



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GILSON CELSO ALBUQUERQUE CHAGAS JUNIOR

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES  
DE LEVEDURAS PRESENTES NA FERMENTAÇÃO DO CACAU DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

BELÉM - PA  
2016

GILSON CELSO ALBUQUERQUE CHAGAS JUNIOR

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES  
DE LEVEDURAS PRESENTES NA FERMENTAÇÃO DO CACAU DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

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

Coorientador: Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo

BELÉM - PA

2016

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES  
DE LEVEDURAS PRESENTES NA FERMENTAÇÃO DO CACAU DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

*por*

**GILSON CELSO ALBUQUERQUE CHAGAS JUNIOR**

Nutricionista

Apresentada em: 02 de setembro de 2016.

Resultado: Aprovado

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA)  
Membro Interno

---

**Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira**  
(ITV – Instituto Tecnológico Vale)  
Membro Externo

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA)  
Membro Suplente Interno

---

**Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira**  
(FEA/ITEC/UFPA)  
Membro Suplente Externo

---

**Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo**  
(FEA/ITEC/UFPA)  
Coorientador

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Santos Lopes**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA)  
Orientadora

BELÉM – PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Chagas Junior, Gilson Celso Albuquerque, 1990-  
Isolamento e identificação molecular de populações  
de leveduras presentes na fermentação do cacau da  
amazônia brasileira / Gilson Celso Albuquerque Chagas  
Junior. - 2016.

Orientadora: Alessandra Santos Lopes;  
Coorientadora: Hamilton Mendes De  
Figueiredo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Federal do Pará, Instituto de Tecnologia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Belém, 2016.

1. Fermentação. 2. Leveduras- Identificação.  
3. Cacau. I. Título.

CDD 22. ed. 664.024

---

*Aos meus pais...*

**Ofereço.**

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste...*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

*Não se pode deixar de agradecer às forças divinas pelo dom da vida e não deixar que nenhum obstáculo possa ser suficiente para atrapalhar nossos sonhos e ambições. Amém!*

*À toda querida família pelo apoio e motivação e principalmente aos meus pais, D. Neuza e Seu Gilson, e minha 'Mãedrinha' Júlia e 'Paidrinho' José (in memoriam). Amores eternos. Minhas amadas avós, Lourdes e Ana Valente (in memoriam). De onde estiverem, sei que torceram pelo meu sucesso...*

*Aos atuais e antigos membros do LABIOTEC (Alan, Bia, Carol, Felipe, Henrique 'Riquinho', Leticia 'Lelê' Carvalho, Marília, Thaís Sena, Thaise) por toda a ajuda dispensada, pelos momentos incríveis de convivência durante esses dois anos, pelas risadas, pelo aprendizado, pelo comprometimento; ao 'Paulinho' Chada por dicas em análises e pela convivência...*

*À parceira de pesquisa e amiga, Silvana pelos conselhos, pela compreensão, pelos 'puxões de orelha', e sobretudo pela amizade construída ao longo dessa jornada...*

*À Prof<sup>a</sup>. Alessandra Lopes, pela orientação, paciência, confiança a mim depositada, pelos ensinamentos que levarei para toda a minha vida pessoal e profissional...*

*Ao meu coorientador Prof. Hamilton Figueiredo, pelos conselhos na realização das análises microbiológicas e pela disponibilização do seu espaço e infra-estrutura de trabalho...*

*À Dr<sup>a</sup>. Silvia Marques juntamente ao Instituto Evandro Chagas (IEC) pela ajuda na realização das análises de PCR, doação dos primers, pela disponibilização da infra-estrutura de seu laboratório. E sobretudo, por mostrar como é fácil e bonito ser humilde ao ensinar, em repassar os conhecimentos, e em ser um amor de pessoa...*

*Ao Instituto Tecnológico Vale (ITV) pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa, pela concessão da bolsa de estudos e por sempre disponibilizar a infra-estrutura para a realização de algumas análises...*

*Aos Drs. Guilherme Oliveira e Nelson Carvalho (ITV) pela ajuda constante e intermediação para realização das análises de extração de DNA e sequenciamento...*

*Ao Dr. Santelmo Vasconcelos e à M.Sc. Mariana Costa, pela ajuda indispensável na realização e interpretação do sequenciamento dos meus produtos de PCR...*

*À Prof<sup>a</sup>. Consuelo Sousa, por sua disponibilidade sempre que precisei e por sua autorização em permanecer em seu laboratório como voluntário no início do mestrado...*

*À Suely 'Susu', por me acompanhar e me ajudar nas análises microbiológicas que eu desconhecia no começo do mestrado. Ao 'Seu Mário', por sua paciência em me receber e me guiar na realização das análises de proteínas e lipídios, por 'tomar conta' das minhas análises de cinzas e por me receber em seu laboratório para o meu estágio em docência...*

*Ao recém-chegado Prof. Nelson Rosa, por seus valiosos ensinamentos e dicas em meu trabalho, por se mostrar um profissional ímpar...*

*À Brenda Brito (LAFAMI), pelo auxílio no uso do *software* para predição dos modelos estatísticos...*

*À Prof<sup>a</sup>. Thais Alessandra (FAU/UFPA) e à M.Sc. Amanda M. pelo auxílio e empréstimo do microscópio óptico para visualização e registros de imagens das leveduras...*

*Ao corpo docente do Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPA (PPGCTA/UFPA) pelos ensinamentos repassados ao longo dos dois anos de mestrado, em especial ao que convivi fazendo disciplinas: Professores (as) Alessandra Lopes, Lúcia Lourenço, Jesus Nazareno, Rosinelson Pena, Antônio Manoel Rodrigues, Raul Carvalho, Consuelo Sousa, Hamilton Figueiredo, Luciana Centeno, Luiza Meller, Éder Araújo. E os discentes de disciplinas condensadas de outras instituições: Adriano Cruz (IFRJ/RJ) e Regina Célia (UFV/MG)...*

*À Dr<sup>a</sup>. Elisa Moura (Embrapa Amazônia Oriental) e à técnica de seu laboratório, Leonora, pela realização da quantificação de DNA e pelas dicas de análise...*

*À família Konagano pela realização da fermentação e coleta da matéria-prima em sua propriedade no município de Tomé-açu...;*

*À secretária do PPGCTA, Hadrienne Pombo por todo serviço prestado e paciência em me atender...*

**MUITO OBRIGADO!**

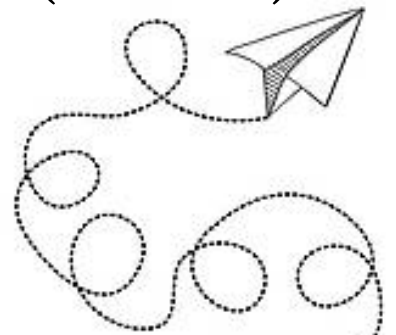
**Gilson C. A. C. Junior**

*“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande.”*

**Louis Pasteur (1822-1895)**

*“Quando tudo parecer estar contra ti, lembra.  
Os aviões não decolam com o vento a favor, mas  
sim, contra.”*

**Henry Ford (1863-1947)**





## RESUMO

CHAGAS JUNIOR, G.C.A. **Isolamento e Identificação Molecular de Populações de Leveduras Presentes na Fermentação do Cacau da Amazônia Brasileira**, 2016, 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal do Pará, Belém.

Este estudo teve como objetivo identificar através de extração e seqüenciamento de DNA, as leveduras atuantes no processo de fermentação de sementes de cacau provenientes de um município paraense. 90 kg de sementes de cacau foram dispostos e divididos em três cochos de madeira (n=3) e fermentadas de acordo com procedimentos adotados pelo produtor local. Ao longo de sete dias de fermentação, alíquotas de sementes foram assepticamente coletadas e armazenadas em sacos de polietileno estéreis, conservados sob refrigeração e encaminhadas para análises microbiológicas e físico-químicas (pH, umidade, cinzas, lipídios e proteínas). Observou-se crescimento inicial de leveduras de  $1,6 \times 10^7$  UFC/g, chegando ao valor máximo de  $5,5 \times 10^9$  UFC/g em 72h de fermentação. Por fim, o valor final foi de  $1,5 \times 10^5$  UFC/g no sétimo dia de fermentação. Foram identificadas cinco espécies de leveduras ao qual ganha destaque a presença de três espécies que ainda não possuem relatos de sua presença na fermentação de sementes de cacau no Brasil. *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie que se mostrou predominante no processo fermentativo. Foi possível conhecer a diversidade de leveduras presentes na fermentação de sementes de cacau em um município do estado do Pará, que é segundo maior exportador de amêndoas de cacau fermentadas secas.

**Palavras-chave:** diversidade, microflora, *Theobroma cacao*, *Saccharomyces*.

## ABSTRACT

CHAGAS JUNIOR, G.C.A. **Isolation and Molecular Identification of Yeasts' population During Cocoa Beans Fermentation Process in Brazil, Amazon Region**, 2016, 57p. Thesis (Master of Science) – Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Pará, Belém.

This study aimed to identify through DNA extraction and sequencing, yeast working in cocoa beans fermentation process from a paraense municipality. 90 kg of cocoa beans were prepared and divided into three wooden troughs (n = 3) and fermented in accordance with procedures adopted by the local producer. Over seven days of fermentation, seed rates were aseptically collected and stored in sterile polyethylene bags, stored under refrigeration and sent for microbiological and physico-chemical analysis (pH, moisture, ash, lipids and proteins). There was initial growth of  $1,6 \times 10^7$  CFU/g yeast, reaching a maximum value of  $5,5 \times 10^9$  CFU/g at 72 hours of fermentation. Finally, the final amount was  $1,5 \times 10^5$  CFU/g on the seventh day of fermentation. Featured were identified five species of yeast which gains the presence of three species, since there are no reports of its presence in the fermentation process of cocoa beans in Brazil. *Saccharomyces cerevisiae* was the species that showed prevailing in the fermentation process. It was possible to know the diversity of yeast present in cocoa beans fermentation in a state in a city of Pará state, which is the second largest exporter of dried fermented cocoa beans.

**Keywords:** diversity, microflora, *Theobroma cacao*, *Saccharomyces*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fruto maduro de cacau da variedade *Forastero* 18
- Figura 2** – Corte longitudinal em semente de cacau *in natura* da variedade *Forastero* e suas respectivas partes internas. 19
- Figura 3** – Cochos de fermentação 21
- Figura 4** – Reações enzimáticas ocorridas durante a fermentação das sementes de cacau 23
- Figura 1 (Artigo)** – Correlação linear de Pearson entre ATT e a temperatura de fermentação. 41
- Figura 2 (Artigo)** – Correlação linear de Pearson entre pH e a temperatura de fermentação. 42

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Diversidade de leveduras presentes na fermentação de sementes de cacau realizadas em diferentes países. 24

**Tabela 1 (Artigo)** – Temperatura de fermentação, análises físico-químicas e contagem de leveduras das amêndoas de cacau, Tomé-açu, 2015. 39

**Tabela 2 (Artigo)** – Distribuição das espécies encontradas durante a fermentação de amêndoas de cacau no município de Tomé-açu (PA), 2015. 42

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcento ou porcentagem
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>ATT</b>	Acidez total titulável
<b>b.s.</b>	Base seca
<b>b.u.</b>	Base úmida
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>g</b>	Gramas
<b>hec</b>	Hectares
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>kg</b>	Quilogramas
<b>LCTEA</b>	Laboratório de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos
<b>m</b>	Metro
<b>MEA</b>	Malt Extract Agar
<b>mEq NaOH/100 g</b>	Miliequivalente de Hidróxido de Sódio por 100 gramas
<b>mL</b>	Mililitros
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>PA</b>	Pará
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>t.</b>	Toneladas
<b>UFPA</b>	Universidade Federal do Pará
<b>YEPD</b>	Yeast Extract Peptone Dextrose Agar

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b>	x
<b>LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b>	xi
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	14
<b>OBJETIVOS DO ESTUDO</b>	16
<b>CAPÍTULO 1 – LEVEDURAS: METABOLISMO E DIVERSIDADE NA FERMENTAÇÃO DO CACAU</b>	17
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2 O FRUTO DE CACAU (<i>Theobroma cacao</i> L.)</b>	18
<b>3 CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO DO FRUTO MADURO</b>	19
<b>4 O PROCESSO FERMENTATIVO DAS SEMENTES DE CACAU</b>	20
<b>5 DIVERSIDADE DAS LEVEDURAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CACAU</b>	23
<b>6 ISOLAMENTO E TAXONOMIA DE LEVEDURAS</b>	24
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	27
<b>CAPÍTULO 2 – ARTIGO “ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA POPULAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CACAU AMAZÔNICO”</b>	30
<b>RESUMO</b>	31
<b>ABSTRACT</b>	32
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	33
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	34
2.1. <i>Fermentação</i>	34
2.2. <i>Amostragem</i>	34

<i>2.3 Análises físico-químicas</i>	35
<i>2.4 Obtenção das culturas de leveduras</i>	35
<i>2.5 Extração do DNA genômico das leveduras</i>	36
<i>2.6. Identificação molecular e caracterização dos isolados</i>	36
<i>2.7 Análise estatística</i>	37
<b>3 RESULTADOS</b>	38
<i>3.1 Análises físico-químicas e contagem de leveduras</i>	38
<i>3.2 Correlação linear da acidez total e do pH com a temperatura</i>	40
<i>3.3 Identificação dos isolados de leveduras</i>	42
<b>4 DISCUSSÃO</b>	43
<b>5 CONCLUSÕES</b>	49
<b>AGRADECIMENTOS</b>	50
<b>REFERÊNCIAS</b>	50
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b>	55

---

## INTRODUÇÃO GERAL

---

A fermentação das sementes de cacau é uma das primeiras etapas para a obtenção do chocolate, sendo ainda realizada em alguns países de forma tradicional, onde as sementes são postas em grandes cochos de madeira ou em até mesmo amontoadas, dispostas no chão, cobertas com folhas de bananeira e sacos de aniagem por um período de 5 a 7 dias. Durante esse período, eventuais revolvimentos são realizados para a indução de oxigênio e favorecimento da sucessão microbiana (LEAL JÚNIOR et al., 2008). Essa fermentação ocorre de forma espontânea na presença de vários microrganismos, envolvendo leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas (NIELSEN et al., 2007).

As leveduras são os primeiros microrganismos atuantes no processo fermentativo do cacau, que convertem os açúcares presentes na polpa em etanol e produzem enzimas que degradam a pectina presente na polpa, favorecendo as condições de crescimento dos outros microrganismos. Além disso, também produzem compostos voláteis como aldeídos, cetonas, alcoóis, terpenos e ésteres, que contribuem significativamente com o sabor e o aroma do chocolate (SCHWAN; WHEALS, 2004).

As leveduras são microrganismos bastante versáteis, em termos de atividade metabólica, especialmente fisiológica (BADER et al., 2010). Por isso, isolar e identificá-las vem a ser de grande importância para avaliar a sua diversidade e distribuição durante a fermentação do cacau.

Tradicionalmente, as leveduras são identificadas através de técnicas convencionais, baseadas em características (macro e micro) e fisiológicas, entre as quais: fermentação de diferentes fontes de carbono; assimilação de diferentes fontes de carbono o nitrogênio; crescimento em diferentes temperaturas e resistência à cicloheximida (YARROW, 1998). Contudo, devido às limitações dessas técnicas, esse tipo de identificação pode gerar dúvidas no processo de identificação de microrganismos



Ao longo dos anos, técnicas biomoleculares têm sido aplicadas para a identificação e classificação de leveduras. Tais técnicas são baseadas principalmente na análise de variabilidade de sequências de genes e regiões específicas do DNA genômico (GUARRO et al., 1999).

O DNA ribossomal e o gene actina vem sendo comumente empregados em estudos taxonômicos devido à presença de regiões que evoluem em diferentes taxas, servindo como base para análise das relações evolucionárias (HIGHTOWER; MEAGHER, 1986; KURTZMAN, 1992). Outra ferramenta molecular que também vem sendo empregada na identificação de leveduras são os minissatélites, pois revelam quase que invariavelmente um extensivo polimorfismo no genoma (PARKER et al., 1998).

Tendo em vista o grande potencial microbiológico da Região Amazônica e do papel importante desses microrganismos para a qualidade do chocolate, este trabalho objetivou isolar e identificar por meio de métodos moleculares, leveduras presentes durante o processo de fermentação do cacau de um município da Amazônia brasileira.

---

## OBJETIVOS DO ESTUDO

- GERAL

- ❖ Identificar através de técnicas moleculares, as espécies de leveduras que atuam durante o processo de fermentação do cacau do município de Tomé-açu (PA).

- ESPECÍFICOS

- ❖ Ter conhecimento a respeito da microflora atuante durante a fermentação de sementes de cacau oriundos da região da Amazônia brasileira;
- ❖ Enriquecer a literatura com dados sobre a fermentação de sementes de cacau da Amazônia brasileira;
- ❖ Saber a importância das espécies de leveduras atuantes no processo fermentativo das sementes de cacau amazônico sobre sua ação para a produção de produtos a base de cacau com qualidade superior.

---

# CAPÍTULO 1

## LEVEDURAS: METABOLISMO E DIVERSIDADE NA FERMENTAÇÃO DO CACAU

---

### 1 INTRODUÇÃO

As leveduras constituem a população microbiana predominante nos primeiros dias de fermentação, em virtude de seu crescimento ser favorecido pela presença de ácidos orgânicos (principalmente ácido cítrico), riqueza em açúcares fermentáveis e baixo conteúdo de oxigênio da massa (JESPERSEN et al., 2005). Estas, desempenham um papel importante na fermentação, promovendo condições favoráveis para o crescimento dos microrganismos atuantes na fase posterior: bactérias lácticas e acéticas.

Dentre as principais atividades metabólicas que as leveduras promovem na fermentação do cacau, destacam-se: (I) assimilação de cerca de 60% do ácido cítrico presente na polpa; (II) conversão de açúcares simples em etanol e dióxido de carbono – CO<sub>2</sub>; (III) produção de ácidos orgânicos (ácidos oxálico, fosfórico, succínico e málico), que migram para a parte interna das sementes, causando a morte do embrião; (IV) produção de metabólitos secundários, os quais contribuem para o sabor e aroma de chocolate; (V) secreção de pectinases que reduzem a viscosidade da polpa, permitindo a aeração da massa (ARDHANA; FLEET, 2003; SCHWAN; WHEALS, 2004; GALVEZ et al., 2007).

A diversidade de leveduras presentes na fermentação do cacau tem sido frequentemente associada às diferentes localidades de fermentação, bem como, as condições do processo fermentativo (tais como, nutrientes disponíveis, pH, temperatura, oxigênio, entre outros). De fato, vários estudos revelam uma abundante diversidade de leveduras na fermentação de cacau em diferentes países.

Pelo exposto, objetivou-se, neste capítulo, fazer uma revisão bibliográfica sobre a diversidade de leveduras atuantes do processo fermentativo de sementes de cacau.

## 2 O FRUTO DE CACAU (*Theobroma cacao* L.)

*Theobroma cacao* L. (família Sterculiaceae), conhecido popularmente como *cacau*, é típico de regiões tropicais da América Central, América do Sul e região amazônica. O nome *cacau* é originário dos povos antigos, astecas e maias, que o denominavam “*cacahuatl*”. Esses povos preparavam o chocolate (*chocolatl*), uma bebida aromática obtida a partir dos grãos secos do cacau (ROHAN, 1964; RUSCONI; CONTI, 2010).

Existem três subespécies de cacau que são mais utilizadas na produção de chocolate: (i) o *Criollo*, variedade mais cultivada na América Central e do Sul, (ii) *Forastero*, variedade do alto e baixo Amazonas, e o (iii) *Trinitário*, um híbrido natural entre o *Criollo* e *Forastero*. Essas variedades de *T. cacao* são classificadas conforme suas características morfológicas, tais como, tamanho, forma, coloração externa e aparência. (THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001).

Ao contrário do *Criollo*, o *Forastero* (Figura 1), incluem várias sub-variedades que são significativamente mais resistentes, em virtude da alta rusticidade e alto potencial de produção. Produzem amêndoas de menor custo e o chocolate produzido a partir das mesmas é relativamente amargo, correspondendo cerca de 80% da produção de chocolate. O *Trinitário* é utilizado em cerca de 10-15% da produção de chocolate (LINS, 2008) e possui características químicas e sensoriais intermediárias entre o *Criollo* e o *Forastero*.

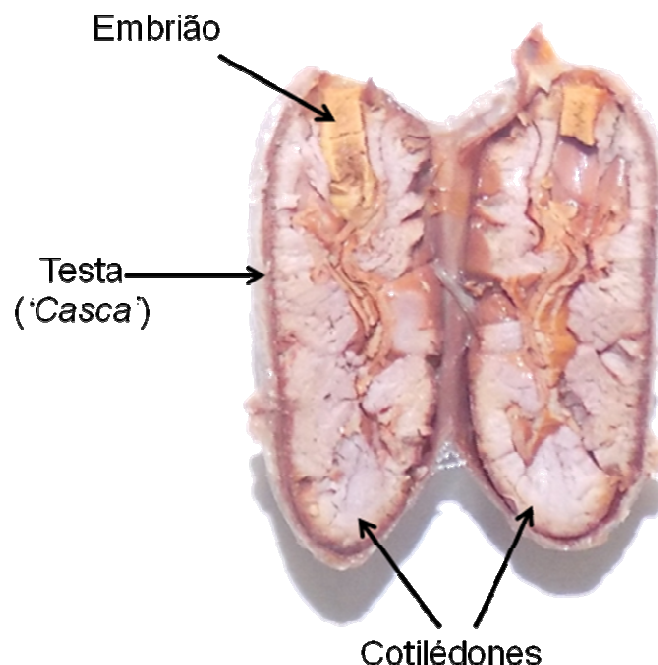


**Figura 1:** Fruto maduro de cacau da variedade *Forastero*.  
**Fonte:** Autor, 2015.

A região produtora de cacau na Amazônia engloba os estados de Rondônia, Amazonas, Pará e Mato Grosso. Em particular, a produção de cacau no estado do Pará vem conquistando seu espaço gradativamente em âmbito nacional (MARTINS; MATOS; SOUSA, 2001).

### 3 CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO DO FRUTO MADURO

O fruto maduro é semelhante a uma vagem que contém de 30 a 40 sementes. Essas sementes são compostas basicamente de duas partes, a parte externa e a parte interna. A parte interna consiste de dois cotilédones, que contêm vários tipos de células de reserva, como células polissacarídicas, polifenólicas e lipídio-proteicas, e o embrião. A parte externa é composta pela testa (película que reveste a semente) e a polpa mucilaginosa que corresponde aproximadamente 40% do peso seco da semente fresca (Figura 2). A testa atua como uma barreira protetora da semente, sendo permeável apenas a moléculas de baixo peso molecular, como etanol e ácido acético, que são capazes de penetrar no interior da semente, causando a morte do embrião. (ROHAN, 1964; SCHWAN; WHEALS, 2004; MARTINI et al., 2008).



**Figura 2:** Corte longitudinal em semente de cacau *in natura* da variedade *Forastero* e suas respectivas partes internas.

**Fonte:** Autor, 2015.

O aspecto da semente varia de acordo com a cultivar. As sementes do *Criollo* são brancas ou de coloração púrpura muito clara, o que está relacionado com a pouca ou nenhuma quantidade de antocianinas encontrada nessas sementes. Ao contrário, as sementes do *Forastero*, apresentam coloração púrpura, apresentando grandes quantidades de antocianinas (ELWERS; ZAMBRANO; ROHSIUS, 2009).

A composição das sementes do cacau consiste de 32-39 % de água, 13.45% de proteína, 51.82% de lipídios, 6.22% de fibras, 10-15% de açúcares totais (95 % de sacarose, 2.7 % de frutose e glicose), 5.6 % de aminoácidos livres, 15-20% de polifenóis e 1 % de ácidos orgânicos (principalmente ácido cítrico, oxálico e málico) (SHWAN, 1996; LOPES, 2000; HASHIM et al., 2007; RAWEL; KULLING, 2007).

As sementes do cacau encontram-se envolvidas por uma polpa mucilagínosa estéril. A polpa é rica em açúcares fermentáveis, como frutose, glicose, sacarose, sorbitol, inositol e manitol, ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico e pequenas quantidades de aminoácidos. O pH é relativamente baixo, em torno de 3,3-4,0, devido a alta concentração de ácido cítrico (REINECCIUS et al., 1972; ARDHANA; FLEET, 2003).

Essa polpa atua como substrato para o crescimento espontâneo de uma variedade de microrganismos, entre eles as leveduras que desempenham um papel importante, juntamente com bactérias e outros fungos, provenientes principalmente do solo, ar, superfície dos frutos, folhas de bananeira, mãos dos manipuladores e utensílios utilizados durante a fermentação. A composição da polpa é um fator que interfere diretamente na seleção da microflora fermentativa, tendo em vista que a composição de glicose, sacarose e frutose é em função da idade do fruto (ICMSF, 1998; SCHWAN; WHEALS, 2004).

#### **4 O PROCESSO FERMENTATIVO DAS SEMENTES DE CACAU**

O beneficiamento do primário do cacau consiste basicamente de quatro etapas: (I) a colheita das amêndoas, (II) a retirada das sementes e a polpa associada às mesmas dos frutos, (III) fermentação e (IV) secagem.

A fermentação pode ser realizada em pilhas, caixas, cestos, ou em bandejas (Figura 3) de acordo com as práticas de processamento de cada região ou país. Na região amazônica, o beneficiamento do cacau consta basicamente de uma fermentação realizada em caixas de madeira (Figura 1), por 5 a 7 dias, seguida da secagem natural ou artificial (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Durante o procedimento de retirada das sementes do fruto ocorre a contaminação externa da polpa por microrganismos que atuam no processo fermentativo. No entanto, estima-se que mais de 60% dos microrganismos não sejam essenciais para uma fermentação eficaz (SCHWAN; WHEALS, 2004).



**Figura 3:** Cochos de fermentação.

**Fonte:** Autor, 2015.

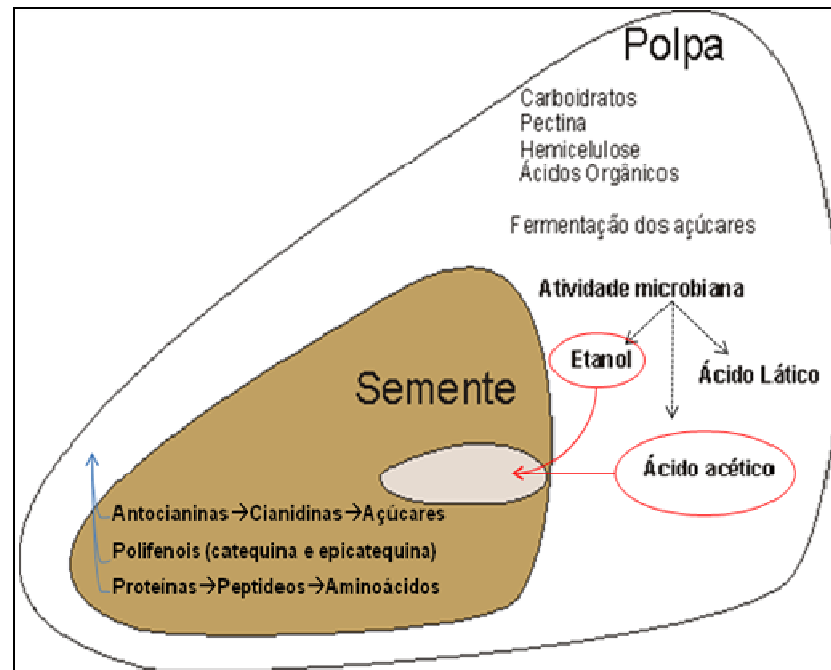
Em função dessa atividade metabólica microbiana, principalmente das bactérias acéticas que promovem reações oxidativas de caráter exotérmico, o processo fermentativo do cacau é acompanhado por um aumento da temperatura da massa, que pode alcançar temperaturas em torno de 45 a 51 °C, em aproximadamente 48 horas, permanecendo nesses níveis por mais alguns dias (GALVEZ et al., 2007).

A prática de revolvimentos frequentes durante a fermentação é uma forma de controlar essa elevação de temperatura e também o nível de ácidos, fatores que influem diretamente na atividade enzimática, a qual é indispensável para o desenvolvimento dos precursores do sabor e aroma do chocolate (SCHWAN et al., 1990).

O efeito combinado de calor, etanol e ácidos orgânicos penetrando na testa, provoca a morte do embrião e, conseqüentemente a ruptura de células polissacarídicas, lipídeo-proteicas e polifenólicas presentes nos cotilédones, difundindo esses compostos durante a fermentação (DE BRITO et al., 2000). Enzimas endógenas presentes nas sementes do cacau, como a glicosidase, polifenoloxidase e protease, atuam nessas substâncias promovendo várias reações enzimáticas (DIAS, 1994; HANSEN; OLMO; BURRI, 1998).

Durante a fermentação, as antocianinas são rapidamente hidrolisadas em antocianidinas e açúcares (galactose e arabinose) pelas glicosidases, o que explica a perda da cor roxa dos cotilédones. As polifenoloxidases convertem os polifenóis (principalmente, epicatequina e antocianidinas livre) em quinonas. Polifenóis e quinonas formam complexos com outros polifenóis, proteínas e peptídeos, diminuindo a sua solubilidade e adstringência e dando origem a coloração marrom típica de amêndoas de cacau bem fermentadas. Por isso, as antocianinas e a coloração marrom das amêndoas fermentadas, a qual é verificada através da prova de corte, tem sido utilizada em aplicações de controle de qualidade do processo fermentativo. As proteínas são degradadas pela ação das proteases produzindo aminoácidos livres (DE BRITO et al., 2000; CAMU et al., 2008b). Um esquema das atividades microbiológicas aliadas às reações químicas e enzimáticas que ocorrem na semente de cacau pode ser visto na Figura 4.





**Figura 4:** Reações enzimáticas ocorridas durante a fermentação das sementes de cacau.  
**Fonte:** Nielsen (2006).

A fermentação das sementes do cacau é uma etapa importante, pois durante essa etapa a grande maioria dos compostos precursores do sabor e aroma são formados devido às reações metabólicas e enzimáticas que ocorrem dentro dos cotilédones (KRATZER et al., 2009).

## 5 DIVERSIDADE DAS LEVEDURAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CACAU

Os microrganismos que realmente desempenham um papel importante na fermentação do cacau ocorrem em três etapas principais: (I) uma fase inicial, anaeróbica, durante a qual as leveduras são dominantes e convertem os açúcares da polpa que envolve a semente em etanol e dióxido de carbono; (II) uma fase intermediária, microaerófila, em que atuam as bactérias lácticas produzindo ácido láctico e a (III) fase final, aeróbica, em que as bactérias acéticas são dominantes e oxidam o etanol a ácido acético, CO<sub>2</sub> e água (ARDHANA; FLEET, 2003; CAMU et al., 2008).

Além desses, outros microrganismos constituem a microflora das sementes do cacau durante a fermentação, como exposto na Tabela 1. A sequência de

crescimento dos microrganismos e a composição da microflora fermentativa podem ser influenciadas por vários fatores, como condições climáticas, ambiente de fermentação, diferentes métodos de fermentação e a falta de homogeneidade da massa (IMCSF, 1998; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2001; CAMU et al., 2008a).

**Tabela 1** - Diversidade de leveduras presentes na fermentação de sementes de cacau realizadas em diferentes países.

Gêneros	Localidade	Referência
<i>Kloeckera</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> e <i>Rhodotorula</i>	Indonésia	Ardhana & Fleet, (2003)
<i>Pichia</i> , <i>Yarrowia</i> , <i>Hanseniaspora</i> e <i>Candida</i>	República Dominicana	Galvez et al, (2007)
<i>Hanseniaspora</i> , <i>Candida</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Saccharomycopsis</i> , <i>Kodamaea</i> , <i>Meyerozyma</i> , <i>Saccharomycodes</i> e <i>Yamadazyma</i>	Gana	Nielsen et al, (2007); Daniel et al, (2009)
<i>Pichia</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Yarrowia</i> , <i>Candida</i>	Costa-do-Marfim	KOUAME et al, (2015)

*Saccharomyces cerevisiae* é a espécie que tem sido mais encontrada na fermentação do cacau em diversos países, e tem sido isolada em até cerca de 70 horas após o início da fermentação, potencialmente devido o seu rápido crescimento, atividade pectinolítica e tolerância ao etanol. Seguida de outras espécies, tais como, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Candida krusei*, *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*) e *Hanseniaspora opuntiae* (ARDHANA; FLEET, 2003; JESPERSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2007; DANIEL et al., 2009; DUARTE et al., 2009).

## **6 ISOLAMENTO E TAXONOMIA DE LEVEDURAS**

São grupos de microfungos eucarióticos integrados no Reino Fungi, domínio Eukarya, sendo caracterizadas por apresentarem um crescimento vegetativo predominantemente unicelular, que pode ocorrer por brotamento ou fissão binária, diferentemente dos bolores (WALKER; WHITE, 2005).

As leveduras pertencem basicamente a dois filós do Reino Fungi, os Ascomicetos e Basidiomicetos. Os ascomicetos, sob determinadas condições, produzem ascósporos dentro da célula, enquanto que leveduras basidiomicetos, desenvolvem esporos externos (JACQUES; CASAREGOLA, 2008).

Seu habitat natural é frequentemente um ambiente rico em fontes de carbono orgânico de baixo peso molecular, como néctar de plantas, frutas e fluidos de animais, visto que as leveduras não são fotossintetizantes e dependem estritamente deste nutriente como uma fonte de energia e carbono. Outras fontes de nutrientes importantes são os minerais, como sais de amônia; fontes de nitrogênio obtidas principalmente através de aminoácidos e ureia; e as vitaminas, como o ácido pantotênico, biotina e tiamina (MUSHTAQ; JAMAL; NAHAR, 2007; BAMFORTH, 2005).

Os fatores físicos e químicos também são primordiais para permitir o crescimento e sobrevivência das leveduras em um determinado habitat. Entre eles destacam-se, o pH (em torno de 3,0 a 8,0), temperatura (são normalmente mesófilos, com uma temperatura ótima de crescimento entre 25 a 30 °C), oxigênio (são aeróbios obrigatórios ou anaeróbios facultativos) e presença de água (crescimento ótimo em 0,88, no entanto, existem leveduras osmofílicas que crescem em uma atividade de água de 0,61) (YARROW, 1998; JAY, 2005).

A identificação e classificação tradicional de leveduras baseiam-se em características morfológicas e fisiológicas. As características morfológicas mais comumente aplicadas são: (I) morfologia das células vegetativas em meio sólido, como textura, cor e brilho; (II) características do crescimento em meio líquido: formação de película, sedimentos floculantes ou mucoide e anel; e (III) esporulação: formação de ascósporos ou basidiósporos. Enquanto que, a identificação a partir as

propriedades fisiológicas consiste basicamente em testes de fermentação de carboidratos, assimilação de compostos carbônicos, assimilação de compostos nitrogenados, crescimento em meios de alta pressão osmótica, hidrólise da ureia, resistência a cicloheximidina, entre outros (YARROW, 1998).

Cruzamentos genéticos tradicionais indicam que cepas com diferentes características morfológicas e metabólicas podem ser membros da mesma espécie, fato que frequentemente tem culminado em uma identificação errônea de estirpes de leveduras (SUH et al., 2006).

O uso de características morfológicas para identificação de leveduras em nível de espécies é um critério instável, visto que a morfologia é variável entre estirpes de mesma espécie; a distinção entre espécies é frequentemente estabelecida com base em apenas uma ou duas características fisiológicas e a maioria das características fisiológicas podem ser modificadas por mutação gênica (RAINIERI; ZAMBONELLI; KANEKO, 2003).

Em virtude dessas limitações, o uso de técnicas moleculares está contribuindo de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de leveduras, bem como para uma melhor classificação das novas espécies. Estas técnicas baseiam-se principalmente na análise de variabilidade de regiões do DNA genômico, através de marcadores moleculares (GUARRO et al., 1999).

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BADER, J. E.; MAST-GERLACH, M. K.; POPOVIĆ, R.; STAHL, U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 2, p. 371-87, 2010.
- BAMFORTH, C. W. **The Science Underpinning Food Fermentations**. In: Food, fermentation and micro-organisms. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2005, 232p.
- CAMU, N.; GONZALEZ, A.; WINTER, T. D.; SCHOOR, A. V.; BRUYNE, K. D.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; ADDO, S. K.; VUYST, L. D. Influence of Turning and Environmental Contamination on the Dynamics of Populations of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Cocoa Bean Heap Fermentation in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 86–98, jan., 2008a.
- DANIEL, H.-M.; MEYERA, W. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 61– 78, 2009.
- DE BRITO, E. S.; GARCIA, N. H. P.; GALLÃO, M. I.; CORTELAZZO, A. L.; FEVEREIRO, P. S.; BRAGA, M. R. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 81, p. 281-288, 2000.
- DEBRAUWERE, H.; GENDREL, C.; LECHAT, G. S.; DUTREIX, M. Differences and similarities between various tandem repeat sequences: Minisatellites and microsatellites. **Biochimie**, v. 79, p. 577-586, 1997.
- DIAS, J. C. Avaliação do grau de fermentação e da acidez do cacau comercial dos Estados do Pará e Rondônia. Belém, CEPLAC/SUPOR. **Boletim Técnico nº12**. 1994, 13p.
- DUARTE, E. A. A.; VIANA, A. J. C.; DIAS, R. J. C.; CHAVES, F.; LEONE, J.; HAMMERSTONE, J.; CASCARDO, J. C. M. **Metagenômica como ferramenta de estudo da diversidade de leveduras na fermentação do cacau**. In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, SP, 30 de agosto a 02 de setembro de 2009.
- FLEET, G. H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 170–175, 2007.
- GALVEZ, S. L.; LOISEAU, G.; PAREDES, J. L.; BAREL, M.; GUIRAUD, J. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p.124–130, 2007.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. Society. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 3, p. 454-500, jul., 1999.

HANSEN, C. E.; 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.

ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS-ICMSF. **Microbiología de los alimentos: Características de los patógenos microbianos**. Zaragoza-España: Acriléia, 1998.

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 321–326, 2008.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. Gaithersburg: Aspen, 2005.

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

KOUAME, L.M.; GOUALIE, B.G.; ADOM, J.N.; KOUA, G.; OUATTARA, H.G.; DOUE, G.; NIAMKE, S.L. Diversity of microbial strains involved in cocoa fermentations from Sud-comoé (Cote D'Ivoire) based on biochemical properties, **European Scientific Journal**, v. 11, n. 18, 69-85, 2015.

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.

KURTZMAN, C P. rRNA Sequence Comparisons for Assessing Phylogenetic Relationships among Yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 42, n. 1, p. 1-6, jan., 1992.

LEAL JUNIOR, 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. **Yeast Research**, v. 8, p. 788–798, 2008.

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

MUSHTAQ, M.; JAMAL, A.; NAHAR, S. Biodiversity of yeast mycoflora in nectar of *Hibiscus rosa-sinensis* and *Ixora coccinea* flowers. **Pak. J. Bot.**, v. 39, n. 4, p. 1367-1376, 2007.

NIELSEN, D. S. **The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations**. Denmark, 2006, 111p. Tese (Doutorado em Microbiologia de Alimentos). The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.

PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTON, G. C.; Fuerst, P. What Molecules Can Tell Us about Populations: Choosing and Using a Molecular Marker. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361-382, 1998.

RAINIERI, S.; ZAMBONELLI, C.; KANEKO, Y. *Saccharomyces* sensu stricto: Systematics, Genetic Diversity and Evolution. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 1, p. 1-9, 2003.

SCHWAN, R. F.; LOPEZ, A.; SILVA, D. O.; VANETTI, M. C. D. Influência da frequência e intervalos de revolvimentos sobre a fermentação de cacau e qualidade do chocolate. **Rev. Agrotrop**, n.2, p. 22–31, 1990.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 44, p. 205–221, 2004.

SILVA, J. J .S. **Sistema de produção do cacau na Amazônia brasileira**. Belém: CEPLAC/ DEPEA, 1985. 118p.

SUH, S.; BLACKWELL, M.; KURTZMAN, C. P.; LACHANCE, M. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1006–1017, 2006.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. **Cocoa and Coffee**. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Library of Congress Cataloging-in-Publication in Data. 2. ed. 2001.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. **Introduction to Fungal Physiology**. In: *Fungi: biology and applications*. KAVANAGH, K. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2005, 293p.

YARROW, D. **Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts**. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. (eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publications. p. 77-101, 1998.

---

## CAPÍTULO 2

### Artigo

#### ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA POPULAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CACAU NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

---

Artigo confeccionado segundo as normas do periódico indexado:

**FOOD RESEARCH INTERNATIONAL**

**Nota:** Ao que rege o Parágrafo 5º, do Artigo 57 do Regimento Interno do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA), este artigo será submetido a um periódico indexado *Qualis*. Análises complementares estão sendo realizadas para posterior submissão.



## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA POPULAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES DURANTE A FERMENTAÇÃO DO CACAU NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar as leveduras atuantes na fermentação de sementes de cacau de uma localidade paraense. Sementes de cacau *var. Forastero* do município de Tomé-açu (PA), foram dispostas em três cochos de madeira (n=3) e recobertas com folhas de bananeira e sacos de aniagem e o procedimento de fermentação foi realizado conforme métodos empregados pelo produtor. Foram coletadas alíquotas de sementes em onze tempos de fermentação, para realização de análises físico-químicas e microbiológicas. Foram realizadas análises de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, além de contagem microbiológica e isolamento das cepas de leveduras para extração do DNA genômico e identificação. Não foram constatadas variações significativas ( $p>0,05$ ) nos resultados das análises físico-químicas. Com relação à contagem microbiológica, observou-se crescimento da população de leveduras durante as 72 primeiras horas de fermentação e decréscimo até o final do processo. Foram isoladas 48 cepas de leveduras onde se verificaram espécies de leveduras que nunca tinham sido relatadas na literatura em fermentações de sementes de cacau no Brasil. *Sacharomyces cerevisiae* foi a espécie predominante durante todo o processo fermentativo. Também foram identificadas espécies de leveduras que é pouco relatada em fermentação de sementes de cacau de Gana e no solo de Camarões, ambos países do continente africano. No Brasil ela não havia sido relatada anteriormente na literatura como uma espécie atuante no processo de fermentação de cacau.

**Palavras-chave:** diversidade; microflora, *Saccharomyces*, *Theobroma cacao*.

## ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF YEASTS' POPULATION DURING COCOA BEANS FERMENTATION PROCESS IN BRAZIL, AMAZON REGION

### ABSTRACT

The aim of this study was to identify the yeasts in the fermentation of cocoa beans of a city in state of Pará (Brazil). Cocoa seeds *var. Forastero* from the city of Tomé-Açu (PA), were arranged in three wooden boxes (n=3) and covered with banana leaves and burlap sacks. The fermentation process was according to methods used by the producer. For eleven fermentation times, rates of 200 g of seeds for further physico-chemical and microbiological analyzes were collected. Analyzes were performed: moisture content, ash, lipids, proteins, and microbiological count and subsequent isolation of yeast strains for genomic DNA extraction and identification. Not found significant differences ( $p>0.05$ ) in the results of physical and chemical analysis. In the microbiological count, there was growth during the 72 first hours of fermentation and decrease by the end of the process. They were isolated 48 strains of yeasts for later identification by molecular techniques. There have been species that never has been related during the fermentation process of cocoa beans in Brazil. *Saccharomyces cerevisiae*, was prevalent for the beginning to the end of fermentation process. Some species has also been identified and is a yeast species that is rarely reported in fermentation of cocoa beans from Ghana and Cameroon soil, both African countries. In Brazil it has not been reported in the literature as an active specie in fermentation process of cocoa .

**Keywords:** diversity; microflora; *Saccharomyces*, *Theobroma cacao*.

## 1. INTRODUÇÃO

A fermentação das sementes de cacau é uma das primeiras etapas para a obtenção do chocolate, sendo realizada em alguns países, inclusive no Brasil, de forma tradicional utilizando cochos de madeira e prática de revolvimentos durante 5 a 7 dias (Schwan; Whels, 2004; Leal Junior et al., 2008). Essa fermentação ocorre de forma espontânea na presença de vários microrganismos, os quais predominam leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas (Nielsen et al., 2007).

As leveduras constituem a população microbiana predominante nos primeiros dias de fermentação, em virtude de seu crescimento ser favorecido pela presença de ácidos orgânicos (principalmente, o ácido cítrico), riqueza em açúcares fermentáveis e baixo conteúdo de oxigênio da massa (Jespersen et al., 2005). Este grupo de microrganismos desempenha um papel importante na fermentação, promovendo condições favoráveis para o crescimento da microbiota atuante na fase posterior: bactérias lácticas e acéticas.

A diversidade de leveduras presentes na fermentação do cacau tem sido frequentemente associada às diferentes localidades de fermentação, bem como as condições do processo fermentativo (nutrientes disponíveis, pH, temperatura, oxigênio, entre outros). De fato, vários estudos revelam uma abundante diversidade de leveduras na fermentação de sementes de cacau em diferentes países. Estes microrganismos são bastante versáteis em termos de atividade metabólica, especialmente fisiológica (Bader et al., 2010). Por estas razões, isolar e identificá-las vem a ser de grande importância para avaliar a sua diversidade e distribuição durante a fermentação do cacau.

O cacau produzido na Amazônia brasileira se destaca em termos de alta qualidade do chocolate como produto final. O estado do Pará detém o título de segundo maior produtor nacional do fruto, com uma produção de 109.100 toneladas (t.) no ano de 2015. Fatores edafoclimáticos, como variedade do cacau, qualidade do solo, temperatura ambiente, são peculiaridades sugestivas de influência no produto final.

Pelo exposto e pela importância de conhecer a diversidade de leveduras iniciantes do processo fermentativo de cacau, este trabalho teve por objetivo estudar as características físico-químicas do cacau amazônico da região de Tomé-Açu (PA) e identificar as leveduras atuantes em sua fermentação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Fermentação

Frutos de cacau da variedade *Forastero* foram colhidos no mês de fevereiro de 2015 no município de Tomé-açu (localizado pelas coordenadas geográficas 02° 25' 08" Sul (latitude) e 48° 09' 08" Oeste (longitude)). Após 48h a colheita, os frutos foram abertos manualmente com auxílio de facas inox, tendo suas sementes com polpa separadas das cascas. Cerca de 90 kg de sementes de cacau foram divididos em três cochos de madeira (n=3) com dimensões de 1 m de comprimento x 0,40 m de largura x 0,30 m de altura, sendo recobertos por folha de bananeira e saco de aniagem para conservação da temperatura de fermentação.

Com o intuito de favorecer a oxigenação, propiciando assim a adaptação do meio à proliferação de bactérias acéticas, após 48h de início do processo, realizou-se revolvimentos nas sementes de cacau. A fermentação ocorreu durante seis dias (144h) na caixa de madeira e mais um dia em uma lona disposta no chão, totalizando sete dias de fermentação (168h). Após esse período, as amêndoas passam pelo processo de secagem natural.

### 2.2 Amostragem

Durante os tempos 0, 4, 8, 24, 32, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas de fermentação, foram medidas as temperaturas no cocho (na superfície, meio e fundo) em cinco pontos aleatórios a fim de uniformizar a temperatura em cada tempo. Em cada ponto de medição da temperatura foram coletadas alíquotas de sementes que totalizaram aproximadamente 200 g de amostra, sendo estas, armazenadas em sacos de polietileno estéreis e mantidos sob refrigeração (3±2 °C). A temperatura ambiente e a umidade relativa do ar (%) foram aferidas com termohigrômetro digital (Instruthemp®, mod. HT-600)

Ao final do processo fermentativo, as amostras foram encaminhadas (sob refrigeração) para o Laboratório de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos (LCTEA/UFGA), onde foram armazenadas sob congelamento ( $-18\pm 2$  °C) para análises físico-químicas e sob refrigeração ( $4\pm 2$  °C) para análises microbiológicas.

### 2.3 Análises físico-químicas

Após descongeladas, retirou-se a testa e o embrião das amêndoas de cacau e analisou-se os cotilédones previamente preparados em moinho de amostras (Ika®, mod. A11B). Segundo métodos preconizados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006), para amêndoas de cacau e seus derivados, foram realizadas as análises de acidez total titulável (31.06.06, AOAC), pH (970.21, AOAC), umidade (931.04, AOAC), cinzas (972.15, AOAC), lipídios (963.15, AOAC) e proteínas (970.22, AOAC). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.4 Obtenção das culturas de leveduras

Uma quantidade de 20 g de amostras de amêndoas foram homogeneizados assepticamente em 180 mL de água peptonada salina 0,1% (Himedia®) usando stomacher (Logen®, mod. LS1901N) por dois minutos em nível *high*, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . Logo, diluições decimais seriadas foram sendo obtidas até  $10^{-8}$ .

O plaqueamento foi realizado em profundidade em meio Ágar Batata Dextrose (Sigma®), acidificado com ácido tartárico 10% e suplementado com antimicrobiano cloranfenicol (Sigma®). As placas inoculadas foram incubadas invertidas em estufa microbiológica a 30 °C por 96h (Daniel et al., 2009). O resultado da contagem em placas foi expresso em UFC/g de amêndoa.

Após a incubação, colônias macroscopicamente típicas de leveduras e que se diferenciavam com relação à morfologia (aspecto, coloração e formato) foram repicadas pela técnica de esgotamento em placas de petri estéreis contendo Ágar Extrato de Malte (MEA) (Sigma®), acidificado com ácido tartárico 10% e incubadas a 30 °C por 72 horas (Daniel et al., 2009).

O processo de isolamento terminou com as colônias sendo repicadas em meio Ágar YEPD (Glicose 2% - Sigma®, Peptona 2% - Sigma®, Extrato de Levedura

– Himedia®, ágar bacteriológico 1,7% - Sigma®) suplementado com cloranfenicol (Sigma®), incubadas por 72 horas a 30 °C.

Para armazenamento e conservação das colônias purificadas, as mesmas foram repicadas para tubos *ependorf* contendo Caldo Extrato de Malte com glicerol a 15%, sendo estocadas sob congelamento.

### 2.5 Extração do DNA genômico das leveduras

Para extração e purificação do DNA genômico de leveduras, uma alçada de cada cepa foi transferida para erlenmeyer contendo 50 mL de caldo YEPD e incubado em agitador orbital (Lucadema®, mod. Luca-223) a 150 rpm, 30 °C por 12 horas.

Após, alíquotas foram transferidas para tubos *ependorf*, centrifugados a 4.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e prosseguiu-se as instruções do fabricante do kit de extração e purificação do DNA genômico (Axygen®, ref. AP-MN-MS-GDNA-50). O DNA extraído e purificado foi armazenado sob congelamento (-18 °C±2) para análises posteriores.

### 2.6 Identificação molecular e caracterização dos isolados

A análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) iniciou-se com o preparo das amostras de DNA extraído e purificados de cada cepa de levedura, sendo descongeladas e homogeneizadas em Thermo-Shaker (Agimaxx®), a 25 °C, 1000 rpm por 20 minutos.

Em seguida, 2 µl de DNA foram adicionados em 23 µl de solução contendo 11,4 µl de água milliQ, 5 µl de Q-solution (Qiagen®), 2,5 µl de solução Tampão 10x (Invitrogen®), 1 µl de dNTP mix (Bioron®), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen®), 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase (5U/µl, Invitrogen®), 0,5 µl de cada primer.

Os espaços internos transcritos (ITS 1 e ITS 2) juntamente com 5,8S das leveduras isoladas foram amplificados usando o par de *primer* ITS-1f (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' e *primer* ITS-4r (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Chang et al.,2001; Chen et al., 2001; Fugita et al., 2001).

Para realização das etapas de PCR, usou-se termociclador automático (Amplitherm®) programado para desnaturação inicial a 95 °C/5', 35 ciclos de 94 °C/1', 55,5 °C/2', 72 °C/2' (fases de desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente) e extensão final a 72 °C/10' (Chen et al., 2001; Fugita et al., 2001).

Os produtos da amplificação foram revelados por eletroforese em gel de agarose (Argagen®) 2% (p/v) sob tensão de 100 V, 90 miliamperes, por 60 minutos, tendo TBE 1x como tampão (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,5). Uma quantidade de 5 µL de produtos de cada amostra foram homogeneizados em 2 µL de solução reveladora (1 µL de Blue Buffer 6x, Invitrogen®: 1 µL de Blue Green Loading Dye, LGC®). Usou-se marcador de peso molecular (ladder) de 1 kb (Invitrogen®). A visualização do DNA foi realizada com o auxílio do Transluminador UV (UVP Bioimaging Systems®).

Os produtos da PCR foram purificados conforme protocolo do fabricante do kit de purificação Big Dye vs. 3. O processo foi realizado em sequenciador eletrônico (Applied Biosystems®, mod. 3730). As sequências foram geradas com o auxílio do *software* Geneious® (vs. R9) e identificadas no banco de dados virtual Blast® (GenBank).

### 2.7 Análise estatística

Para obtenção das médias e desvio-padrão dos resultados das temperaturas e das análises físico-químicas, usou-se o *software* Microsoft Office Excel® 2007. As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Estabeleceu-se a correlação linear e não-linear de pH e de ATT com a temperatura encontrada durante a fermentação, através da correlação linear de Pearson.

A análise de variância seguindo a comparação pelo teste de Tukey a 5% de significância e a correlação linear de Pearson, foram realizados com o auxílio do *software* Statistica 7.0® (STATSOFT INC., 2004).

### **3 RESULTADOS**

#### *3.1 Análises físico-químicas e contagem de leveduras*

Os resultados das análises físico-químicas e a contagem de leveduras presentes na fermentação estão expostos na Tabela 1.



**Tabela 1.** Temperatura de fermentação, análises físico-químicas\* e contagem de leveduras das amêndoas de cacau, Tomé-açu (PA), 2015.

Tempo (horas)	Temperatura de Fermentação (°C)	pH	Acidez Total Titulável (mEq NaOH/100 g)	Umidade <sup>1</sup> (%)	Cinzas <sup>2</sup> (%)	Lipídios <sup>2</sup> (%)	Proteínas <sup>2</sup> (%)	Contagem de Leveduras (UFC/g)
0	29,0±0,78 <sup>c</sup>	5,93±0,51 <sup>ab</sup>	11,54±1,76 <sup>d</sup>	39,42±0,88 <sup>a</sup>	2,43±0,07 <sup>a</sup>	48,31±0,99 <sup>a</sup>	12,92±0,33 <sup>a</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>
4	30,1±0,63 <sup>c</sup>	5,99±0,07 <sup>ab</sup>	12,59±3,34 <sup>d</sup>	-	-	-	-	2,8x10 <sup>7</sup>
8	31,5±0,85 <sup>bc</sup>	5,97±0,12 <sup>ab</sup>	13,34±2,03 <sup>cd</sup>	-	-	-	-	1,2x10 <sup>7</sup>
24	40,7±1,96 <sup>a</sup>	4,68±0,15 <sup>cd</sup>	41,62±4,47 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1,4x10 <sup>9</sup>
32	41,0±0,93 <sup>a</sup>	4,51±0,15 <sup>cd</sup>	46,60±5,74 <sup>ab</sup>	-	-	-	-	4,1x10 <sup>5</sup>
48	42,1±0,61 <sup>a</sup>	4,43±0,14 <sup>d</sup>	52,83±2,35 <sup>a</sup>	-	-	-	-	1,6x10 <sup>7</sup>
72	39,0±1,34 <sup>a</sup>	4,79±0,22 <sup>cd</sup>	38,60±1,65 <sup>b</sup>	-	-	-	-	5,5x10 <sup>9</sup>
96	34,3±1,52 <sup>b</sup>	5,45±0,36 <sup>bc</sup>	23,59±1,51 <sup>c</sup>	-	-	-	-	1,7x10 <sup>7</sup>
120	29,3±0,95 <sup>c</sup>	5,96±0,35 <sup>ab</sup>	15,89±1,87 <sup>cd</sup>	-	-	-	-	1,3x10 <sup>6</sup>
144	29,3±0,81 <sup>c</sup>	6,35±0,36 <sup>ab</sup>	13,84±1,21 <sup>cd</sup>	-	-	-	-	6,4x10 <sup>5</sup>
168	30,8±0,60 <sup>c</sup>	6,69±0,28 <sup>a</sup>	11,21±1,97 <sup>d</sup>	40,57±0,43 <sup>a</sup>	2,24±0,24 <sup>a</sup>	48,58±0,80 <sup>a</sup>	12,53±0,35 <sup>a</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>

\*Os valores representam a média de três repetições±desvio-padrão. Médias seguidas pela mesma letra em mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância ( $p>0,05$ ).

<sup>1</sup>: em base úmida; <sup>2</sup>: em base seca.

Observou-se a elevação da temperatura, especialmente após 24 horas (40,7 °C) até 72 horas. Como resultado da ação dos microrganismos verificou-se a elevação da acidez total até as primeiras 48 horas e redução contínua após o tempo de 72 horas de fermentação. Não foram observadas diferenças significativas nas análises de umidade, cinzas, proteínas e lipídios ( $p > 0,05$ ) entre os tempos zero e 168 horas de processo. A contagem máxima de leveduras foi observada durante as 72h após o início do processo fermentativo.

No tempo zero de fermentação a contagem de leveduras foi de  $1,6 \times 10^7$  UFC/g, após 24 horas houve um aumento significativo ( $1,4 \times 10^9$  UFC/g) da população até as 72 horas ( $5,5 \times 10^9$  UFC/g). Após as 96 horas verificou-se um decréscimo populacional das leveduras até o término da fermentação ( $1,5 \times 10^5$  UFC/g).

### *3.2 Correlação linear da acidez total e do pH com a temperatura*

Pela análise da correlação pelo teste de Pearson, foi verificada uma alta correlação linear positiva para ATT ( $r=0,98$ ) e negativa para o pH ( $r=-0,91$ ) com relação a temperatura de fermentação nos cochos. Os gráficos das Figuras 1 e 2 mostram o comportamento da ATT e de pH, respectivamente, de acordo com a temperatura de fermentação.

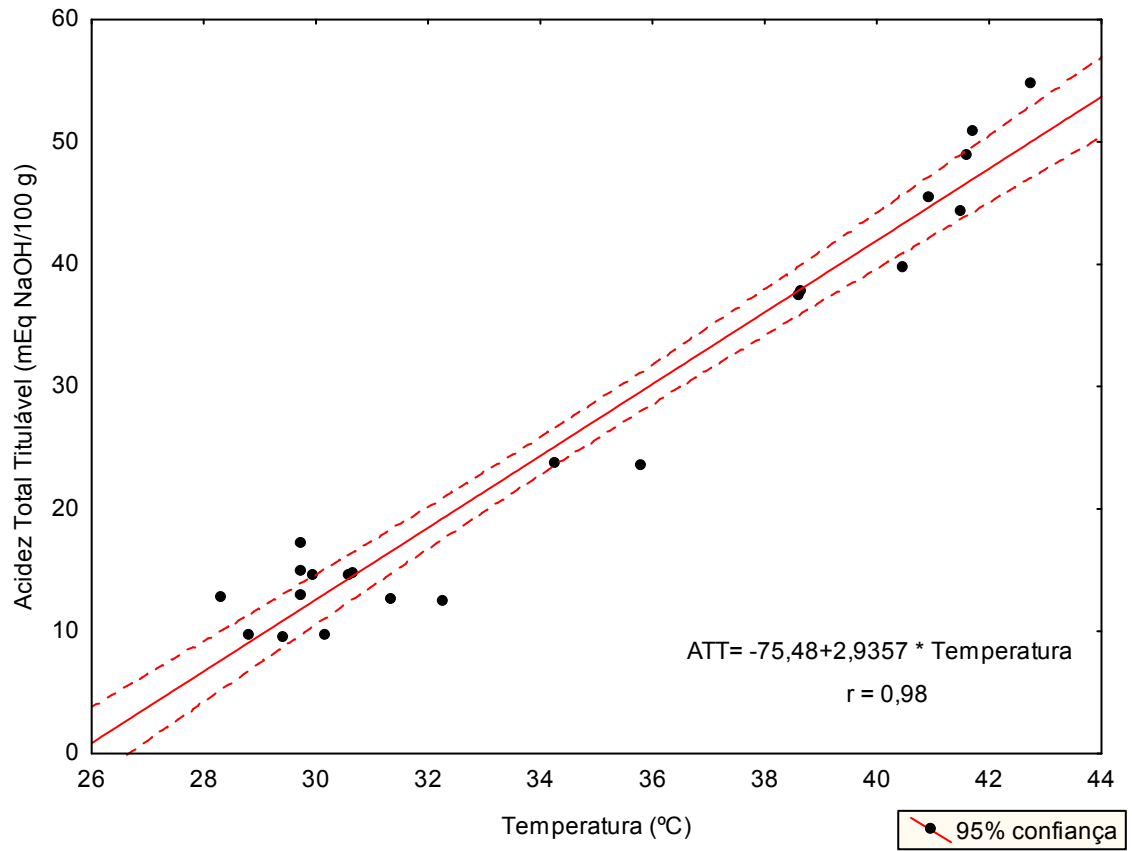
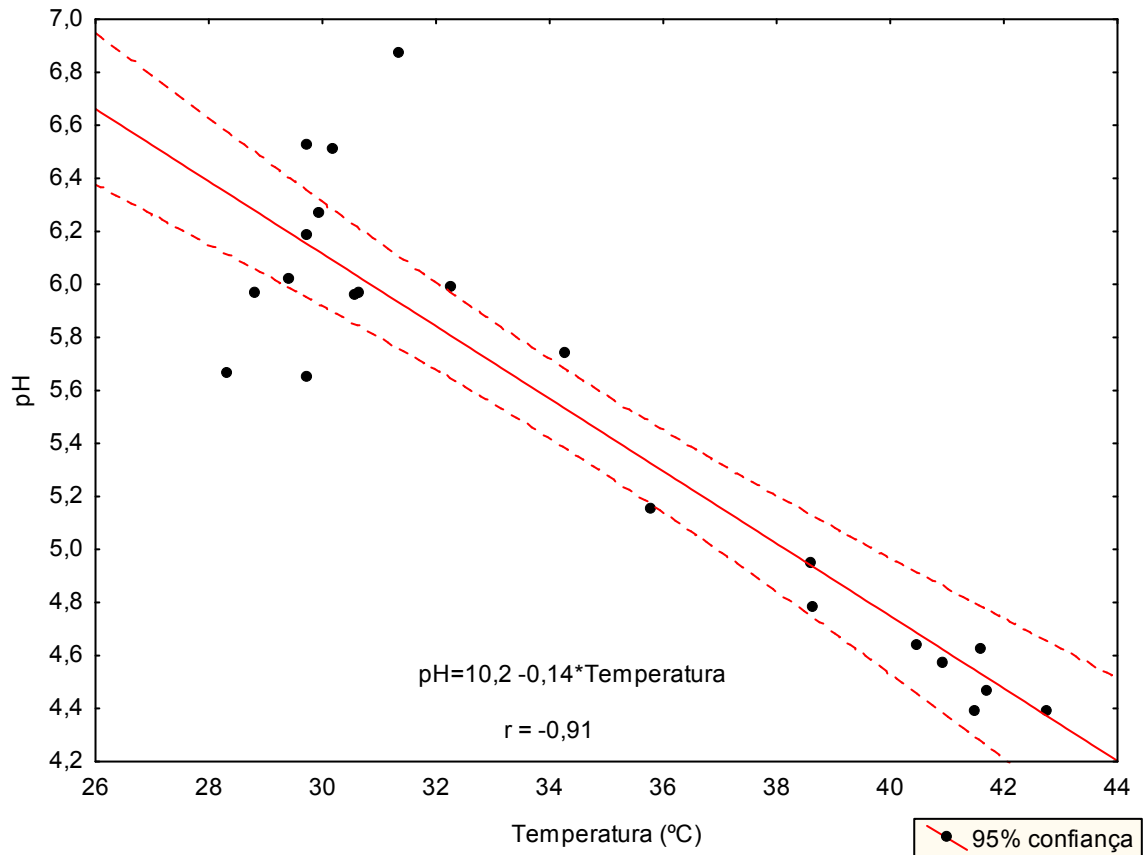


Figura 1. Correlação linear de Pearson entre ATT e a temperatura de fermentação.



**Figura 2.** Correlação linear de Pearson entre pH e a temperatura de fermentação.

### 3.3 Identificação dos isolados de leveduras

Cerca de 48 colônias de leveduras foram isoladas e purificadas neste estudo. Foram identificadas cinco espécies: *Trichosporon asahii*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia manshurica*, *Torulaspota delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo esta última a mais predominante durante a fermentação. A Tabela 2 mostra a distribuição em % das espécies encontradas.

**Tabela 2.** Distribuição das espécies encontradas durante a fermentação de amêndoas de cacau no município de Tomé-açu (PA), 2015.

Espécie	%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71,05%
<i>Trichosporon asahii</i>	10,52%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	7,90%
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	7,90%
<i>Pichia manshurica</i>	2,63%

## 4 DISCUSSÃO

A microbiota presente na fermentação de sementes de cacau vem sendo estudada ao longo dos anos em diversos países produtores de cacau, como Gana, Indonésia, Costa do Marfim, República Dominicana e no Brasil. Este estudo é de caráter inédito para a região da Amazônia brasileira, uma vez que ainda são escassos os dados microbianos durante esse processo na região.

Fatores como temperatura da fermentação alcançada durante o período do processo, localidades geográficas, época do ano, pH são fatores que são determinantes para a proliferação e sucessão microbiana efetiva na fermentação.

O aumento gradativo da temperatura da massa durante o processo fermentativo decorre da atividade microbiana. Durante as 48h primeiras horas de fermentação, há a atuação mais expressiva das leveduras transformando açúcares da polpa, ácido cítrico, entre outros componentes, em etanol promovendo assim uma elevação da temperatura da massa (reação exotérmica). Com o consumo do ácido cítrico inicialmente pelas leveduras, os valores de pH da polpa aumentam propiciando um meio favorável para a proliferação das bactérias lácticas e acéticas, alcançando temperaturas próximas de 45-50 °C (Camu et al., 2007; Papalexandratou et al., 2011).

Ao avaliar condições físico-químicas das sementes de cacau fermentadas em uma região da Costa do Marfim, Kouame et al., (2015) obtiveram temperaturas de fermentação similares com as deste estudo. Os autores encontraram temperatura inicial de 27 °C, chegando ao ápice com 41 °C após 36 horas. Houve uma manutenção da temperatura até o fim do processo (31 °C).

Durante o processo de fermentação de amêndoas de cacau em diversos países, pode-se verificar que os valores iniciais de pH são inferiores aos deste ensaio. Lagunes Gálvez et al., (2007) encontraram valores iniciais que variaram entre 4,5 e 4,0. Os estudos de Camu et al., (2007); Samagaci et al., (2014); Arana-Sánchez et al., (2015); Kouame et al., (2015) também reportam valores de pH iniciais inferiores aos deste estudo, o que pode ser sugerido que há peculiaridades que influenciam como variedade do cacau, solo, condições edafoclimáticas, etc.

A diminuição dos valores de pH observados neste ensaio entre os tempos de 4 e 48 horas de fermentação, é explicada pela difusão de ácidos produzidos por bactérias acéticas e lácticas durante o processo (Thompson et al., 2001; Afoakwa et al., 2008), por outro lado, a elevação do pH nos momentos finais do processo, decorre da evaporação de ácidos produzidos (principalmente o ácido acético) durante as 24 horas em que as amêndoas se encontravam dispostas no chão da propriedade para finalização do processo pelo produtor.

Ho; Zhao; Fleet (2014) analisaram fermentações de sementes de cacau provenientes de fazendas de Sydney, Austrália. Os pesquisadores fermentaram duas caixas de sementes de cacau: uma sem o antifúngico natamicina e outra com o antifúngico. Foram mensurados valores iniciais de pH de 3,8 a 4,0 em caixa sem natamicina e de 6,8 para as sementes que não entram em contato com o antifúngico permanecendo em 5,4 ao término da fermentação. Por ter sido realizada a adição de um antifúngico à caixa de fermentação, os pesquisadores justificam os altos valores de pH no momento inicial da fermentação, uma vez que as leveduras não se fizeram presentes no processo e conseqüentemente, não houve degradação dos açúcares da polpa do fruto e a ocorrência de todas as reações químicas necessárias nesta fase.

Para a fabricação de chocolates com menor acidez, a indústria seleciona amêndoas com ATT igual ou inferior a 15 mEq NaOH/100 g. O valor encontrado neste estudo ao término da fermentação (11,21 mEq NaOH/100 g) está abaixo do valor estabelecido, configurando assim, amêndoas bem fermentadas. Amêndoas de cacau com baixos teores de acidez são denominadas como cacau fino, e possuem maior valor no mercado (Lopez, 1984).

O pH das amêndoas deve estar entre 5,0 e 5,5 para permitir uma boa atividade das proteases, enzimas essenciais para a degradação das proteínas e formação de aminoácidos fundamentais para a formação do sabor característico do chocolate (Ho; Zhao; Fleet, 2014).

Estudos recentes sobre a qualidade das amêndoas após fermentadas apontam que para pH e ATT, os valores apropriados seriam de 5,60 a 6,57 e de

10,53 a 19,37 mEq NaOH/100 g, respectivamente (Araújo et al., 2014), configurando assim amêndoas bem fermentadas e com qualidades sensoriais de interesse para a indústria. As amêndoas deste estudo, segundo estes parâmetros estão adequadamente fermentadas, caracterizando um produto de baixa acidez.

A temperatura atingida na fermentação é um fator que influi diretamente na qualidade final das amêndoas, e diversas pesquisas consideram que temperaturas inferiores a 45 °C seriam prejudiciais para a ocorrência da morte do embrião e de algumas reações bioquímicas, tendo como consequência a formação incipiente de aroma e sabor de chocolate (Barel, 1997; Schwan; Wheals, 2004). Araújo et al., (2014) propõe a combinação de vários parâmetros químicos (teor de lipídios, acidez total, fenólicos totais, catequina e epicatequina, ácidos orgânicos e metais pesados) para a definição de um índice de qualidade para as amêndoas fermentadas de cacau. Esta pesquisa abrange um maior número de componentes de qualidade avaliados e reflete de forma mais completa a diversidade de sabor e aroma das amêndoas de cacau fermentadas, do que simplesmente a afirmação baseada na temperatura.

Com a análise estatística da correlação linear e não-linear de Pearson da temperatura de fermentação com ATT e pH, observou-se que essas duas variáveis se correlacionaram fortemente com a temperatura. ATT se correlacionou fortemente de forma positiva ( $r=0,98$ ) e o pH de forma fortemente negativa ( $r=-0,91$ ). Sugere-se que a temperatura alcançada durante a fermentação foi eficiente para proporcionar índices de acidez desejáveis para a qualidade final das amêndoas fermentadas.

O comportamento de leveduras neste estudo mostra crescimento durante as 72 primeiras horas do processo fermentativo e decréscimo até o final do processo. Autores relatam que leveduras atuam com mais frequência durante as primeiras 48h, pois nesse momento, as leveduras atuam metabolizando os açúcares da polpa e os transformando em etanol (Ardhana & Fleet, 2003, Schwan; Whells, 2004).

Curiosamente, observa-se um decréscimo acentuado da contagem populacional de leveduras nas 32h de fermentação, chegando a  $4,1 \times 10^5$  UFC/g e posterior crescimento na população de leveduras. Sugere-se que esse fato ocorreu

devido a quantidade de etanol produzida nas primeiras horas de fermentação, conseqüentemente, inibição da proliferação de outras espécies de leveduras durante o período. Após a adaptação da população de leveduras presente, sob as atuais condições do meio, houve a retomada de sua proliferação.

Ao isolarem leveduras durante a fermentação de amêndoas de cacau em Ilhéus (Bahia, Brasil), Papalexandratou et al, (2011) também encontraram elevado crescimento durante as primeiras 24h. As taxas foram de  $3,2 \times 10^5$  UFC/g no início do processo até o máximo de  $1,6 \times 10^7$  UFC/g. Ao término, a taxa reduziu-se para  $6,3 \times 10^2$  UFC/g.

Ho; Zhao; Fleet (2014) identificaram três espécies de leveduras que se proliferaram durante fermentações nos meses de março e outubro com intervalo de um ano. No estudo, *Hanseniaspora guilliermondii* proliferou após as 48h de fermentação. *Pichia kudriavzevii* e *Issatchenkia orientalis* proliferaram com taxas máximas ( $10^6$ - $10^7$  UFC/g) nas 72h e 96h de fermentação. Em suma, as leveduras tiveram seu ápice de crescimento nas primeiras 72h.

Lagunes Gálvez et al., (2007) ao fermentarem sementes de cacau na República Dominicana, encontraram valores de crescimento máximo de leveduras ( $1,5 \times 10^6$  UFC/g) nas primeiras 24h de fermentação. O mesmo ocorreu com o estudo de Ardhanan & Fleet (2003) na Indonésia ( $1,0 \times 10^7$  UFC/g). Em uma época em que as técnicas moleculares ainda eram muito recentes para a identificação de microrganismos em fermentação de cacau, os autores identificaram leveduras em nível de espécie por meio de testes bioquímicos. Foram identificadas leveduras dos gêneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* e *Yarrowia*.

Cinco espécies foram identificadas durante a fermentação. Relatos na literatura reportam quantidades superiores de identificação. Cerca de oito e dez espécies foram reportadas nos estudos de Crafacck et al., (2013) e de Handouche et al., (2015), respectivamente.

Espécies de leveduras presentes durante a fermentação de sementes de cacau são apontadas como responsáveis iniciais na produção de precursores de sabor e aroma de chocolate, dentre elas está a *Saccharomyces cerevisiae*,



amplamente identificada em fermentação em diversos países como Brasil, Gana, Indonésia e Malásia (Ardhanna; Fleet, 2003; Papalexandratou et al., 2013; Menezes et al., 2016; Visintin et al., 2016).

*Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie mais prevalente durante o processo (71,05%), permanecendo do início ao término. Esta espécie é encontrada na fermentação em diversos países, e em sua maioria é a que mais prevalece ao longo do processo fermentativo (Camu et al., 2007; Pereira et al., 2012; Lefeber et al., 2012; Arana-Sánchez et al., 2015). Estudos apontam que a presença desta espécie de levedura exerceu grande contribuição para o aprimoramento das características sensoriais em bebidas à base de cacau (Puerari; Magalhães; Schwan, 2012), reduzindo a concentração de ácido láctico, remove o peróxido de hidrogênio e favorece a produção de compostos para o crescimento de outras bactérias (Magalhães et al., 2010).

Em estudo recente, Maura et al., (2016) relatam que *S. cerevisiae* proliferou de forma mais proeminente quando a fermentação se iniciava no dia da colheita do fruto, diferentemente quando o processo se iniciava três dias após a colheita. Contudo, no presente ensaio, a fermentação iniciou-se 48h após a colheita do fruto de cacau, observado assim, a predominância de *S. cerevisiae*. Este ocorrido pode ser atribuído à importância do período pós-colheita para a liberação de açúcares naturalmente presentes na polpa do fruto que envolve a semente, com isso, servindo de substrato para a proliferação de leveduras.

De Melo Pereira et al, (2013) destacam que *S. cerevisiae* foi predominante em fermentações realizadas em tanque de aço inoxidável. Assim como ensaios de Lefeber et al, (2011). Ainda segundo De Melo Pereira et al, (2013), a fermentação realizada em tanques de aço inoxidável seria uma excelente alternativa para produtores que desejam ter um maior controle do processo fermentativo e assim ter a qualidade desejada do produto final. Ho; Zhao; Fleet (2014) não conseguiram explicar a razão da não presença de *S. cerevisiae* em pH em torno de 3,8 e 4,0.

Espécies de *Pichia kudriavzevii* e *P. manshurica* são relatadas em estudos sobre fermentação de sementes de cacau em países como Gana, México, Costa do

Marfim, Brasil. Meersman et al, (2013) mostram que leveduras do gênero *Pichia* foram encontradas em poucas quantidades, assim como neste estudo. Os autores explicam que leveduras pertencentes a este gênero, assim como as do gênero *Saccharomyces* são bastante adaptáveis ao meio em que se encontram e suportam grandes fatores de estresse a que são submetidas, como variações de pH e de temperatura.

Estas duas espécies de leveduras ainda não possuem registros na literatura em fermentações de sementes de cacau brasileiras e participam ativamente na produção de compostos essenciais para a formação de compostos aromáticos essenciais para chocolate. *P. kudriavzevii* possui alta capacidade de produção de compostos voláteis como alcoóis, aldeídos e ésteres, assim como a *P. manshurica*. Estudos apontam que esta última, possui a capacidade de proteção de reservas lipídicas dentro de estruturas celulares.

Leveduras das espécies *Pichia kudriavzevii*, *Pichia manshurica* e *Saccharomyces cerevisiae* foram as mais predominantes das dez espécies identificadas em fermentação realizada no Equador (Papalexandratou et al., 2011), onde o tempo de fermentação na maioria das vezes é de apenas 96h e a prática de revolvimentos periódicos é quase inexistente. Esses fatos podem prejudicar a sucessão microbiana e conseqüentemente não formação dos compostos precursores de aroma e sabor do chocolate.

Estudos sugerem que leveduras do gênero *Hanseniaspora spp.* e *S. cerevisiae* são favoráveis à formação de aroma e sabor do chocolate, uma vez que são altas produtoras de enzimas pectinolíticas e esta última, de etanol, contribuindo também para a inibição de microrganismos indesejáveis como bactérias putrefativas (Ramos et al., 2014; Menezes et al., 2016). Relatos da dominância dessas duas espécies já foram reportados por Pereira et al., (2012) e Ramos et al., (2014).

Leveduras do gênero *Kluyveromyces*, *Hanseniaspora* e *Pichia* são pouco produtoras de etanol (Ho; Zhao; Fleet, 2014). Comumente são encontradas em fermentações em localidades como Costa do Marfim (Handouche et al., 2015), Brasil (Pereira et al., 2012; Menezes et al., 2016) e Gana (Jespersen et al., 2005; Crafac

et al., 2013). Crafacck et al., (2013) reporta que após análise sensorial realizada em chocolates feitos com amêndoas de cacau fermentadas com inóculo contendo *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Lactobacillus fermentum* e *Acetobacter pastorianus*, os mesmos apresentaram alto índice de amargor e adstringência, enquanto os chocolates produzidos a partir de amêndoas fermentadas naturalmente foram melhores avaliadas nestes quesitos.

*Trichosporon asahii* mostrou-se presente na fermentação (10,52%) assim como no estudo de Nielsen et al., (2005). Jespersen et al., (2005) encontraram esta espécie de levedura sendo uma das mais dominantes durante a fermentação em Gana. Leveduras deste gênero pouco são relatadas durante o processo fermentativo de sementes de cacau e ainda não possuem um papel conhecido durante o processo. Assim como a maioria desses microrganismos, são facilmente encontradas na superfície de folhas e no solo, como no estudo de Stringini et al., (2008). Os relatos da presença desta espécie de levedura em fermentações realizados no Brasil ainda são ausentes na literatura.

## 5 CONCLUSÕES

Foi possível identificar cerca de cinco espécies de leveduras sendo que três ainda não foram relatadas durante a fermentação em localidades brasileiras. Essas três espécies são conhecidas na literatura por serem altas produtoras de compostos essenciais para a formação de compostos aromáticos formadores de sabor característicos de chocolate. Ensaio futuros são fundamentais para o conhecimento do papel que estas espécies exercem durante o processo de fermentação do cacau amazônico.

O estudo das linhagens da microbiota presente na fermentação amazônica pode ser de grande importância para um maior controle da qualidade da fermentação, e assim a possibilidade de obtenção de produtos a base de cacau com qualidade superior proporcionando a produção de chocolate e diversos outros produtos com características genuinamente paraenses.

## AGRADECIMENTOS

Os autores deste trabalho agradecem ao Instituto Tecnológico Vale (ITV) pelo suporte financeiro, Dr. Santelmo Vasconcelos e M.Sc. Mariana Costa pelo auxílio na etapa de purificação e sequenciamento dos produtos da PCR, ao Instituto Evandro Chagas (MS/IEC) pela disponibilização de material e infra-estrutura para a realização da PCR e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará (PPGCTA/UFGPA) pela disponibilização da infra-estrutura.

## REFERÊNCIAS

- Afoakwa, E.O.; Paterson, A.; Fowler, M.; Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 1-18.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 16 ed. Arlington, 2006.
- Arana-Sánchez, A., Segura-García, L. E., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E., & Gschaedler-Mathis, A. (2015). Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 359–369. <http://doi.org/10.1007/s11274-014-1788-8>
- Araujo, Q. R., Fernandes, C. A. F., Ribeiro, D. O., Efraim, P., Steinmacher, D., Lieberei, R., ... Araujo, T. G. (2014). Cocoa Quality Index - A proposal. *Food Control*, 46, 49–54. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.003>
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 87–99. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Bader, J. E.; Mast-gerlach, M. K.; Popović, R.; Stahl, U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. (2010). *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), p. 371-87.
- Barel, M. La fermentation du cacao: le moyen de l'apprécier et de la maîtriser. (1997) *Revue des Industries Alimentaires et Agricoles*, 14, 211-214.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., ... De Vuyst, L. (2007). 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*, 73(6), 1809–1824. <http://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>

Chang, H. C., Leaw, S. N., Huang, a Y. H., Wu, T. S. U. L. a N., & Chang, T. C. (2001). Rapid Identification of Yeasts in Positive Blood Cultures by a Multiplex PCR Method. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3466–3471. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3466>

Chen, Y. C., Eisner, J. D., Kattar, M. M., Rassoulian-barrett, S. L., Lafe, K., Bui, U., ... Sara, L. (2001). Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4042–4051. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4042>

Crafack, M., Mikkelsen, M. B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., ... Nielsen, D. S. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 103–116. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>

Daniel, H., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., & Vos, P. De. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x>

de Melo Pereira, G. V., Magalhães, K. T., de Almeida, E. G., da Silva Coelho, I., & Schwan, R. F. (2013). 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*, 161(2), 121–133. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.018>

Fernández Maura, Y., Balzarini, T., Clapé Borges, P., Evrard, P., De Vuyst, L., & Daniel, H.-M. (2016). The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 233, 34–43. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.012>

Fujita, S.; Senda, Y., Nakaguchi, S.; Hashimoto, T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. (2001) *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (10), 3617-3622.

Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K. B. D., Montet, D., & Meile, J. C. (2015). Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. *Food Control*, 48, 117–122. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.031>

Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>

Jespersen, L., Nielsen, D. S., Hønholt, S., & Jakobsen, M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5(4-5), 441–453. <http://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.11.002>

Kouame, L.M.; Goualié, B.G.; Adom, J.N.; Koua, G.; Ouattara, H.G.; Doue, G.; Niamke, S.L. (2015) Diversity of microbial strains involved in cocoa fermentations from Sud-comoé (Cote D'Ivoire) based on biochemical properties, *European Scientific Journal*, 11 (18), 69-85.

Lagunes Gálvez, S. KOUAME, L.M.; GOUALIE, B.G.; ADOM, J.N.; KOUA, G.; OUATTARA, H.G.; DOUE, G.; NIAMKE, S.L. (2015) Diversity of microbial strains involved in cocoa fermentations from Sud-comoé (Cote D'Ivoire) based on biochemical properties, *European Scientific Journal*, 11 (18), 69-85.

Leal Junior, G. A.; Gomes, L. H.; Efraim, P.; Tavares, F. C. A.; Figueira, A. (2008) Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes, *Yeast Research*, 8, 788-798.

Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28(3), 457–464. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.010>

Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30(2), 379–392. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.021>

Lopez, A.S. Limitação da “prova de corte” no controle de qualidade do cacau comercial. (1984), *Revista Theobroma*, 14, 199-207.

Magalhães, K. T., Pereira, M. A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J. A., ... Schwan, R. F. (2010). Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*, 101(22), 8843–8850. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.083>

Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P. J., Saels, V., Struyf, N., ... Verstrepen, K. J. (2013). Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PLoS ONE*, 8(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0081559>

Menezes, A. G. T., Batista, N. N., Ramos, C. L., de Andrade e Silva, A. R., Efraim, P., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2016). Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 81, 83–90. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.036>

Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., & Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22(4), 271–284. <http://doi.org/10.1002/yea.1207>

Papalexandratou, Z., Vrancken, G., de Bruyne, K., Vandamme, P., & de Vuyst, L. (2011). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(7), 1326–1338. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>

Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35(2), 73–85. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>

Pereira, G. V. de M., Miguel, M. G. da C. P., Ramos, Cí. L., & Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5395–5405. <http://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>

Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, 48(2), 634–640. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.005>

Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G. da C. P., & Schwan, R. F. (2014). 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*, 64, 908–918. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>

Samagaci, L., Ouattara, H. G., Goualié, B. G., & Niamke, S. L. (2014). Growth capacity of yeasts potential starter strains under cocoa fermentation stress conditions in Ivory Coast. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(10), 861–870. <http://doi.org/10.9755/ejfa.v26i10.18114>

Schwan, R.F.; Wheals, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. (2004) . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, p.1-17.

STATSOFT, INC. **STATISTICA (data analysis software system)**, versão 7.0 [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com), 2004.

Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., & Ciani, M. (2008). Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2), 184–189. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.017>

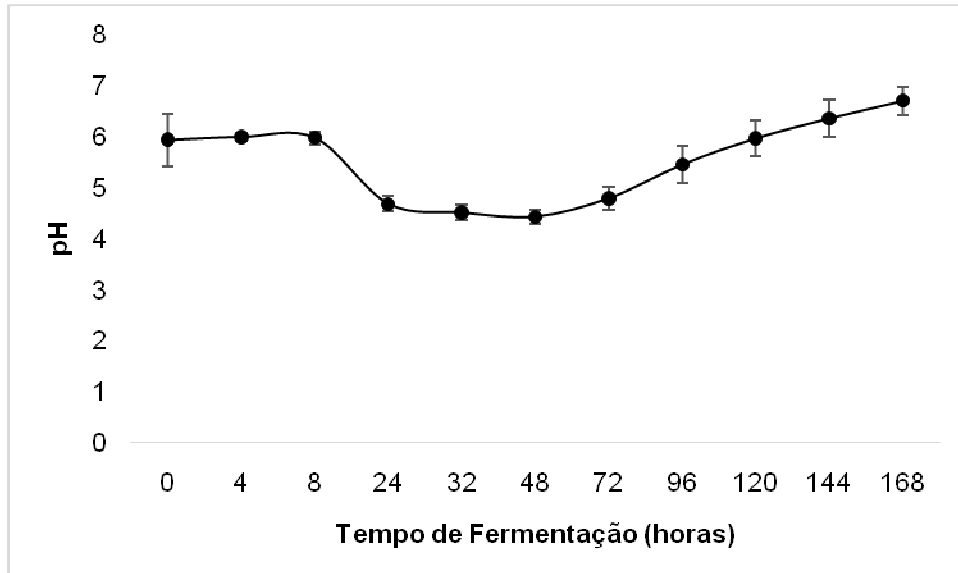
Thompson, S. S.; Miller, K. B.; Lopez, A. S. (2001) Cocoa and coffee. In M. P. Doyle, M. P. Beuchat, T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology, fundamentals and frontiers* Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 721-733.

Visintin, S., Alessandria, V., Valente, A., Dolci, P., & Cocolin, L. (2016). Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 69–78. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004>

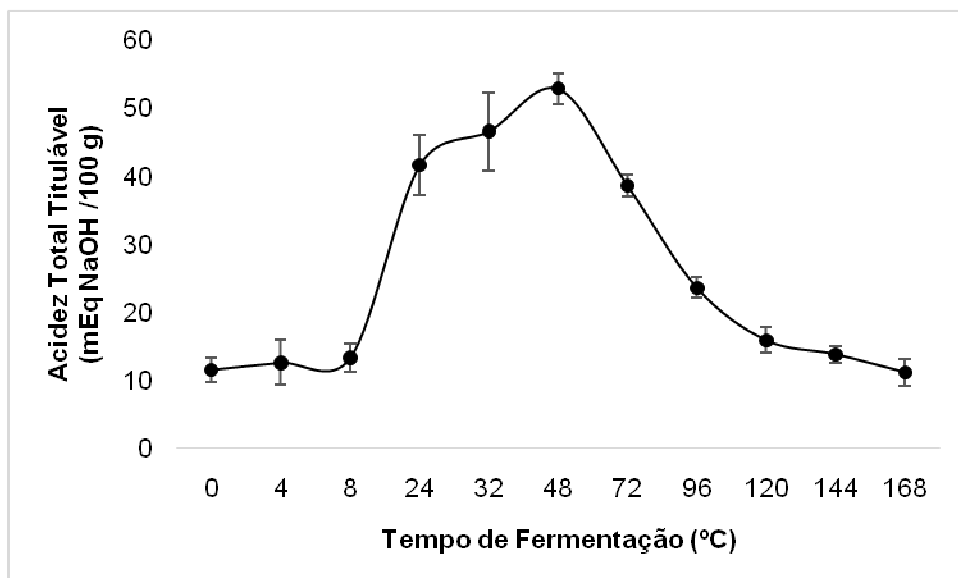
Yarrow, D. **Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts.** In: Kurtzman, C. P.; FELL, J. (eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publications. 77-101, 1998.



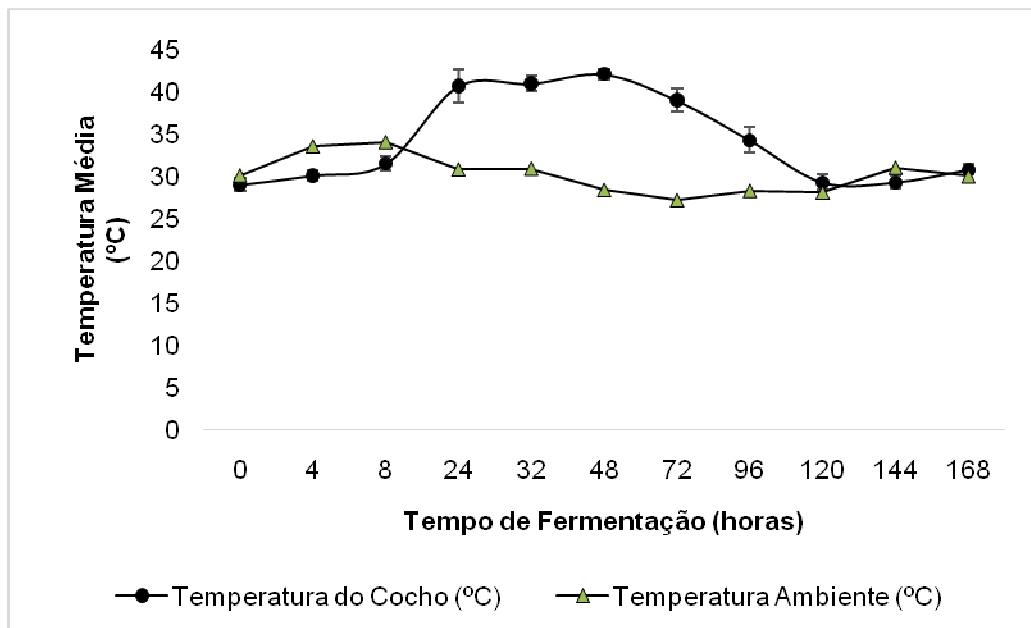
## MATERIAL SUPLEMENTAR



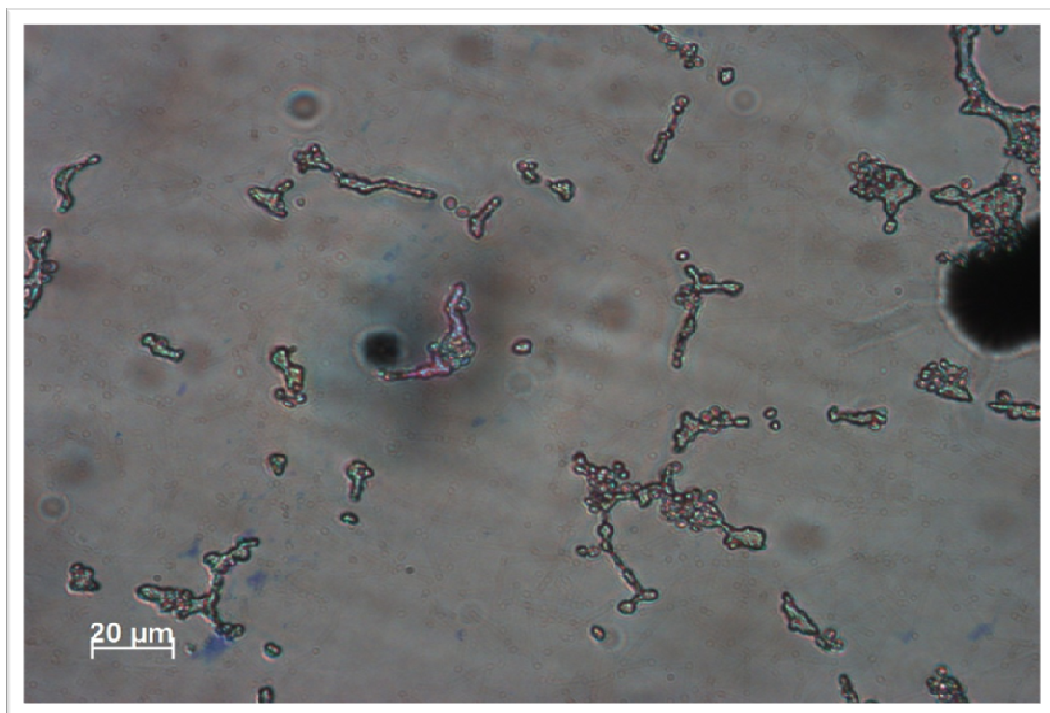
**Figura 1.** Comportamento do pH durante a fermentação de sementes de cacau, Tomé-açu (PA), 2015.



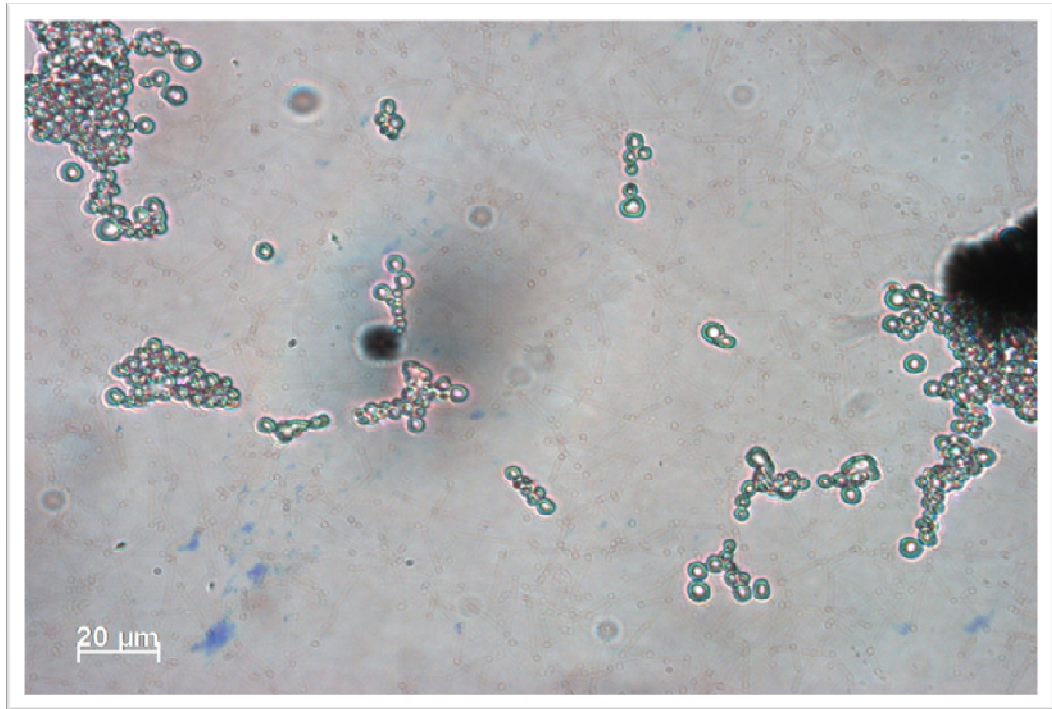
**Figura 2.** Comportamento da acidez total titulável (ATT) durante a fermentação de sementes de cacau, Tomé-açu (PA), 2015.



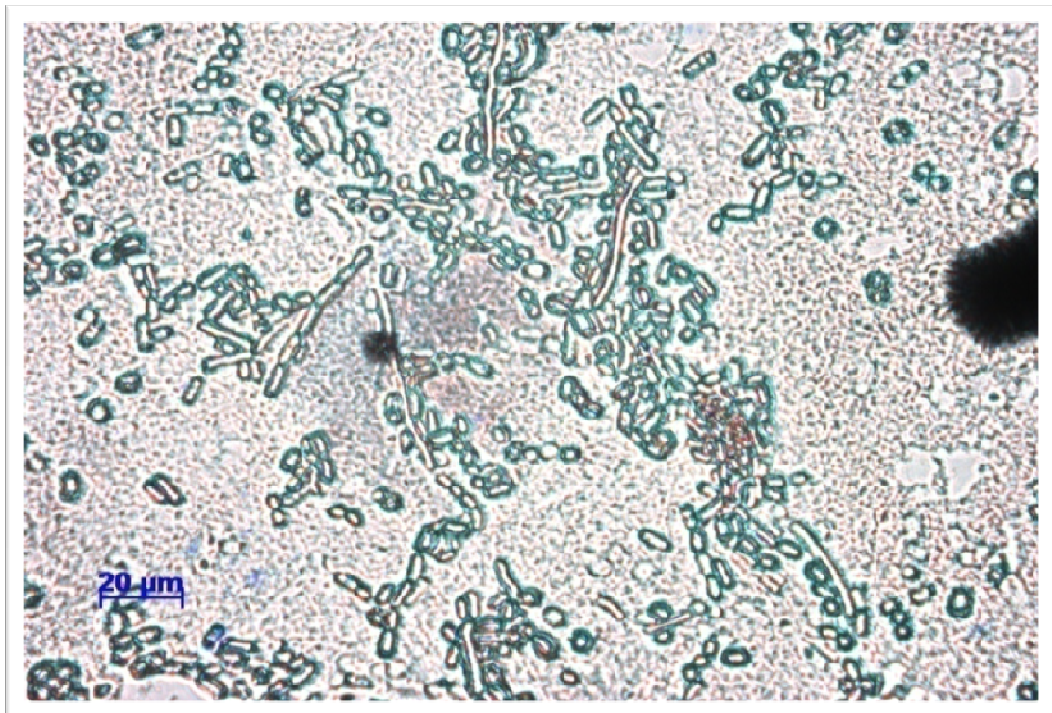
**Figura 3.** Comportamento da temperatura de fermentação e da temperatura ambiente durante a fermentação de sementes de cacau, Tomé-açu (PA), 2015.



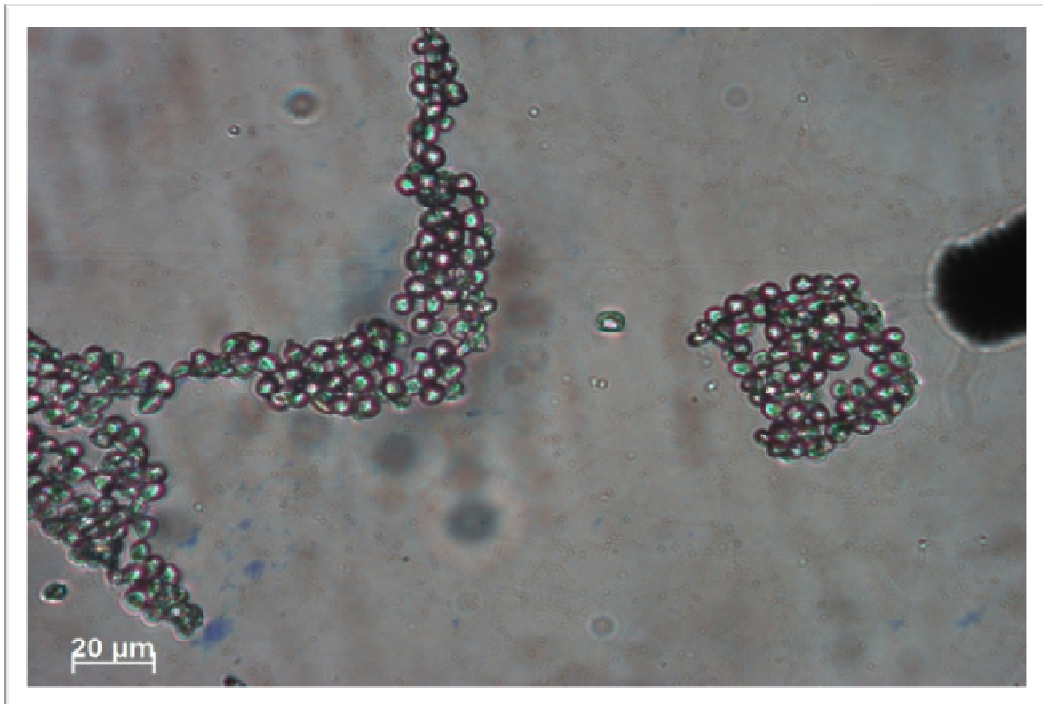
**Figura 4.** *Pichia manshurica* ao microscópio. Aumento de 500x.



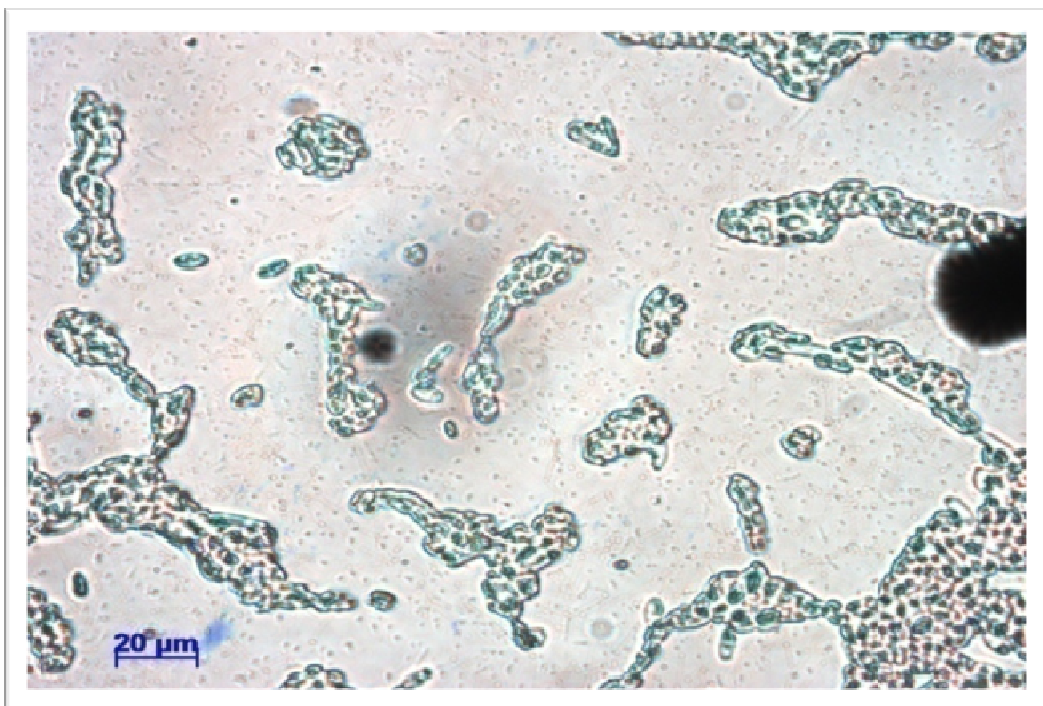
**Figura 5.** *Torulaspora delbrueckii* ao microscópio. Aumento de 500x.



**Figura 6.** *Trichosporon asahii* ao microscópio. Aumento de 500x.



**Figura 7.** *Saccharomyces cerevisiae* ao microscópio. Aumento de 500x.



**Figura 8.** *Pichia kudriavzevii* ao microscópio. Aumento de 500x.