, 2015a.

PARKER, J. K. Thermal generation of aroma. In: *Flavor* development, analysis and perception in food and beverages. **Food Science, Technology and Nutrition**, 2015b.

PIEMOLINI-BARRETO, L. T.; ZACARIA, J.; DELAMARE, A. P. L.; ANTONIO, R. V.; ECHEVERRIGARAY, S. Variation in phenolic compounds, anthocyanins, and color in red wine treated with enzymatic extract of *Kluyveromyces marxianus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2013, v. 30, p. 1541–1547.

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**, v. 64, p. 908–918, 2014.

RAMOS, S. M. N.; DANZL, W.; ZIEGLEDER, G.; EFRAIM, P. Formation of volatile compounds during cupuassu fermentation: Influence of pulp concentration. **Food Research International**, v. 87, p.161–167, 2016

SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**. 1997. V. 21. P. 234-244.

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

SPADA, F. P.; ZERBETO, L. M.; RAGAZI, G. B. C.; GUTIERREZ, E. M. R.; SOUZA, M. C.; PARKER, J. K.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Optimization of Postharvest Conditions To Produce Chocolate Aroma from Jackfruit Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 1196-1208, 2017.

SROUR, N.; DAROUB, H.; TOUFEILI, I.; OLABI, A. Developing a carob-based milk beverage using different varieties of carob pods and two roasting treatments and assessing their effect on quality characteristics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 3047-3057, 2016

YOUSIF, A. K.; ALGHZAWI, H. M. Processing and characterization of carob powder. **Food Chemistry**, v. 69, 2000. p. 283-287.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Em vista desses fatores, o objetivo geral do trabalho de pesquisa foi acompanhar o processo fermentativo da semente de jaca, com a utilização de cultura *starter*, visando à obtenção de aromas similares aos do cacau.

2.2. Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Isolar os microrganismos presentes na massa fermentativa de semente de jaca e identificá-los fenotipicamente, caracterizando a microbiota natural;
- Realizar fermentação controlada, através da adição de culturas *starters* (*Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*);
- Avaliar as características da massa fermentativa (temperatura, pH, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, minerais, produção de ácido láctico, ácido acético e etanol), o consumo de nutrientes (açúcares e proteínas);
- Avaliar a produção de compostos voláteis.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cenário da produção do cacau e substitutos

O cenário da produção mundial de cacau dos últimos anos mostrou insuficiência na relação oferta e demanda, pois os meios e as dificuldades de produção não foram capazes de suprir a busca crescente por essa matéria prima, especialmente pelas indústrias produtoras de chocolate, sendo observada a superação do consumo em relação à produção (FADEL et al., 2006; FAIRTRADE FOUNDATION, 2011; FERDMAN, 2014). O problema do abastecimento decorre de uma série de fatores, incluindo o tempo seco na África Ocidental, principalmente nas regiões da Costa do Marfim e Gana, onde mais de 70% do cacau mundial é produzido, e a ocorrência de doenças fúngicas, que geram perdas, estimadas em 35-40% do volume total produzido (FAIRTRADE FOUNDATION, 2011; FERDMAN, 2014; GOLDSTREIN RESEARCH, 2017). No Brasil, em 1989, danos foram causados na produção de cacau devido à “vassoura de bruxa”, uma infestação fúngica, que resultou em perdas de produção de até 70%. Após quase três décadas do surgimento da doença, a produção no país ainda possui déficit relacionado a este problema; em 2013 o Brasil produziu apenas 65% do volume produzido em 1989 (ICCO, 2013; TEIXEIRA, THOMAZELLA, PEREIRA, 2015). Dados de produção mundial dos últimos seis anos mostraram queda até 2016, e aumento em 2017. Houve queda de 2,7% (2011-2013), 4,4% (2013-2015) e 4,6% (2014-2016), aumento entre 2012-2014, em 5,9%, e os dados mais recentes mostram uma elevação na produção, passando de 3,9 milhões de toneladas entre 2015 e 2016, a 4,7 entre 2016 e 2017 (ICCO, 2013-2017). Esses dados indicam melhora na produção e fornecimento de cacau na última safra, contudo, a demanda crescente e perdas de produção, além da elevada dependência da sazonalidade e das condições ambientais, o elevado custo de insumos, e o uso limitado de técnicas agrícolas modernas, ainda fornecem risco para o suprimento e mercado de cacau. Além disso, devido ao histórico de produção, não é esperado um aumento consecutivo da mesma na próxima safra. Aliado a isto, além da demanda por produtos de chocolate, há também aumento no interesse por produtos com sabor de chocolate, viabilizando a condução de pesquisas e investimento em substitutos que possam atender a essas necessidades (ICCO, 2017; GOLDSTREIN RESEARCH, 2017; WORLD COCOA FOUNDATION, s.d.).

O desenvolvimento de substitutos, como alfarroba, cupuaçu e recentemente a jaca dura, propiciam o fornecimento de alimentos de qualidade e inovadores, a preços competitivos, implicando em menor dependência do cacau (CARVALHO, GARCÍA, FARFÁN, 2008; MEDEIROS, LANNES, 2009; ROSA et al., 2015; RAMOS et al., 2016;

OLIVEIRA, 2016; AYDIN, OZDEMIR, 2017; SPADA et al., 2017). Desse modo, estes vêm se consolidando e adquirindo maior impacto no mercado, podendo ser aplicados em diversas classes de produtos, nas quais se incluem sobremesas, sorvetes, produtos de panificação, bebidas lácteas, biscoitos e achocolatados (MEDEIROS, LANNES, 2009; ROSA et al., 2015; AYDIN, OZDEMIR, 2017).

Os substitutos são utilizados principalmente em produtos de menor valor agregado, visando reduzir os custos de produção dos alimentos com atributos sensoriais de chocolate. Com esse propósito, a indústria de *flavors* busca compostos, ou processos de obtenção de componentes, que produzam a sensação de aroma de cacau ou chocolate (FADEL et al., 2006). Um dos potenciais substitutos do aroma de chocolate é a alfarroba torrada, pois possui perfil volátil semelhante ao cacau (YOUSIF, ALGHZAWI, 2000; FADEL et al., 2006; SROUR et al., 2015; OLIVEIRA, 2016), além do cupuaçu (GENOVESE, LANNES, 2009; QUAST et al., 2011; OLIVEIRA, GENOVESE, 2013; RAMOS et al., 2016), e da semente de jaca dura (SPADA et al., 2017).

3.2 Jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

A jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) pertence à família Moraceae, sendo bastante adaptável e com grande importância em regiões tropicais, abundante na Ásia (especialmente na Tailândia), América do Sul, Austrália e África (ELEVITCH, MANNER, 2006; SAXENA et al., 2011). Os frutos são compostos, consistindo em três regiões, o eixo, ou núcleo, o qual não é comestível, o perianto, que constitui a maior porção da fruta, e os frutos verdadeiros, os quais se aglomeram no eixo central. Cada fruto verdadeiro contém uma semente, que constitui aproximadamente 12% do fruto, rica em amido e proteínas, envolvida individualmente por uma polpa amarela, de sabor adocicado, aromática e espessa (CHEN et al., 2016; SEAGRI, 2015).

No Brasil, são conhecidas três variedades, a jaca-mole, a jaca-manteiga e a jaca-dura. A jaca-dura apresenta os maiores frutos, os quais possuem de 15 a 20kg. A jaca é geralmente consumida na forma *in natura*, entretanto, devido à sazonalidade, a oferta no período de sua produção é maior que a demanda, o que acarreta em desperdício. Visando minimizar as perdas, há necessidade de mais pesquisas que indiquem o uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de produtos alimentícios inovadores (OLIVEIRA, 2009; FOLEGATTI, 2003).

A semente da jaca possui 2 a 3 centímetros de comprimento e 1 a 1,15 cm de diâmetro e representa, em média, 30% do peso do fruto. As sementes são sendo estudadas, pois

apresentam diversas aplicações alimentícias, como na Ásia, onde são consumidas como conserva enlatada. Além do potencial de utilização industrial, principalmente devido ao seu elevado teor de amido, elas podem ser consumidas de modo rudimentar quando cozidas, assadas, ou ainda usadas para o preparo de farinhas (quando assadas e moídas), a qual se torna matéria-prima para o preparo de biscoito, doces, entre outros. Contudo, devido à alta produtividade e processamento dos frutos, grande parte das sementes é descartada, gerando elevado desperdício (OLIVEIRA, 2009; MADRUGA et al., 2014).

Em pesquisa realizada na ESALQ/USP com farinha de semente de jaca torrada, Spada et al. (2017) mostraram um uso promissor para as mesmas, pois foi evidenciada a formação de aroma característico de chocolate com atributos sensoriais e compostos voláteis idênticos aos estudados em cacau, os quais se desenvolvem a partir da fermentação, que oferece potencial de melhoria.

3.3 Formação do aroma do chocolate

Após a colheita do cacau, as sementes, principais matérias primas para a produção do chocolate, e fontes exclusivas de manteiga de cacau, sendo, portanto, a parte que interessa à indústria para este fim, apresentam características sensoriais indesejadas (sabor amargo e odor adstringente) (ARDHANA, FLEET, 2003; LIMA et al., 2001; PIRES et al., 1998). As amêndoas somente secas, lavadas e torradas não exibem o aroma de chocolate, pois este é resultante de uma série de compostos formados durante o processo pós-colheita (FERRÃO, 2008). Para adquirir o sabor e aroma típicos do cacau, as amêndoas devem passar por um processo de cura, envolvendo fermentação e reações enzimáticas, seguida da secagem e torração (PINI et al., 2004; BONVEHÍ, 2005; LIMA, SCHULER, GUERRA, 2010; OWUSU, PETERSEN, HEIMDAL, 2012).

Para que ocorra a fermentação, as amêndoas envoltas pela polpa são empilhadas e cobertas com folhas de bananeira, que atuam como fonte natural de leveduras para o processo, ou sacos de aniagem (MARTINS et al., 2011; BRITO et al., 2017). Esta etapa é aquela em que as amêndoas sofrem ação da microbiota presente, a qual é responsável por desenvolver os precursores do aroma e sabor do chocolate (LOPES, PEZOA-GARCÍA, VASCONCELOS, 2003). A primeira etapa da fermentação ocorre na polpa mucilaginosa, rica em açúcares, em torno de 20% de glicose, frutose e sacarose, e umidade, que aliadas à ausência de oxigênio e baixo pH 3,0-3,5, gerado pela presença de ácidos orgânicos (1 a 2%), possibilitam o desenvolvimento de leveduras (ARDHANA, FLEET, 2003; SCHWAN, WHEALS, 2004;

THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001). Durante essa fase, ocorre a fermentação alcoólica, com a produção de álcool etílico e dióxido de carbono, além de um aumento da temperatura na massa fermentativa. Na fermentação alcoólica, é iniciado o processo de aeração da massa fermentativa através da ação de microrganismos, que promovem a degradação da polpa que envolve a semente, produzindo um líquido que é drenado e exsudado do recipiente onde ocorre a fermentação. Inicialmente, a polpa mucilaginosa que envolve a semente contribui para a anaerobiose nos estágios primários da fermentação. No decorrer do processo, a degradação da polpa causa ruptura das células do tecido, que está associada à ação da gravidade e culminam na drenagem do líquido resultante desse processo, contribuindo para a aeração. Juntamente com essa ação, o revolvimento diário da massa provoca entrada de ar no interior dos lotes fermentativos. Além disso, diversas culturas capazes de liberar enzimas pectinolíticas já foram isoladas e identificadas, acelerando a degradação pécica enzimática (WOOD, 1985; SCHWAN, WHEALS, 2004; LEAL et al., 2008).

No final da fermentação alcoólica, inicia-se o crescimento de bactérias acéticas, as quais consomem o álcool produzido oxidando-o a ácido acético. Aliada à ação das bactérias acéticas, as bactérias lácticas atuam produzindo ácido láctico através do consumo de glicose e ácido cítrico (THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001; SCHWAN, WHEALS, 2004). O ácido acético produzido provoca alterações nas paredes celulares das sementes, tornando-a permeável, além de impossibilitar a germinação, permitindo que os substratos e as enzimas do interior das sementes interajam, produzindo precursores de aroma. Após a fermentação, ocorre a secagem e a torração, que são responsáveis por estabilizar a umidade, sabor, aroma e cor típicos do cacau, através da ocorrência de reação de Maillard na presença de peptídeos, aminoácidos e açúcares redutores (FERRÃO, 2008; OWUSU, PETERSEN, HEIMDAL, 2012; THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001).

3.4 Microrganismos envolvidos nos processos fermentativos

A fermentação da semente do cacau é realizada com a microbiota natural da polpa, a qual pode variar de acordo com a presença de contaminantes dos funcionários, ambiente, utensílios, recipientes, superfícies e insetos. No processo fermentativo, que ocorre em um período de aproximadamente 8 dias, os diferentes microrganismos consomem diferentes compostos e produzem uma série de produtos, cada um fundamental para a boa qualidade do cacau (SCHWAN, WHEALS, 2004; JESPERSEN et al., 2005). Devido às características da massa de cacau, que apresenta pH em torno de 3,0-3,5, principalmente pela presença do ácido cítrico, e é rica em açúcares fermentescíveis e umidade, na fase inicial, que compreende as

primeiras 24 a 36 horas, predomina a proliferação de leveduras, as quais vão atuar em meio anaeróbico, produzindo álcool (ARDHANA, FLEET, 2003; SCHWAN, WHEALS, 2004; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011). As principais espécies envolvidas são: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida stellimalicola*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenia sporauvarum*, *Hansenia sporaopuntiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, e *Debaryomyces hansenii* (ILLEGHEMS et al., 2012).

A ação das leveduras provoca produção de compostos orgânicos precursores do sabor de chocolate, formação de álcool e enzimas pectinolíticas, as quais são responsáveis por reduzir a viscosidade da polpa, permitir a aeração da massa (permitindo a multiplicação de microrganismos aeróbicos) e liberar açúcares, que são consumidos por bactérias lácticas, a partir de 36 horas do início da fermentação até 48 horas, especialmente *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*. A segunda fase da fermentação envolve a presença de acetobactérias (88 a 112 horas), favorecida pelo aumento da temperatura, em torno de 37°C, e pela presença de oxigênio e etanol, os quais serão convertidos a ácido acético por oxidação. Nesta fase, há um declínio do teor de ácido láctico e etanol, e aumento do ácido acético, além da elevação da temperatura para 50 °C ou mais, decorrente das reações exotérmicas causadas pelas bactérias acéticas. As principais bactérias envolvidas nessa etapa são *Acetomonas oxydase*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* (SCHWAN, ROSE, BOARD, 1995; SCHWAN, WHEALS, 2004; ILLEGHEMS et al., 2012; BRITO, GARCIA, AMANCIO, 2004; GÁLVEZ et al., 2007; JESPERSEN et al., 2005; KOSTINEK et al., 2008).

As transformações que ocorrem durante a fermentação provocam a morte do embrião e danos às estruturas das sementes, reduzindo a seletividade da membrana, e permitindo a entrada de ácidos e interação entre enzimas e substratos. O ácido acético é o principal envolvido neste processo, e provoca essas alterações associados ao aumento da temperatura. Como resultado, enzimas e substratos que permaneciam isolados, passam a reagir, gerando uma série de reações de degradação. Entre essas há a degradação protéica, ocasionada pela interação entre proteínas e proteases endógenas, que produzem peptídeos e aminoácidos considerados os principais precursores de aroma e sabor (CAMU et al., 2008; HASHIM et al., 1998; THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001).

As sementes de cacau são envolvidas pela polpa, rica em carboidratos, dos quais os mais importantes são a pectina, sacarose, glicose e frutose. Essa polpa mucilaginosa, que envolve a semente, contribui para a anaerobiose no início da fermentação (UENOJO,

PASTORE, 2007; LEAL et al., 2008). Durante a fermentação, as leveduras, inicialmente, utilizam os açúcares simples presentes na mucilagem como fonte de carbono, e são capazes de produzir diversas classes de enzimas, dentre elas, a invertase, que é uma das principais, e atua hidrolisando sacarose em frutose e glicose, e as pectinases (UENOJO, PASTORE, 2007; BOFO, CASTRO, MEDEIROS, 2005). A ação das pectinases é essencial para a obtenção de cacau com boa qualidade para produção de chocolate, pois permite a aeração da semente e permeabilidade das mesmas. Deste modo, é possível obter matéria-prima adequada à produção de chocolates, visto que a obtenção de aeração adequada é fator essencial no processo fermentativo. A inadequada aeração da massa fermentativa, ocasionada principalmente pelo excesso de polpa envolvendo as sementes, resulta em uma fermentação lenta, com elevada produção de ácido láctico e etanol, aumentando a acidez residual nas sementes obtidas ao final do processo (BIEHL et al., 1991; JINAP, ZESLINDA, 1995; JINAP, NAZAMID, JAMILAH, 2002; LEAL et al., 2008).

Outra classe de enzimas que atuam durante a fermentação são as endoproteases e exopeptidases, as quais hidrolisam proteínas em peptídeos e aminoácidos livres. Esses compostos são precursores do sabor e requeridos para a formação de aroma na presença dos açúcares redutores, durante a torrefação (VOIGT et al., 1994a). Embora se tenha a produção de enzimas por atividade microbiana, não se tem evidências de sua entrada no interior das sementes e atuação nas mesmas. Deste modo, estas vão atuar principalmente na polpa, permitindo a ocorrência das alterações bioquímicas durante o processo e, a partir destas, permitir a interação das enzimas e substratos endógenos para produção de precursores (VOIGT et al., 1994b; BIEHL et al., 1996).

3.5 *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são essenciais para o processo de fermentação do cacau, e a ausência das mesmas resulta na obtenção de produtos de baixa qualidade, sem as características de aroma e sabor comuns aos chocolates. As espécies *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* foram identificadas como umas das principais durante o processo fermentativo da semente do cacau, sendo isoladas com frequência em estudos de população microbiana, e ambas exercem papel essencial no processo (ILLEGHEMS et al., 2012; ARDHANA, FLEET, 2003; SCHWAN, WHEALS, 2004).

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* são capazes de produzir diversas classes de enzimas, tais como a inulinase, a pectinase e a lipase. Contudo, apresentam destaque na

produção de enzimas pectinolíticas, especialmente a espécie *Kluyveromyces marxianus* (FONSECA et al., 2007; SCHWAN, COOPER, WHEALS, 1997; PIEMOLINI-BARRETO et al., 2013). As enzimas pectinolíticas catalisam a hidrólise das substâncias pécticas presentes nos materiais vegetais. Estas substâncias são polissacarídeos responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos vegetais e atuam juntamente com a celulose e hemicelulose, na organização da parede celular (ALKORTA et al., 1998; VRIES, VISSER, 2001; MOHNEN, 2008; PIEMOLINI-BARRETO, 2012; PIEMOLINI-BARRETO et al., 2013). Portanto, a ação das pectinases provoca redução da viscosidade da polpa, possibilitando maior aeração da massa fermentativa, e permite a obtenção de sementes adequadas à produção do chocolate, através da entrada de ácidos e compostos no interior da semente (SCHWAN, 1998; SCHWAN, WHEALS, 2004).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é largamente empregada na produção de alimentos e bebidas. Esta se deve as suas características, como a capacidade de transformar açúcar em etanol de maneira rápida, elevada tolerância ao produto formado, o que lhe confere vantagem competitiva com outros microrganismos, viabilidade em ampla faixa de temperatura, e atividade em ambiente com elevada acidez (ANDRIETTA, STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006; ALEXANDRINO, 2012), favorecendo seu uso em processos fermentativos. Deste modo, a inoculação da *Saccharomyces cerevisiae* tem sido responsável por acelerar o processo fermentativo, devido, principalmente, ao rápido consumo de carboidrato. Batista et al. (2015) e Ramos et al. (2014) confirmam a ação da levedura *S. cerevisiae*. Segundo dados apresentados pelos autores, a inoculação em fermentação de cacau resultou em processo fermentativo mais rápido, com alta taxa de consumo de carboidratos e elevada produção de etanol e ácidos orgânicos, que evitam o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis no processo.

A aplicação de culturas *starters* em processos fermentativos permite a obtenção de um produto de qualidade, padronizado, e um processo de maior controle (MENEZES et al., 2016).

3.6 Degradação protéica

A degradação protéica que ocorre durante a fermentação é fundamental na formação do aroma durante a torrefação. A degradação das proteínas de reserva pode atingir 20% do conteúdo das sementes de cacau, formadas principalmente pelas frações albumina (52%) e

vicilina (43%) (VOIGT, BIEHL, WAZIR, 1993). Essas passam por mudanças drásticas durante a fermentação, sendo degradadas a peptídeos e aminoácidos. Segundo Voigt, Biehl, Wazir (1993) e Laloi et al. (2002), os aminoácidos obtidos por degradação das vicilinas são os principais precursores de aroma de cacau, pois, entre estas e as albuminas, as primeiras são os principais alvos da ação de endoproteases, aminopeptidases e carboxipeptidases e em torno de 88 a 90% de seu conteúdo é degradado (AMIN, JINAP, JAMILAH, 1997; VOIGT, BIEHL, WAZIR, 1993). As albuminas possuem peso molecular de 21 kDa, e as vicilinas tipo globulinas, 66kDa, e geram as sub-frações de 47kDa, 31kDa e 15 kDa (LEAL et al., 2008; SPENCER, HODGE, 1992; VOIGT, BIEHL, WAZIR, 1993).

Para a ocorrência da degradação dessas proteínas, é necessário que as proteases sejam ativadas durante o processo fermentativo (SCHWAN, WHEALS, 2004). Foi relatado que para a melhor ação das proteases na clivagem das proteínas das sementes, o meio deve estar ácido, com ótimo de pH em torno de 3,5, obtido pela produção de ácidos orgânicos durante a fermentação e posterior difusão destes no interior da semente, principalmente do ácido acético (AMIN et al., 2002). Contudo, a rota da formação de peptídeos durante o processo fermentativo de cacau ainda não está totalmente estabelecida (MAYORGA-GROSS et al., 2016).

3.7 Processos durante a torração

Uma das principais reações de formação de aroma em alimentos é a reação de Maillard. Durante o processo fermentativo do cacau são obtidos aminoácidos livres e açúcares redutores através da ação de enzimas, estes compostos reagem entre si gerando melanoidinas e outros compostos não voláteis, e mais de 3500 compostos voláteis, que são os responsáveis pela formação de aroma e sabor (BASTOS et al., 2002; RIBEIRO, 2014). O aroma do chocolate é resultante do conjunto de compostos voláteis ou não, presentes na amêndoa de cacau, após passar pelo processo de cura (fermentação e torração) (ALMEIDA, 2003). Segundo Nijssen et al. (1996), mais de 600 compostos voláteis já foram identificados no cacau ou em produtos de cacau. Counet et al. (2002) e Ioannone et al. (2015) descreveram alguns desses grupos responsáveis pelo aroma de chocolate, dentre eles se situam os compostos heterocíclicos (pirazinas, pirróis, piridinas, furanos e tiazóis), hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, fenóis, aminas, amidas e acetatos. Dentre esses grupos de compostos, as pirazinas são as principais, que estão presentes em maiores quantidades (aproximadamente 17%), seguidos de ésteres (12%), ácidos (11%) e hidrocarbonetos (9%) (ALMEIDA, 2003).

As pirazinas são compostos formados por dois átomos de nitrogênio situados nas posições 1 e 4 de um anel de 6 carbonos, denominados como aromatizantes ou flavorizantes pela indústria alimentícia, contribuindo para a formação de aroma de torrado, sendo usualmente associados à qualidade do aroma de chocolate (SEITZ, 1994; de MARIA, MOREIRA, TRUGO, 1999; MAGA, SIZERI, 1973; NAGAMATO et al., 2010; FARAH, ZAIBUNNISA, MISNAWI, 2012). Elas podem ser geradas por diferentes meios, entretanto é relatado que são formadas pela reação de Maillard, através da condensação entre açúcares e aminoácidos, por degradação de Strecker ou por pirólise de hidroxí-aminoácidos (NAGAMATO et al., 2010; MAGA, SIZERI, 1973; COUNET et al., 2002).

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, N. **Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridização e evolução adaptativa.** Dissertação (Mestre em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. 101p.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, 1998. p. 21-28.
- ALMEIDA, M. H. G. **Efeito da tecnologia pós colheita na fração volátil do *flavor* a cacau. Estudo de uma fermentação em São Tomé e Príncipe.** Departamento de Agroindústrias e Agronomia Tropical, Secção de Agronomia Tropical, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal. 2003.
- AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Vicilin-class globulins and their degradation during cocoa fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, n.1, p. 1–5. 1997.
- AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B.; HARIKRISNA, K.; BIEHL, B. **Oligopeptide patterns produced from *Theobroma cacao* L of various genetic origins.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 82, p. 733-737, 2002.
- ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 87-99, 2003.
- AYDIN, S.; OZDEMIR, Y. Development and Characterization of Carob Flour Based Functional Spread for Increasing Use as Nutritious Snack for Children. **Journal of Food Quality**, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5028150>
- BASTOS, D. H. M.; FRANCO, M. R. B.; SILVA, M. A. A. P. da; JANZANTTI, N. S.; MARQUES, M. O. M. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 122-129, 2002.

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, p. 221-227, 2015.

BIEHL, B.; ZIEGELER-BERGHAUSEN, H.; SRIVASTAVA, S.; XIONG, Q.; PASSERN, D.; HEINRICHS, H.; HAMMOOR, M. Cocoa specificity of proteolytic *flavor* precursors: the cocoa seed proteases. **Proceedings of the 1991 International Cocoa Conference: Challenges in the 90s**, Kuala Lumpur, Malaysia. 1991.

BIEHL, B.; HEINRICHS, J.; VOIGT, G.; BYTOF, G.; AND SERRANO, P. Nature of proteases and their action on storage proteins in cocoa seeds during germination as compared with fermentation. In **12th Cocoa Research Conference**, Salvador, p. 18–23. Lagos, Nigeria: Cocoa Producers Alliance. 1996.

BOFO, D. C. S.; CASTRO, H. F.; MEDEIROS, M. B. Immobilization efficiency comparison between *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerant) and *S. cerevisiae* ATCC 9763 yeasts in sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 121-124, 2005.

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

BRITO, E. S.; GARCIA, N. H. P.; AMANCIO, A. C. Use of a Proteolytic Enzyme in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n. 4, p. 553-558, 2004.

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

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

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; FARFÁN, J. A. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, 2008. p. 986-993.

CHEN, J.; LIANG, Y.; LI, X.; CHEN, L.; XIE, F. Supramolecular structure of jackfruit seed starch and its relationship with digestibility and physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 269–277. 2016.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; OUWERX, C.; COLLIN, S. Use of Gas Chromatography–Olfactometry to Identify Key Odorant Compounds in Dark Chocolate. Comparison of Samples before and after Conching. **Journal Agricultural and Food Chemistry**.v.50, p. 2385–2391, 2002.

ELEVITCH, C. R.; MANNER, H. I. *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit): Moraceae (mulberry family). **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**, p. 1-17, 2006.

FADEL, H. H. M.; MAGEED, M. A. A.; SAMAD, A. K. M. E. A.; LOTFY, S. N. Cocoa substitute: Evaluation of sensory qualities and flavor stability. **European Food Research and Technology**, v. 223, 2006. p. 125-131.

FAIRTRADE FOUNDATION. Fairtrade and Cocoa – Commodity Briefing, p.1–17. 2011. Disponível em: <<http://curtisresearch.org/wp-content/uploads/Cocoa-Briefing-FINAL-8Sept11.pdf>>, acesso em 08/03/18

FARAH, D. M. H., ZAIBUNNISA, A. H., MISNAWI. Optimization of cocoa beans roasting process using Response Surface Methodology based on concentration of pyrazine and acrylamide. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 4, p. 1355–1359. 2012.

FERDMAN, R. A. **The world's biggest chocolate-maker says we're running out of chocolate.** The Washington Post, 2014. Disponível em: <<https://www.washingtonpost.com/news/wonk/wp/2014/11/15/the-worlds-biggest-chocolate-maker-says-were-running-out-of-chocolate/>>, acesso em 14/12/2017.

FERRÃO, J. E. M. A “morte da semente” sua importância na tecnologia pós-colheita do cacau. **Revista Ciência Agrária**. v.31, n.1, 262-267, 2008.

FOLEGATTI, M. I. S. Aproveitamento industrial do umbu: Processamento de geléia e compota. **Ciência agrotécnica**, v.27, n.6, p.1308-1314, 2003.

FONSECA, G. G.; GOMBERT, A. K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. Physiology of the *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **FEMS Yeast Research**, n. 7, 2007. p. 422-435.

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

GENOVESE, M. I.; LANNES, S. C. S. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, 2009. p. 810-814.

Goldstein Research. Global Cocoa Beans Market Outlook 2024: Global Opportunity And Demand Analysis, Market Forecast, 2016-2024. Publicado em 2017. Disponível em: <<https://www.goldsteinresearch.com/report/global-cocoa-beans-market-outlook-2024-global-opportunity-and-demand-analysis-market-forecast-2016-2024>>, acesso em 05/04/2018.

HASHIM, P.; SELAMAT, J.; SYED MUHAMMAD, S. K.; 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, p.535–542. 1998.

ICCO – **Internacional Cocoa Organization**. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**. May (2013). Disponível em: <<https://www.icco.org/about-us/icco-news/229-may-2013-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>>, acesso em 05/03/2018.

ICCO – **Internacional Cocoa Organization.Cocoa Marketing Review**. May (2013). Disponível em: <file:///C:/Users/Amanda/Downloads/ICCO%20monthly%20review_May%202013.pdf>, acesso em 17/02/2018.

ICCO – **Internacional Cocoa Organization.Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**.May (2014). Disponível em: <<https://www.icco.org/about-us/icco-news/259-may-2014-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>>, acesso em 17/02/2018.

ICCO – **Internacional Cocoa Organization.Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**.May (2015). Disponível em: <<https://www.icco.org/about-us/icco-news/282-may-2015-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>>, acesso em 17/02/2018.

ICCO – **Internacional Cocoa Organization.Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**.May (2016). Disponível em: <<https://www.icco.org/about-us/icco-news/317-may-2016-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>>, acesso em 17/02/2018.

ICCO – **Internacional Cocoa Organization.Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**. May (2017). Disponível em:< <https://www.icco.org/about-us/icco-news/372-may-2017-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>>, acesso em 17/02/2018.

ILLEGHEMS, K.; DE VUYST, L.; PAPALEXANDRATOU, Z.; WECKX, S. Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity, **Plos one**, v. 7, p. 1-11, 2012.

IOANNONE, F.; DI MATTIA, C. D.; DE GREGORIO, M.; SERGI, M.; SERAFINI, M.; SACCHETTI, G. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. **Food Chemistry**, v. 174, 2015. p. 256–262.

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

JINAP, S.; ZESLINDA, A. Influence of organic acids on *flavor* perception of Malaysian and Ghanaian cocoa beans. **Journal of Food Science and Technology**, v.32, p. 153–155. 1995.

JINAP, M. N.; NAZAMID, S.; JAMILAH, B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 407-417, 2002.

KOSTINEK, M.; BAN-KOFFI, L.; OTTAH-ATIKPO, M.; TENIOLA, D.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. K.; FRANZ, C. M. A. P. Diversity of Predominant Lactic Acid Bacteria Associated with Cocoa Fermentation in Nigeria. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 306-314, 2008.

LALOI, M.; MCCARTHY, J.; MORANDI, O.; GYSLER, C.; BUCHELI, P. Molecular and biochemical characterisation of two aspartic proteinases TcAP1 and TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. **Planta**, v.215, p.754–762. 2002.

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

LIMA, E. D. P. A.; PASTORE, G. M.; BARBERY, S. D. F.; GARCIA, N. H. P.; BRITO, E. S.; LIMA, C. A. A. Obtenção e utilização de enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha madura no melhoramento do sabor de cacau. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, 2001. p. 709-713.

LIMA, L. L. A.; SCHULER, A.; GUERRA, N. B. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 5, 2010. P. 1186-1189.

LOPES, A. S.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das condições de torração após a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobromagrandiflorum* Schum) e cacau (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 309-316, 2003.

MADRUGA, M. S.; DE ALBUQUERQUE, F. S. M.; SILVA, I. R. A.; DO AMARAL, D. S.; MAGNANI, M.; NETO, V. Q. Chemical, morphological and functional properties of Brazilian jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) seeds starch. **Food Chemistry**, v.143, p.440–445. 2014.

MAGA, J. A.; SIZER, C. E. Pyrazines in foods: a review. **Journal agricultural and food chemistry**, v.21, n.1. 1973.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado. Parte 1: Compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 209-217, 1999.

MARTINS, J. M.; SANTOS, J. H. F.; SILVA, W. S.; SILVA, V. B.; ARRUDA, J. A. P.; NASCIMENTO, J. A. R.; DORTAS, L. C.; FREITAS, A. J. A.; RAMOS, A. A. **Melhoria da qualidade do cacau**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ilhéus. CEPLAX/CENEX, 2011. 45p.

MAYORGA-GROSS, A. L.; QUIRÓS-GUERRERO, L. M.; FOURNY, G.; VAILLANT, F. An untargeted metabolomic assessment of cocoa beans during fermentation. **Food Research International**, v.89, p. 901–909. 2016.

MEDEIROS, M. L.; LANNES, S. C. S. Avaliação química de substitutos de cacau e estudo sensorial de achocolatados formulados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.2, p.247-253, 2009.

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. p. 83–90.

MOHNEN, D. Pectin Structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, 2008. p. 266-277.

NAGAMATO, R. J.; NETO, G. K.; WASZCZYNSKYJ, N.; CÓRDOVA, K. R. V. Tratamento de compostos orgânicos voláteis pela técnica da incineração catalítica. **Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia**, n. 1, ano 1, 2010.

NIJSSEN, L. M.; VISSCHER, C. A.; MAARSE, H.; WILLEMSSENS, L. C.; BOELEN, M. H. Cocoa. In: **Volatile compounds in food**. Qualitative and quantitative data, Zeist, TNO Nutrition and Food Research Institute. 1996.

OLIVEIRA, L. F. de. **Efeito dos parâmetros do processo de desidratação de jaca (*Artocarpusheterophyllus* Lam.) sobre as propriedades químicas, físico-químicas e a aceitação sensorial**. 2009. 121p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

OLIVEIRA, L. F. **Emprego de métodos quimiométricos em análises por cromatografia gasosa bidimensional abrangente para avaliação de cacau, seus derivados e alfarroba**. 2016. 128p. Tese (Doutora em Ciências). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 2016.

OLIVEIRA, T. B.; GENOVESE, M. I. Chemical composition of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) and cocoa (*Theobroma cacao*) liquors and their effects on streptozotocin-induced diabetic rats. **Food Research International**, v. 51, 2013. p. 929–935.

OWUSU, M.; PETERSEN, M. A.; HEIMDAL, H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, 2012. p. 446-456.

PIEMOLINI-BARRETO, L. T. **Enzimas pectinolíticas de *Kluyveromycesmarxianus*: seleção e aplicação em processos da indústria de alimentos**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. 111p.

PIEMOLINI-BARRETO, L. T.; ZACARIA, J.; DELAMARE, A. P. L.; ANTONIO, R. V.; ECHEVERRIGARAY, S. Variation in phenolic compounds, anthocyanins, and color in red wine treated with enzymatic extract of *Kluyveromycesmarxianus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2013, v. 30, p. 1541–1547.

PINI, G. F.; BRITO, B. E. S.; GARCÍA, N. H. P.; VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. A. Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) Method for the Chromatographic Determination of Alkylpyrazines in Cocoa Samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, 2004. p. 267-271.

PIRES, J. L.; CASCARDO, J. C. M.; LAMBERT, S. V.; FIGUEIRA, A. Increasing cocoa butter yield through genetic improvement of *Theobroma cacao* L: seed fat content variability, inheritance, and association with seed yield. **Euphytica**, v.103, p.115–121. 1998.

RAMOS, S. M. N.; DANZL, W.; ZIEGLER, G.; EFRAIM, P. Formation of volatile compounds during cupuassu fermentation: Influence of pulp concentration. **Food Research International**, v. 87, p.161–167, 2016

RIBEIRO, M. S. **Avaliação do 5-hidroximetilfurfural como produto de reação de Maillard durante o processo de torração de amêndoas de cacau (*Theobromacacao* L.)**. 2014. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2014.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; OROZCO-AVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, 2011. p. 250–258.

ROSA, C. S.; TESSELE, K.; PRESTES, R. C.; SILVEIRA, M.; FRANCO, F. Effect of substituting of cocoa powder for carob flour in cakes made with soy and banana flours. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 5, p. 2111-2118, 2015.

SAXENA, A.; BAWA, A. S.; RAJU, P. S. Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). In: YAHIA, E. M. **Postharvest Biology and Technology of Tropical And Subtropical Fruits**. Ed.; Woodhead: Philadelphia, PA, USA, p.275–298. 2011.

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 - Symposium Supplement**, v. 79, 1995.p. 96-107.

SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**. 1997. V. 21. P. 234-244.

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

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

SEAGRI – **Secretária de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária**. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br>>, acesso em 20/07/2016.

SEITZ, E. W. Fermentation production of pyrazines and terpenoids for *flavor* and fragrances. In **Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients**. Gabelman, A., Ed.; Wiley: New York, 1994; p. 95–134.

SPADA, F. P.; ZERBETO, L. M.; RAGAZI, G. B. C.; GUTIERREZ, E. M. R.; SOUZA, M. C.; PARKER, J. K.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Optimization of Postharvest Conditions To Produce Chocolate Aroma from Jackfruit Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 1196-1208, 2017.

SPENCER, M. E.; HODGE, R. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*. **Planta**, v.186, p.567–576. 1992.

SROUR, N.; DAROUB, H.; TOUFEILI, I.; OLABI, A. Developing a carob-based milk beverage using different varieties of carob pods and two roasting treatments and assessing their effect on quality characteristics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 3047-3057, 2016

TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. T.; PEREIRA, G. A. G. Time for chocolate: current understanding and new perspectives on cacao Witches' broom disease research. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 10, 2015.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In: DOYLE, M. J., BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington, D. C., p. 721-733, 2001.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VOIGT, J.; BIEHL, B.; WAZIR, S. K. S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**, v. 47, n.2, p.145–151. 1993.

VOIGT, J.; HEINRICHS, H.; VOIGT, G.; BIEHL, B. Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. **Food Chemistry**, v. 50, p.177–184, 1994a.

VOIGT, J.; BIEHL, B.; HEINRICHS, H.; KAMARUDDIN, S.; GAIM MARSONER, G.; HUGI, A. *In vitro* formation of cocoa specific aroma precursors: Aroma-related peptides generated from cocoa seed protein by cooperation of an aspartic endoprotease and a coarboxypeptidase. **Food Chemistry**, v.49, p.173–180. 1994b.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, 2001. p. 496-522.

WORLD COCOA FOUNDATION. The cocoa value chain faces a number of challenges in growing and selling this delicate crop. Disponível em: <<http://www.worldcocoafoundation.org/about-cocoa/challenges/>>, acesso em 05/04/2018.

YOUSIF, A. K.; ALGHZAWI, H. M. Processing and characterization of carob powder. **Food Chemistry**, v. 69, 2000. p. 283-287.

4 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE UTILIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE SEMENTES DE JACA POR MEIO DO EMPREGO DE CULTURAS *STARTERS* DE LEVEDURAS

RESUMO

O processo de fermentação é essencial para a obtenção de amêndoas de cacau adequadas à produção de chocolates, sendo realizado com a microbiota natural, envolvendo três principais grupos de microrganismos, leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas. Contudo, o uso de culturas *starters* pode melhorar o processo fermentativo, tornando-o mais rápido, menos susceptível a contaminações e mais direcionado à obtenção de características de sabor e aroma desejados para a produção de chocolates. Recentemente, estudo evidenciou que ao submeter sementes de jaca dura a processos de fermentação, secagem e torração similares aos utilizados no cacau, são obtidos compostos voláteis que conferem aroma de chocolate. Porém, esse processo foi conduzido com a microbiota natural, favorecendo assim a produção de muitos compostos de *off-flavor*. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar os grupos de microrganismos que atuam na fermentação natural e utilizar culturas *starters* de leveduras, a fim de melhorar o processo fermentativo de sementes de jaca dura. Foram realizados três tratamentos: controle, sem inoculação de microrganismos; KM, com inoculação de *Kluyveromyces marxianus*; e MIX, contendo *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo também avaliado o consumo e produção de compostos. A caracterização microbiológica foi realizada no controle, e observou-se a presença dos três principais grupos presentes na fermentação de cacau (leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas). Além disso, observou-se que a aplicação da mistura de culturas *starters* acelerou o processo fermentativo e contribuiu para a produção de precursores de aroma, através da degradação protéica, indicando seu uso potencial na fermentação de sementes de jaca dura visando à obtenção de aroma de chocolate.

Palavras-chave: Subprodutos; Fermentação; Culturas starters; Microrganismos

ABSTRACT

The fermentation process is essential for the obtainment of cocoa almonds suitable to chocolate production, being carried out with the natural microbiota, involving three main groups of microorganisms, the yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. However, the use of starter cultures can improve the fermentation process, making it faster, less susceptible to contamination and more directed to obtaining desired flavor and taste for the chocolates production. Recently, a study has evidenced that by subjecting hard jackfruit seeds to fermentation, drying and roasting processes similar to those used in cocoa, volatile compounds that confer chocolate aroma are obtained. However, this process was conducted with the natural microbiota, favoring the production of many off-flavor compounds. Thus, the aim of the present work was to identify the groups of microorganisms that act in the natural fermentation, and to use yeast starters cultures in order to improve the hard jackfruit seeds fermentative process. Three treatments were carried out, the control, without microorganisms inoculation, the KM with *K.marxianus*, and MIX with *K.marxianus* and *S. cerevisiae*, being followed the consumption and production of compounds. Microbiological characterization was performed in the control, and it was observed the presence of the three main groups present in cocoa fermentation (yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria). In addition it was observed that the application of starters culture mixture accelerated the fermentative

process and contributed to higher production of aroma precursors, through protein degradation, indicating its potential use in the hard jackfruit seeds fermentation aiming the chocolate aroma obtaining.

Keywords: By-products; Fermentation; Starter cultures; Microorganisms

4.1 INTRODUÇÃO

As sementes de cacau constituem a principal matéria-prima para a produção de chocolates, contudo, apresentam características sensoriais inadequadas, como adstringência e amargor, assim é necessário submetê-las a etapas de processamento que as modifiquem e as caracterizem com aroma, cor e sabor típicos dos produtos de cacau. Essas etapas envolvem a fermentação, secagem e torração. O processo de fermentação é considerado primordial na obtenção de sementes adequadas e determinam a qualidade final dos produtos de cacau (HO, ZHAO, FLEET, 2015; KONGOR et al., 2016; MAYORGA-GROSS et al., 2016). Essa etapa tem o objetivo de remover a polpa mucilaginosa que envolve a semente, por meio da liquefação, ocasionar a morte das sementes, e promover o desenvolvimento de precursores de cor, sabor e aroma (NIGAM, SING, 2014).

A polpa de cacau é rica em açúcares fermentescíveis, e apresenta pH ácido (entre 3,0 - 3,8) devido à presença de ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico. Essas características favorecem o desenvolvimento espontâneo de microrganismos, que atuam fermentando a polpa e ocasionando diversas mudanças bioquímicas. Embora possam ser identificados diversos microrganismos, três grupos apresentam maior relevância durante a fermentação: as leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas, os quais atuam sequencialmente (ARDHANA, FLEET, 2003; BIEHL, ZIEGLEDER, 2003; DAND, 2011). As condições iniciais de acidez, teor de açúcares e baixa concentração de oxigênio favorecem a ação de leveduras, que convertem carboidratos em etanol e produzem enzimas responsáveis pela degradação da polpa (pectinases) e de carboidratos (invertase) (ARDHANA, FLEET, 2003; SCHWAN, WHEALS, 2004; CAMU et al., 2007; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011). A ação dessas enzimas permite aeração da massa e liberação de açúcares. Posteriormente se tem a presença de bactérias lácticas, as quais produzem ácido lático a partir de ácido cítrico e açúcares (SCHWAN, ROSE, BOARD, 1995; CAMU et al., 2007). No período final do processo, com a aeração da massa, há conversão de etanol em ácido acético por ação de acetobactérias, em um processo exotérmico, que provoca aumento da

temperatura, atingindo em torno de 50 °C (SCHWAN, ROSE, BOARD, 1995; SCHWAN, WHEALS, 2004; CAMU et al., 2007).

Os produtos da ação dos microrganismos, principalmente o ácido acético e o aumento da temperatura, provocam a morte do embrião das sementes, reduzindo a seletividade das membranas, possibilitando a reação entre enzimas e substratos, produzindo degradações (LEFEBER et al., 2011; AFOAKWA et al., 2008). Entre essas, há a degradação protéica, ocasionada pela interação entre proteínas e proteases endógenas, que geram peptídeos e aminoácidos que são os principais precursores de aroma e sabor de chocolate, os quais reagem com açúcares redutores, por meio da reação de Maillard durante a torração (CAMU et al., 2008; HASHIM et al., 1998; THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001).

A obtenção de eficácia no processo fermentativo é altamente dependente de uma adequada aeração (LEAL et al., 2008). No início do processo fermentativo, a presença de polpa mucilaginosa envolvendo as sementes reduz a difusão de oxigênio na massa fermentativa, contribuindo para a anaerobiose, essencial para a ação de leveduras na produção de etanol (SCHWAN et al., 1995; UENOJO, PASTORE, 2007). Contudo, o excesso de polpa limita a difusão de oxigênio, promovendo uma fermentação lenta, com elevada produção de ácido láctico e etanol e reduz a oxidação do ácido acético a CO₂ na fase final, aumentando a acidez residual nas sementes obtidas (BIEHL et al., 1991; JINAP, ZESLINDA, 1995; JINAP, NAZAMID, JAMILAH, 2002).

A fermentação de cacau é realizada com a microbiota natural, contudo, já foi relatado que o uso de culturas *starters* pode melhorar o processo e produzir sementes com características sensoriais melhoradas (LEAL et al., 2008; RAMOS et al., 2014; VISINTIN et al., 2017). As espécies *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* foram identificadas como uma das principais em fermentações naturais de cacau (ILLEGHEMS et al., 2012; ARDHANA, FLEET, 2003; SCHWAN, WHEALS, 2004; NIELSEN et al., 2007). A espécie *K. marxianus* exerce importante papel na produção de pectinases, que hidrolisam a pectina da parede celular vegetal, permitindo a degradação da polpa e contribuindo, consequentemente, para a aeração da massa e obtenção de sementes com baixa acidez, elevada degradação protéica e coloração amarronzada (LEAL et al., 2008; SCHWAN, WHEALS, 2004). A espécie *S. cerevisiae* possui elevada capacidade fermentativa, acelerando o processo, e possui vantagem competitiva com outros microrganismos (ANDRIETTA, STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006; ALEXANDRINO, 2012; BATISTA et al., 2015; RAMOS et al., 2014). Deste modo, o uso de culturas *starters* de leveduras evita o

desenvolvimento de microrganismos contaminantes, permite a maior padronização no processo e a obtenção de produtos de qualidade (BATISTA et al., 2015; RAMOS et al., 2014; MENEZES et al., 2016).

Em trabalho anterior, realizado por Spada et al. (2017), os autores observaram que ao submeter as sementes de jaca dura aos processos de fermentação, secagem e torração semelhantes aos do cacau é possível obter perfil aromático similar ao de chocolate, evidenciando-o como um substituto potencial. Contudo, é necessário acompanhar o processo a fim de identificar as mudanças bioquímicas que ocorrem durante a fermentação. Além disso, ao se utilizar culturas *starters* de leveduras, espera-se a obtenção de produto com características mais próximas as do cacau.

4.2. OBJETIVO

4.2.1. Geral

O objetivo geral foi acompanhar o processo fermentativo da semente de jaca dura com e sem a inoculação de cultura “*starter*”, caracterizando a ação de microrganismos e o consumo de nutrientes e produção de compostos.

4.2.2. Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Realizar fermentação natural de sementes de jaca dura, isolar os microrganismos presentes na massa fermentativa e identificá-los fenotipicamente, caracterizando a microbiota natural e verificando semelhanças com o cacau;
- Realizar fermentação controlada, por meio da adição de culturas starters (*Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*);
- Avaliar as características da massa fermentativa (temperatura, pH, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, minerais, produção de ácido lático, ácido acético e etanol) e o consumo de nutrientes (açúcares e proteínas), e comparar os efeitos da aplicação de cultura *starter* no processo fermentativo.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Fermentações

Foram realizadas três fermentações, em períodos distintos da mesma safra. Para as duas primeiras fermentações, as jacas da variedade dura (JD) foram obtidas em uma propriedade particular localizada na cidade de Limeira-SP, colhidas manualmente no estado de maturidade fisiológica (estágio antes da fruta cair do pé, apresentando saliências

desenvolvidas e amareladas, com consistência firme quando pressionada). Para a última fermentação, houve necessidade de obtenção de novo fornecedor, localizado na cidade de Piracicaba-SP. As coletas das amostras foram realizadas no período de novembro de 2016 a janeiro de 2017. Após obtidas, as frutas foram higienizadas em água corrente e em seguida abertas no laboratório de Nutrição Humana e Alimentos, pertencente ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), sendo posteriormente fracionadas em polpa, semente e bagaço, e submetidas aos processos ilustrados na Figura 1.

Figura 1: Fluxograma das etapas e análises realizadas.

4.3.2 Preparo dos lotes fermentativos

As diferentes partes do fruto foram distribuídas igualmente entre os lotes da mesma repetição (Figura 2), para que houvesse homogeneidade na massa fermentativa em cada bloco do experimento (A', A'', A''') garantindo a padronização do mesmo. Os lotes fermentativos A', A'' e A''' foram compostos, de $8,0\text{kg} \pm 0,7$ de acordo com o volume de frutos obtidos no grau de maturação ideal, sendo 36,1% de semente, 53,4% de polpa, 9,3% de bagaço e 1,2% de folhas de bananeira, adicionados intencionalmente ou não de leveduras 0,1%.

Figura 2: Repetição dos lotes fermentativos em blocos.

As culturas *starters* (*Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*) purificadas foram fornecidas pelo laboratório de Química do Departamento de Ciências Exatas, pertencente à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. As culturas foram propagadas em caldo YEPD (1% extrato de levedura, 3% sacarose e 1% peptona), permanecendo sob agitação (150 RPM) a 30 °C, por 48 horas.

4.3.3 Fermentação

Os lotes fermentativos foram divididos em três tratamentos, um sendo submetido à fermentação microbiológica a partir da flora natural presente (controle), ou seja, sem inoculação de micro-organismos; e os outros utilizando dois grupos de leveduras (*Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*) como culturas *starters*, a fim de padronizar o processo fermentativo e potencializar a formação de compostos pirazínicos. Os tratamentos foram inoculados com aproximadamente 0,1% da massa fermentativa (peso fresco) da cultura purificada de *Kluyveromyces marxianus* (KM), e um tratamento inoculado com um mix 0,1% de *Kluyveromyces marxianus* (0,05%) e *Saccharomyces cerevisiae* (0,05%) (MIX). O volume total de cultura inoculada foi de aproximadamente 400 mL. Esses volumes foram calculados considerando-se que a cada 100 mL de caldo propagado, havia 2 gramas de leveduras viáveis.

As massas fermentativas foram dispostas isoladamente em recipientes plásticos, com orifícios de 2 cm, os quais tinham a finalidade de permitir o escoamento do caldo proveniente da degradação pécica da polpa de jaca. Esses recipientes foram acondicionados em estrutura isolante constituída de poliestireno expandido, permitindo a manutenção da temperatura, fator importante no processo de inviabilização embrionária da semente durante a fermentação. A massa foi envolta e coberta com folhas de bananeira.

Durante o período de fermentação, a cada 24 horas, foram avaliadas as temperaturas diretamente nos recipientes de fermentação, em três pontos diferentes (centro e laterais) com auxílio de termômetro digital e analógico, e mensurados os volumes de líquido drenado decorrentes da degradação pécica, utilizando-se proveta graduada. Posteriormente foram coletadas amostras em triplicata, nas quais foram analisados o pH da massa fermentativa, o teor de sólidos solúveis e acidez titulável. As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com o tempo de atuação dos diferentes grupos de microrganismos (leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas).

Durante o processo de fermentação, amostras de massa fermentativa dos diferentes tratamentos foram coletadas a cada 24 horas, congeladas e armazenadas a -26 °C para as determinações posteriores de ácido láctico, ácido acético, etanol, açúcares redutores, proteínas e minerais.

Após a etapa de fermentação, as sementes foram separadas do restante da massa fermentativa, e submetidas ao processo de secagem, a 60 °C durante 48 horas em estufa com circulação e renovação de ar (Solab, SL – 102), sendo que após 24 horas, a espermodermis foi retirada para efetiva secagem da amêndoa. O processo de torração foi realizado a 154 °C durante 35 minutos, condições previamente determinadas por Spada (2017) a partir de testes de otimização de tempo - temperatura. Segundo a autora, o uso de temperaturas de torração muito elevadas em sementes de jaca dura fermentadas ocasiona aroma de queimado. A moagem foi feita em moinho de martelos devido à rigidez da amostra, com atenção a manutenção da temperatura evitando perdas decorrentes de possíveis volatilizações. Amostras de 200 gramas de cada tratamento e de cada lote fermentativo foram torradas e posteriormente moídas. Após moagem, as amostras foram armazenadas refrigeradas e sob proteção de luz.

4.3.4 Determinação de pH

O pH da massa fermentativa foi determinado em três amostras de cada recipiente de fermentação, a cada 24 horas, com o auxílio de um pHmetro digital. Foram coletadas 10

gramas de massa fermentativa, em triplicata, as quais foram diluídas em 100 mL de água destilada e homogeneizadas com auxílio de gral com pistilo de porcelana.

4.3.5 Teor de sólidos solúveis (°Brix)

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado em três amostras de cada recipiente de fermentação, coletadas a cada 24 horas durante o processo fermentativo, com o auxílio de um refratômetro analógico RHB32.

4.3.6 Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada em três amostras de cada recipiente de fermentação, coletadas a cada 24 horas durante o processo fermentativo. Foram coletadas 10 gramas de massa fermentativa, em triplicata, as quais foram diluídas em 100 mL de água destilada e homogeneizadas com auxílio de gral e pistilo de porcelana. Posteriormente, as amostras foram tituladas com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até atingir a faixa de pH de 8,2 a 8,4. Os resultados foram expressos em % de ácido cítrico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985; AOAC, 1995).

4.3.7 Caracterização microbiológica durante a fermentação natural de sementes de jaca

Durante a segunda e terceira repetição do processo de fermentação (A'' e A''' – Figura 3) foi realizado isolamento dos microrganismos presentes nas massas fermentativas, com o intuito de identificar fenotipicamente quais espécies atuam. Era esperado que fossem encontrados microrganismos similares aos envolvidos na fermentação do cacau (leveduras, bactérias lácticas e acetobactérias). Portanto, o isolamento foi realizado visando à obtenção desses grupos de microrganismos, por meio da identificação em meios seletivos.

Figura 3: Esquema das análises de isolamento e caracterização microbológica

4.3.7.1 Leveduras

Foram coletadas duas amostras da massa fermentativa controle durante as primeiras 48-72 horas de fermentação, com o objetivo de identificar o crescimento de leveduras. Cada amostra (25g) foi coletada em Erlenmeyer® contendo 225 mL água peptonada (0,1%) esterilizada, seguindo-se uma etapa de homogeneização do conteúdo em Stomacher, obtendo-se a diluição 10^{-1} . A partir dessa amostra, foram feitas diluições seriadas em água peptonada (0,1%), adicionando-se 1 mL da diluição 10^{-1} a um tubo contendo 9 mL da água peptonada estéril, repetindo-se esse procedimento até obter a diluição 10^{-6} . Então as amostras das diferentes diluições foram inoculadas (0,1 mL) em placas de Petri® contendo meio MYGP (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1,5% de glicose, 2% de ágar, 400µL/L de ampicilina e 400µg/L de tetraciclina), sendo incubadas por 48h a 28°C (CLARK, 1965; SCHORTEMAYER et al., 1996). Após o período de incubação foi realizada a contagem das colônias em placas contendo de 30 a 300 colônias, e o armazenamento das mesmas a -80 °C (500 µL de suspensão de leveduras em 500 µL de solução de glicerol 30%). As colônias foram diferenciadas de acordo com suas características morfológicas, tais como forma, tamanho e cor.

4.3.7.2 Bactérias lácticas

No período de 96 horas da fermentação até o final (oitavo dia) foram coletadas duas amostras (a cada 24 horas) da massa fermentativa controle, com o objetivo de identificar o crescimento de bactérias lácticas. O preparo da amostra e as diluições foram realizadas conforme descrito no item 4.3.7.1, seguindo-se a inoculação (0,1 mL) em placas de Petri contendo meio Ágar Man Rogosa e Sharpe (MRS), adicionado de 100 mg/L de ciclohexamida para evitar crescimento de leveduras, sendo incubadas a 30 °C por 48h. Após incubação, as colônias foram caracterizadas de acordo com suas características morfológicas, contadas e armazenadas a -80 °C (500 µL de suspensão de bactérias lácticas em 500 µL de solução de glicerol 30%) (HO, ZHAO, FLEET, 2015; MAMHOUD et al., 2016).

4.3.7.3 Bactérias acéticas

No período final da fermentação, quando há aumento da aeração da massa fermentativa, há predominância de bactérias acéticas (HEEMSKERK, 1999). Com o intuito de identificar o crescimento das mesmas, foram coletadas 2 amostras da massa fermentativa controle, a partir do quarto dia de fermentação, a cada 24 horas, até chegar ao final (oitavo dia). O preparo da amostra e as diluições foram realizadas conforme descrito no item 4.3.7.1, seguindo-se a inoculação (0,1 mL) em placas de Petri contendo meio de *Frateur* (10g de extrato de levedura, 20g de etanol, 20g de carbonato de cálcio e 20g de Agar em 1 litro de água, com pH ajustado entre 6,0-7,0) (KRIEG, HOLT, 1984; CASSONI, 2008), sendo incubadas a 25°C por 5 dias. Após o período de incubação, as bactérias acéticas foram identificadas através da visualização da formação de um halo transparente em volta da colônia, devido à solubilização do carbonato de cálcio pelos ácidos produzidos pelos microrganismos, contadas, e armazenadas a -80 °C (500 µL de suspensão de bactérias acéticas em 500 µL de solução de glicerol 30%) (KRIEG, HOLT, 1984; CASSONI, 2008).

4.3.8 Açúcares redutores totais livres

Para a determinação dos açúcares redutores totais livres foi utilizada a metodologia de Somogyi & Nelson (Figura 4). Foram pesados 2 gramas ($\pm 0,05$ g) de amostra de massa fermentativa em béquer e adicionou-se 30 mL de água destilada, os quais foram agitados em mesa agitadora, a aproximadamente 100 RPM por 2,5 horas para extração dos açúcares. Posteriormente transferiu-se a solução, desprezando-se o conteúdo sólido, para balão

volumétrico de 100 mL, completando com água destilada. A solução obtida foi filtrada e diluída, e foi feita a determinação dos açúcares redutores livres totais transferindo-se 1 mL da mesma para tubos de ensaio e adicionando-se 1 mL do reagente de Somogyi. Após homogeneização, os tubos foram dispostos em banho-maria em ebulição por 10 minutos, e resfriados em água corrente até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 1 mL do reagente de Nelson em cada tubo, homogeneizou-se o conteúdo e completou-se o volume dos tubos para 12,5 mL. Após esse processo, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm, com auxílio do software *UV Probe* (BACILA, 1960; FALCONE, MARQUES, 1965). A determinação foi realizada em triplicata, em amostras dos oito dias de fermentação. Os resultados foram expressos em mg/g de massa fresca.

Figura 4: Determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi e Nelson.

4.3.9 Determinação de etanol

Para a extração do etanol da massa fermentativa, seguiu-se o procedimento descrito por Montipó (2012) e Silva et al. (2002), com modificações, utilizando tampão fosfato com concentração de 25 mM e pH 2,5 (ajustado com ácido fosfórico). Inicialmente foram pesadas $3 \pm 0,05$ gramas de cada amostra em Erlenmeyer® de 250 mL, onde foram adicionados 20 mL de tampão fosfato. Estes foram agitados a 150 RPM por um período de 2,5 horas. Após a agitação, a parte líquida foi transferida para tubos Falcon® e submetida à centrifugação por 10 minutos a 2975 xg sob refrigeração (5 °C). Após a separação de fases, o líquido foi filtrado em membrana éster celulose (MCE 47 mm x 0,45 µm) e o extrato obtido foi analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foram realizadas duas extrações para cada amostra (massa fermentativa dos dias 1, 4, 5 e 8) de cada tratamento. A metodologia utilizada foi adaptada de Ramos et al. (2014). A determinação de etanol foi realizada utilizando cromatógrafolíquido de alta eficiência (HPLC), no equipamento Shimadzu, LC20AT, com detector de índice de refração (RID-10A), utilizando-se coluna HPLCZorbax-NH₂ (250 mm x

4,6 mm x 5 μ m – Zorbax-NH₂), e temperatura do forno de 32 °C. A fase móvel foi composta de 57% de acetonitrila e 43% água, e o tempo de corrida foi de 20 minutos, com fluxo constante de 1 mL/min e 20 μ L de volume de injeção. Foram obtidos dois cromatogramas por extrato, os quais foram analisados no software LC solution com integração manual. A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas com base no tempo de retenção dos padrões injetados nas mesmas condições do equipamento. Os resultados foram expressos em mg/g de massa fresca.

4.3.10 Determinação ácido láctico e acético

Para a extração dos ácidos orgânicos da massa fermentativa, seguiu-se o mesmo procedimento realizado na extração do etanol, descrito no item 4.3.9 (MONTIPÓ, 2012; SILVA et al., 2002). As extrações foram realizadas em amostras de massa fermentativa dos 8 dias de fermentação, para todos os tratamentos realizados nos quatro lotes fermentativos. Foram realizadas duas extrações para cada amostra de cada tratamento. Após a extração, 750 μ L de extrato foram transferidos para vials de 1,5 mL, e o restante da amostra foi congelado a -26 °C. O equipamento utilizado para identificação e quantificação foi o HPLC (Agilent 1100), acoplado a uma bomba quaternária, detector de UV/VIS com comprimento de onda de 210 nm, coluna analítica ECLIPSE XDB C-18 (4,6 mm x 250 mm x 5 μ m), sistema de injeção automático com volume de 50 μ L, e sistema de aquisição de dados através do software *Chemstation*. Foi utilizado fluxo de 0,5 mL min⁻¹, fase móvel 100% tampão fosfato 25 mM em pH 2,5 e temperatura ambiente (25 °C $\pm$ 2 °C). Os solventes utilizados foram de grau de pureza para HPLC, e foram filtrados em filtro LCR em PTFE modificado 0,45 μ m e degaseificados. Após a passagem das amostras, foi injetado metanol 100% nas mesmas condições para limpeza da coluna. Os resultados foram expressos em mg/g de massa fresca.

4.3.11 Análise de proteínas

Com o intuito de verificar as mudanças na fração protéica durante o processo de fermentação, o perfil eletroforético das proteínas foi determinado nas sementes *in natura* e em amostras coletadas ao longo dos oito dias de fermentação, para os três tratamentos, do último lote fermentativo (fermentação 4). Para análise nas sementes, houve a remoção da mucilagem, a liofilização por 72 horas e a moagem do núcleo da semente com auxílio de pistilo e cadinho de porcelana.

4.3.11.1 Extração protéica

A extração protéica foi realizada de acordo com Leal et al. (2008) com adaptações. Após obtenção das sementes trituradas, aproximadamente 3 gramas de cada amostra foram ressuspensas em 5 mL de água destilada. Uma alíquota foi transferida para tubos Eppendorf® e centrifugadas a 1200 xg por 7 minutos para extração das proteínas solúveis, com posterior coleta do sobrenadante. Um total de 200 µL do sobrenadante foi coletado e adicionado a 200 µL de tampão de amostra (42,5% de água destilada, 12,5% de Tris-HCl 0,5M em pH 6,8, 20% de glicerol, 20% de SDS, 5% de β-mercaptoetanol, e 0,1% de bromofenol) sendo submetido à fervura por 5 minutos. Após esse processo, foi determinada a concentração protéica dos extratos (BRADFORD, 1976).

4.3.11.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A separação eletroforética das proteínas foi realizada de acordo com procedimento descrito por Laemmli (1970), com adaptações. Amostras com concentração de aproximadamente 10 µg de proteína foram dispostas separadamente nos poços do gel de acrilamida, utilizando concentração de 12,5% para géis de separação e 3% para os de empilhamento. A corrida foi realizada sob amperagem de 38 mA, por um período aproximado de 4,5 horas. Após a corrida eletroforética, os géis foram mergulhados em solução corante de Brillante Blue G a 0,1% em solução de ácido acético e metanol, permanecendo nesta por um período de 3 horas, sendo então descorados em solução de ácido acético e metanol. A identificação dos grupos protéicos foi realizada através de comparação com um padrão (Invitrogen®), e analisadas com ajuda de software Image Lab 3.0 (Bio Rad Laboratories).

4.3.12 Análise de minerais da massa fermentativa

A determinação dos minerais nas amostras das massas fermentativas foi realizada por digestão nitro-perclórica e leitura em espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Foram pesados $0,500 \pm 0,005$ gramas de amostra de massa fermentativa seca (em estufa a 105 °C) em tubos de vidro. Foram adicionados 10 mL de ácido nítrico a 65% em cada tubo, os quais foram inseridos no bloco digestor. A temperatura do bloco foi aumentada gradativamente, iniciando em 50 °C até atingir 150 °C, e foi mantida até que a solução ficasse transparente. Posteriormente, o bloco foi desligado e, quando os tubos atingiram temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de ácido perclórico 70%. O bloco foi

novamente aquecido gradativamente até atingir 200 °C. Após a digestão completa, o bloco foi desligado e as amostras foram transferidas para tubos Falcon[®], completando-se seu volume a 25 mL, os quais foram armazenados sob refrigeração até o momento da leitura. Para leitura, foi necessário realizar uma diluição 1:1 em água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25 °C), e as amostras foram analisadas em ICP-OES (Association of Official Analytical Chemists, 2005; SOLA-LARRAÑAGA, NAVARRO-BLASCO, 2009).

O procedimento de detecção foi realizado no Laboratório de Química Analítica Professor Henrique Bergamin Filho, pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), em ICP-OES (iCAP 7400 Duo Optical Emission Spectrometer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), utilizando-se as condições operacionais listadas na Tabela 1. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Qtegra. Foram determinados os teores de minerais (Ca, Fe, P, Mg, K, Na, S, Cu, Mn e B), em amostras do período inicial e final da fermentação para os lotes 3 e 4, em triplicata, com três repetições cada. Para garantir os melhores resultados, os elementos Ca, Fe, P, Mg, K, Na, S e B foram determinados em modo axial, enquanto Cu, Mn, Cr e Ni em modo radial. A escolha do modo de visualização do plasma levou em consideração que os microelementos estão presentes em menores concentrações na amostra, requerendo a visão axial (em que o posicionamento da tocha é horizontal em relação ao detector), que possibilita medidas com maior sensibilidade (PERKIN ELMER, 2008). Os resultados foram expressos em mg/100g de massa seca.

Tabela1 - Parâmetros operacionais utilizados na análise por ICP OES.

Potência da rádio-frequência aplicada (kW)	1,20	
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	12,0	
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,50	
Vazão do gás do nebulizador (L min ⁻¹)	0,60	
Taxa de aspiração da amostra (mL min ⁻¹)	1,50	
	Ca II	393,366
	Fe II	259,940
	P I	178,766
	Mg II	279,553
	K I	766,490
Linhas de emissão (nm)	Na I	588,995
	S I	180,731
	Cu I	324,754
	Mn II	257,610
	B I	249,773

Legenda: I: atômica; II: iônica.

4.3.13 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

As diferentes fermentações foram avaliadas utilizando delineamento fatorial duplo em blocos completos casualizados (DBC) com três repetições, sendo cada repetição em um período distinto na mesma safra. Os dados obtidos foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) com 5% de significância e submetidos ao teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico computacional R versão 3.3.1 (R CORE TEAM, 2016). Para análise dos minerais, foi utilizado teste F a 5% de significância.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Fermentações

Foram realizadas 3 fermentações (Figura 5) contendo 3 tratamentos: controle, MIX e *K. marxianus*. O período final da fermentação, definido de acordo com as características da massa fermentativa (valor de pH, acidez e teor de sólidos solúveis), acompanhados individualmente, ocorreu no oitavo dia, semelhante ao relatado por Pereira et al. (2013), que

indicaram fermentação natural de cacau em 6 dias. As sementes foram isoladas do restante da massa, e submetidas ao processo de secagem (60 °C por 48 horas).

Figura 5: Processo fermentativo da jaca dura, envolvendo a abertura dos frutos (A), separação da casca e bagaço (B), distribuição para fermentação (C), homogeneização (D), e a finalização do processo (E e F).

4.4.1.1 Controle de temperatura

As temperaturas foram mensuradas diariamente em três pontos em cada recipiente de fermentação, e as médias destes pontos estão expressas na Figura a seguir (Figura 6).

Figura 6: Medidas das temperaturas nos recipientes para os três lotes fermentativos realizados, respectivamente. Os valores apresentados, são a média de 6 repetições em cada tratamento, sendo 3 mensuradas em termômetro analógico, e 3 em termômetro digital.

As temperaturas observadas em cada uma das fermentações variaram de acordo com os tratamentos, e com os volumes de massa empregados. Nas primeiras fermentações, o tratamento controle apresentou os picos maiores de temperatura, situados em torno de 36,0

°C, seguidos dos tratamentos MIX e KM. Na última fermentação o tratamento MIX (41,2 °C) atingiu os picos maiores, seguido do controle (36,5 °C) e KM (36,2 °C). Esse perfil diferente na terceira fermentação pode ser devido ao fato dos frutos serem provenientes de outra propriedade, com possível variação de composição, a qual pode ter interferido no processo fermentativo, pois segundo Jentzsch et al. (2016) e Zhang et al. (2016), o teor de açúcar, amido, proteínas e minerais, podem interferir na fermentação, variando de acordo com a cultivar e região de produção. Do mesmo modo, esse resultado obtido na terceira fermentação pode ser decorrente apenas do volume de massa fermentativa, que foi maior e pode ter favorecido a ação das leveduras, especialmente da espécie *S. cerevisiae*, como mostram os resultados, culminando em maior temperatura.

Observa-se também que as maiores temperaturas foram obtidas na fermentação 3 (41,2 °C). Isso se deve ao volume de fermentação. Na última fermentação, os volumes de frutos foram maiores (8,7 kg) por recipiente, o que contribuiu para melhor formação de centro de calor, resultando, portanto, em temperaturas mais elevadas. De acordo com Jespersen et al. (2005), a ação de leveduras, bactérias lácticas e acéticas resultam no aumento da temperatura. Em estudos com cacau, foram mensuradas temperaturas superiores às do presente estudo, conforme relatado por Miguel et al. (2017), que obtiveram em torno de 44,8 °C no período final da fermentação contendo aproximadamente 100 kg de massa fermentativa e Crafacek et al. (2013), que ao fermentar 20 kg de cacau, obtiveram o valor máximo de 47 °C. Brito et al. (2017) obtiveram temperatura máxima próxima as do presente estudo (41 °C) ao fermentar cacau em lotes de 45 kg. Considerando-se a aplicação da fermentação em substitutos de cacau, Ramos et al. (2016) obteve pico de 38 °C na fermentação de cupuaçu em lotes de 4kg, e Spada et al. (2017), em estudo com fermentação de jaca dura, encontraram valores semelhantes aos obtidos no presente estudo (40 °C).

As temperaturas obtidas nas fermentações foram inferiores às comumente mensuradas na fermentação de cacau, que segundo Schwan e Wheals (2004), chegam a aproximadamente 50 °C, durante a conversão de etanol em ácido acético. A fermentação do cacau é realizada em lotes maiores, compesagens que variam de 10 kg a duas toneladas, sendo tradicionalmente utilizados lotes de 900 kg, o que contribui para melhor formação do centro de calor (OETTERER, REGITANO D'ARCE; SPOTO, 2006). A formação do centro de calor é extremamente importante no processo, pois, juntamente com o ambiente ácido, provocam a morte do embrião e perda da seletividade das membranas, permitindo que enzimas e substratos, antes compartimentados, reajam culminando em mudanças bioquímicas e produção de precursores de aroma (THOMPSON et al., 2001).

4.4.1.2 Exsudado

Durante o processo fermentativo, houve adrenagem de líquido decorrente da degradação ptica da polpa de jaca dura. Este lquido foi coletado e mensurado diariamente (Figura 7).

Figura 7: Volume de lquido exsudado por recipiente nos trs lotes fermentativos, A, B e C, respectivamente.

Durante as três fermentações realizadas observou-se a mesma tendência de exsudação, havendo maior volume no primeiro dia, o qual foi gradativamente diminuindo no decorrer do processo, devido ao consumo de substrato (polpa) ao longo dos dias. Além disso, é possível notar que os tratamentos inoculados com *Kluyveromyces marxianus* (MIX e KM) apresentaram maior volume exsudado, devido à produção e liberação de enzimas pectinolíticas (LEAL et al., 2008). A atividade pectinolítica é responsável pela elevada degradação da pectina presente nos tecidos da polpa da jaca, e liquefação da polpa. Portanto, quanto maior a atividade enzimática, maior a drenagem (PEREIRA et al., 2013). Essa característica é essencial para obtenção de produtos substitutos de qualidade, visto que, no cacau, a degradação pectica tem papel fundamental, pois aumenta a permeabilidade das sementes e a aeração da massa, que são fatores críticos para a obtenção de produtos derivados de qualidade, com características adequadas ao mercado (OUATTARA et al., 2017; LEAL et al., 2008). Resultados semelhantes foram identificados na fermentação de semente de cacau utilizando *K. marxianus* como cultura *starter*, comparado ao tratamento sem inoculação. A inoculação dessa espécie de levedura resultou em melhoria dos atributos finais do cacau, em relação à fermentação natural, a qual foi atribuída à drenagem da polpa e aeração da massa (LEAL et al., 2008).

Além disso, é possível detectar que a terceira fermentação apresentou o maior volume de líquido exsudado em relação às outras. Isso é resultado do maior volume de massa fermentativa presente nestes tratamentos, havendo, conseqüentemente, maior degradação pectica.

4.4.1.3 Teor de sólidos solúveis (°Brix)

O teor de sólidos solúveis apresentou decréscimo ao longo do tempo (Figura 8), devido ao consumo de açúcar, como principal substrato, pelas leveduras e bactérias lácticas.

Figura 8: Teor de sólidos solúveis mensurados ao longo dos 8 dias de fermentação. Os valores apresentados, são a média de 3 repetições em cada tratamento.

Entre os tratamentos, observou-se tendência de diminuição rápida e pronunciada naquele em que houve inoculação de *Saccharomyces cerevisiae* (tratamento MIX), devido ao elevado poder fermentativo desta espécie, que possui característica de fermentação rápida. Em trabalho anterior, Ramos et al. (2014), indicaram que a inoculação de *Saccharomyces cerevisiae* contribuiu acelerando o processo fermentativo de cacau; de modo similar, observou-se a mesma ação dessa espécie na fermentação de jaca dura, a qual consumiu o

açúcar mais rapidamente em relação aos tratamentos controle e inoculado somente com *K. marxianus*.

Houve queda do teor de sólidos solúveis, entretanto, ao final do processo, os valores passaram a se manter ou apresentaram ligeira elevação. Durante a fermentação, houve exsudação e também perdas por volatilização, que possivelmente concentrou o teor de açúcares, resultando em aumento dos teores de sólidos solúveis, ou a presença de ácidos contribuiu para o aumento nestes valores.

4.4.1.4 pH

O pH foi decrescendo ao longo do tempo (Figura 9), devido à produção de ácidos orgânicos durante a fermentação, realizada pelo grupo de bactérias lácticas e acéticas (KONGOR et al., 2016). Assim como descrito no presente estudo, Brito et al. (2017) também evidenciaram queda de pH durante a fermentação natural de cacau e Spada et al. (2017) também observaram a redução do pH durante o processo de fermentação da jaca dura. Os valores variaram entre aproximadamente 3,6 (menor valor) e 4,9 (maior valor), e não foi observada uma tendência entre os diferentes tratamentos.

Figura 9: Valores de pH dos diferentes tratamentos, nas três fermentações realizadas, respectivamente. Os valores apresentados, são a média de 3 repetições em cada tratamento.

A partir do terceiro dia de fermentação, os valores de pH se situaram em torno de 4,0 para todos os tratamentos. De acordo com Jinap e Dimick (1990), valores de pH próximos a 4,0 podem causar a morte do embrião. Portanto, observa-se que em todos os tratamentos provavelmente houve a morte do embrião, com consequente produção de compostos precursores de aroma.

4.4.1.5 Acidez titulável

Segundo Silva (2008), a titulação com uma base é a melhor forma de se quantificar o ácido presente em uma amostra. Conforme esperado, os valores, expressos em porcentagem de ácido, aumentaram no decorrer da fermentação, passando de aproximadamente 0,5% nos primeiros dias (dias 1 e 2), a 2,0% no período final (dia 8), como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10: Acidez titulável no decorrer dos oito dias de fermentação para todos os tratamentos, nas três fermentações realizadas, respectivamente. Os valores apresentados, são a média de 3 repetições em cada tratamento.

Isso se deve à elevada produção de ácidos que ocorre na fermentação, devido à ação de diferentes grupos de microrganismos, especialmente bactérias lácticas e acéticas (KONGOR et al., 2016). Correlacionando os valores de acidez com os de pH, observa-se que, embora ambos tenham apresentado grande variação ao longo do tempo, eles foram inversamente proporcionais, pois houve aumento da acidez conforme a redução do pH. Spada et al. (2017) e Rodrigues-Campos et al. (2011) também evidenciaram essa tendência no processo fermentativo de sementes de jaca dura e cacau, respectivamente.

Nos três lotes fermentativos, o controle apresentou os menores teores de ácidos, ou seja, a utilização de culturas *starters* resultou em maior produção. Porém, é necessária a identificação dos ácidos produzidos e de seus teores, pois eles podem ser benéficos ao processo. Segundo Jinap (1994), Thompson et al. (2001) e Rodriguez-Campos et al. (2011), o ácido láctico produzido durante a fermentação migra para o interior das sementes, permanecendo no cacau e no chocolate após o processamento, resultando em produto com flavor indesejável. O ácido acético, de acordo com Ho, Zhao e Fleet (2015), Batista et al. (2015) e Batista et al. (2016) é responsável pela morte das sementes, pois, juntamente com a elevada temperatura, atua na desintegração da membrana celular e migra para o interior da semente, induzindo reações enzimáticas que formam os precursores de aroma, importantes durante o processo fermentativo. Entretanto, em concentrações elevadas, o ácido acético é indesejável, fornecendo forte aroma de vinagre, prejudicando a qualidade dos produtos derivados dessa matéria-prima, principalmente em relação ao flavor.

4.4.2 Caracterização microbiológica

As contagens microbianas encontradas ao longo da fermentação estão apresentadas na Tabela 2. Nota-se que os resultados estão de acordo com os dados da literatura para fermentação de cacau.

Tabela 2: Crescimento de leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas no tratamento controle ao longo do tempo, durante os lotes fermentativos 2 e 3.

	Dias	Leveduras	Bactérias lácticas	Bactérias acéticas
Fermentação 2	2	$1,28 \times 10^5$ UFC/mL	-	-
	3	-	$2,02 \times 10^8$ UFC/mL	-
	4	-	-	$1,33 \times 10^3$ UFC/mL
Fermentação 3	2	$1,54 \times 10^5$ UFC/mL	-	-
	3	$< 10^3$ UFC/mL	$8,15 \times 10^7$ UFC/mL	-
	4	-	$2,84 \times 10^7$ UFC/mL	$< 10^3$ UFC/mL
	5	-	$2,14 \times 10^7$ UFC/mL	$4,32 \times 10^2$ UFC/mL
	6	-	$7,85 \times 10^6$ UFC/mL	$9,84 \times 10^2$ UFC/mL
	7	-	$1,36 \times 10^7$ UFC/mL	$6,86 \times 10^3$ UFC/mL
	8	-	$3,55 \times 10^6$ UFC/mL	$2,52 \times 10^4$ UFC/mL

A caracterização microbiológica, visando à identificação de leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas foi realizada no segundo lote fermentativo. Após a obtenção desses dados, optou-se por acompanhar o perfil microbiológico ao longo dos 8 dias de fermentação (terceiro lote fermentativo), com foco nos três grupos de micro-organismos já citados. A contagem de leveduras se situou em torno de 10^5 UFC/mL no segundo dia (48h), e menor que 10^3 UFC/mL no terceiro dia (72h), não sendo detectadas nos períodos posteriores. Assim como no presente estudo, Ardhana e Fleet (2003), Ho, Zhao e Fleet (2014) e Ho, Zhao e Fleet (2015) identificaram que as diferentes espécies de leveduras são predominantes nos estágios iniciais da fermentação de cacau, com declínio da população conforme o avanço do processo. Esses microrganismos são essenciais para a fermentação de cacau, conduzindo uma forte fermentação alcoólica, produzindo etanol e ácidos orgânicos, a qual contribui para a morte das sementes, evitando sua germinação e possibilita a ocorrência de conversões químicas, além da produção de enzimas pectinolíticas (HANSEN et al., 1998; ARDHANA, FLEET, 2003). Ademais, as leveduras são responsáveis pela produção de ésteres, ácidos graxos e alcoóis superiores que também contribuem para o flavor do chocolate (ARDHANA, FLEET, 2003; SCHWAN, WHEALS, 2004). Deste modo, supõe-se que as leveduras possuam a mesma importância na fermentação de jaca dura, contribuindo para a produção de substratos para as bactérias acéticas, e de ácidos, os quais são responsáveis pela morte das sementes, com consequente alteração bioquímica e produção de precursores de aroma.

A partir do terceiro dia, passou a ser observado o crescimento de bactérias lácticas, havendo contagens elevadas até o oitavo dia, com picos de 10^7 - 10^8 UFC/g nos dias 3 (48h) e

4 (72h) do processo fermentativo. Resultados semelhantes foram reportados por Ouattara et al. (2017), os quais verificaram contagens da ordem de 10^8 UFC/g de bactérias lácticas em massa fermentativa de cacau, com picos no terceiro e quarto dia da fermentação. Ardhana e Fleet (2003) encontraram populações ligeiramente superiores em fermentação de cacau, da ordem de 10^8 - 10^9 UFC/g, atingindo o máximo após 36 horas do início do processo. Bactérias lácticas também foram identificadas por Ho, Zhao e Fleet (2015) em fermentação de cacau. Os autores verificaram a presença das mesmas após 24 horas de fermentação, atingindo população máxima (10^6 UFC/g) e posterior declínio. As bactérias lácticas atuam metabolizando os açúcares presentes na polpa mucilaginosa do cacau produzindo ácido láctico, o qual possui importância na acidez e qualidade final da semente (THOMPSON et al., 2001; ARDHANA, FLEET, 2003). A partir do terceiro dia de fermentação de jaca dura, a contagem de bactérias lácticas foi bastante elevada, e permaneceu até o período final da fermentação, o que pode ter gerado a produção elevada de ácido láctico. A produção excessiva deste ácido pode levar a produção de sementes com elevada acidez, indesejável para a obtenção de substituto aromático de chocolate.

A partir do quarto dia da fermentação, observou-se a ação de bactérias acéticas (Figura 11), juntamente com as lácticas, devido a abertura dos recipientes de fermentação e consequente entrada de oxigênio. Além disso, a ação das enzimas pectinolíticas produzidas através do metabolismo das leveduras favorece a entrada de ar na massa fermentativa, pois é responsável pela redução da viscosidade da polpa de jaca, contribuindo para a ação de bactérias acéticas, pois estas possuem metabolismo aeróbio, e atuam convertendo etanol (sintetizado pelas leveduras a partir de açúcar) em ácido acético (OUATTARA et al., 2008; SCHWAN, ALAN, 2004). Ardhana e Fleet (2003) identificaram a presença deste grupo de bactérias no período inicial da fermentação de cacau (primeiras 24 horas). A população detectada foi de 10^6 a 10^9 UFC/g, de acordo com a extensão do revolvimento da massa fermentativa, com consequente aeração. Os dados obtidos pelos pesquisadores não estão em concordância com os detectados no estudo atual, o que provavelmente é devido às diferenças empregadas nos processos, pois para as sementes de jaca dura, os recipientes de fermentação permaneceram fechados até o quarto dia da fermentação, mantendo o processo em anaerobiose, impedindo o desenvolvimento das bactérias acéticas, enquanto no processo fermentativo de cacau realizado pelos autores, os lotes fermentativos foram mantidos em contato com o oxigênio, permitindo o desenvolvimento desses micro-organismos.

Figura 11: identificação de culturas de bactérias acéticas em meio Frateur, de acordo com suas características morfológicas (formação de halo decorrente da hidrólise do carbonato de cálcio presente no meio).

Por meio da caracterização microbiana, foi possível detectar a presença dos principais grupos de micro-organismos que atuam na fermentação de cacau. Deste modo, espera-se que os processos bioquímicos que culminam na formação de precursores sejam similares aos que ocorrem no cacau.

4.4.3 Secagem

Ao final do processo de fermentação, as sementes isoladas foram pesadas, dispostas em bandejas, e levadas à estufa de circulação de ar forçado a 60 °C por 24 horas. Após esse período, houve retirada das sementes para remoção das películas (Figura 12) que as recobriam e nova pesagem, seguida de retorno à estufa por mais 24 horas (para secagem total), retirada, pesagem e armazenamento das sementes sob refrigeração, até o momento de sua torração. Foram calculadas a porcentagem de umidade, matéria seca e rendimento.

Figura 12: Sementes com película e sem película.

Na Tabela 3 encontram-se os valores percentuais de umidade, matéria seca e rendimento para as fermentações realizadas.

Tabela 3: Teores de umidade removida, matéria seca e rendimento (%).

	Peso (g)	Controle	Mix	<i>K. marxianus</i>
Fermentação 1	% Umidade	43,42%	44,60%	45,30%
	% Matéria seca	56,58%	55,40%	54,70%
	Rendimento	53,98%	52,83%	52,05%
Fermentação 2	% Umidade	45,24%	45,72%	44,86%
	% Matéria seca	54,76%	54,28%	55,14%
	Rendimento	52,24%	51,69%	52,42%
Fermentação 3	% umidade	51,85%	52,79%	51,85%
	% Matéria seca	48,15%	47,21%	48,15%
	Rendimento	45,17%	43,83%	45,27%

Os teores de umidade removida após secagem se situaram em torno de 45 a 50%. O processo de secagem tem a finalidade de reduzir a umidade das sementes, tornando-as estáveis ao armazenamento, e deve ser feito imediatamente após a fermentação, sendo conduzido de maneira adequada a fim de evitar o desenvolvimento de fungos responsáveis por alteração nas características sensoriais (CRESPO, 1985; BECKETT, 1994). Após secagem, as amostras foram armazenadas individualmente sob refrigeração, até o momento de sua torração, a qual foi realizada em lotes de 200g a 154°C por 35 minutos em torrador Probat. Após torração, as sementes foram moídas em moinhos de martelos, e armazenadas sob refrigeração e proteção de luz.

4.4.4 Açúcares redutores totais livres

Os teores de açúcares redutores totais livres, mensurados ao longo dos 8 dias de fermentação, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: teor de açúcares redutores totais livres para os três tratamentos, em mg/g de massa fermentativa em base fresca, ao longo dos oito dias de fermentação.

Dias	Controle	Kmarx	Mix
1 (24h)	143,36 ^{aA} ±5,4	150,04 ^{aA} ±16,2	140,89 ^{aA} ±12,2
2 (48h)	116,26 ^{abB} ±3,2	128,66 ^{abB} ±10,2	101,89 ^{abB} ±17,6
3 (72h)	103,05 ^{aBC} ±11,0	107,15 ^{aC} ±3,1	76,17 ^{bc} ±8,7
4 (96h)	90,09 ^{aCD} ±16,8	79,40 ^{aD} ±16,0	55,01 ^{bd} ±6,0
5 (120h)	81,37 ^{aDE} ±12,0	71,43 ^{aDE} ±15,9	54,93 ^{bd} ±8,0
6 (144h)	72,21 ^{aDEF} ±13,6	64,14 ^{aDE} ±14,2	48,56 ^{bd} ±10,7
7 (168h)	67,52 ^{aEF} ±18,5	60,24 ^{aE} ±16,0	45,70 ^{bd} ±12,9
8 (192h)	60,25 ^{aF} ±17,6	57,89 ^{abE} ±12,5	43,97 ^{bd} ±11,4

Os valores seguidos por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que os tratamentos diferem significativamente entre si ($p < 0,05$), e os valores seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de fermentação, de acordo com o teste de Tukey.

Nos processos de fermentação alcoólica, há o consumo dos açúcares (frutose e glicose) por leveduras e sua transformação em etanol, majoritariamente, e em compostos secundários, como ésteres, alcoóis superiores e ácidos (ARDHANA, FLEET, 2003; CRAFACK et al., 2013; BATISTA et al., 2016). Desse modo, a partir dos dados apresentados, e conforme esperado, pode-se observar a redução das concentrações de açúcares redutores livres ao longo do tempo no processo fermentativo.

O tratamento MIX apresentou maior consumo de açúcares em relação aos demais tratamentos, além de redução mais drástica até o dia 4. Isso se relaciona aos perfis das culturas *statters* aplicadas, em ação conjunta. *Kluyveromyces marxianus* apresenta elevada atividade pectinolítica, reduzindo a viscosidade da massa e permitindo a liberação de açúcares, os quais, juntamente com os açúcares presentes na polpa, são consumidos rapidamente por *Saccharomyces cerevisiae*, que possui elevado poder fermentativo, acelerando o processo (SCHWAN, WHEALS, 2004; RAMOS et al., 2014; MENEZES et al., 2016). Visintin et al. (2017) observaram o mesmo perfil na fermentação de cacau, comparando o tratamento controle com o inoculado com *S. cerevisiae* e *Torulaspora*

delbrueckii. Segundo os autores, o consumo dos carboidratos foi mais rápido no tratamento inoculado. Ramos et al. (2014) e Oliveira (2015) também evidenciaram redução mais drástica no teor de açúcares na fermentação com inoculação de *S. cerevisiae* em relação à natural; e com inoculação de *K. marxianus* e *S. cerevisiae* em relação ao controle, respectivamente.

Observa-se também, que o rápido consumo de açúcares ocorre principalmente no período inicial da fermentação, até o quarto dia, sendo mais predominante entre o primeiro e o segundo dia. A partir do dia 4, até o período final, o teor de açúcares se manteve semelhante para o MIX, mas para os demais houve redução. Esse perfil de consumo evidencia a ação da *S. cerevisiae* no início do processo fermentativo. Assim como o observado na fermentação de jaca dura, Craack et al. (2013), Ramos et al. (2014) e Visintin et al. (2017) verificaram redução significativa do teor de açúcares nas primeiras 36 horas de fermentação de cacau, e Oliveira (2015), nas primeiras 24 horas.

Nos demais tratamentos, houve queda progressiva do teor de açúcares redutores livres, sendo significativa estatisticamente até o terceiro dia para controle, e até o quarto para KM. Em todos os dias as concentrações de açúcares foram estatisticamente iguais nos dois tratamentos, com valores ligeiramente maiores no tratamento KM até o terceiro dia de fermentação. A partir do quarto dia, KM apresentou valores inferiores ao controle, indicando maior consumo de açúcares. Embora *Kluyveromyces marxianus* seja responsável pela produção de pectinases, que permite maior degradação da polpa e liberação de açúcares (LEAL et al., 2008), a levedura não apresenta perfil de consumo rápido, deste modo, parte dos açúcares liberados são perdidos no líquido exsudado, devido à maior taxa de degradação da polpa em relação à de fermentação, evidenciando que a ação conjunta de *K. marxianus* e microbiota natural não foram eficazes no rápido consumo dos açúcares, os quais foram drenados, ou ainda que *K. marxianus* tenha interferido no desenvolvimento dos demais microrganismos. Assim, o tratamento KM e o controle, apresentaram valores semelhantes de consumo de açúcares.

4.4.5 Etanol

A concentração de etanol foi mensurada nos períodos de maior relevância durante o processo fermentativo. As determinações foram realizadas no dia inicial (dia 1), no período intermediário, onde houve oxigenação das massas fermentativas (dias 4 e 5), e no período final (dia 8). Os dados obtidos apresentam-se na Tabela 5.

Tabela 5: concentrações de etanol para os três tratamentos no decorrer do processo fermentativo, em mg/g de massa fermentativa em base fresca.

Horas	Controle	K Marx	Mix
Dia 1 (24h)	11,67 ^{aA} ±1,2	11,45 ^{aA} ±3,8	11,74 ^{aC} ±2,93
Dia 4 (96h)	10,29 ^{bA} ±2,0	13,06 ^{bA} ±4,5	24,86 ^{aAB} ±3,6
Dia 5 (120h)	9,14 ^{bA} ±0,8	10,77 ^{bA} ±4,14	17,89 ^{aBC} ±3,12
Dia 8 (192h)	9,01 ^{aA} ±0,82	9,01 ^{aA} ±0,43	10,82 ^{aC} ±1,0

Os valores seguidos por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que os tratamentos diferem significativamente entre si ($p < 0,05$), e os valores seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de fermentação, de acordo com o teste de Tukey.

De acordo com os dados apresentados, observa-se que, entre os tratamentos, somente o MIX diferiu dos demais nos períodos intermediários, apresentando concentrações de etanol superiores. Nos estágios iniciais e finais da fermentação, os valores foram estatisticamente iguais ($p < 0,05$) entre os três tratamentos, indicando que as culturas inoculadas passaram a agir mais rapidamente após as primeiras 24 horas, no estágio intermediário da fermentação, e que o consumo ou perda de etanol foi mais significativo no período final. Entre os tratamentos KM e controle, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) nas concentrações de etanol ao longo do processo fermentativo, e essas foram inferiores às do mix, pois a capacidade de degradação pectínica das pectinases produzidas pela levedura *Kluyveromyces marxianus* é bastante elevada, e desse modo, embora se tenha bastante substrato fermentescível, parte é drenado para fora do recipiente de fermentação, não sendo utilizado para sua conversão a etanol (SCHWAN, COOPER, WHEALS, 1997). No caso do controle, a fermentação ocorre de maneira mais lenta devido à menor população de leveduras, resultando em menor produção de etanol. Além disso, no caso do tratamento KM, além da elevada exsudação, parte do açúcar liberado provavelmente foi transformada por bactérias lácticas em ácido láctico, pois, segundo Camu et al. (2007 e 2008), esses microrganismos consomem açúcar, especialmente glicose e frutose, gerando ácido láctico, e, como produtos secundários, em menores concentrações, ácido acético e etanol. Desse modo, provavelmente houve competição com bactérias lácticas, reduzindo também a produção de etanol (como pode ser observado nos dados de produção de ácido

lático, que apresentaram concentrações superiores nos tratamentos inoculados). Nos demais tratamentos também há a ação de bactérias lácticas. Porém, no caso do MIX, devido à elevada capacidade fermentativa da *S. cerevisiae*, somente parte foi utilizada por bactérias lácticas, resultando em elevada produção de etanol por *S. cerevisiae*. Através disso é possível explicar o fato do consumo de açúcares no controle e KM terem sido elevado nos primeiros 4 dias de fermentação, contudo sem elevada produção de etanol.

Em fermentação de cacau com uso de *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, Oliveira (2015) observou a mesma tendência dos resultados obtidos na fermentação de jaca. O processo foi mais acelerado em relação à fermentação controle, sendo obtidos picos de etanol de 44,57 mg/g em 48 horas (tratamento inoculado), em comparação ao controle, onde se obteve 37,94 mg/g após 96 horas. No experimento conduzido pelo autor, os lotes fermentativos eram compostos de 35 kg de massa fermentativa, o que explica o teor mais elevado encontrado em relação ao do obtido em jaca, que utilizou volume de massa fermentativa de aproximadamente 7,5 kg. Outro fator que pode explicar a discrepância nos teores de etanol é a alta volatilidade do mesmo, o que interfere negativamente na sua determinação. A fermentação de jaca, embora feita em recipientes fechados no início, não foi realizada em um sistema totalmente isolado, permitindo, portanto, a entrada de oxigênio e saída de compostos voláteis. Além disso, a produção de ácido acético ocorreu juntamente com a produção de etanol, portanto, parte deste foi consumida e consequentemente, não detectada na análise de quantificação.

Visintin et al. (2017), ao fermentar cacau com *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* observaram que a concentração de etanol neste tratamento foi superior ao controle, assim como o observado em jaca dura. Do mesmo modo, Ramos et al. (2014) e Batista et al. (2015) observaram picos de produção de etanol (entre 36 e 108, e 48 a 72 horas, respectivamente) mais elevados em tratamentos com *S. cerevisiae* em relação ao controle. Esses resultados evidenciam a influência de *S. cerevisiae* acelerando o processo fermentativo.

Observa-se nos dados apresentados, que houve alto coeficiente de variação entre as amostras, os quais podem ser justificados pela própria volatilidade do etanol.

4.4.6 Ácidos orgânicos (ácido acético e lático).

De acordo com Bonvehí (2005), Thompson, Miller, Lopez, (2001) e Rodriguez-Campos et al. (2012), ocorre elevação nos níveis de ácidos orgânicos durante todo o processo fermentativo de cacau, inclusive nos primeiros dias da fermentação, sendo consequência do metabolismo do açúcar presente. Em jaca, ao determinar a concentração de ácido acético e

lático, observou-se a mesma tendência. A jaca possui maior teor de carboidratos em relação ao cacau, apresentando em torno de 225 mg/g, em comparação aos 194 mg/g do cacau (TACO, 2011). Provavelmente este fato influenciou a elevada produção de ácidos encontrada no processo fermentativo de jaca, o que não é desejável, pois pode interferir, posteriormente, na qualidade do aroma obtido. A seguir são apresentados os resultados da determinação de ácido acético e lático. Na Figura 13 pode ser observado um cromatograma obtido da polpa de jaca, mostrando a presença de ácido acético e lático.

Figura 13: Determinação dos ácidos acético e lático em amostras de massa fermentativa de jaca dura extraídos com tampão fosfato 25mM pH 2,5. Os picos 7,629 e 8,160 correspondem, respectivamente aos ácidos lático e acético.

4.4.6.1 Ácido Acético

As concentrações de ácido acético mensuradas ao longo do processo fermentativo são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Concentrações de ácido acético para os três tratamentos no decorrer do processo fermentativo, em mg/g de massa fermentativa em base fresca.

Dias	Controle	K Marx	Mix
1 (24h)	30,61 ^{aC} ±6,6	30,97 ^{aE} ±5,1	28,97 ^{aE} ±8,1
2 (48h)	67,09 ^{aB} ±6,0	54,37 ^{abDE} ±12,0	41,72 ^{bE} ±4,8
4 (96h)	65,90 ^{aB} ±7,0	60,72 ^{aCD} ±10,6	48,81 ^{aDE} ±6,4
5 (120h)	105,88 ^{aA} ±13,1	75,53 ^{bCD} ±15,9	81,50 ^{bCD} ±17,9
6 (144h)	111,64 ^{aA} ±20,2	89,96 ^{aAB} ±12,1	100,51 ^{aBC} ±14,9
7 (168h)	120,16 ^{aA} ±18,5	93,65 ^{bAB} ±14,1	120,32 ^{aAB} ±24,9
8 (192h)	99,76 ^{bA} ±12,9	115,14 ^{abA} ±6,4	131,29 ^{aA} ±22,1

Os valores seguidos por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que os tratamentos diferem significativamente entre si ($p < 0,05$), e os valores seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de fermentação, de acordo com o teste de Tukey.

A partir dos dados apresentados é possível observar que o teor de ácido acético aumentou progressivamente ao longo do tempo para os três tratamentos. Na fermentação controle, o aumento na produção ocorreu até o quinto dia de fermentação, mantendo-se com concentrações estatisticamente iguais ($p < 0,05$) até o final. Para os demais tratamentos, a maior produção ocorreu no final da fermentação (MIX – dia 7 e 8 e KM, dias 6, 7 e 8).

A produção de ácido acético ocorre principalmente pela ação de bactérias acéticas no período final da fermentação, onde há oxigenação da massa fermentativa. Contudo, conforme relatado por Schwan e Wheals (2004) e Camu et al. (2007), o ácido acético é produzido também nos estágios iniciais da fermentação, por ação de várias espécies de leveduras e bactérias lácticas. Portanto, a presença deste ácido no período inicial (até dia 4 – 96 horas) em condição de anaerobiose, provavelmente decorre da ação desses microrganismos. Entretanto, a partir do dia 5, onde houve oxigenação da massa fermentativa, as concentrações de ácido acético apresentaram aumento, pois as bactérias acéticas passaram a agir na oxidação de etanol, gerando o ácido. O ácido acético é o principal produto da reação (Camu et al., 2007), o que impulsionou a elevação nos teores desse ácido nas massas fermentativas.

Entre os diferentes tratamentos, em determinados tempos de fermentação (48, 120, 168 e 192 horas), observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) nas concentrações de ácido acético. Nos períodos de 48 e 120 horas, foi verificada predominância no tratamento controle,

sendo superior ao MIX nas 48h, e a ambos em 120h. Esses teores mais elevados no controle podem ser explicados novamente pela ação de bactérias lácticas e leveduras, pois a ausência de aplicação de inóculo favoreceu a ação destas. No caso do tratamento mix, a presença de *S. cerevisiae* e *K. marxianus* deve ter minimizado a atividade de outras espécies. Nos períodos finais (a partir de 144h), a produção de ácido acético do tratamento controle se igualou aos demais, ou foi superada pelo mix (192h). A produção a partir de 120 horas, onde houve oxigenação da massa, passou a ser mais expressiva e ser proveniente da ação de bactérias acéticas, que consomem o etanol oxidando-o a ácido acético. O tratamento MIX apresentou maior produção de etanol, o qual passou a ser consumido após 120 horas de fermentação, deste modo, os elevados teores de ácido no período final da fermentação são decorrentes deste processo. Esses resultados mostram a importância da presença de etanol para obtenção de ácido acético, pois sua produção por bactérias acéticas é dependente da presença de etanol. Essa reação é exotérmica, dependente de oxigênio, e provoca o aumento da temperatura da massa fermentativa, a qual, juntamente com o ácido acético produzido, ocasiona a morte do embrião das sementes, permitindo a ação de enzimas endógenas que promovem a degradação protéica, gerando os precursores aromáticos (THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001; SCHWAN, WHEALS, 2004). Desse modo, observa-se a importância do ácido acético para a obtenção de perfil aromático de chocolate.

Visintin et al. (2017) também observaram maior produção de ácido acético no período final da fermentação do tratamento inoculado com *S. cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*, em comparação ao controle, sendo que com o uso de *starter*, assim como para jaca dura, foram obtidas maiores concentrações de etanol, refletindo posteriormente na produção de ácido acético. Deste modo, observa-se novamente a importância da ação conjunta de duas espécies de leveduras. No caso de Batista et al. (2015) com fermentação de cacau, os autores observaram que, embora o tratamento inoculado com *S. cerevisiae* tenha apresentado maior teor de etanol, as concentrações de ácido acético foram semelhantes nos tratamentos controle e inoculado, provavelmente devido à temperatura da massa fermentativa, que promoveu a perda de etanol por volatilização, reduzindo o substrato para as bactérias acéticas.

4.4.6.2 Ácido láctico

As concentrações de ácido láctico quantificado ao longo do processo fermentativo são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7: concentrações de ácido láctico para os três tratamentos no decorrer do processo fermentativo, em mg/g de massa fermentativa em base fresca.

Dias	Controle	Mix	K. Marx
1 (24h)	34,04 ^{aABC} ±5,4	37,28 ^{aB} ±4,6	26,74 ^{aD} ±5,9
2 (48h)	40,23 ^{aAB} ±2,15	54,99 ^{aAB} ±2,7	45,15 ^{aCD} ±8,3
4 (96h)	53,64 ^{bA} ±5,24	56,59 ^{abAB} ±3,8	70,71 ^{aA} ±17,3
5 (120h)	42,24 ^{bAB} ±3,61	62,04 ^{aA} ±6,0	67,56 ^{aAB} ±7,7
6 (144h)	29,14 ^{bBC} ±7,59	58,20 ^{aA} ±5,97	66,70 ^{aAB} ±4,3
7 (168h)	29,44 ^{cBC} ±5,24	45,12 ^{bAB} ±7,8	66,97 ^{aAB} ±14,2
8 (192h)	18,96 ^{bC} ±3,7	46,02 ^{aAB} ±11,7	54,79 ^{aABC} ±2,8

Os valores seguidos por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que os tratamentos diferem significativamente entre si ($p < 0,05$), e os valores seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de fermentação, de acordo com o teste de Tukey.

Conforme observado, a produção de ácido láctico ocorreu principalmente nos tempos iniciais e intermediários da fermentação, apresentando queda ao final do processo. O ácido láctico é produzido principalmente por bactérias lácticas, em anaerobiose, através do consumo de açúcares e ácidos orgânicos, sendo o principal produto da reação, e, assim como o ácido acético, tem capacidade de migrar para o interior das sementes (CAMU et al., 2007). Entretanto, por apresentar baixa volatilidade, permanecendo até o final do processo (secagem e torração das sementes), e conferir características de aroma e sabor que afetam a qualidade do produto, sua produção é indesejável (THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001). Devido à abertura dos recipientes de fermentação, a partir do dia 5 (e 6 para o tratamento MIX), observou-se redução dos níveis de ácido láctico, devido à oxigenação da massa, e redução da atividade das bactérias lácticas. Resultados semelhantes foram observados por Craack et al. (2013) e Oliveira (2015) em fermentação de cacau, os quais evidenciaram um pico de produção de ácido láctico, seguido da redução gradativa em seus níveis até o período final da fermentação.

A partir de 96 horas (dia 4), as concentrações de ácido láctico diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre o tratamento controle e os inoculados, sendo inferior no primeiro. A atividade de enzimas pectinolíticas pode explicar o ocorrido. Devido à elevada produção dessas enzimas por linhagens de *K. marxianus*, os açúcares redutores se tornam mais disponíveis

para fermentação. Deste modo, os tratamentos inoculados apresentam mais substratos para ação de bactérias lácticas, refletindo na maior produção desse ácido.

As concentrações de ácido láctico e acético foram bastante elevadas em relação a alguns trabalhos realizados em cacau (CRAFAK et al.; 2013; RAMOS et al., 2014; OLIVEIRA, 2015; VISINTIN et al., 2017). Segundo Camu et al. (2008) e Ho et al. (2015), o ácido acético migra mais facilmente ao interior das sementes, embora ácido láctico também possa ser encontrado, contudo em menores concentrações. Ambos são os principais responsáveis pela acidez das sementes, refletindo na qualidade do cacau, e na qualidade do aroma similar ao cacau obtido nas jacas (JINAP, 1994; HO et al.; 2015).

4.4.7 Degradação protéica

A degradação protéica ao longo do processo fermentativo possui relevância na formação de compostos precursores de aroma na fermentação de cacau. Desse modo, o intuito de identificar a degradação foi analisar se processos similares ao cacau ocorrem na fermentação de jaca dura. Amostras de proteínas em vários estágios da fermentação (dia 0 a dia 8) foram submetidas à separação eletroforética, a fim de evidenciar a degradação das proteínas de armazenamento (vicilinas e albuminas) ao longo do processo fermentativo, pois, de acordo com Voigt, Biehl e Wazir (1993) e Scollo et al. (2018), essas proteínas são importantes precursoras da formação de aroma de chocolate. Durante o processo fermentativo, elas sofrem intensas alterações, resultando na sua quebra em peptídeos e aminoácidos, que dão origem ao aroma de chocolate durante o processo de torração (ZAK, KEENEY, 1976).

Desse modo, foram analisadas a degradação das proteínas de armazenamento em todos os tratamentos realizados, para verificar diferenças entre os mesmos. Para todos os tratamentos, observou-se a degradação das vicilinas e albuminas. No caso das vicilinas, a degradação foi completa, verificando-se sua ausência nos períodos finais da fermentação. As albuminas permaneceram até o final, embora tenham apresentado degradação, a qual foi observada através da intensidade das bandas. As Figuras 14 a 16 mostram a degradação nos tratamentos controle, MIX e KM, respectivamente.

Figura 14: Tratamento controle. As colunas 1 a 10 referem-se, respectivamente ao padrão, e aos dias de fermentação (dia 0 a dia 8). Degradação total a partir do dia 6 (coluna 8).

Figura 15: Tratamento MIX. As colunas 1 a 10 referem-se, respectivamente ao padrão, e aos dias de fermentação (dia 0 a dia 8). Degradação total a partir do dia 5 (coluna 7).

Figura 16: Tratamento KM. As colunas 1 a 10 referem-se, respectivamente ao padrão, e aos dias de fermentação (dia 0 a dia 8). Degradação total a partir do dia 7 (coluna 9).

A partir dos géis apresentados, observa-se que para os tratamentos controle e KM, as frações de vicilina presentes foram somente as de aproximadamente 66 KDa (SPENCER, HODGE, 1992; KRATZER et al., 2009). Para MIX, houve também a presença da fração de 47 KDa (VOIGT, BIEHL, WAZIR, 1993; LEAL et al. 2008). Em relação ao tempo necessário para degradação, observa-se que no tratamento MIX esta foi mais rápida, sendo a partir do dia 5 (120 horas), controle, dia 6 (144 horas), e km, dia 7, (168 horas). Para as albuminas, 21kDa, (LEAL et al., 2008) não houve degradação completa, mas sua redução foi observada já nos períodos iniciais das fermentações.

As diferenças da degradação entre os tratamentos podem ser explicadas por processos que ocorreram durante a fermentação. No processo fermentativo, a produção de ácido acético e consequente produção de calor culminam na morte dos embriões das sementes, que perdem a seletividade das membranas, possibilitando a interação de substratos e enzimas que reagem formando precursores de aroma (THOMPSON, MILLER, LOPEZ, 2001). Desse modo, é necessária a presença de temperatura e ácido acético para a degradação protéica. O tratamento MIX apresentou as maiores temperaturas (em torno de 41 °C), seguido do controle e KM. Em relação ao ácido acético, omix apresentou o maior pico, seguido do controle e KM. Portanto, o efeito conjunto de temperatura e ácido acético resultou nos diferentes tempos de degradação protéica.

Resultados similares foram evidenciados por Leal et al. (2008) e Kumari et al. (2016), os quais observaram degradação total das vicilinas em fermentação de cacau a partir de 120 horas de fermentação para fermentação natural, sem inoculação de culturas *starters*, e para o tratamento inoculado com *Kluyveromyces marxianus*, realizado apenas por Leal et al. (2008). O período de degradação total das vicilinas no cacau foi mais rápido que os observados em sementes de jaca dura principalmente devido à temperatura, que chegou em torno de 50 °C no trabalho desenvolvido por Leal et al. (2008), com lotes fermentativos de 45kg de massa. Em relação às albuminas (21kDa), os trabalhos citados evidenciaram sua presença até o final da fermentação, podendo ser decorrentes de sua baixa susceptibilidade à degradação. Em jaca dura, a presença de albumina no final do processo fermentativo também pode estar relacionada à quantidade presente, visualizada através das bandas, mais intensas em relação às das vicilinas.

Desse modo, pode-se concluir que o perfil aromático das sementes de jaca dura fermentadas e torradas pode ser melhorado se a fermentação for realizada em lotes maiores, atingindo temperaturas mais elevadas, com consequente melhoria na degradação das proteínas de reserva presentes.

4.4.8 Minerais

A presença de minerais no processo fermentativo é de extrema importância, sendo necessário ao desenvolvimento de microrganismos, e atuando como co-fatores de enzimas. Portanto, é necessário que estes estejam disponíveis na massa fermentativa, sobretudo, nitrogênio, cálcio, ferro, potássio, magnésio, fósforo, sódio, enxofre, cobre, manganês e alguns outros em menores proporções (LIMA et al., 2001; WALKER, 2004).

A Tabela 8 apresenta os teores, em mg/100g dos minerais determinados em massa fermentativa de jaca dura.

Tabela 8: Teores dos minerais em mg/100g em base seca de amostra de massa fermentativa (polpa e semente) no período inicial da fermentação. Comparação entre 2 amostras (jacas obtidas em Limeira – Amostra-1, e jacas obtidas em Piracicaba – Amostra-2).

Elemento	Inicial		Fcalc	Ftab
	Amostra-1	Amostra-2		
Ca	68,4±8,3	119,5±14,9	10,4*	5,05
Fe	1,88±0,4	3,53±0,6	5,1*	3,79
P	71,9±11,8	153,8±12,1	1,1	4,39
Mg	134,9±14,0	186,6±20,6	4,7	5,05
K	1053,7±162,3	1194,54±222,6	3,5	6,39
Na	48,8±6,5	78,1±12,9	15,4*	3,97
S	77,7±9,9	115±15	5,2*	5,05
Cu	0,38±0,04	0,73±0,12	147,1*	5,05
Mn	1,47±0,08	1,34±0,13	4,4	6,26
B	1,24±0,16	2,47±0,4	30,4*	4,53

Legenda: *Quando F calculado (Fcalc) é maior ao F Tabelado (Ftab), há diferença significativa entre as amostras a 95% de confiança.

Comparando-se os teores iniciais de cálcio, fósforo, potássio, sódio e ferro com os dados levantados por Baliga et al. (2011) em jacas maduras, observa-se que as concentrações determinadas no presente estudo são superiores. Isso pode ser decorrente da metodologia adotada neste estudo, combinando procedimentos de preparo de amostra mais apropriado à matriz e quanto ao tipo de detecção, que possui, dentre outras características, alta faixa linear e baixos limites de detecção para os elementos, sobretudo para os avaliados neste estudo. Ainda com relação à detecção, destaca-se a alta sensibilidade e reprodutibilidade, o que garante a alta precisão e exatidão do processo de detecção adotado (BOSS, FREDEEN, 2004).

Observa-se ainda, que houve diferença significativa entre as amostras no período inicial para a maioria dos elementos. Contudo, no período final da fermentação, essas diferenças foram menores. Portanto, a diferença entre as amostras no período inicial pode ser decorrente de algum interferente no processo de digestão da amostra 1, como fibras, teor de açúcar, ou outros materiais orgânicos que possam ter dificultado o processo de digestão. Ao final do processo, devido às degradações que ocorreram durante a fermentação, o processo de digestão foi mais eficaz e as amostras apresentaram perfil semelhante. Para verificar isto, procedimentos de digestão da amostra devem ser desenvolvidos, otimizados e validados, para

garantir que estes efeitos sejam menos pronunciados, o que demanda o desenvolvimento de um nicho de pesquisa específico para tal finalidade. Outra hipótese é que apresentavam teores distintos inicialmente, devido à localização de cultivo das plantas.

A partir dos dados apresentados na Tabela 8, observa-se que os principais elementos, citados por Lima et al. (2001) encontram-se na massa fermentativa no período inicial. Portanto, aliando a presença desses nutrientes, com a boa condução do processo fermentativo, observado através dos dados apresentados anteriormente, pode-se inferir que a disponibilidade dos minerais na massa fermentativa foi adequada às necessidades microbianas ao longo do processo.

O magnésio possui importância no desenvolvimento das leveduras, atuando como cofator de enzimas glicolíticas e das envolvidas com o processo de replicação, transcrição e tradução do DNA. Atua também na parte estrutural, interferindo na estabilidade das estruturas celulares e membranas (BIRCH, WALKER, 2000; WALKER et al., 2003). Potássio atua nas reações da glicólise, síntese protéica, na síntese de ATP e são encontrados na composição de leveduras (AMORIM, 1977). Outro elemento de grande importância é o fósforo, sendo um constituinte do DNA e das membranas fosfolipídicas. Deste modo, a ausência deste elemento pode ocasionar problemas durante a fermentação, devido ao baixo desenvolvimento da levedura (WALKER, 1998). A presença de cálcio, em concentrações moderadas, é essencial para o desenvolvimento das leveduras durante a fermentação. Entretanto, o excesso de cálcio está diretamente ligado ao processo de floculação, ou formação de aglomerados entre as células de leveduras. Isto ocorre porque o cálcio iônico (presente em solução) atua como um indutor de floculação, reduzindo a eficiência de fermentação. Contudo, não foi observado esse efeito durante a fermentação (SATO et al., 2001).

Segundo Berg, Tymoczko e Strye (2002), os microelementos, em geral, são essenciais no metabolismo celular, pois atuam como cofatores de diversas classes de enzimas. Para o seu desenvolvimento, as leveduras necessitam de cobre e manganês, em baixas concentrações. Eles atuam como cofatores de enzimas envolvidas no processo metabólico sendo essenciais ao seu desenvolvimento (JONES, GADD, 1990; COLLINS, DOBSON, 1997).

Todos os elementos encontrados, segundo Reed e Nagodawithana (1991) são constituintes inorgânicos das leveduras, indicando a importância no seu desenvolvimento. Portanto, conclui-se que o meio forneceu todos os minerais necessários à fermentação.

Não foram encontrados dados que indicassem os teores mínimos para a condução de um bom processo fermentativo em matéria-prima semelhante. Contudo, as concentrações para

todos os elementos foram superiores ao mínimo indicado por Lima et al. (2001) em mosto de cana-de-açúcar.

A Tabela 9 indica os teores dos minerais para as amostras no final do processo fermentativo.

Tabela 9: Teores dos minerais em mg/100g de amostra de massa fermentativa (polpa e semente), em base seca, no período final da fermentação. Comparação entre 2 amostras (jacas obtidas em Limeira – Amostra-1, e jacas obtidas em Piracicaba – Amostra-2).

Elemento	Final		Fcalc	Ftab
	Amostra-1	Amostra-2		
Ca	149,6±16,4	133,6±11,3	4,5	6,09
Fe	2,97±0,4	3,75±0,6	3,6	3,73
P	142,3±10	174,7±13,8	3,6	4,12
Mg	232,8±24,0	196,1±25,4	1,3	5,05
K	1107,1±132,9	1349,7±198,4	5,0	6,39
Na	75,9±11,0	102,9±10,0	1,5	5,05
S	129,5±11,9	136,9±17,3	4,4*	3,87
Cu	1,06±0,12	0,81±0,1	1,9	4,53
Mn	2,88±0,3	2,04±0,24	1,4	4,39
B	2,24±0,24	3,01±0,38	6,9*	4,12

*Quando F calculado (Fcalc) é maior ao F Tabelado (Ftab), há diferença significativa entre as amostras a 95% de confiança.

Entre as concentrações finais dos elementos, observa-se que para a maior parte dos elementos, não houve diferença significativa entre as amostras.

Comparando-se as concentrações iniciais e finais dos elementos nas amostras, é possível observar que houve aumento, na maioria dos casos, ou eles se mantiveram próximos. Esse aumento no teor pode ser devido à concentração dos elementos minerais na massa fermentativa, visto que, no início do processo, os teores dos demais nutrientes (açúcares, proteínas, fibras, pectina) eram superiores ao período final, pois houve o consumo e drenagem destes. Assim, o teor de minerais acabou sendo concentrado ao final do processo, refletindo em seu maior valor. Além disso, segundo Nguyen, Savage (2013), a hidrólise da pectina, que ocorre durante o processo fermentativo, resulta na disponibilização dos minerais que se

encontram na forma de complexos. Greffeuille et al., (2011) e Olagunju et al. (2018) observaram o mesmo efeito de aumento na concentração de ferro, e aumento na disponibilidade de fósforo pós fermentação, respectivamente. Olagunju et al. (2018) observaram ainda o aumento de cálcio, magnésio, cobre, manganês e ferro em fermentação de tamarindo.

Deste modo, observa-se que a massa fermentativa é rica em minerais, fornecendo os principais necessários à fermentação ao longo de todo o processo, e não foram observados efeitos inibitórios, de acordo com os dados de consumo de açúcares e produção de etanol e ácidos, indicando que a fermentação ocorreu de maneira satisfatória.

4.5. CONCLUSÃO

As alterações bioquímicas que ocorreram nas sementes de jaca dura foram similares às observadas para o cacau, segundo o que existe na literatura. Isso se deve principalmente à presença dos três principais grupos de microrganismos isolados de cacau (leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas), os quais atuam de maneira semelhante em sementes de jaca dura, consumindo nutrientes e produzindo ácidos e álcoois. As fermentações realizadas na presença de culturas *starters* foram mais aceleradas, especialmente a inoculada com MIX de culturas, gerando maior consumo de açúcares, degradação de proteínas, e produção de ácidos e etanol. Contudo, a elevada produção de ácido láctico e acético pode se prejudicial ao produto final, contribuindo para indesejável acidez. A fermentação acelerada com uso de *starters* também indica que estas poderiam ser interrompidas antes, gerando um ganho no tempo de obtenção das sementes adequadas. Ademais, a degradação protéica, principal precursor de flavor de chocolate, ocorreu antecipadamente no tratamento MIX, indicando, possivelmente, a melhoria no perfil aromático obtido nas sementes fermentadas e torradas.

Conclui-se que a aplicação de mix de cultura *starter* (*S. cerevesiae* e *K. marxianus*) acelera o processo fermentativo, indicando potencial redução no período de fermentação, além de permitir que a qualidade dos produtos obtidos sejam sempre similares, devido ao maior controle da microbiota, mesmo quando realizados em condições e locais distintos.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, N. **Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridização e evolução adaptativa.** Dissertação (Mestre em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. 101p.

AMORIM, H.V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica.** Araras: Planalsucar, 1977.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-16, 2006.

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

Association of Official Analytical Chemists – AOAC. 2005. **Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**(18th ed.). Arlington: AOAC, 1995. Chapter 37, p.11.

Association of Official Analytical Chemists – AOAC. 2005. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**(18th ed.). Maryland: AOAC.

BACILA, M. **Curso de fisiologia de microrganismo.** Curitiba: Instituto de Bioquímica/UFPr. 1960. 209p.

BALIGA, M. S.; SHIVASHANKARA, A. R.; HANIADKA, R.; DSOUZA, J.; BHAT, H. P. Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review. **Food Research International**, v.44, p.1800–1811. 2011.

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, p. 221-227, 2015.

BATISTA, N. N.; RAMOS, C. L.; RIBEIRO, D. D.; 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. 53, n. 2, p.1101-1110, 2016.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use.** 2 ed. London: Chapman and Hall, 1994. 408 p.

BERG, J. M. ; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**, WH Freeman and Company: New York, 2002.

BIEHL, B.; ZIEGELER-BERGHAUSEN, H.; SRIVASTAVA, S.; XIONG, Q.; PASSERN, D.; HEINRICHS, H.; HAMMOOR, M. Cocoa specificity of proteolytic *flavor* precursors: the cocoa seed proteases. **Proceedings of the 1991 International Cocoa Conference: Challenges in the 90s**, Kuala Lumpur, Malaysia. 1991.

Biehl, B.; Ziegler, G. COCOA: chemistry of processing. In: BENJAMIN, C.; FINGLAS, P.; TOLDRA, F. **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2 ed. Elsevier. Academic Press: 2003.

BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 678-687, 2000.

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

BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. **Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**. 3^a ed. Shelton: Perkin Elmer Corporation. 2004. 120p

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248–254. 1976.

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

CAMU, M. WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; VUYST, L. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1809-1824, 2007.

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

CASSONI, V. **Valorização de resíduo de processamento de farinha de mandioca (Manipueira) por acetificação**. 2008. 76p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2008.

CLARK, F. E. Agarplate method for total microbial count. In: BLACK, C. A.; EVANS, D. D.; ENSMINGER, L. E.; WHITE, J. L.; CLARK, F. E. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, v. 2, p. 1460-1466, 1965.

COLLINS, P. J.; DOBSON, A. D. W. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3444-3450, 1997.

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 flavor using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, 2013. p. 103–116.

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

DAND, R. Agronomics of international cocoa production. In: **The international cocoa trade**. Elsevier.Woodhead Publishing: 2011.

FALCONE, M.; MARQUES, A. B.; Estudo sobre as condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. **Tecnologia de Alimentos e Bebidas**. São Paulo: 1965. v.4, p.24 - 29.

GREFFEUILLE, V.; KAYODÉ, A. P. P.; ICARD-VERNIÈRE, C.; GNIMADI, M.; ROCHETTE, I.; MOUQUET-RIVIER, C. Changes in iron, zinc and chelating agents during traditional African processing of maize: Effect of iron contamination on bioaccessibility. **Food Chemistry**, v.126 , p.1800–1807, 2011.

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. 273–281. 1998.

HASHIM, P.; SELAMAT, J.; SYED MUHAMMAD, S. K.; 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, p.535–542. 1998.

HEEMSKERK, R. F. M. **Cleaning, Roasting and Winnowing**. In: Industrial chocolate – Manufacture and use. Blackwell Science: third edition, 1999.

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

HO, V. T. T.; ZHAO, J.; FLEET, G. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation.**International Journal of Food Microbiology**, v. 205, 2015. p. 54-67.

ILLEGHEMS, K.; DE VUYST, L.; PAPALEXANDRATOU, Z.; WECKX, S. Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity, **Plos one**, v. 7, p. 1-11, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. V. 1 **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. Ed. São Paulo: IMESP, 1985. P. 25-26.

JENTZSCH, P. V.; CIOBOTA, V.; SALINAS, W.; KAMPE, B.; APONTE, P. M.; RÖSCH, P.; POPP, J.; RAMOS, L. A. Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 211, p.274–280, 2016.

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

JINAP, S.; DIMICK, P. S. Acidic characteristics of fermented and dried cocoa beans from different countries of origin. **Journal of Food Science**. 1990, v. 55, 547.

JINAP, S. Organic acids in cocoa beans — a review. **ASEAN Food Journal**. v. 9, p. 3–12, 1994.

JINAP, S.; ZESLINDA, A. Influence of organic acids on *flavor* perception of Malaysian and Ghanaian cocoa beans. **Journal of Food Science and Technology**, v.32, p. 153–155. 1995.

JINAP, M. N.; NAZAMID, S.; JAMILAH, B. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 407-417, 2002.

JONES, R. P. ; GADD, G. M. Ionic nutrition of yeast—physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme and Microbial Technology**.v.12, p. 402-418, 1990. p. 1–17.

KRATZER, U.; FRANK, R.; KALBACHER, H.; BIEHL, B.; WÖSTEMEYER, J.; VOIGT, J. Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. **Food Chemistry**, v.113, p.903–913, 2009.

KUMARI, N.; KOFI, K. J.; GRIMBS, S.; D'SOUZA, R. N.; KUHNERT, N.; VRANCKEN, G.; ULLRICHA, M. S. Biochemical fate of vicilin storage protein during fermentation and drying of cocoa beans. **Food Research International**, v.90, p.53–65, 2016.

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

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G.; **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v.1, p. 267-277, 1984.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, 1970. p. 680-685.

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

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

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial**, vol 3 – processos fermentativos e enzimáticos. 1 ed. Ed. Edgard Blucher Ltda.: São Paulo, 2001b.

MAMHOUD, A.; NIONELLI, L.; BOUZAIN, T.; HAMDI, M.; GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G. Selection of lactic acid bacteria isolated from Tunisian cereals and exploitation of the use as starters for sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 225, 2016. p. 9-19.

MAYORGA-GROSS, A. L.; QUIRÓS-GUERRERO, L. M.; FOURNY, G.; VAILLANT, F. An untargeted metabolomic assessment of cocoa beans during fermentation. **Food Research International**, v.89, p. 901–909. 2016.

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. p. 83–90.

MIGUEL, M. G. C. P.; REIS, L. V. C.; EFRAIM, P.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SCHWAN, R. F. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p.362-369, 2017.

MONTIPÓ, S. **Produção de ácido láctico a partir da casca de arroz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2012. 86p.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Cocoa and Coffee fermentations. **Encyclopedia of Food Microbiology** (Second Edition), p. 485-492, 2014.

NIJSSEN, L. M.; VISSCHER, C. A.; MAARSE, H.; WILLEMSSENS, L. C.; BOELEN, M. H. Cocoa. In: **Volatile compounds in food**. Qualitative and quantitative data, Zeist, TNO Nutrition and Food Research Institute. 1996.

NGUYEN, H. V. H.; SAVAGE, G. P. The effects of temperature and pH on the extraction of oxalate and pectin from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.), golden kiwifruit (*Actinidia chinensis* L.), kiwiberry (*Actinidia arguta*) and persimmon (*Diospyros kaki*). **International Journal of Food Science and Technology**, v.48, p.794–800, 2013.

OETTERER, M., REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Ed. Manole, 1 ed., 2006.

OLAGUNJU, O. F.; EZEKIEL, O. O.; OGUNSHE, A. O.; OYEYINKA, S. A.; IJABADENIYI, O. A. Effects of fermentation on proximate composition, mineral profile and antinutrients of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed in the production of daddawa-type condiment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 455–459. 2018.

OLIVEIRA, M. P. M. **Seleção de leveduras pectinolíticas para melhoria da fermentação do cacau**. 2015. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2015.

OUATTARA, H. G.; KOFFI, B. L.; KAROU, G. T.; SANGARÉ, A.; NIAMKE, S. L.; DIOPOH, J. K. Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1753–1760, 2008.

PEREIRA, G. V. D.; MAGALHÃES, K. T.; de ALMEIDA, E. G.; COELHO, I. D.; SCHWAN, R. F. spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 121-133, 2013.

PERKIN ELMER. Dual View ICP the Best of both worlds. Publicação eletrônica (2008). Disponível em: <http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74835TCH_DualViewICP.pdf>. Acesso em 06 mar 2018.

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**, v. 64, p. 908–918, 2014.

RAMOS, S. M. N.; DANZL, W.; ZIEGLEDER, G.; EFRAIM, P. Formation of volatile compounds during cupuassu fermentation: Influence of pulp concentration. **Food Research International**, v. 87, p.161–167, 2016

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast Technology**. Van Nostrand Reinhold Book: New York, 2 ed., 1991. 378p.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; OROZCO-AVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, 2011. p. 250–258.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; CONTRERAS-RAMOS, S. M.; OROZCO-AVILA, I.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; LUGO-CERVANTES, E. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. **Food Chemistry**, v.132, p.277–288. 2012.

R CORE TEAM. (2016). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

SATO, M.; WATARI, J.; SHINOTSUKA, K. Genetic Instability in Flocculation of Bottom-Fermenting Yeast. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, n.3, p. 130-134, 2001.

SCHORTEMEYER, M.; HARTWIG, U. A.; HENDREY, G. R.; SADOWSKY, M. J. Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (face). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p. 1717-1724, 1996.

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 - Symposium Supplement**, v. 79, 1995.p. 96-107.

SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**. 1997. V. 21. P. 234-244.

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

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

SCOLLO, E.; NEVILLE, D.; ORUNA-CONCHA, M. J.; TROTIN, M.; CRAMER, R. Characterization of the Proteome of *Theobroma cacao* Beans by Nano-UHPLC-ESI MS/MS. **Plant Proteomics**, 2018.doi: 10.1002/pmic.201700339.

SILVA, F. A. M.; NOGUEIRA, F. D.; GUIMARÃES, P. T. G.; GODINHO, A.; MALTA, M. R. Determinação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular na rizosfera de cafeeiro por cromatografia líquida de alta eficiência (clae). **Ciência agrotec.**, Lavras. Edição Especial, p.1391-1395, dez., 2002.

SILVA, P. P. M. **Utilização do palmito basal de pupunha em alternativa ao palmito foliar, visando aumentar o aproveitamento da palmeira *Bactris gasipaes***. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SOLA-LARRAÑAGA, C.; NAVARRO-BLASCO, I. Optimization of a slurry dispersion method for minerals and trace elements analysis in infant formulae by CP OES and FAAS. **Food Chemistry**, v. 115, 2009. p. 1048-1055.

SPADA, F. P. **Roasted jackfruit seed as a potential substitute for chocolate aroma: obtainment, composition, olfactometry, and application**. 2017. 151p. Thesis (Doctor in Food Science and Technology). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 2017.

SPADA, F. P.; ZERBETO, L. M.; RAGAZI, G. B. C.; GUTIERREZ, E. M. R.; SOUZA, M. C.; PARKER, J. K.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Optimization of Postharvest Conditions To Produce Chocolate Aroma from Jackfruit Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 1196-1208, 2017.

SPENCER, M. E.; HODGE, R. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*. **Planta**, v.186, p.567–576. 1992.

TACO - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO**. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: UNICAMP/NEPA, 2011. 161 p. Disponível em: < http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf >. Acesso em 02/03/2018.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. In: DOYLE, M. J., BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington, D. C., p. 721-733, 2001.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

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

VOIGT, J.; BIEHL, B.; WAZIR, S. K. S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**, v. 47, n.2, p.145–151. 1993.

WALKER, G.M, Metals in yeast fermentation processes. In: LASKIN, A. I.; BENNET, J. W.; GADD, G. M. **Advances in Applied Microbiology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. V. 54, p. 197-225.

WALKER, G.M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. Wiley, 1 ed., 1998.

WALKER, G.M.; SMITH, G.; HALL, N. The importance of metal ions in ethanolic fermentations. In: BRICE, J.; STEWARD, G. G. **Proceedings of the 1st Worldwide Conference on Distilled Spirits**. London: Institute of Brewing, 2003. Cap. 16, p. 113-119.

ZAK, D. L.; KEENEY, P. G. Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n.3, p.483–486. 1976.

ZHANG, Y. ;ZHU, K.; HE, S.; TAN, L.; KONG.; X. Characterizations of high purity starches isolated from five different jackfruit cultivars. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 785-794, 2016.

5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL VOLÁTIL DE SEMENTES DE JACA SECAS, FERMENTADAS E TORRADAS

RESUMO

As sementes de jaca dura fermentadas, secas e torradas apresentam perfil volátil semelhante ao do cacau, indicando seu potencial uso como substituto. Durante a fermentação do cacau, por ação da microbiota natural, são produzidos diversos precursores de aroma, que na etapa de torração, reagem através da reação de Maillard, gerando compostos voláteis. Uma importante classe destes compostos são as pirazinas, que conferem o aroma característico de chocolate, e os ésteres, que contribuem com o aroma frutado. Em estudo prévio foi observada a formação dessas classes de compostos quando as sementes de jaca dura foram submetidas à fermentação, contudo, o processo foi realizado com a microbiota natural, indicando potencial de melhoria. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de compostos voláteis que conferem aroma de chocolate em sementes de jaca dura fermentadas na presença de culturas *starters*. Foram avaliadas as farinhas de jaca dura fermentadas e torradas obtidas a partir da fermentação natural (controle), com inoculação de *Kluyveromyces marxianus* (KM), e com inoculação da mistura (MIX) de *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram que em todos os tratamentos houve produção de compostos voláteis que fornecem aroma de chocolate, especialmente as pirazinas. Contudo, observou-se que a aplicação do MIX das culturas *starters* pode atuar maximizando a produção de alguns compostos voláteis desejados, indicando a possibilidade de obtenção de produtos padronizados. Salienta-se que houve concomitantemente a produção de *off-flavors*, especialmente ácidos. Ao final, concluiu-se que é possível a aplicação de culturas *starters* visando à melhoria no perfil volátil de sementes de jaca dura.

Palavras-chave: Compostos voláteis; Aroma de chocolate; Sementes de jaca; Substituto de chocolate

ABSTRACT

The fermented, drying and roasted hard jackfruit seeds have an aromatic profile similar to cocoa, indicating their potential use as substitute. During the cocoa fermentation, by the action of the natural microbiota, several aroma precursors are produced, which in the roasting stage, react through the Maillard reaction, generating volatile compounds. An important class of compounds are pyrazines, which confer the characteristic aroma of chocolate, and esters which contribute with the fruity aroma. In a previous study it was observed the formation of these classes of compounds when the hard jackfruit seeds were submitted to fermentation, however, the process was carried out with the natural microbiota, indicating potential for improvement. Thus, the aim of the present study was to evaluate the volatile compounds production that confer chocolate aroma on hard jackfruit seeds fermented in the presence of starters cultures. Fermented, drying and roasted flours of hard jackfruit seeds from the natural fermentation (control), with inoculation of *Kluyveromyces marxianus* (KM), and with inoculation of mixture (MIX) of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* were evaluated. The results showed that in all treatments there was production of aromatic compounds which provide chocolate aroma, especially pyrazines. However, it was observed that the application of starter culture MIX can act maximizing the production of some desirable volatile compounds, indicating the possibility of obtaining standardized products. It should be noted that there was concomitant production of off-

flavors, especially acids. At the end, was concluded that it is possible to apply starters cultures in order to improve the volatile profile of hard jackfruit seeds.

Keywords: Volatile compounds; Chocolate aroma; Jackfruit seeds; Chocolate substitute

5.1 INTRODUÇÃO

A jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) é uma fruta tropical, que consiste em três partes, o núcleo, o perianto e os frutos verdadeiros. Cada fruto contém uma semente envolvida por uma polpa amarela, de sabor adocicado, aromática e espessa (ELEVITCH, MANNER, 2006; CHEN et al., 2016; SEAGRI, 2015). Os frutos de jaca são consumidos principalmente na forma *in natura*, e são sazonais, acarretando em desperdício, mostrando a necessidade de estudos para seu melhor aproveitamento (OLIVEIRA, 2009; FOLEGATTI, 2003). Aliado a essa necessidade, atualmente, foi mostrado por Spada et al. (2017) que sementes de jaca dura fermentadas, secas e torradas possuem perfil volátil semelhante ao do cacau, indicando seu potencial de substituição.

Em cacau, para obtenção de aroma de chocolate, são necessárias etapas que envolvem a fermentação, a secagem e a torração (BONVEHÍ, 2005; LIMA, SCHULER, GUERRA, 2010; OWUSU, PETERSEN, HEIMDAL, 2012). Durante o processo de fermentação, através da ação de microrganismos, ocorrem diversas mudanças bioquímicas que promovem a produção de ácidos, principalmente o ácido acético e lático, e a degradação de proteínas e carboidratos em aminoácidos e açúcares redutores, respectivamente, os quais são precursores de aroma (SCHWAN, WHEALS, 2004; JOHN et al., 2016; KONGOR et al., 2016). Após a fermentação, as sementes são secas, e nesse processo começam a ser formados os compostos voláteis; contudo, a contribuição mais expressiva na produção dos mesmos ocorre durante a torração. Nesta etapa, os aminoácidos e açúcares redutores reagem entre si, através da reação de Maillard, produzindo uma série de compostos voláteis (AFOAKWA et al., 2008; CRAFTACK et al., 2014; PARKER, 2015; JOHN et al., 2016).

A reação de Maillard em cacau envolve várias etapas, como desidratação, ciclização, fragmentação e condensação, as quais ocorrem a partir dos grupos carbonila dos açúcares redutores e dos grupos amino dos aminoácidos (BELITZ, GROSCH, SCHIEBERLE, 2004). Essas reações originam uma série de compostos voláteis responsáveis pelo aroma de chocolate, como pirazinas, pirróis, piridinas, furanos, tiazóis, hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, fenóis, aminas, amidas e acetatos. Entre estes, as pirazinas são os principais, presentes em maiores quantidades, seguidos de ésteres, ácidos e

hidrocarbonetos (COUNET et al., 2002; BONVEHÍ, 2005; ALMEIDA, 2003; CRAFTACK et al., 2014; IOANNONE et al., 2015; VISINTIN et al., 2017; MOREIRA et al., 2018). As pirazinas são os principais compostos aromáticos presentes no cacau, e são geradas por diversas vias, contudo é relatado que são formadas pela reação de Maillard, por meio da condensação entre açúcares e aminoácidos, por degradação de Strecker ou por pirólise de hidroxí-aminoácidos (AFOAKWA et al., 2008; NAGAMATO et al., 2010; MAGA, SIZERI, 1973; COUNET et al., 2002).

A fermentação de cacau é realizada com a microbiota natural, contudo, as espécies *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* já foram isoladas nestes processos (ILLEGHEMS et al., 2012; ARDHANA, FLEET, 2003; SCHWAN, WHEALS, 2004). Deste modo, com o uso dessas culturas, espera-se que a produção de compostos voláteis presentes no chocolate seja encontrada nas sementes de jaca dura fermentadas e torradas.

O objetivo do presente trabalho foi identificar a produção de compostos voláteis em farinhas de jaca dura fermentadas e torradas, comparando-se o perfil obtido com os principais voláteis que conferem o aroma de chocolate em cacau. Farinhas obtidas por fermentação controle (microbiota natural), com inoculação de *K. marxianus*, e com inoculação de MIX de leveduras (*K. marxianus* e *S. cerevisiae*) foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, e os diferentes perfis voláteis foram avaliados.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Determinação dos compostos voláteis

As farinhas de jaca dura fermentadas, secas e torradas do controle, e dos tratamentos KM e mix, foram submetidas à análise de compostos voláteis. As amostras para essa análise foram as mesmas obtidas no item 4. Na extração dos compostos voláteis, realizada por SPME, foi utilizado um *holder* com fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) de 65 µm. Foram coletadas três gramas das amostras de semente de jaca dura fermentada em um *vial* de 10 mL, os quais foram dispostos em uma chapa de aquecimento a 45°C durante 10 minutos. Posteriormente, a fibra foi inserida no *headspace* do *vial* durante 55 minutos para que ocorresse a absorção. Então foi realizada a separação dos compostos voláteis por cromatografia gasosa (CG), e a identificação por espectrometria de massas (sistema QP2010 Shimadzu). Os compostos voláteis absorvidos na fibra foram desorvidos no injetor *splitless*

do cromatógrafo a gás, por 30 minutos à 235 °C. Para a separação dos compostos voláteis, foi empregada uma coluna capilar RTX5MS (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura do filme), e o gás de arraste foi o hélio (fluxo de 1 mL/min e velocidade linear de 36 cm/s). Durante a separação, foi utilizado gradiente de temperatura no forno do cromatógrafo, empregando-se 40 °C por 1 minuto, chegando até 240 °C a taxa de 5 °C por minuto, e 4 minutos a 240 °C. Após a separação, o espectro de massas foi obtido por impacto de elétrons a 70 eV, e os dados foram recebidos na faixa de m/z de 35 a 450 no modo *scan*. Para determinar os componentes, foi feita comparação com espectro de massas dos bancos de dados da Wiley 8a e FFNSC1.3, com o índice de retenção de Kovats e comparação com os bancos de dados. Foram calculados os índices de retenção linear (LRI) dos fragmentos e comparados com os LRIs dos padrões autênticos submetidos às mesmas condições de corrida (SPADA, 2017).

5.2.2 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Os dados obtidos na análise de compostos voláteis foram analisados utilizando o programa estatístico XLSTAT para Análise de Componentes Principais (ACP).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Compostos voláteis

O cromatograma obtido na análise de compostos voláteis para o tratamento controle está ilustrado na Figura 1. O perfil dos demais tratamentos foi semelhante, contudo, houve diferença em relação à área dos picos referentes aos compostos obtidos.

Figura1: Cromatograma da análise de compostos voláteis em CG-MS para o tratamento controle.

O perfil aromático de cacau envolve uma combinação de compostos voláteis que, em conjunto, conferem seu aroma característico. Este é resultado de uma mistura de 30-50 compostos ativos de odor, sendo que estes, quando isolados, não conferem o aroma de chocolate (SPADA et al., 2017). Entre esses compostos, encontram-se as pirazinas, que compreendem um dos principais voláteis responsáveis pelo aroma de cacau (ALMEIDA, 2003; BONVEHÍ, 2005). Em estudos de compostos voláteis de cacau, Owusu, Petersen e Heimdal (2012) e Bonvehí (2005) observaram predominância de pirazinas, compreendendo mais de 27% e 40% dos voláteis totais, respectivamente. Estas, em sua maioria, são formadas sob aquecimento, predominantemente a temperaturas superiores a 100 °C, via degradação de Strecker, que ocorre na reação de Maillard; entretanto, já foi evidenciada a formação de alguns compostos pirazínicos (trimetilpirazina e tetrametilpirazina) durante a fermentação, através de biossíntese microbiana (*Bacillus subtilis* e *Bacillus megatrium*) no período final do processo (JINAP et al., 1994; SCHWAN, WHEALS, 2004; BONVEHÍ, 2005; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012; PARKER, 2015b). Além das pirazinas, os ésteres também são relevantes na formação do aroma de chocolate, e juntos, eles compreendem os dois maiores grupos de compostos voláteis. Os ésteres conferem aroma frutado e floral (JINAP et al., 1998; BONVEHÍ, 2005; SPADA, 2017). Segundo Spada (2017), além das pirazinas e ésteres serem os grupos mais associados ao aroma de chocolate em cacau, esses também estão entre os mais ativos de odor.

Entre os compostos pirazínicos, a tetrametilpirazina (2,3,5,6 tetrametilpirazina) compreende um dos maiores e principais voláteis em cacau, conferindo aroma de noz, torrado, café e chocolate, e já foi observada sua predominância em 90% do total de compostos

pirazínicos em cacau após processo de torração (JINAP et al., 1998; BONVEHÍ, 2005; RAMLI et al., 2006; AFOAKWA et al., 2009). Do mesmo modo, a trimetilpirazina (2,3,5 trimetilpirazina) confere também aroma de noz, torrado, amendoim e chocolate (BONVEHÍ, 2005; AFOAKWA, 2010; OWUSU, PETERSEN, HEIMDAL, 2012). Além desses, outros compostos pirazínicos foram identificados como os mais importantes em cacau torrado, tais como 2,3 dimetilpirazina, 2,5 dimetilpirazina, 2,6 dimetilpirazina, 2-etilpirazina, 3-etil-2,5-dimetilpirazina e 2-etil-3,5-dimetilpirazina (PINI et al., 2004; BONVEHÍ, 2005; OWUSU, PETERSEN, HEIMDAL, 2012; RODRIGUES-CAMPOS et al., 2011; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012; CRAFACK et al., 2014; SPADA et al., 2017). Entre os ésteres que contribuem para o aroma floral no cacau, estão o 2-feniletil acetato e o 3-metilbutil éster (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2011; SPADA, 2017).

A determinação dos principais componentes baseou-se na literatura referente ao aroma de chocolate. Os compostos apresentados na Tabela 1 são os principais contribuintes encontrados nas farinhas de jaca fermentadas e torradas.

Tabela 1: Compostos voláteis de interesse para o aroma de chocolate.

Compostos	Percepção de aroma	Referência
2,3 dimetilpirazina	Caramelo, cacau	(Rodríguez-Campos et. al, 2012)
2,5 dimetilpirazina	Cacau, torrado, noz, café, verde da terra	(Spada, 2017; Bonvehí, 2005)
2,3,5 trimetilpirazina	Cacau, torrado, noz, chocolate	(Rodríguez-Campos et. al, 2012; Spada, 2017; Spada et al., 2017)
2 etil 3,5dimetilpirazina	Noz, terra	(Owusu, Petersen, Heimdal, 2012; Spada, 2017)
3 metil butil éster	Frutado, doce	(Owusu, Petersen, Heimdal, 2012; Spada, 2017)
2,3,5,6 tetrametilpirazina	Torrado, chocolate, cacau, café	(Bonvehí, 2005; Rodríguez- Campos et. al, 2012)
2 feniletil acetato	Mel, floral	(Rodríguez-Campos et. al, 2011; Spada et al., 2017)
3,5,6 trimetilpirazina	Noz, terra	(Spada et al., 2017)

Os compostos apresentados na Tabela 1 foram encontrados nas farinhas de semente de jaca dura fermentada e torrada para todos os tratamentos. Na Tabela 2 é possível identificar a

porcentagem de área dos picos do perfil cromatográfico de cada um desses compostos voláteis. A Figura 2 mostra a análise dos componentes principais, correlacionando os compostos voláteis aos diferentes tratamentos.

Tabela 2: Porcentagem relativa a partir da área total dos picos do perfil cromatográfico para os compostos de interesse nos diferentes tratamentos.

Compostos de interesse	LRI CGMS	LRI autêntico	Porcentagem de área dos picos		
			Controle	Mix	<i>K.marxianus</i>
2,3 dimetilpirazina	916	916	0,7±0,13	0,5±0,10	0,7±0,15
2,5 dimetilpirazina	922	922	1,3±0,15	1,0±0,40	1,4±0,32
2,3,5 trimetilpirazina	1461	1465	0,2±0,05	0,4±0,10	0,1±0,0
2 - etil - 3,5 dimetilpirazina	1086	1086	0,4±0,05	0,8±0,14	0,3±0,0
3 metil butil éster	1045	1055	1,5±0,21	2,0±0,31	1,6±0,25
2,3,5,6 tetrametilpirazina	1095	1095	12,0±0,0	6,0±0,0	4,0±0,53
2 feniletil acetato	1251	1251	0,2±0,06	0,2±0,06	0,1±0,0
3,5,6 trimetilpirazina	1253	1233	1,3±0,13	1,0±0,12	0,4±0,0

Legenda: LRI CGMS= índice de retenção linear dos fragmentos detectados em CGMS; LRI autêntico = índice de retenção linear do padrão autêntico submetido às mesmas condições de corrida.

Figura 2: Gráfico Biplot para análise dos componentes principais dos compostos de interesse para o aroma de chocolate. A direção dos vetores indica o aumento da produção dos compostos indicados.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2 e Figura 2, é possível observar que entre os tratamentos, o KM apresentou o pior perfil volátil para os compostos relacionados ao aroma de cacau, apresentando produção mais significativa somente para as dimetilpirazinas (2,3 e 2,5 dimetilpirazina). Talvez a produção dos precursores durante a fermentação para esses compostos seja pouco dependente de temperatura, pois o tratamento KM foi o que apresentou as menores temperaturas durante o processo fermentativo, ou pode ser que a produção dos mesmos necessite de uma fermentação mais lenta, pois o tratamento MIX, que apresentou o processo mais acelerado, produziu os menores teores desses compostos.

Entre os tratamentos controle e MIX, observa-se uma melhoria no perfil volátil, apresentando produção mais elevada de um número maior de compostos voláteis similares aos do cacau. O tratamento MIX foi o mais associado aos compostos 3 metil butil éster, 2 etil – 3,5 dimetilpirazina, e ao 2,3,5 trimetilpirazina; e o controle, ao 2,3,5,6 tetrametilpirazina e 3,5,6 trimetilpirazina. O 2-feniletilacetato foi produzido igualmente pelos tratamentos controle e mix. Spada et al., (2017) também observaram a produção desse composto em sementes de jaca fermentadas, contribuindo com o aroma floral do chocolate.

Segundo Spada (2017), o 2 etil – 3,5 dimetilpirazina e a trimetilpirazina estão entre os compostos de odor mais ativos em pó de cacau. Entre os tratamentos, o MIX apresentou maior concentração do primeiro e também para a 2,3,5 trimetilpirazina; em ambos, a porcentagem de área observada foi 2 vezes maior em relação ao controle. Esse resultado indica a potencialização da formação dessas duas classes de pirazinas por aplicação de *K. marxianus* e *S. cerevisiae* como culturas *starter*. Em relação a 3,5,6 trimetilpirazina, a aplicação das culturas não foi tão eficaz no aumento de sua produção, pois esta foi superior no controle, embora em valores próximos ao MIX. Ainda segundo Spada (2017), a intensidade do aroma produzida pelas trimetilpirazinas em farinha de jaca fermentada foi superior à do cacau, indicando, portanto, a relevância de sua presença para o perfil aromático das farinhas de jaca.

Ramli et al. (2006) relataram que a tetrametilpirazina em cacau representa 90% da concentração total das pirazinas, e Jinap et al. (1998), relataram que a mesma é a maior pirazina encontrada em cacau. Pode-se observar, a partir dos dados da Tabela 11, que a 2,3,5,6 tetrametilpirazina foi a principal pirazina encontrada em todos os tratamentos, representando as maiores porcentagens de área em relação às demais. No controle, observou-se maior incidência dessa pirazina, representando 2 vezes mais em relação ao tratamento MIX, e três vezes mais que o KM. A tetrametilpirazina, segundo Jinap et al. (1998), Hashim et al. (1998) e Rodriguez-Campos et al. (2012), é produzida durante o processo fermentativo

através de ação microbiana, apresentando maiores concentrações após 6 dias de fermentação, juntamente com as trimetilpirazinas, embora a maior concentração destas ocorra durante a torração, através da reação de Maillard (RAMLI et al., 2006; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2012; CRAFTACK et al., 2014). Segundo Hashim et al. (1999), a produção da tetrametilpirazina, e das pirazinas em geral, é dependente de calor. Deste modo, a tetrametilpirazina foi mais associada ao tratamento controle, que apresentou as maiores temperaturas durante o processo fermentativo, seguido do MIX e KM, já que a temperatura de torração foi igual para todos os tratamentos.

Estudo anterior realizado com fermentação de cacau com uso de *K. marxianus* como cultura starter apresentou resultados similares ao encontrado em jaca dura. Ao identificar a presença de compostos voláteis em licor e chocolate feitos a base de fermentados de cacau com e sem a presença de *K. marxianus*, os autores observaram que as concentrações de 2,3,5 trimetilpirazina e 2,3,5,6 tetrametilpirazina foram superiores no tratamento controle, assim como no presente estudo. Para 2,3 dimetilpirazina o teor foi superior no tratamento inoculado, semelhante ao encontrado para jaca, onde controle e KM foram iguais (CRAFTACK et al., 2014).

Assim como o reportado no presente estudo, Spada et al. (2017), encontraram os mesmos compostos voláteis com aroma final de chocolate em farinha de semente de jaca fermentada, seca e torrada, indicando o potencial uso desta como substituto de chocolate. Spada (2017) também mostrou que a produção desses compostos em farinha de jaca fermentada, seca e torrada foi igual ou superior ao pó de cacau. Desse modo, através dos resultados apresentados, é possível concluir que o uso de cultura *starter* tem potencial de melhorar ainda mais o perfil volátil apresentado na fermentação controle, propiciando um substituto potencial de aroma de chocolate para o mercado consumidor. Assim, observa-se a importância do uso de culturas *starters* na produção de aroma de chocolate em sementes fermentadas de jaca dura.

Durante a fermentação, além da produção de compostos voláteis que conferem aroma de chocolate, há produção também de *off-flavors*, que são indesejáveis, pois produzem atributos negativos para o perfil volátil. Os principais componentes de *off-flavor* relatados na literatura para chocolate e para farinhas de semente de jaca fermentadas, secas e torradas, e encontrados no presente trabalho, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Compostos de *off-flavor* segundo a literatura

Compostos	Percepção de aroma	Referência
Ácido Acético	Ácido, vinagre	(Rodríguez-Campos et. al, 2012, Spada et al., 2017)
Ácido Isovalérico	Rançoso, queijo parmesão	(Bonvehí, 2005; Rodríguez-Campos et. al, 2012, Spada et al., 2017)
Ácido Propanoico	Pungente, rançoso	(Rodríguez-Campos et. al, 2012)
Ácido Pentanoico	Pútrido, rançoso	(Bonvehí, 2005; Craack et al., 2014)
Ácido Hexanoico	Pungente, rançoso, ácido	(Bonvehí, 2005; Craack et al., 2014)
Ácido Heptanoico	Rançoso, ácido	(Bonvehí, 2005; Craack et al., 2014)

Os compostos apresentados na Tabela 3 foram encontrados nas farinhas de semente de jaca dura fermentada e torrada para todos os tratamentos. Na Tabela 4, é possível identificar a porcentagem de área dos picos do perfil cromatográfico de cada um desses compostos voláteis. A Figura 3 mostra a análise dos componentes principais, correlacionando os compostos voláteis aos diferentes tratamentos.

Tabela 4: Porcentagem relativa a partir da área total dos picos do perfil cromatográfico para os compostos de *off-flavor* nos diferentes tratamentos.

Compostos de <i>off-flavor</i>	LRI CGMS	LRI autêntico	Porcentagem de área dos picos		
			Controle	<i>K.marxianus</i>	Mix
Ac. Acético	611	618	45,11±6,12	47,46±4,13	45,42±8,34
Ac. Propanoico	773	745	0,30±0,06	0,50±0,13	0,13±0,03
3-Metil butanóico (isovalérico)	874	873	2,49±0,52	4,09±1,43	1,78±0,79
Ac. Pentanoico	901	902	0,39±0,07	0,29±0,07	0,35±0,03
Ac. Hexanoico	909	934	0,12±0,03	0,22±0,08	0,37±0,07
Ac. Heptanoico	1108	1112	0,17±0,06	0,10±0,04	0,33±0,04

Legenda: LRI CGMS= índice de retenção linear dos fragmentos detectados em CGMS; LRI autêntico = índice de retenção linear do padrão autêntico submetido às mesmas condições de corrida.

Figura 3: Gráfico Biplot para análise dos componentes principais dos compostos de *off-flavor*. A direção dos vetores indica o aumento da produção dos compostos indicados.

A partir da análise dos dados da Tabela 4 e Figura 3, pode-se observar que o tratamento KM apresentou maior produção de três compostos de *off-flavor*, dentre eles, os ácidos isovalérico (3 metil butanóico) e acético, que segundo Spada (2017), possui forte contribuição no odor, conferindo aroma de queijo parmesão e vinagre, respectivamente, e são indesejáveis para o perfil volátil de chocolate. Além desses, o tratamento KM teve maior produção de ácido propanóico, que confere odor pungente e rançoso (RODRÍGUES-CAMPOS et al., 2012). O tratamento MIX foi associado aos ácidos hexanóico e heptanóico, que conferem rancidez e acidez ao aroma. Para o tratamento controle, observou-se maior produção apenas de ácido pentanóico, que contribui negativamente com rancidez (BONVEHÍ, 2005). Embora o tratamento controle tenha apresentado maior produção de ácido pentanóico, esta foi semelhante para o tratamento mix. Além disso, o teor de ácido acético foi semelhante para os dois tratamentos. Desse modo, para a produção de *off-flavors*, observa-se que o tratamento controle apresentou melhor perfil, seguido do MIX, contudo, o ideal seria a realização de análise sensorial para confirmar esses dados, pois o aroma é resultado da mistura de compostos voláteis. Para minimizar a produção de ácidos no tratamento MIX, e assim, obter melhores resultados, é possível reduzir o tempo de fermentação, visto que, a

inoculação de *starters* acelerou o processo. Segundo Rodríguez-Campos et al. (2012), seis dias de fermentação são suficientes para que haja produção de compostos desejáveis e que seja minimizada a produção de *off-flavors*.

Ao se observar os dados da Tabela 4, é possível notar também que houve, para os três tratamentos, elevada produção de ácido acético (em torno de 45% do total de compostos voláteis). O ácido acético é volátil, e durante processo de torração, realizado a 154 °C, é perdido. Contudo, devido à elevada produção durante a fermentação, houve alta concentração desses nas sementes, impactando negativamente no aroma. Uma outra hipótese para a elevada concentração de ácido acético é a retenção no interior das sementes, principalmente na parte central. As sementes de jaca dura são maiores que as de cacau, dificultando, portanto, a volatilização de ácido acético. Desse modo, poderiam ser realizados processos alternativos, como a torração das sementes fracionadas, ao invés de inteiras.

5.4. CONCLUSÃO

Ao submeter às sementes de jaca dura aos processos de fermentação, secagem e torração semelhantes aos do cacau, foi possível obter produção de compostos voláteis que conferem aroma de chocolate, indicando seu potencial uso como substituto aromático. Embora o tratamento controle tenha apresentado elevada produção de compostos pirazínicos, responsáveis pelo aroma de chocolate, o uso de mistura de culturas *starters* (MIX) maximizou a produção de alguns dos principais compostos, indicando o uso potencial dessas culturas para melhoria do perfil volátil. Contudo, o uso de MIX de culturas *starters* acelerou o processo fermentativo, produzindo concentração maior de alguns ácidos em relação ao controle. Deste modo, acredita-se que ao reduzir o tempo de fermentação do tratamento inoculado, o perfil aromático possa ser melhorado, através da produção de menores concentrações de ácidos, que atuam como *off-flavors*. Assim, conclui-se que é possível a utilização de mistura de culturas de *K. marxianus* e *S. cerevisiae* como culturas *starters* em processo fermentativo de sementes jaca dura, visando a maximização da produção de compostos voláteis que conferem aroma de chocolate.

REFERÊNCIAS

- AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Matrix effects on *flavor* volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. **Food Chemistry**, v.113, n.1, p. 208–215. 2009.
- AFOAKWA, E. O. Cocoa cultivation, bean composition and chocolate *flavor* precursor formation. In: **Chocolate Science and Technology**, AFOAKWA, E. O. Ed. Wiley Blackwell: Oxford, UK, p. 12–34. 2010.
- ALMEIDA, M. H. G. **Efeito da tecnologia pós colheita na fração volátil do *flavor* a cacau. Estudo de uma fermentação em São Tomé e Príncipe.** Departamento de Agroindústrias e Agronomia Tropical, Secção de Agronomia Tropical, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal. 2003.
- ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 87-99, 2003.
- Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P. **Food chemistry**, 3rd ed. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 2004
- BONVEHÍ, J. S. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. **Europe Food Research and Technology**, v. 221, 2005. p. 19-29.
- CHEN, J.; LIANG, Y.; LI, X.; CHEN, L.; XIE., F. Supramolecular structure of jackfruit seed starch and its relationship with digestibility and physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 269–277. 2016.
- COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; OUWERX, C.; COLLIN, S. Use of Gas Chromatography–Olfactometry to Identify Key Odorant Compounds in Dark Chocolate. Comparison of Samples before and after Conching. **Journal Agricultural and Food Chemistry**.v.50, p. 2385–2391, 2002.
- CRAFACK, M.; KEUL, H.; ESKILDSENA, C. E.; PETERSEN, M. A.; SAERENS, S.; BLENNOW, A.; SKOVMAND-LARSEN, M.; SWIEGERS, J. H.; PETERSEND, G. B.; HEIMDAL, H.; NIELSENA, D. S. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, v. 63, 2014. p. 306–316.
- ELEVITCH, C. R.; MANNER, H. I. *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit): Moraceae (mulberry family). **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**, p. 1-17, 2006.
- FOLEGATTI, M. I. S. Aproveitamento industrial do umbu: Processamento de geléia e compota. **Ciência agrotécnica**, v.27, n.6, p.1308-1314, 2003.
- HASHIM, P.; SELAMAT, J.; SYED MUHAMMAD, S. K.; 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, p.535–542. 1998.

ILLEGHEMS, K.; DE VUYST, L.; PAPALEXANDRATOU, Z.; WECKX, S. Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity, **Plos one**, v. 7, p. 1-11, 2012.

IOANNONE, F.; DI MATTIA, C. D.; DE GREGORIO, M.; SERGI, M.; SERAFINI, M.; SACCHETTI, G. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. **Food Chemistry**, v. 174, 2015. p. 256–262.

JINAP, S.; WAN ROSLI, W. I.; RUSSLY, A. R.; NORDIN, L. M. Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, p.441–448. 1998.

JOHN, W. A.; KUMARI, N.; BÖTTCHER, N. L.; KOFFI, K. J.; GRIMBS, S.; VRANCKEN, G.; D'SOUZA, R. N.; KUHNERT, N.; ULLRICHA, M. S. Aseptic artificial fermentation of cocoa beans can be fashioned to replicate the peptide profile of commercial cocoa bean fermentations. **Food Research International**, v.89, p.764–772, 2016.

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

LIMA, L. L. A.; SCHULER, A.; GUERRA, N. B. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 5, 2010. P. 1186-1189.

MAGA, J. A.; SIZER, C. E. Pyrazines in foods: a review. **Journal agricultural and food chemistry**, v.21, n.1. 1973.

MOREIRA, I. M. V; VILELA, L. F.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SCHWAN, R. F. Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. **Food Research International**, v. 109, p. 196-203, 2018.

NAGAMATO, R. J.; NETO, G. K.; WASZCZYNSKYJ, N.; CÓRDOVA, K. R. V. Tratamento de compostos orgânicos voláteis pela técnica da incineração catalítica. **Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia**, n. 1, ano 1, 2010.

OLIVEIRA, L. F. de. **Efeito dos parâmetros do processo de desidratação de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) sobre as propriedades químicas, físico-químicas e a aceitação sensorial**. 2009. 121p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

OWUSU, M.; PETERSEN, M. A.; HEIMDAL, H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, 2012. p. 446-456.

PARKER, J. K. *Flavor Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*. In ***Flavor Development, Analysis and Perception in Food and Beverages***, pp. 3–30, 2015a.

PARKER, J. K. Thermal generation of aroma. In: *Flavor development, analysis and perception in food and beverages*. ***Food Science, Technology and Nutrition***, 2015b.

PINI, G. F.; BRITO, B. E. S.; GARCÍA, N. H. P.; VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. A. Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) Method for the Chromatographic Determination of Alkylpyrazines in Cocoa Samples. ***Journal of the Brazilian Chemical Society***, v. 15, n. 2, 2004. p. 267-271.

RAMLI, N.; HASSAN, O.; SAID, M.; SAMSUDIN, W.; IDRIS, N. A. Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. ***Journal of Food Processing and Preservation***, v.30, p. 280–298. 2006.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; OROZCO-AVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. ***Food Research International***, v. 44, 2011. p. 250–258.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; CONTRERAS-RAMOS, S. M.; OROZCO-AVILA, I.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; LUGO-CERVANTES, E. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. ***Food Chemistry***, v.132, p.277–288. 2012.

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

SEAGRI – **Secretária de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária**. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br>>, acesso em 20/07/2017.

SPADA, F. P. **Roasted jackfruit seed as a potential substitute for chocolate aroma: obtainment, composition, olfactometry, and application**. 2017. 151p. Thesis (Doctor in Food Science and Technology). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 2017.

SPADA, F. P.; ZERBETO, L. M.; RAGAZI, G. B. C.; GUTIERREZ, E. M. R.; SOUZA, M. C.; PARKER, J. K.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Optimization of Postharvest Conditions To Produce Chocolate Aroma from Jackfruit Seeds. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 65, p. 1196-1208, 2017.

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

6. CONCLUSÃO GERAL

A utilização de culturas *starters* no processo fermentativo das sementes de jaca dura permitiu a aceleração do processo, e maximização da produção de algumas pirazinas, responsáveis pelo aroma de chocolate. A ação conjunta de duas culturas resultou em um processo fermentativo mais eficiente, pois houve disponibilização de substratos e aeração da massa pela levedura *K. marxianus*, e consumo rápido por *S. cerevisiae*, resultando em melhor produção de intermediários, que culminaram na obtenção de precursores de aroma e, posteriormente, de compostos voláteis semelhantes aos do cacau. Os dados permitiram observar que a fermentação com uso isolado de *K. marxianus* produziu rápida degradação da polpa e liberação de açúcares, que não foram totalmente consumidos, e portanto, inutilizados durante o processo. Deste modo, a atuação sinérgica destas duas culturas *starters* apresenta-se mais adequada para formação do aroma de chocolate.

Para os compostos voláteis, observou-se que as fermentações foram bem conduzidas, pois houve formação dos principais compostos aromáticos de chocolate em todos os tratamentos realizados. Contudo, comparando-se os dados obtidos, observou-se que a inoculação isolada de *K. marxianus* produziu perfil volátil de qualidade inferior aos demais (menores concentrações de pirazinas e maiores de *off-flavors*), que provavelmente se relaciona à menor eficiência do processo fermentativo, e principalmente às baixas temperaturas obtidas durante o processo.

O tratamento MIX apresentou maior semelhança em relação ao tratamento controle, e permitiu a maximização da produção de alguns voláteis que exercem grande impacto na formação do aroma de chocolate, indicando sua potencial utilização no direcionamento da produção de compostos desejáveis. Contudo, acredita-se que possam ser obtidos resultados ainda melhores com uso de *K. marxianus* e *S. cerevisiae* se forem empregados lotes fermentativos com maior volume de massa, visto que a temperatura, essencial para a formação de precursores de aroma, não atingiu os valores ideais observados em cacau, indicando potencial de melhoria.

Considerando-se a produção de *off-flavors*, principalmente ácidos, acredita-se que a redução no tempo de fermentação seja uma alternativa de melhoria, minimizando sua produção. No tratamento MIX, houve aceleração do processo fermentativo, indicando a possibilidade de redução do período da fermentação.

Deste modo, conclui-se que a fermentação com inoculação de mistura de leveduras possa ser empregada em jaca dura permitindo a produção de compostos voláteis de aroma de chocolate, redução do tempo de fermentação, e maior padronização dos lotes fermentativos em relação ao controle, que possui variação de microbiota e é susceptível a contaminações.