

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E TECNOLOGIA  
CURSO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



**ADRIANE FERREIRA DE MIRANDA**

**Otimização do Beneficiamento das amêndoas de cacau  
Amazônico, da localidade de Icaruçaua, Município de  
Igarapé-Miri, Estado do Pará.**

**Belém  
2019**

**Adriane Ferreira de Miranda**

**Otimização do Beneficiamento das amêndoas de cacau Amazônico, da localidade de Icaruçaua, Município de Igarapé-Miri, Estado do Pará.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção de grau de Tecnólogo (a) de Alimentos, da Universidade do Estado do Pará.

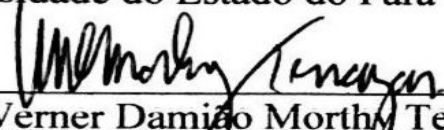
Orientador (a): Dra. Maricely Uría Toro

Data de aprovação: 29/10/2019

Banca examinadora:

 Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Maricely Janette Uría Toro  
Dr<sup>a</sup>. Química Analítica  
Universidade do Estado do Pará

 - Membro  
Prof. Werner Damiano Morthy Terrazas  
Dr. Em Alimentos e Nutrição  
Universidade do Estado do Pará

 - Membro  
Anaiza Bitencourt de Aragão  
Dr<sup>a</sup>. Em Alimentos e Nutrição  
Universidade Estadual Paulista UNESP

Belém  
2019

IDENTIFICAÇÃO BIBLIOTECA (verificar se é necessário)

,

Aos inúmeros esforços para me proporcionar senão, a melhor educação financiada com seu suor diário, sou, sigo e serei eternamente grata, logo, dedico a este incomensurável amor que sinto na forma do meu trabalho de conclusão de curso, também árduo, a quem abdicou do seu tempo livre, para me proporcionar a evolução social construtiva do meu ser, minha amável, mãe.

Adriane.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho não teria sido planejado e executado sem antes o amor imensurável e incentivo vindo por parte de todos os familiares que eu recebi nesses anos de UEPA, visto que nos tempos atuais os seres humanos respeitados e que detêm o mínimo de justiça que resta, são aqueles que detêm graus e títulos acadêmicos. Não tão pouco me esqueço das forças e ações naturalmente racionais que me rege, me guarda e me conduz meu mais sincero afeto e respeito. Agradeço a oportunidade que pouco são alcançados por milhares de seres humanos capazes, que é adentrar e conseguir a formação por uma instituição pública de ensino superior. Aos professores, técnicos, funcionários e alunos, pela educação e respeito repassados, o que me tornei é reflexo do que recebi, absorvi e transgredir durante esses muitos anos de academia.

À minha astuciosa e implacável orientadora e coordenadora do Laboratório de Química, Dra<sup>a</sup> Maricely Uría eu agradeço a confiança e também os “puxões de orelha”. Ao laboratório de Tecnologia e Microbiologia de Alimentos e seus respectivos coordenadores e técnicos, sou grata pelo amparo e auxílio.

Ao laboratório de Designer, em especial ao Sr Miguel, pela confecção do Fermentador Sustentável; e a Designer, Bianca Mendes quem colocou no papel a projeção para o Fermentador Sustentável e *Pallet*, meus agradecimentos.

Ao Prof<sup>o</sup> Cláudio Serra e a monitora Sofia Henriques, ambos do LEP, onde obtive orientação e organização dos meus dados analíticos estatísticos.

Ao Lacen-PA, o LAMICRO, do DAP, por proporcionar a realização das análises finais para o isolamento microscópico das células leveduriformes, isoladas do exsudado e sementes de cacau Amazônico.

Às famílias que me receberam na visita, para a análise e observação do Beneficiamento do cacau efetuada na localidade de Icaruçaua, entre os dias 11 a 18 de julho de 2017. O trabalho de conclusão de curso está inteiramente voltada para a valorização e a otimização da cadeia produtiva do cacau por eles requerida.

Os obstáculos? Incontáveis. Porém, o foco em efetuar os experimentos se sobrepôs às dificuldades. A ciência, a educação e o respeito constroem pessoas aptas a inserirem mudanças nos hábitos escusados da nossa decadente sociedade, então, que não sejamos apenas mais um títere, e sim os catalisadores biológicos na escalada por

uma sociedade racionalmente solidária e empática com nossos semelhantes e riquezas naturais, retribuindo com educação e respeito a quem quiser que seja.

Ao meu âmagô, que respondem por: Maria Izete e José Afonso; à minha tão pequena, saudosa, sobrinha, Adrya, filha de meu irmão, Andrey e aos demais amigos que me incentivam ao apreço pelos estudos, meus agradecimentos.

## RESUMO

DE MIRANDA, ADRIANE FERREIRA. **Otimização do Beneficiamento das amêndoas de cacau Amazônico, da localidade de Icaruçaua, Município de Igarapé-Miri, Estado do Pará.** 2019. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Universidade do Estado do Pará, Belém, 2019.

A América do Sul da qual o Brasil acompanhado de outros países fazem parte, é a região biogeográfica de elevado índice de Biodiversidade no planeta. Na região Amazônica, o nordeste paraense possui uma expressiva plantação do fruto de cacau (*Theobroma cacao L.*), o que o tornou objeto de estudo neste trabalho. A fermentação dos frutos é uma das etapas importante do beneficiamento da cultura de cacau por apresentar um ambiente propício à atividade e proliferação de fungos e enzimas que hidrolisam e oxidam a polpa do cacau, produto este extraído da parte comestível do fruto e que contém nutrientes necessários para dar início à atividade da fermentação, por isso, torna-se o cenário ideal ao desenvolvimento dos precursores que fornecem interações com as ligações entre substratos e compostos químicos que incidem no alcance sensorial, desenvolvendo força substancial propulsora do *flavor*. As leveduras são unicelulares que habitam em profusão nos *habitat* alimentos, onde há presença de substratos com pH ácido, carboidratos, lipídios, etc. Com isso o trabalho teve como objetivo a otimização do processo de Fermentação das amêndoas do cacau, utilizando Fermentador Sustentável; formulando o caldo alternativo para a multiplicação na biomassa da células *start* do coquetel final obtido com o processo da Fermentação inicial ( $f_1$ ) e *Pallet* para Secagem, com intuito de alcançar um processo otimizado do beneficiamento dos *Nibs*. Os resultados foram analisados com o programa de estatística R, para comparar os valores médios das análises físico-químicas e microbiológicas das amostras coletadas durante o monitoramento das etapas: Fermentação inicial ( $F_0$ ) e final ( $F_1$ ); Secagem inicial ( $s_0$ ) e final ( $s_1$ ); Torração a 170 °C; Temperatura °C, pH, ° Brix, Umidade (%), Cinzas (%), Proteínas (%), Lipídios (%), Microbiologia (UFC) desde a Fermentação *in loco*, *in Icaruçaua* ( $f_0$ ), ensaios sem ( $f_1$ ) e com inóculo *start* ( $f_3$ ) em fermentador sustentável. Os resultados encontrados foram a redução do tempo de fermentação de 7 para 5 dias, sustentado com aumento no pH 5,19 e declínio do °Brix no 5° dia, maior disponibilidade para Compostos Fenólicos 331,5 mg.AG. g<sup>-1</sup> e Atividade Antioxidante 148,5 µmol.Trolox.g o que permite concluir que a Otimização efetuada obteve *Nibs* com disponibilidade bioquímica melhores que o ensaio de Beneficiamento convencional.

**Palavra Chave:** Cacau. Biodiversidade. Fermentação.

## ABSTRACT

DE MIRANDA, ADRIANE FERREIRA. Optimization of the processing of Amazonian cocoa almonds, from Icaruçaua, Igarapé-Miri, State of Pará. 2019. Final Paper (Graduation in Food Technology) - State University of Pará, Belém, 2019.

South America, a region of which Brazil and other countries are part, is one of the biogeographic regions with the highest biodiversity index on the planet. The Amazon region, specifically the northeast of Pará, has a significant planting of cocoa (*Theobroma cacao* L.), which became the object of study in this work. Fruit fermentation is one of the important stages of cocoa cultivation because it provides a favorable environment for the activity and proliferation of fungi and enzymes that hydrolyze and oxidize cocoa pulp. oxidize cocoa pulp, which is extracted from the edible part of the fruit and contains nutrients needed to start fermentation activity, Therefore, it becomes the ideal setting for the development of precursors that provide interactions with the bonds between substrates and chemical compounds that affect sensory range, developing substantial flavor-driving force. Yeasts are unicellular organisms that inhabit the food habitats, where there are substrates with acidic pH, carbohydrates, lipids and etc. This work aimed to optimize the process of fermentation of cocoa beans using a Sustainable Fermenter by formulating alternative broth for multiplication in cell biomass start of the final cocktail obtained with the process of Initial Fermentation (f1) and Pallet for Drying, in order to achieve an optimized process of Nib processing. The results were analyzed with the R statistical program, to compare the average values of the physicochemical and microbiological analysis of the samples collected during monitoring of the steps: Initial (F0) and final (F1) fermentation; Initial (s0) and final (s1) drying; Roasting at 170 ° C; Temperature ° C, pH, ° Brix, Moisture (%), Ash (%), Protein (%), Lipids (%), Microbiology (CFU) from In-Place Fermentation, in Icaruçaua (f0), Assays without (f1) and with inoculum start (f3) in sustainable fermenter. The results were: reduction of fermentation time from 7 to 5 days, sustained with increase in pH 5.19 and decline of °Brix on day 5, greater availability for phenolic compounds 331.5 mg.AG. g-1 and Antioxidant Activity 148.5 µmol.Trolox.g which allows us to conclude that the Optimization performed obtained Nibs with better biochemical availability than the conventional Beneficiation assay.

Keyword: Cocoa. Biodiversity Fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Ilustração do Fruto do cacau.	20
<b>FIGURA 2</b>	Ilustração do fermentador sustentável para as sementes de cacau.	28
<b>FIGURA 3</b>	Amostragens em água peptonada tamponada (APT) estéreis, diluições $10^{-1}$ .	30
<b>FIGURA 4</b>	Placas contendo o crescimento do inóculo em ágar (DRBC)	31
<b>FIGURA 5</b>	Análise microscópica das células leveduriformes	31
<b>FIGURA 6</b>	Tubos de ensaio vedados com PARAFILM com cepas leveduriformes em ágar SABOURAUD	32
<b>FIGURA 7</b>	Tubos contendo as formulações dos Caldos alternativo F.M, F.G e F.MG com inóculo das células leveduriformes	33
<b>FIGURA 8</b>	Coquetel <i>start</i> Final	33
<b>FIGURA 9</b>	Fluxograma da Otimização do Beneficiamento do cacau Amazônico	34
<b>FIGURA 10</b>	Curva padrão de ácido gálico	41
<b>FIGURA 11</b>	Curva padrão de Trolox	42
<b>FIGURA 12</b>	Higiene	43
<b>FIGURA 13</b>	Luvas	43
<b>FIGURA 14</b>	Máscaras	43
<b>FIGURA 15</b>	Valores médios e desvios padrão para o peso dos frutos do cacau Amazônico	44
<b>FIGURA 16</b>	Valores médios da biometria dos frutos.	45
<b>FIGURA 17</b>	Valores médios da biometria das sementes.	45
<b>FIGURA 18</b>	Resultado para análise da Prova de Corte.	46
<b>FIGURA 19</b>	Valores médios e desvios padrão da temperatura de fermentação feita em fermentador sustentável ( $f_1$ ) e ( $f_3$ ).	50

<b>FIGURA 20</b>	Valores médios dos parâmetros Físico-Químicos (pH e SST*) no processo fermentativo em fermentador sustentável ( $f_1$ ) e ( $f_3$ ) . *Sólidos Solúveis Totais.	52
<b>FIGURA 21</b>	Teste qualitativo positivo para a presença das enzimas PO e PPO em exsudado do cacau.	57
<b>FIGURA 22</b>	Valores médios e desvio padrão para a temperatura das amêndoas secas <i>in loco</i> .	59
<b>FIGURA 23</b>	Valores medianos para os parâmetros físico-químicos (pH e lipídios) <i>in loco</i> .	59
<b>FIGURA 24</b>	Valores da perda de umidade das amêndoas <i>in loco</i> .	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Formulações dos caldos de enriquecimento para Leveduras	32
<b>Tabela 2</b>	Resultado da análise física: Prova de corte das amêndoas de cacau	46
<b>Tabela 3</b>	Caracterização Físico-Química do Exsudado do cacau para todos os ensaios	49
<b>Tabela 4</b>	Caracterização Centesimal da Massa 100 % cacau obtido <i>in loco</i> e do <i>Nibs</i> cominuídos em <i>Sire Cutter</i>	54
<b>Tabela 5</b>	Análise Quantitativa das Enzimas Polifenoloxidase (PPO), Peroxidase (PO) e Pectina-Metilesterase (PME) durante o ensaio da Fermentação ( <i>fi</i> )	57
<b>Tabela 6</b>	Caracterização das amêndoas dispostas em <i>Pallet</i> na Secagem <i>in loco</i>	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>ABTS</b>	Radical 2,2' - azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
<b>Af</b>	Amêndoas fermentadas durante os 7 (sete) dias de Fermentação
<b>AP</b>	Água Peptonada
<b>APT</b>	Água Peptonada Tamponada
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabricação
<b>° Brix</b>	Sólidos solúveis
<b>° C</b>	Grau Celsius
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CEP</b>	Controle Estatístico do Processo
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CCNT</b>	Centro de Ciências Naturais e Tecnologia
<b>CF</b>	Compostos Fenólicos
<b>DAP</b>	Divisão de Análise e Produtos
<b>DBO</b>	Demanda Bioquímica de Oxigênio
<b>DRBC</b>	Ágar <i>Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol</i>
<b>f<sub>0</sub></b>	Fermentação <i>in loco</i>
<b>f<sub>1</sub></b>	Fermentação em Fermentador sustentável
<b>f<sub>3</sub></b>	Fermentação com inóculo <i>start</i>
<b>Fc</b>	Fator de correção
<b>F.S</b>	Fermentador Sustentável
<b>g</b>	grama
<b>h</b>	Hora

<b>HMF</b>	<i>Hidroximetilfurfural</i>
<b>H<sub>1</sub></b>	Hidrogênio molecular
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>LEP</b>	Laboratório de Engenharia de Produção
<b>Lacen</b>	Laboratório Central
<b>LAMICRO</b>	Laboratório de Microbiologia
<b>mL</b>	Militro
<b>min</b>	minutos
<b>M</b>	Molaridade
<b>N</b>	Normalidade
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Sódio Monobásico Anidro
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Sódio Fosfato
<b>nm</b>	nanômetro
<b>NMP</b>	número mais provável
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio

<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>OH</b>	Hidroxila
<b>P</b>	Peso
<b>PE</b>	Pectinesterase
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PO</b>	Peroxidase
<b>PPO</b>	Polifenoloxidase
<b>PM</b>	Pectinametilnesterase
<b>RDC</b>	Regime Diferenciado de Contratações Públicas
<b>T<sub>s0</sub> T<sub>sf</sub></b>	Temperatura da Secagem inicial e final
<b>T<sub>0</sub> T<sub>f</sub></b>	Temperatura inicial e final da Fermentação
<b>UEPA</b>	Universidade do Estado do Pará
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>V</b>	Volume

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	19
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
3.1	<i>Theobroma cacao</i> L	20
3.2	Fermentação Inicial	21
3.3	Reação de <i>Maillard</i>	22
3.4	Enzimas	23
3.4	Ação das leveduras	25
3.5	Secagem	27
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
4.1	PROCEDÊNCIA DOS FRUTOS	27
4.2	SECAGEM NATURAL EM <i>PALLET</i>	27
4.3	ENSAIO DA FERMENTAÇÃO EM FERMENTADOR SUSTENTÁVEL - ( <i>f<sub>i</sub></i> )	29
4.3.1	Coleta amostral no processo de Fermentação	29
4.3.2	Caracterização Física	30
4.3.2.1	Biometria dos frutos e sementes de Cacau	
4.3.2.2	Avaliação da Qualidade das amêndoas	
4.4	<b>METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DA CULTURA <i>START</i></b>	29
4.4.1	Crescimento, Separação e Isolamento de Células <i>Leveduriformes</i>	30
4.4.1.1	Pré-Tratamento das amostras	30
4.4.1.2	Plaqueamento para o crescimento das células leveduriformes	32
4.4.1.3	Caracterização morfológica - microscópica e coloração de Gram	31
4.4.1.4	Técnica de Microcultivo	31

4.4.1.5	<b>Caldo alternativo para Leveduras</b>	33
4.4.2	<b>Fermentação com indução do coquetel <i>start</i> - (<math>f_3</math>)</b>	33
4.4.3	Secagem Artificial	33
4.4.4	Torrção	33
4.5	<b>AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS E ANÁLISE BIOQUÍMICA DO <i>NIBS</i></b>	35
4.5.1	Avaliação da temperatura no beneficiamento do cacau	40
4.5.2	Determinação do pH	40
4.5.3	Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	41
4.5.4	Determinação de Umidade	42
4.5.5	Lipídios Totais	43
4.5.6	Cinzas Totais	44
4.5.7	Proteínas Totais	45
4.6	<b>ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PECTINA-METILESTERASE</b>	45
4.6.1	Preparo do Extrato Enzimático	49
4.6.2	Atividade da Pectina-Metilesterase (PME)	49
4.7	<b>ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA POLIFENOLOXIDASE E PEROXIDASE</b>	49
4.7.1	Preparo do Extrato	51
4.7.3	Atividade Enzimática da Polifenoloxidase (PPO)	53
4.7.4	Cálculo para atividade enzimática	53
4.8	<b>DETERMINAÇÃO DE HMF (<i>Hidroximetilfurfural</i>)</b>	59
4.8.1	Extração do HMF	62
4.9	<b>DETERMINAÇÃO FENÓLICOS TOTAIS</b>	62
4.10	<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b>	64
4.1.1	Obtenção do extrato	65

4.11	CONTROLE E QUALIDADE DOS FRUTOS DE CACAU	67
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	67
5.1	Biometria dos Frutos e Sementes	70
5.2	Prova de Corte	71
5.3	Obtenção do inóculo das leveduras	
5.4	Otimização do beneficiamento das sementes de cacau	
5.5	Fermentação sem inóculo ( $f_1$ ) e com inóculo ( $f_3$ )	
5.6	Perfil da Umidade das amêndoas na Fermentação	
5.7	Atividade enzimática na Fermentação do cacau	
5.8	Monitoramento da temperatura em função do tempo de Secagem	
<b>6.</b>	Natural em <i>Pallet</i>	
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

“A produção de cacau do Pará é de 132 mil t/ano e atualmente é o maior produtor do Brasil”, (Governo do Estado do Pará, 2019). O consumo do cacau oscila de acordo com os de costumes de cada região de origem, sendo consumido *in natura* ou na forma de subprodutos como chocolate, achocolatado, chocolate em pó, licor fino, bebida fermentada e calda a base do chocolate. Estes derivados do cacau também são muito consumidos em produtos de confeitaria por serem utilizados como matérias primas na elaboração de bolos, sorvetes, *mousses* e etc. (OLIVEIRA, 2015).

O sabor do chocolate não existe naturalmente nas sementes de cacau, consumido universalmente por conter aspecto sensorial exclusivo, pelos quais as sementes tornam-se amêndoas de cacau ao serem submetidas a uma série de reações químicas, que iniciam desde o tratamento pós-colheita do fruto até a obtenção do produto, como a seleção de frutos aptos a serem submetidos a Fermentação; Secagem, Torração e demais processos envolvidos na fabricação dos diversos produtos derivados do cacau (SANTOS, 2012; MARTINHO et al., 2012; GARCÍA e MORETA, 2013).

O desenvolvimento do *flavor* do produto final é influenciado pela constituição genética das sementes, aplicação de ótimo e seguro tratamento nas etapas do Beneficiamento (DEUS, 2015; RAMÔA JÚNIOR, 2011; BRITO, 2013), por conter nutrientes múltiplos tais como água, pectina, açúcares, amido, lipídios, proteínas, sais inorgânicos, compostos bioativos tais qual a teobromina, cafeína, triptofano, taninos, antocianinas, segundo “SANTOS, (2013); INSTITUTO ADOLFO LUTZ, (1976); OLIVEIRA, (2015); LEITE, (2012)”.

Dos efeitos benéficos que o chocolate propícia à saúde, temos uma potente atividade antioxidante que atua na prevenção de reações oxidativas e de formação de radicais livres, bem como na proteção contra danos ao DNA das células, causadores de toxidade hepática, dependendo da dose e do tipo de nutriente ingerido, são inibidores da transcriptase reversa em HIV, podem agir como anti-inflamatórios e cicatrizantes, são compostos facilmente oxidáveis por enzimas ou por metais, como cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) o que ocasiona o escurecimento das amêndoas, possuem pectina que contém fibras solúveis inibidoras, destacando-se como agentes anticarcinogênicos (PETRILLI, 2015; EFRAIM et al., 2006; ALVES et al., 2010; CARPER, 1995).

As etapas de Fermentação e Secagem estão inclusas na sequência de operações relacionadas ao processo de Beneficiamento das sementes de cacau e que em conjunto, corroboram para a elevação da qualidade final das amêndoas e do produto final, uma

vez que seja de vital importância, pois atuam como a principal matéria prima na elaboração de uma variedade de produtos derivados do cacau, e que nenhum outro processamento posterior é capaz de corrigir falhas nestas etapas iniciais de Beneficiamento (BRITO, 2013; ENGELHARDT, 2016).

As práticas agrícolas em conjunto com as técnicas dos produtores tradicionais, a localização geográfica, o sistema de Fermentação e o grau de maturação dos frutos são os fatores que incidem diretamente no ótimo desenvolvimento do ambiente que propicia o desenvolvimento das leveduras, estas que são as responsáveis por iniciar o processo de degradação da polpa que circunda as sementes de cacau durante a Fermentação (SERRA et al., 2016; DE ALMEIDA, 2013; SANTOS, 2013).

Portanto, foi proposto neste trabalho a inserção de um Fermentador Sustentável; Coquetel *start* obtido no processo da Fermentação inicial ( $f_1$ ) e *Pallet* para Secagem, objetivando o melhoramento e a padronização do processo fermentativo para obtenção de uma matéria prima final de qualidade, exacerbada, e uma alternativa acessível para o Beneficiamento do cacau, corroborando para agregação de valor da cadeia produtiva do cacau na região Amazônica Paraense.

## 2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo a otimização do processo de Fermentação das amêndoas do cacau, utilizando Fermentador Sustentável; coquetel *start* obtido no processo da Fermentação inicial ( $f_1$ ) e *Pallet* para Secagem.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A construção de um fermentador;
- Seleção de células leveduriformes *starts* associadas à fermentação das amêndoas (cultura pura), multiplicada em caldo nutritivo alternativo e inocular no processo para a Otimização da Fermentação;
- Controle da temperatura, pH e sólidos solúveis totais durante o processo fermentativo;
- Determinação do teor de Compostos Fenólicos Totais, *Hidroximetilfurfural* (HMF) e atividade antioxidante;
- Determinação da atividade enzimática (Polifenoloxidase, Peroxidase e Pectina-Metilesterase) durante o processo fermentativo.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Theobroma cacao* L.

“O Brasil exporta cacau em amêndoas desde 1961. Em 2012, o país exportou US\$ 250,3 milhões em cacau e 53,5 mil toneladas”, (MDIC, 2013). O que faz deste fruto um alimento de exacerbada excelência, ao que se remete a potencial econômico para a Amazônia Paraense.

“O termo *Theo* (Deus) *broma* (alimento) advém da lenda asteca que se refere ao fruto como um alimento dos deuses”, (OETTERER et al., 2006). “Pertencente à família *Sterculiaceae*, árvore de cultura perene, nativa das matas equatoriais da região Amazônica, América do Sul e Central” (CRUZ, 2012; SANTOS, 2010; DEUS, 2015; PEREIRA, 2013). Os frutos de cacau fornecem a matéria prima para a elaboração do chocolate, produto altamente energético e mundialmente consumido (LEITE, 2012; CAVALCANTE, 2010; MAKI, 2006) o que faz deste fruto um dos mais ricos, dentre as inúmeras riquezas naturais da Amazônia...

O cacau firma-se como um alimento apreciado por sua singularidade de aspecto sensorial e nutricional benéfica ao metabolismo humano, sendo sua composição de pericarpo (casca) e polpa carnososa (Figura 1), com variação na forma, tamanho e cor. Os frutos da região Amazônica são caracterizados por serem angulosos e elipsóides, com a testa recoberta por uma quantidade menor de polpa comparado às sementes, sendo esta de coloração branca, adocicada e levemente acidificada (OETTERER, 2006; CAVALCANTE, 2010).



**FIGURA 1** – Ilustração do Fruto do cacau.

Fonte - Autor, 2019.

A composição nutricional do fruto indefere de acordo com o tipo genético do

cacaueiro, condições climáticas, estação da colheita, integridade dos frutos, grau de maturação e eficiência do processo de Beneficiamento das amêndoas (LLERENA, 2016; SANTOS, 2010).

### 3.2 Fermentação do cacau

A Fermentação é um processo metabólico exotérmico onde há produção de energia na forma de calor, devido à complexas reações que culmina na morte do embrião, com isso os compostos fenólicos entram em contato com as enzimas polifenoloxidase e glicosidase presentes das sementes, ocasionando reação de oxidação, complexação com proteínas e formação de pigmentos, como as quinonas (DIAZ, 2016).

O processo fermentativo é antigo e tradicionalmente aplicado para produzir, conservar e/ou modificar o *flavor* desagradável, adstringente e amargo das amêndoas, característico da transformação tecnológica do cacau em chocolate e dos diversos outros produtos análogos do cacau (AMORIM, 2005; PRADO, 2007; SANTOS, 2010; SERRA et al., 2016). A matéria orgânica exposta ao processo é um sistema de moléculas complexas, mas são sintetizadas a outras moléculas mais simples, devido à ação incessante de certos microrganismos denominados fermentos, estando intrínseco ao alimento *in natura* (NELSON e COX 2014; ALMEIDA et al., 2011).

A degradação dos carboidratos que circunda a polpa mucilaginosa, inicialmente ocorre em anaerobiose, com a conversão da glicose em outros compostos orgânicos, expelindo subprodutos como álcool e CO<sub>2</sub>, pela ação incessante de microrganismos como leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas (DIAZ, 2016; LLERENA, 2016; RAMÔA JÚNIOR, 2011), acarretando inúmeras transformações bioquímicas, com o propósito de obtenção de energia na forma de ATP.

Entre os parâmetros que compõem e contribuem para o processo fermentativo está a temperatura, a acidez em que se encontram as sementes, o intervalo de tempo que desencadeia todo o processo e principalmente a capacidade de degradação das leveduras, juntamente com a microflora que constitui o ambiente em que o fruto é submetido (CRUZ, 2012). O ambiente que favorece a Fermentação está relacionado à presença de substratos formados pela contaminação com microrganismos endofíticos (MAKI, 2006), contaminantes naturais da planta e fungos não causadores de danos ao hospedeiro (*Colletotrichum spp*). Algumas espécies de microrganismos crescem e se proliferam, outras são mortas por conta da disputa por nutrientes, das condições

ambientais do sistema o qual estão dispostas, do tipo de Fermentação, e outros fatores como pH, temperatura, carboidratos, aeração, etc (MIGLIARI, 2001).

O Beneficiamento das sementes é responsável pela redução significativa dos polifenóis solúveis, presentes na semente de cacau fresca, concomitantemente a redução na adstringência, visto que inúmeros e distintos compostos voláteis e não voláteis, tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos carboxílicos, pirazinas e açúcares são produzidos em decorrência da atividade microbiana durante a Fermentação do cacau (DEUS, 2015; EFRAIM et al., 2010).

### 3.3 Reação de *Maillard*

Durante todo o processo de Beneficiamento das sementes, acontecem reações desejáveis para que ao final, as amêndoas desenvolvam o *flavor* convencional e peculiar do chocolate. Nas últimas etapas do processo estão a secagem e a torração, aonde ocorre a reação de *Maillard* desencadeada pelas altas temperaturas. A reação de *Maillard* é uma reação química de escurecimento não enzimático que envolvem várias etapas, e que tem início com a reação do amino grupo de aminoácidos, peptídeos ou proteínas com o grupo hidroxila envolvido na ligação glicosídica de açúcares redutores como glicose, maltose e lactose, e termina com a formação de pigmentos marrons chamados de melanoidinas. As melanoidinas são polímeros nitrogenados marrons de baixo peso molecular responsáveis pelo gosto, cor e aroma dos alimentos (NESPOLO et al., 2015).

A despigmentação das amêndoas do cacau é provocado pela reação e interação do grupo amina com açúcar redutor (aldeído), um monossacarídeo, via condensação do grupo carbonila com a amina (ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio do grupo amina); seguida da eliminação de água e formação da glicosilamina. Para que esta reação aconteça deve existir condições apropriadas e sua velocidade depende de diversos fatores, como temperatura ( $> 40^{\circ} \text{C}$ ), atividade de água ( $a_w$ ), pH do meio (na faixa de 6 a 8), umidade relativa (30 a 70 %), açúcar redutor, quantidade de oxigênio, presença de metais, fosfatos e dióxido de enxofre, (RIPPER, 2015; NESPOLO et al., 2015; SILVA et al., 2014).

De acordo com Nespolo et al. (2015) a reação de *Maillard* envolvem várias etapas: 1) As etapas iniciais são de condensação, envolvendo a formação de glicosilamina (base de Schiff) e, a seguir de cetosamina (quando o açúcar é uma aldose) pelo rearranjo de Amadori ou aldossamina (quando o açúcar é uma cetose) pelo rearranjo

de Heyns.

2) As etapas intermediárias são de desidratação e degradação do amino-açúcar responsável pela enolização, com formação de vários compostos  $\alpha$ -dicarbonílicos (Degradação de Strecker) responsáveis pelo *flavor* característico dos alimentos.

3) Nas etapas finais os compostos formados nas etapas anteriores sofrem condensação e polimerização, com a produção de melanoidinas e outros compostos de baixo peso molecular como hidroximetilfurfural, maltol, piridinas e furanos, responsáveis pelas características sensoriais como cor, sabor e aroma (FENNEMA et al., 2010).

A reação de *Maillard* poderá ser desejável como no caso do pão, café, amêndoas onde produz a cor e o sabor característicos do produto; ou prejudicial, quando estas características são alteradas ou ocorrem perdas de proteínas utilizáveis pelo homem, devido ao aumento do consumo de alimentos industrializados que, em geral, sofreram processamento térmico (SHIBAO E BASTOS, 2011).

### 3.4 Enzimas

As enzimas são moléculas de proteínas produzidas por vegetais e microrganismos, possuem alta massa molecular uma vez que catalisam reações em sistemas biológicos, aumentando a velocidade de uma reação química, estão associadas a biomoléculas por conter elevado poder catalítico, atuando também como reagentes altamente especializadas, ou seja, participam da digestão, respiração, metabolismo e manutenção dos tecidos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011; LIMA, 2001).

Dentre as aplicações industriais, envolvendo as enzimas, estas podem ser utilizadas na otimização de processos fermentativos, na modificação de alimentos e em outros processos industriais, possibilitando a obtenção de produtos com diferentes características físico-químicas e sensoriais LIMA (2001). Nos alimentos, as enzimas poligalacturonase, ou desmetoxilação e pectinametilsterase (PME) catalisam reações que reduzem a consistência da polpa do cacau por despolimerização, as enzimas oxidativas, polifenoloxidase e peroxidase, degradam vitaminas e minerais que reduzem as propriedades vitamínicas das substâncias; A enzima ascorbicoxidase, atua quando o teor de vitamina C tende a diminuir durante o processo de estocagem de frutas e hortaliças minimamente processadas, devido ação das enzimas oxidantes, (SKOOG et al., 2015).

As formas químicas de certos pigmentos são demasiadamente alteradas em condições que afetam a integridade estrutural do tecido destes antioxidantes naturais devido a fatores como: Exposição à luz, pH, Temperatura, Reações de oxidação (GAIO, 2016; ANDRADE, 2016; PALUDO e KRÜGER, 2011; SANTI, 2005; DOMINGUES, 2010).

À medida que o fruto amadurece, o teor de pectina diminui em detrimento da ação das enzimas pectinolíticas (BOOBIO e BOOBIO, 2003). As substâncias pécticas, são polissacarídeos ácidos, envolvidas na estrutura rígida da parede celular dos vegetais, sendo sua estrutura química heterogênea, um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, unidos por ligações  $\alpha,1-4$ , parcialmente esterificados por grupos metil e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (GAIO, 2016; ANDRADE, 2016).

As pectinases são substâncias produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras, possuem distintas funções, tais como: adesiva na parede celular dos vegetais superiores; envolvidas na elaboração de bebidas; clarificação enzimática de sucos naturais utilizando como catalisador uma pectinase; degomagem; tratamento de fibras naturais e extração de café. A pectina também é utilizada para reduzir os níveis de colesterol no sangue e no tratamento de desordens gastrointestinais. Também são utilizadas para elevar o rendimento de extração de suco e clarificação do mesmo, além de diminuir a viscosidade do suco e proporcionar uma melhor separação entre as fases sólida e líquida, diminuindo o tempo de processo e melhorando a qualidade do produto final (GAIO, 2016; ANDRADE, 2016; PALUDO e KRÜGER, 2011; SANTI, 2005).

A pectinesterase – (PE) refere-se ao grupo de enzimas que agem sobre os resíduos de ácido galacturônico, que catalisam a hidrólise de grupamentos metoxil da pectina, liberando metanol, e formando ácido péctico. Esta enzima atua sobre a pectina de alta metoxilação e a transforma em pectina de baixa metoxilação. Também auxiliam os fitopatógenos no processo de infecção em plantas. As pectinases de microrganismos não patogênicos estão também envolvidas na decomposição de material orgânico vegetal, contribuindo para o ciclo do carbono, podendo estar envolvidas em mudanças das substâncias pécticas durante o amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais uma vez que o pH ideal para suas atividades está na faixa de 3,0 a 5,5 (GAIO, 2016; SANTI, 2005).

A pectinametilesterase – (PME) catalisa a remoção dos grupos metil, remove grupos metoxil da pectina por um ataque nucleofílico da enzima no éster metílico (localizados nos carbonos 6 do grupo carboxílico), resultando na formação de um complexo intermediário substrato-enzima e lançamento de um metanol (GAIO, 2016). Durante a reação são formados carboxilatos livres (COO<sup>-</sup>), metanol (CH<sub>3</sub>OH) e íons hidrônio (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) (CHAICOUSKI et al., 2016).

As pectinases, enzimas pécticas ou enzimas pectinolíticas são responsáveis pela hidrólise das substâncias pécticas, ou seja, rompem a cadeia péctica por reações de despolimerização (hidrolases e liases) ou de desesterificação (esterases) (CHAICOUSKI et al., 2016).

A enzima Polifenoloxidase (PPO) é encontrada em diversos tecidos vegetais, em especial, cogumelos, batata, maçã, banana, café e etc., quando não desejáveis ao alimento estão associadas a descoloração das antocianinas, pigmentos naturais contidos nas sementes de cacau, quando desejáveis ao alimentos as reações catalisadas pelas (PPO) aceleram o processo de pigmentação das sementes, acentuando a coloração final marrom das amêndoas, o escurecimento oxidativo em café, cacau e ameixa seca (SILVA, et al., 2014).

A polifenoloxidase (PPO) quando em contato com o oxigênio O<sub>2</sub>, oxida os compostos fenólicos dos alimentos por meio de reações de eliminação, onde o hidrogênio H<sub>2</sub> é extraído dos compostos fenólicos. Sendo os produtos iniciais dessa oxidação, a água e quinonas, que ao se condensar formam os polímeros, escuros e insolúveis, denominados, melanina, resultando no processo final da pigmentação responsável pelo escurecimento das amêndoas de cacau, (SILVA, et al., 2014).

A enzima peroxidase (PO) está relacionada com o aparecimento de sabores estranhos nos alimentos. A inativação dessas enzimas em produtos protéicos acontece por meio de tratamentos térmicos (ARAÚJO, 1995), capazes de oxidar compostos fenólicos somente na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sua detecção está baseada no desenvolvimento da cor laranja a vermelha na presença de substrato-guaiacol-água oxigenada (incolor) (NESPOLO et al., 2015).

### 3.5 Fase de ação das leveduras

As leveduras possuem mecanismo genético para metabolizar açúcares por dois

processos distintos para o alcance de energia, aeróbica (respiração) ou anaeróbica (Fermentação). Uma vez que crescem e se reproduzem mais rapidamente que os bolores, são aeróbios facultativos, logo, adaptam-se metabolicamente a presença ou ausência de O<sub>2</sub> (BARROS, 2013; LIMA, 2001; BORGES, 1999).

Os principais microrganismos que iniciam e atuam no processo de fermentação de certos alimentos, são as leveduras, onde, degradam e consomem os substratos como açúcares simples, contidos na composição da polpa do cacau, expelindo enzimas para produzir biomassa e metabólitos a partir dessa degradação, modificando o composto inicial, sendo propulsor dos pigmentos intrínsecos as amêndoas de cacau, produzem etanol, ácidos e subprodutos modificados, objetivando características desejáveis ao produto final (ALMEIDA et al., 2011; LIMA, 2001).

A ótima predominância das células leveduriformes, está nas temperaturas mesófilas, entre 25 – 28 °C, em alimentos líquidos, que por serem unicelulares se dispersam melhor nesse ambiente, proliferam-se em distintas concentrações de (CO<sub>2</sub>) (DA SILVA et al., 2007), e adaptam-se em ambientes com pH ácido com ótima atividade na faixa de 4,0 a 4,5 (BORGES, 1999), excretando enzimas responsáveis por degradar a polpa e serem convertidas em produtos de interesse (AMORIM, 2005).

As leveduras (*Saccharomyces*) atuam como matéria organizada para sua reprodução, cujas células são globulares, variam entre 5 e 8 µm, tendo sua divisão celular originado por brotamento. Podem formar filamentos, crescem em profusão nos *habitats* onde há a presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores, são aplicadas em diversos processos fermentativos, tais como no processo de panificação, produção de bebidas alcoólicas, iogurte, etc., por possuir vantagens tecnológicas como, a capacidade de assimilar grande variedade de substratos, alta velocidade de crescimento e facilidade de dissociação de sua biomassa (AMORIM, 2005; SANTOS, 2010; DE ARAÚJO, 2015).

As leveduras regeneram o NAD + pela redução do piruvato a etanol e destinada à realização de atividades fisiológicas, absorção e excreção, necessárias a manutenção, crescimento e reparação das espécies atuantes na fermentação das sementes a fim de obter um produto final com *flavor* acentuado (NELSON e COX 2014; BARROS, 2013; LIMA, 2001).

### 3.6 Secagem

A secagem é a etapa essencial para manter a estabilidade e qualidade das amêndoas de cacau requerida pelo comércio de distribuição. Este tratamento é aplicado para que as amêndoas alcancem a umidade necessária para o armazenamento e dar continuidade às reações químicas concomitantes que estabilizam a cor marrom, característica das amêndoas do cacau, além de ser responsável pela redução da acidez final das amêndoas (IMBERTI, 2017; CRUZ, 2012).

A secagem pode ser aplicada de forma natural ou artificial, estando inteiramente interligada a qualidade do produto final, quanto às porcentagens de nutrientes contidos nas amêndoas, uma vez que mantêm as características sensoriais do produto, preservações das propriedades físicas das sementes, sendo esse ambiente inócuo (ENGELHARDT, 2016).

A Secagem natural das amêndoas possui duração de 4 a 5 dias, com execução de constantes revolvimentos necessários para promover a homogeneidade da diversidade microbiana, da concentração de polpa e fatores extrínsecos ligados à temperatura onde se encontram a massa de cacau, além de incorporar oxigênio à massa de forma a garantir a uniformidade do Beneficiamento das amêndoas (DEUS, 2015; CRUZ, 2012).

A Secagem artificial é realizada em secadores ou estufas onde a temperatura é controlada subindo lentamente, não excedendo 55 ° C durante 30 h (MARTINHO et al., 2012), aplicando revolvimentos das sementes de modo a evitar conglomerados e possibilitar uma secagem homogênea por toda a massa de cacau.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PROCEDÊNCIA DOS FRUTOS

Foi acompanhada a fermentação inicial  $f_0$  (primeiro ensaio) que ocorreu *in loco* - na comunidade do Icaruçaua, localizada no município de Igarapé-Miri, na safra de julho de 2017, com um total de 3,310 kg de sementes. Esta fermentação foi realizada pelos membros da comunidade em uma espécie de peneira e teve duração de 48 horas, seguido da secagem natural em *Pallet*.

### 4.2 SECAGEM NATURAL EM PALLET

Foi proposto neste, a concepção do *Pallet*, para estudar a secagem natural das amêndoas *in loco*, com as sementes de cacau dispostas aleatoriamente entre as frestas

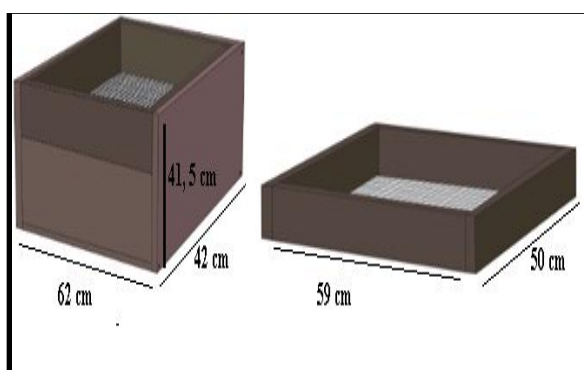
do *Pallet*, estando recoberto com uma lona de polietileno higienizada para dispersar as amêndoas por entre as frestas.

O *Pallet* foi direcionado a certa altura, para que as amêndoas não estivessem em contato com o solo e nem com a madeira no ambiente *in loco*, visto que, na Secagem natural há maior retenção de polifenóis do que nas Secagens realizadas artificialmente.

A Secagem natural teve duração de 59 h ( $T_f$ ), equivalente a 3 dias de secagem ao sol. Foi determinado a temperatura e o peso das sementes contendo 20 sementes por amostragem no início do processo (tempo  $T_0$ ), no primeiro dia a cada uma hora; no segundo dia a cada duas horas e no decorrer do processo, as amostras foram retiradas e mensuradas no intervalo de três horas.

#### 4.3 ENSAIO DA FERMENTAÇÃO EM FERMENTADOR SUSTENTÁVEL - ( $f_1$ )

Com base nos resultados concebidos na primeira Fermentação ( $f_0$ ) foi proposto à construção de um Fermentador sustentável, de material isolante, folha de compensado, espessura 2 cm, de acordo com a (Figura 2), confeccionada no laboratório de Designer do CCNT, que contém um compartimento central, removível, contendo orifícios, confeccionado mediante a técnica do filetador em garrafas PETs para captar o exsudado do cacau resultante do processo fermentativo das amêndoas.



**FIGURA 2** – Ilustração do fermentador sustentável para as sementes de cacau.

##### 4.3.1 Coleta amostral no processo de fermentação ( $f_1$ )

O processo da fermentação foi realizado no CCNT da UEPA e teve duração de sete dias, com um total de 1,835 kg de sementes. Foram realizados revolvimentos nas sementes nos respectivos intervalos de monitoramento iniciais e finais, sequencialmente: -0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h, equivalentes a sete

dias de fermentação.

Foram retiradas amostras em diferentes pontos do fermentador, epicentro, laterais e em profundidade no tempo inicial, a cada 24 horas até atingir 168 horas, referentes aos sete dias da fermentação. Parte das amostras foi direcionada para a realização das análises físicas, físico-químicas e bioquímicas no laboratório de Tecnologia de Alimentos e Química da UEPA, Campus V, CCNT e outra parte utilizada para isolar as células leveduriformes por plaqueamento, após a diluição em série executado no laboratório LAMICRO, do Laboratório Central do Pará (LACEN-PA).

#### 4.3.2 Caracterização Física

##### 4.3.2.1 Biometria dos frutos e sementes de Cacau

A Biometria foi realizada com 100 sementes e com o auxílio de um paquímetro, foram medidos o comprimento e largura dos frutos e sementes.

##### 4.3.2.2 Avaliação da Qualidade das Amêndoas

Foi aplicada ao final da etapa de Secagem com a finalidade de avaliar o grau e qualidade das amêndoas submetidas às etapas de fermentação. Com isso, foi coletado um total de 100 amêndoas aleatoriamente, em seguida foram submetidas a cortes longitudinais, com o auxílio de um material de superfície cortante, devidamente higienizado, classificando-as se estas estavam aptas ou não a serem comercializadas, considerando a coloração e a compartimentação dos cotilédones (BRASIL, 2008).

#### 4.4 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DA CULTURA *START*

As sementes provenientes da primeira fermentação ( $f_1$ ) foram introduzidas em sacos de polietilenos estéreis, e as amostras líquidas (exsudado) foram retiradas do fermentador com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e acondicionadas em garrafas plásticas estéreis que suportam até 10 g, codificadas de acordo com o dia, e armazenadas em caixa térmica de isopor a temperatura inferior a  $-5^{\circ}\text{C}$ .

O método utilizado corresponde à inoculação de uma cultura pura isolada da fermentação inicial ( $f_1$ ) no meio fermentativo a ser otimizado ( $f_3$ ). O procedimento inicia após a certificação do crescimento dos fungos em placas contendo ágar DRBC, seguido da seleção, isolamento e multiplicação dos microrganismos de interesse (células

leveduriformes) em ágar SABOURAUD e caldo nutritivo, respectivamente, sendo essas células reativadas para garantir o desenvolvimento positivo e preliminar do coquetel *start*. As análises quanto aos parâmetros bioquímicos efetuadas nos *nibs* resultantes das fermentações iniciais e com inóculo *start* serviram para avaliar a tendência do procedimento proposto em otimizar a fermentação do cacau amazônico.

#### 4.4.1 Crescimento, separação e isolamento de Células *Leveduriformes*

##### 4.4.1.1 Pré-tratamento das amostras

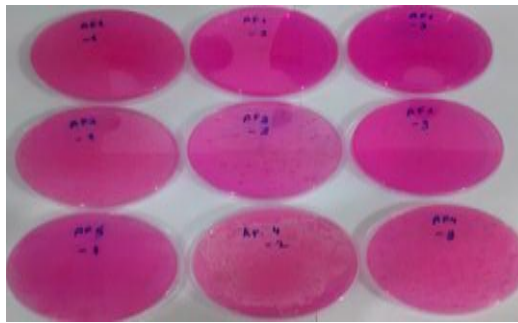
Para obter a primeira diluição seriada analítica  $10^{-1}$ , figura 3 foram transferidos assepticamente 25 g das amostras das amêndoas fermentadas (Af) e exsudado para 225 mL de APT (diluyente esterilizante). As diluições decimais sucessivas inicia logo após a transferência de 1 mL da diluição inicial para o tubo de ensaio com 9 mL de água peptonada (AP)  $10^{-2}$  e finaliza após a diluição  $10^{-3}$  obtida de maneira similar.



**FIGURA 3** - Amostragens em água peptonada tamponada (APT) estéreis, diluições  $10^{-1}$ .

##### 4.4.1.2 Plaqueamento para o crescimento das células leveduriformes

O método do plaqueamento utilizado foi o da inserção das alíquotas de 0,1 mL de cada diluição decimal seriada citadas acima no centro da superfície de placas descartáveis (*Spread Plate*), com auxílio de pipetas esterilizadas, utilizando o bastão de vidro em L, para espalhar uniformemente o inóculo na superfície do meio sólido ágar *Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol* (DRBC), que contém antibiótico inibidor de bactérias, de acordo com a figura 4. A placas foram invertidas e incubadas durante o período de 3 a 5 dias a  $25 \pm 1$  °C em Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), (DA SILVA et al., 2007; VIEIRA et al., 2006).



**FIGURA 4** – Placas contendo o crescimento do inóculo em ágar (DRBC).

#### 4.4.1.3 Caracterização morfológica - microscópica e coloração de Gram

Após o período de incubação e crescimento de colônias fúngicas, realizou-se a leitura quanto às conformações morfológicas macroscópicas, o diâmetro das colônias, aspecto sensorial: forma, tamanho, pigmento para prosseguir com o esfregaço daquelas que possuem características típicas para leveduras, forma ovóide, pigmento diferenciado e rugosidade, mediante a técnica referente à preparação a fresco que inicia com o esfregaço do material, com auxílio da alça de platina flambada e resfriada para uma lâmina de borda fosca, codificada, seguido de uma gota de lactofenol ou azul de metileno e sobrepõe a lamínula para confirmar a identificação das células leveduriformes mediante leitura em microscópio óptico, figura 5, (OLIVEIRA 2015; SOUZA, et al., 2012; GUTIÉRREZ 2007; MIGLIARI 2001).

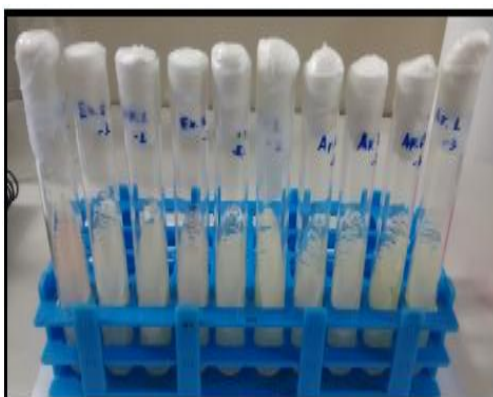


**FIGURA 5** - Análise microscópica das células leveduriformes.

#### 4.4.1.4 Técnica de Microcultivo

Após confirmação do material de interesse (células leveduriformes) foi transferido com auxílio da alça de platina para os tubos de ensaios com ágar SABOURAUD para serem ativadas como culturas puras. Os 12 tubos contendo cepas isoladas da fermentação inicial foram envolvidos por PARAFILM ‘M’ para isentar o

contato com o meio externo e ser incubados em DBO a 25° C durante ± 30 dias, conforme a figura 6, (Sbravatti Junior et al., 2013).



**FIGURA 6** - Tubos de ensaio vedados com PARAFILM com cepas leveduriformes em ágar SABOURAUD.

#### 4.4.1.5 Caldo alternativo para Leveduras

As leveduras são fungos mais exigentes, algumas espécies são incapazes de assimilar nitrato e carboidratos complexos, devendo constar desta forma, no caldo, nutrientes susceptíveis a serem metabolizados pelas células leveduriformes isoladas, uma vez que esse caldo, seja responsável por multiplicar a biomassa das células a certo volume que assegure a realização da otimização da fermentação de forma a agregar valor final as amêndoas e, por conseguinte aos produtos derivados do cacau, visto que, nesse caldo proposto e descritos na (Tabela 1) contém exsudado do cacau captado do segundo dia (48 h), subproduto expelido durante a fermentação, estando a um pH ácido com quantidades consideráveis de sólidos solúveis dissolvidos, sendo essas condições propícias para o crescimento (ataque) de leveduras.

**Tabela 1** - Formulações dos caldos de enriquecimento para Leveduras

Abreviação	Formulação	Componentes (%)
F.M	Maltose	3 de exsudado do cacau, 5 de peptona e 15 de maltose monohidratada
F.G	Glicose	3 de exsudado do cacau, 5 de peptona e 2 de D-glicose anidra dextrose

F.M.G	Maltose e glicose	3 de exsudado do cacau, 5 de peptona, 2 de D-glicose anidra dextrose e 15 de maltose monohidratada
-------	-------------------	--

---

Os caldos foram para autoclave a 121 ° C durante 15 min e o valor médio do pH ajustado para 5,0, com auxílio de uma solução ácida de HCl 0,1 N, pois as leveduras crescem em pH amplo entre 3,0 a 8,0, sendo o pH 5,0, o adequado para seu melhor desenvolvimento. Cada colônia isolada dos estágios da Fermentação inicial ( $f_1$ ) foram inoculadas para as 3 três formulações de caldo, de acordo com a figura 7, contendo 9 mL em cada um dos 30 tubos de ensaios e incubados em DBO a 25 °C por  $\pm$  72 h.



**FIGURA 7** – Tubos contendo as formulações dos Caldos alternativo F.M, F.G e F.M.G com inóculo das células leveduriformes.

Os tubos positivos da etapa anterior foram centrifugados em centrífuga marca (QUIMIS – 222-T) durante 40 min a 2270 RPM, onde as partículas de maior densidade, por inércia, são arremessadas para o fundo. Neste período de decantação das células, o sobrenadante é descartado e a proporção retida nos tubos foi direcionada para compor o coquetel *start* a ser inserido na fermentação. Obtendo-se 2,02 g do coquetel.

#### 4.4.2 Fermentação com indução do coquetel *start* – ( $f_3$ )

O coquetel *start* da etapa anterior, figura 8, foi utilizado na fermentação ( $f_3$ ) na proporção 0,13 % por kg de amêndoas para isso, 2,02 g do coquetel foi ressuspensão em 5 mL de água destilada e homogeneizado por 15 min em agitador magnético, logo em seguida, foi disperso diretamente na massa de cacau (1,555 kg) para iniciar a etapa de fermentação em fermentador sustentável, e prosseguiu-se com o monitoramento dos parâmetros físico-químicos sequencialmente: -0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e

168 h, equivalentes a sete dias de fermentação. A figura 9 apresenta o fluxograma com as etapas efetuadas durante a otimização do beneficiamento.



**FIGURA 8** – Coquetel *start* final.

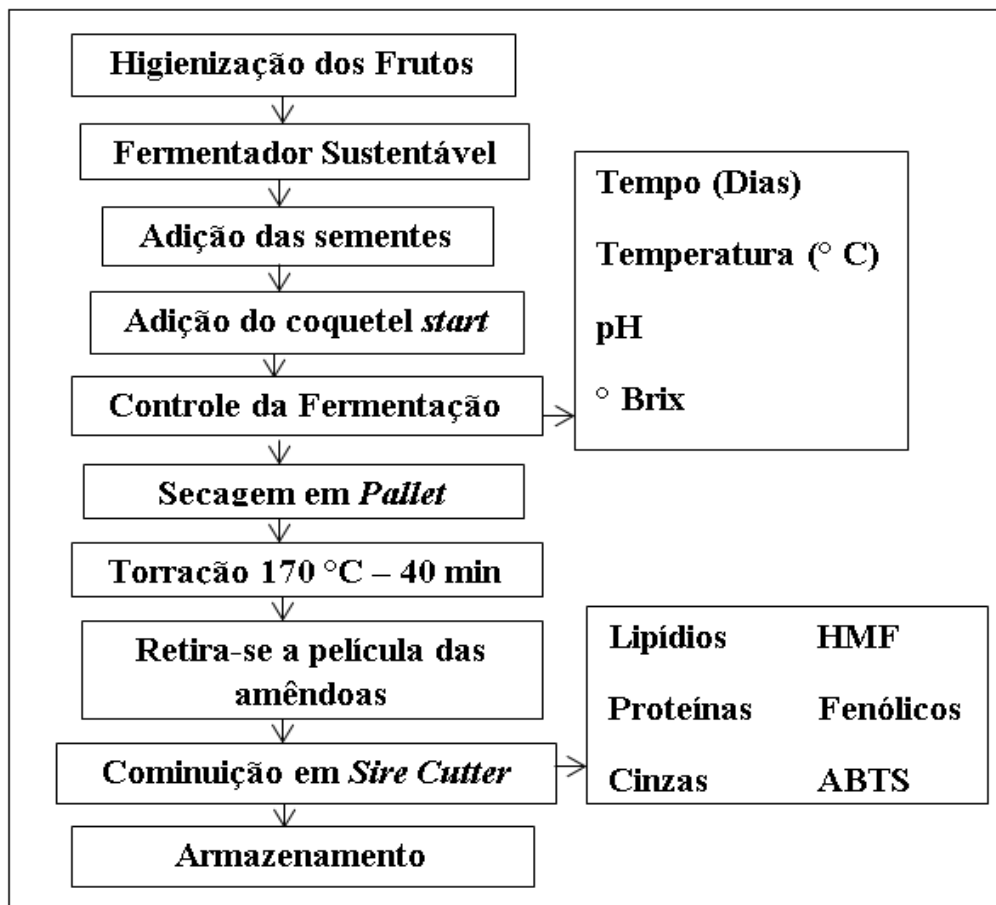
#### 4.4.3 Secagem Artificial

Após os 7 dias de fermentação, as sementes foram submetidas à Secagem em estufa com circulação de ar forçada para retirada de umidade. As amêndoas foram colocadas em recipientes de alumínio, a temperatura de 60 ° C durante 20 horas e finaliza quando alcançar peso constante do recipiente contendo as amêndoas.

#### 4.4.4 Torração

As amêndoas de cacau após a secagem, foram submetidas ao forno de panificação a 170 ° C durante 40 min para dar início ao tratamento térmico de torra das amêndoas, sendo este procedimento responsável por intensificar o pigmento e *flavor* inconfundível do chocolate, concomitante a reação de *Maillard*, a inativação de enzimas lipolíticas além da diminuição da umidade e redução de ácidos voláteis.

Ao final, foi removida a casca, uma vez que o calor proporciona facilidade na retirada da película que circunda o cotilédone, e o processamento foi finalizado com a cominuição dessas dando origem ao *Nibs* torrado, sendo esse o resultado das amêndoas após serem processadas no equipamento *Sire Cutter*.



**FIGURA 9** – Fluxograma da otimização do beneficiamento do cacau amazônico.

## 4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS E ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS *NIBS*

### 4.5.1 Avaliação da temperatura no beneficiamento do cacau

A oscilação da temperatura durante o beneficiamento das amêndoas de cacau foi monitorado durante os 7 dias do processo fermentativo ( $f_0$ ,  $f_1$  e  $f_3$ ), aferindo o termômetro nos intervalos de 24 h (1º dia), 48 h (2º dia), 72 h (3º dia), 96 h (4º dia), 120 h (5º dia), 144 h (6º dia) e 168 h (7º dia).

O acompanhamento da temperatura da Secagem natural em *Pallet in loco* ( $f_1$ ) na comunidade de Icaruçaua, foi realizado no tempo zero [ $s_0$ ], em 14 de julho de 2017 às 10h:04min, as observações da temperatura e coleta das amêndoas ocorreram no decorrer de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h e perdurou durante 59 h [ $s_f$ ], temperatura final.

### 4.5.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada segundo método do (Instituto Adolfo Lutz, 2008). A concentração desses íons H<sup>+</sup> é mensurada e expressa através da leitura direta em pH-metro digital (QUIMIX). A determinação foi realizada nos intervalos no tempo 0 zero, com 24 h (1º dia), 48 h (2º dia), 72 h (3º dia), 96 h (4º dia), 120 h (5º dia), 144 h (6º dia) e 168 h (7º dia).

#### 4.5.3 Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (° Brix)

A determinação do teor de sólidos solúveis totais foi realizada em refratômetro de bancada Abbe, conforme normas da AOAC (2005), nos intervalos de 24 h (1º dia), 48 h (2º dia), 72 h (3º dia), 96 h (4º dia), 120 h (5º dia), 144 h (6º dia) e 168 h (7º dia).

#### 4.5.4 Determinação de Umidade

O teor de umidade foi determinado com a Secagem direta em estufa, em triplicata, método por gravimetria, utilizando estufa com circulação de ar a temperatura de 60 °C até peso constante de acordo com os métodos descritos pela AOAC (2005) n° 925. A Secagem por estufa baseia-se na remoção da água por aquecimento em que o ar quente é absorvido por uma camada muito fina do alimento, e então levado para o interior por condução (DE SOUZA, et al., 2016). Os resultados são expressos em porcentagem de umidade conforme as equações 1 e 2.

Equação 1: % Matéria seca = 
$$\frac{(P_{c+amostra} - P_c) \times 100}{P}$$

Equação 2: % Umidade = 100 - % Matéria Seca

$P_{c+amostra}$  → Peso do cadinho tratado mais amostra

$P_c$  → Peso do cadinho tratado

$P$  → Peso inicial da amostra (g)

#### 4.5.5 Lipídios Totais

O teor de lipídios contido nas amostras das sementes de cacau foi determinado pelo método de Soxhlet conforme descrito por Instituto Adolfo Lutz, 2008. O método está fundamentado na solubilidade dos lipídios em solventes apropriados (éter de

petróleo), onde há o refluxo do solvente no extrator aquecido, o vapor liberado passa por um condensador e circula por entre o papel-filtro, nesse está condicionada a amostra para a extração dos compostos solúveis após vários ciclos no aparelho Soxhlet, para obter o extrato solubilizado no solvente; em seguida, o solvente é evaporado e o extrato final levado à estufa com circulação e renovação de ar até peso constante para obtermos a porcentagem de lipídios (DE SOUZA, et al., 2016).

Equação % Lipídios: 
$$\frac{(R_0 - R_f) * 100}{P}$$

Temos:

$R_0$  → *Reboiler* inicial

$R_f$  → *Reboiler* final

P → peso da amostra inicial (g)

#### 4.5.6 Cinzas Totais

Consiste em pesar 2,0 g de amostra no cadinho, previamente tratado em estufa a 105 °C, por 1 h, resfriar até temperatura ambiente e pesar (tratado). Carbonizar esta amostra em mufla a temperatura inicial de 220° C em seguida incinerar entre 550 °C a 570 °C, promovendo a evaporação da água, de substâncias voláteis e a oxidação da matéria orgânica (DE SOUZA, et al., 2016).

Equação % Cinzas: 
$$\frac{(P_f - P_i) * 100}{P}$$

Temos:

$P_f$  → Peso do resíduo final do cadinho

$P_i$  → Peso inicial do cadinho

P → Peso da amostra (g).

#### 4.5.7 Proteínas Totais

O método de Kjeldahl é executado em três principais etapas: digestão da amostra, destilação do nitrogênio e titulação. Esse método quantifica o teor de

nitrogênio total e estima indiretamente o teor de proteína dos alimentos por meio da multiplicação por um fator de conversão (DE SOUZA et al., 2016). A análise foi realizada em duplicata, contendo em média 0,2 g de amostras da massa 100 % cacau e *Nibs* amazônico, seguido do acondicionamento dessas em papel filtro e introduzidos nos tubos de ensaio para dar início a digestão, destilação e titulação, AOAC, 2005.

Equação 1: 
$$\% N = \frac{(V_a - V_b) * Fc * 14 * 100}{A * 1000}$$

Equação 2: 
$$\% \text{ Proteína} = \% N * 6,25$$

% N → Teor de nitrogênio total

V<sub>a</sub> → volume gasto na titulação da amostra

V<sub>b</sub> → volume gasto na titulação do branco

M → Molaridade da solução de HCl

Fc → Fator de correção da solução de HCl

A → massa de amostra

#### 4.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PECTINA-METILESTERASE

Para o monitoramento e quantificação da atividade enzimática durante a fermentação, as amostras (sementes de cacau), coletadas nos intervalos de 24 h (1º dia), 48 h (2º dia), 72 h (3º dia), 96 h (4º dia), 120 h (5º dia), 144 h (6º dia) e 168 h (7º dia) e submetidas às leituras de absorbância com bandas de absorção máxima em 620 nm ao longo do comprimento eletromagnético do equipamento espectrofotômetro marca (METASH), (<http://www.nadp.ufc.br/assets/proc-anbiol-enzima-pme.pdf>).

##### 4.6.1 Preparo do Extrato Enzimático

Foram pesados cerca de 5 g das amostras trituradas e filtradas a vácuo, e submetidas como solução em erlenmeyer com 40 mL de solução Tampão de fosfato de potássio 0,1M, pH 6,0; seguindo da homogeneização do extrato em agitador magnético, durante 1 hora a 4 °C, (<http://www.nadp.ufc.br/assets/proc-anbiol-enzima-pme.pdf>).

##### 4.6.2 Atividade da Pectina-Metilesterase (PME)

Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,16 mL do extrato, 1,0 mL de pectina cítrica a 0,5 %, 0,3 mL da solução de azul de bromotimol a 0,01 % e 0,4 mL de NaCl a 1 M, em seguida realizou-se o aquecimento do substrato a 80 ° C por 1 min, seguido do repouso por 9 min e leituras das absorvância das amostras em comprimento de onda em 620 nm (<http://www.nadp.ufc.br/assets/proc-anbiol-enzima-pme.pdf>).

#### 4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA POLIFENOLOXIDASE E PEROXIDASE

##### 4.7.1 Preparo do Extrato

Foram pesados 10 g das amêndoas, e adicionados 40 mL da solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6, em seguida a solução foi agitada com agitador magnético em banho de gelo durante 1 hora a 4 °C. (GARCIA, 2006; PAZ, 2010)

##### 4.7.2 Atividade Enzimática para Peroxidase (PO)

Foi adicionado em tubo de ensaio 1,5 mL de guiacol a 1%, 1,2 mL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6, 0,1 mL do extrato e 0,4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,4 %. A atividade enzimática foi medida com leituras espectrofotométricas de absorvâncias em 470 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causar um aumento de 0,001 de absorvância por minuto por grama de amostra. (LIMA et al., 2001)

##### 4.7.3 Atividade Enzimática da Polifenoloxidase (PPO)

O método baseia-se em inserir no tubo de ensaio 1,7 mL de solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 6, 1,2 mL do catecol 0,4 % e 0,2 mL de extrato, homogeneizar a solução em agitador magnético e introduzir à solução na cubeta.

##### 4.7.4 Cálculo para atividade enzimática

$$U/mL = \frac{A * FD * 1000}{E * V_e * T}$$

**A** → absorvância

**FD** → Fator de Diluição

**E** → Absorvância da Enzima (PPO = 26.9/ PO = 26.6)

**V<sub>e</sub>** → Volume utilizado

**T** → Tempo

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DE HMF (*Hidroximetilfurfural*)

O procedimento deu-se segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). Foram preparadas três soluções: Carrez I (1,5 g de Ferrocianeto de Potássio/50 mL), Carrez II (3 g de Acetato de Zinco/50 mL) e uma solução de Bissulfito de Sódio à 0,2 %.

Pesou-se 10 g da massa de cacau fermentado e torrado e acrescentou-se 25 ml de água. Em um erlenmeyer adicionou-se 0,5 mL da solução de Carrez I, 0,5 mL de solução de Carrez II e completou-se o volume com água destilada seguido da homogeneização. Filtrou-se a solução, descartando os primeiros 10,0 mL do filtrado. Pipetou-se 5 mL dessa solução em dois tubos de ensaio e adicionou-se 5,0 mL de água em um dos tubos e no segundo tubo de ensaio continha 5,0 mL da amostra e 5 mL de solução de bissulfito de sódio 0,2 % no outro (Adolfo Lutz, 2008). Realizou-se a leitura no espectrofotômetro, na absorvância da amostra a 284 e 336 nm.

##### 4.8.1 Extração do HMF

Para extração do HMF da massa e *Nibs* de cacau pesou-se 10,0 g das amostras, diluídas inicialmente em 25 mL de água destilada, seguido da filtração a vácuo.

Equação: 
$$\frac{(A_{284} - A_{336}) * 149,7 * 5}{P} = \text{HMF MG/Kg}$$

Temos:

$A_{284}$  → leitura da abs a 284

$A_{336}$  → leitura da abs a 336

P → massa das amostras  $M_0$ ,  $M_{C1}$  e  $M_{C3}$  em (g).

5 → massa nominal da amostra

149,7 →  $(126/16830) * (1000/10) * (1000/5)$ .

#### 4.9 DETERMINAÇÃO FENÓLICOS TOTAIS

Foi determinado pelo método proposto por Singleton et. al. (1999). Foram pesadas 10,0 g do produto final do beneficiamento (*Nibs*) e extraído em solução de

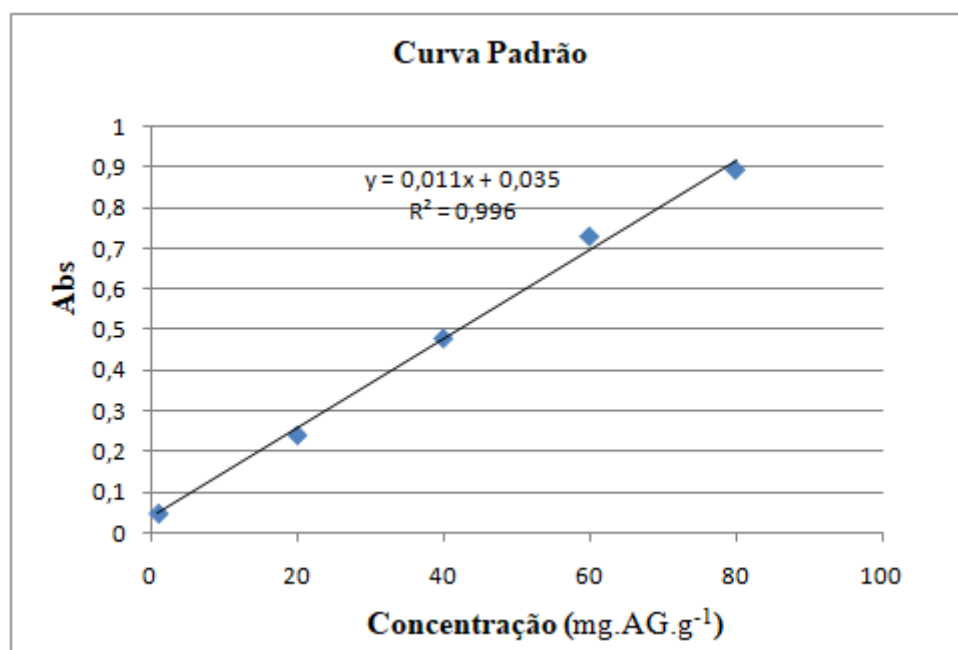
metanol aquoso 50 % durante  $\pm 1$  h, em seguida foi filtrado e centrifugado. A quantidade total de fenóis de cada extrato foi quantificada mediante a curva padrão preparada com ácido gálico concentração  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 2,5 mL de solução aquosa a 10 % do reativo Folin- Ciocalteu e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5 %, os tubos foram incubados em banho maria a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min, após o resfriamento dos tubos, foi iniciada a leitura a 750 nm. O padrão da análise é feito em diferentes concentrações de ácido gálico, figura 10.

Equação:  $Y = a + bx$

Onde;

Y  $\rightarrow$  Abs da amostra

x  $\rightarrow$  Fenóis equivalente ao padrão (ácido gálico)



**FIGURA 10** - Curva padrão de ácido gálico.

#### 4.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

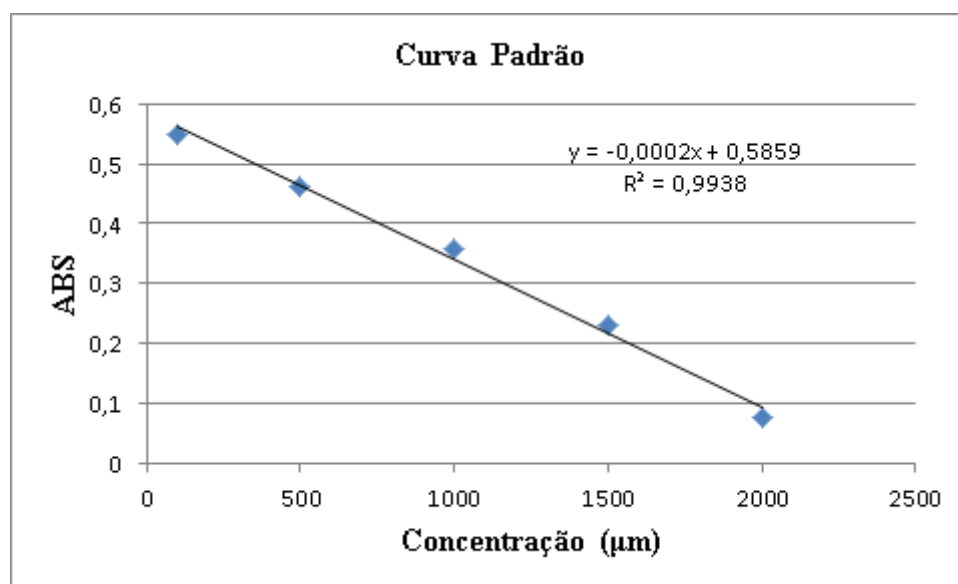
A metodologia para a determinação da atividade antioxidante realizada no *Nibs* de cacau foi determinada mediante a captura ou redução do radical livre - ABTS produzido pela oxidação do 2,2 - azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) (EMBRAPA, 2007; BRITO, 2013). O  $\text{ABTS}^+$  reage com um doador de átomos hidrogênio, como compostos fenólicos, sendo convertido em uma forma incolor de ABTS. A quantidade de  $\text{ABTS}^+$  reduzido, decorrente da reação com compostos

fenólicos contidos na amostra é expressa em equivalentes de Trolox (curva padrão), figura 11. Esse valor foi designado TEAC, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox.

#### 4.10.1 Obtenção do extrato

Foram pesados 10,0 g dos Nibs das amêndoas e adicionados 40,0 mL de metanol 50 %, homogeneizado em agitador magnético por 15 min, e deixado em repouso por 60 min, seguido da filtração a vácuo e o filtrado levado a um balão volumétrico 100 mL. Foram adicionados 40,0 mL de acetona 70 %, e o volume foi completado com 100 mL com água destilada, e posteriormente a leitura das absorvância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 734 nm.

Para análise da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), a partir do extrato obtido no item anterior, foram preparadas em tubos de ensaio, três diluições diferentes, em triplicata. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 30 µL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS<sup>+</sup> e homogeneizados em agitador de tubos. Foi realizada a leitura das absorvâncias em 734 nm, após 6 minutos de repouso (EMBRAPA, 2007). Foi utilizado o álcool etílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. Foi realizada uma curva Padrão com Trolox, figura 11.



**FIGURA 11** - Curva padrão de Trolox.

#### 4.11 CONTROLE E QUALIDADE DOS FRUTOS DE CACAU

Os frutos de cacau foram acondicionados em recipientes inox e submetidos a rupturas, com o auxílio de um martelo, de forma a romper ao meio os frutos, extraindo apenas as sementes envolvidas por polpa mucilaginosa para dar início ao processo de fermentação. A separação das sementes do fruto foi realizada manualmente, com as mãos devidamente calçadas por luvas, atendendo as normas de higienização, utilizando os EPI's, figuras 12 a 14 para não promover a contaminação e manter isenta a probabilidade de contaminação cruzada e com isso, conferir um produto confiável e seguro para o consumidor, corroborando para a preservação e manutenção da saúde, aumento da qualidade útil ofertado além da padronização dos processos dos produtos regidos pela Resolução - RDC n° 12, de janeiro, BRASIL, 2001.



**FIGURA 12** - Higiene.



**FIGURA 13** - Luvas.



**FIGURA 14** - Máscaras.

### Esquema do Beneficiamento do cacau Amazônico



**I. Fermentador Sustentável**



**II. Pallet**



**III. Estufa**



**IV. Forno de Panificação**



**V. Amêndoa Torrada**



**VI. Sire Cutter (Nibs)**

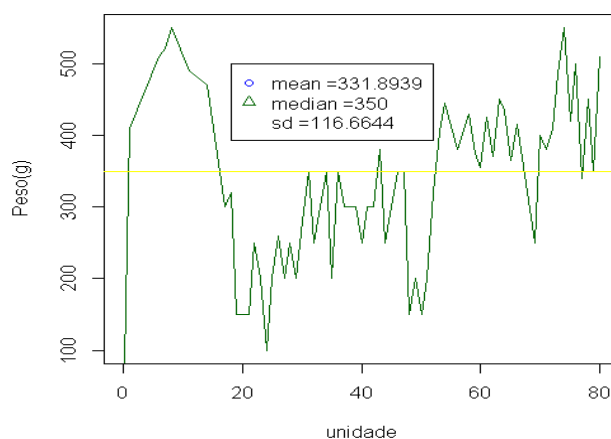
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Biometria dos Frutos e Sementes**

As escalas biométricas de 100 frutos de cacau com peso médio de 350 g, estão

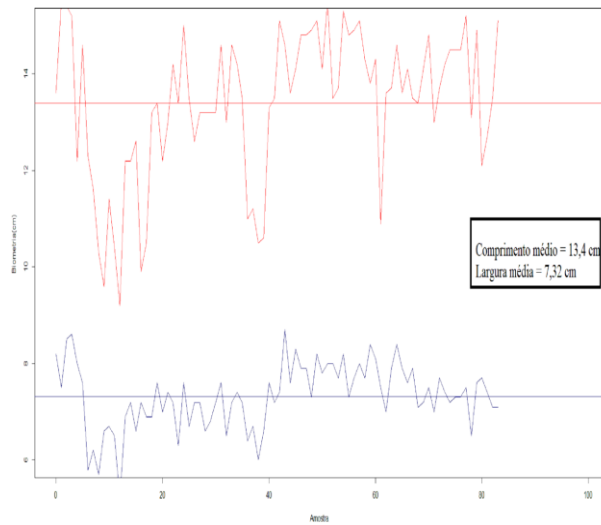
apresentados na figura 15. Em um único fruto, continha 46 sementes envolvidas por polpa, esse resultado esteve superior aos valores encontrados por CAVALCANTE (2010), que foi de 20 a 40 sementes no seu interior.

De acordo com a figura 16, os frutos de cacau analisados possuem comprimento médio de 13,00 cm e 7,00 cm de largura, as sementes apresentam 2,00 cm de largura e 2,06 cm de comprimento, figura 17. Estes resultados diferem dos valores apresentados na literatura, por conta as condições edafoclimáticas do fruto de origem.

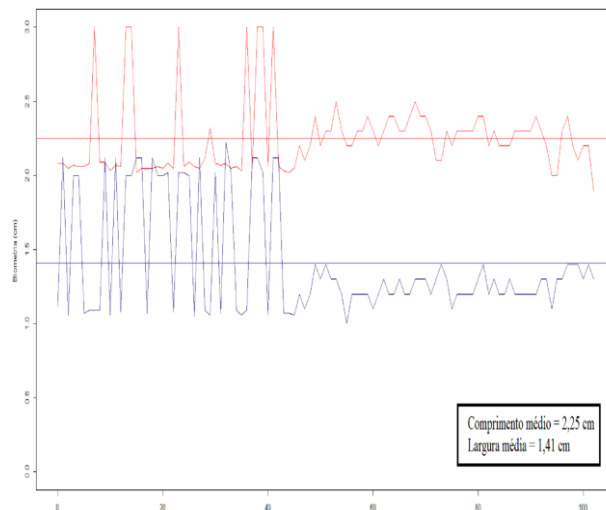


**FIGURA 15** - Valores médios e desvios padrão para o peso dos frutos do cacau.

Em estudos realizados por CRUZ (2013), o fruto de cacau possui 25,00 cm de comprimento e 10,00 cm no maior diâmetro, as amêndoas 2,00 cm de comprimento e 1,00 cm de largura, contendo no interior do fruto 20 a 50 sementes. Os frutos de cacau estudados por EFRAIM (2004) possuem média de 16,21 cm de largura, as amêndoas 2,62 cm de comprimento e 1,47 cm de largura.



**FIGURA 16** - Valores médios da biometria dos frutos.



**FIGURA 17** - Valores médios da biometria das sementes.

## 6.2 Prova de Corte

A análise consiste na mensuração do índice da qualidade do processo fermentativo, classificadas quanto à coloração dos cotilédones, figura 18. amêndoas mofadas, germinadas, com índices de degradação por insetos invasores e amêndoas achatadas que impossibilita ao corte das amêndoas de cacau (BRASIL, 2008; DOMINGUES, 2010).



**FIGURA 18** – Resultado para análise da Prova de Corte.

A INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 38, DE 23 DE JUNHO DE 2008, do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), estabelece o Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem e o modo de apresentação, uma vez que as sementes não fermentadas adequadamente apresentam cotilédones compactos, coloração cinza-escuro ou roxo e de sabor extremamente amargo. De acordo com os resultados obtidos nos ensaios da prova de corte e apresentados na tabela 2, onde 90 % das amêndoas atingiram boa fermentação, apresentando cotilédones marrom ao final da secagem, uma vez que a coloração roxa/violeta, remete ao aspecto de quando as amêndoas ainda não foram submetidas ao processo do beneficiamento, sementes *in natura*.

**Tabela 2** - Resultado da análise física: Prova de corte das amêndoas de cacau

<b>Classificação</b>	<b>Proporção (%)</b>
<b>Bem Fermentadas</b>	<b>90</b>
<b>Violeta</b>	<b>0</b>
<b>Achatadas</b>	<b>10</b>

### 5.3 Obtenção do inóculo das leveduras

A contagem média das células leveduriformes naturais isoladas da fermentação inicial ( $f_i$ ) foi de  $1,3 \times 10^3$  UFC/25 g, resultado esse semelhante ao encontrado por SERRA et al. (2016), que foi de  $1,3 \times 10^3$  UFC/20 g de leveduras no quarto dia de fermentação. A presença dessas células se deu nas primeiras 12, 24 e 48 h em condição aeróbia e anaeróbia, o que permitiu inferir que as células leveduriformes encontradas

são anaeróbias facultativas, pois só há a incorporação de oxigênio na massa após o 2º dia de fermentação. As colônias se apresentam com aspecto cremoso, médias e pequenas que variam da cor creme, ao pink e verde neon os resultados aqui apresentados se adequam aos encontrados por GUTIÉRREZ (2007), OLIVEIRA (2015), MIGLIARI (2001) e SOUZA, et al. (2012) quando mencionam ter identificado colônias isoladas de leveduras de cor branca, creme e em menor proporção rosadas, cremosas e regulares.

Foi observado neste trabalho o crescimento de leveduras no caldo alternativo através do desprendimento de gás CO<sub>2</sub>, odor de fermento e sedimentação foram notados nos tubos após a incubação, esses resultados corroboram para com os estudos sobre o crescimento e multiplicação desse fungo, principais características e produção de metabólitos de acordo com DA SILVA et al. (2007); AMORIM (2005) e BORGES (1999).

O exsudado contido nas formulações dos caldos alternativos apresentaram pH 3,3 e segundo GARCÍA e MORETA (2013) e MENDOZA (1997) esse resíduo possui ótima disponibilidade para carboidratos e pectina, além de que o pH encontrado está próximo ao mencionado por EFRAIM (2004) e SILVA (2002) que concluíram em seus estudos que bolores e leveduras desenvolvem-se melhor no ambiente com pH menor que 4,5 e valores de pH próximos de 3,6 auxiliam para uma ótima atividade de leveduras.

Dentre as cepas isoladas nesse estudo, foram observadas diferenças nos aspectos morfológicos e microscópicas das células e colônias dos isolados a partir da incubação das placas contendo ágar DRBC, iniciais ( $f_1$ ) e finais ( $f_3$ ) que por motivo da indisponibilidade de material não foi possível realizar as identificações das espécies isoladas nesse estudo, pois não foi disponibilizado o número de cartelas suficientes para iniciar a identificação das células no equipamento. Os resultados apresentados reitera os encontrados nos estudos de NELSON e COX (2014) e BARROS (2013), em que as leveduras se reproduzem sexualmente, pela fusão de duas células, portanto, no período final da fermentação ao isolar a levedura desse processo pode ocorrer que essa seja diferente daquela introduzida no início da fermentação, entretanto, se ela tiver uma boa capacidade fermentativa, poderá ser a cepa adequada para otimizar processo de fermentação das sementes, visto que o emprego de fermentos previamente selecionados é direcionado a elucidar a Fermentação lenta, ou seja, poderá acelerar essa etapa,

ocasionando a diminuição do tempo final da Fermentação, proporcionando produtos finais com qualidade mais uniforme, visto que o desempenho do processo de Fermentação é afetado pelo tipo de levedura atuante.

Torna-se necessário realizar um estudo no que versa em identificar e quantificar o conjunto de metabólitos produzidos por essas linhagens sobreviventes em meio à competição por nutrientes do caldo alternativo em que seja possível padronizar uma base de dados, contendo os organismos isolados a partir desse estudo com a fermentação, a fim de estruturar uma placa com os testes bioquímicos para tais fenótipos de interesse, uma vez que cepas passam por processos de modificação genética clássica, cruzamento seletivo, visando dessa forma aperfeiçoar o potencial de expressão de metabólitos das células isoladas a partir desse estudo, com a finalidade de Otimizar desde as escalas sensoriais até bioquímicas dos *Nibs* quando utilizado cepas *starts* (DIAZ, 2016; CAPRINI, 2007; BASTOS, 2015; WINN et al., 2014; NELSON e COX, 2014).

Dois tipos de interações micoparasitas têm sido estudadas, em uma delas, o parasita atua sem efeitos aparentes para o seu desenvolvimento e outros o antagonico destrói a célula hospedeira e utiliza os nutrientes para multiplicação de células EMBRAPA (2018). Com isso, torna-se, imprescindível avaliar o potencial da comunidade endofítica que produzem substâncias capazes de melhorar o controle biológico de *Crinipellis* perniciososa impedindo o avanço dos patógenos para com os frutos da região Amazônica Paraense, realizando ensaios a partir dos fungos isolados nesse estudo (SOUZA et al., 2017; SILVA et al., 2015; SILVA, 2010).

#### 5.4 Otimização do beneficiamento das sementes de cacau

A proposta deste estudo consiste no melhoramento da qualidade final das amêndoas fermentadas, para isso, foram realizados ensaios na Fermentação com inóculo *start* e por fim, efetuar observações frente aos processos fermentativos caracterizados quando *in loco*, submetidas à Secagem natural em *Pallet* ( $f_0$ ); sem inóculo quando em Fermentador sustentável ( $f_1$ ) e quando há inserção do inóculo *start* 1 ( $f_3$ ).

No primeiro dia de Fermentação é perceptível sentir o processo de degradação dos constituintes da massa de cacau, um odor característico de açúcares, visto que a polpa do cacau contém 80 % de umidade e 15 % de carboidratos, tornando esse

ambiente favorável ao desenvolvimento de leveduras, via ação das enzimas (Zimase) que catalisa a conversão de glicose de um organismo vivo (leveduras) que formam no seu interior etanol e gás carbônico que são eliminados (OETTERER et al., 2006; UCKO, 1992).

Após o terceiro dia a massa das sementes apresenta odor intenso de ácidos, resultante da decomposição dos carboidratos envolvidos na composição química da polpa das sementes e ação das enzimas PPO e PO, essa por sua vez desintegra-se, tornando-se pegajosa, havendo desprendimento de exsudado

A tabela 3 apresenta os resultados do monitoramento do exsudado capturado durante o processo fermentativo com a finalidade de acompanhar o andamento essa etapa. Observou-se a formação do exsudado nos dois primeiros dias de fermentação em todos os ensaios, entretanto, quando inserido o coquetel *start*, a formação do exsudado se deu até o terceiro dia de fermentação, o mesmo foi observado por OLIVEIRA (2015) e DOMINGUES (2010) que reportaram em seus trabalhos que a drenagem do mel do cacau foi eficiente nas primeiras 24 h de fermentação, porém em 48 h o volume de mel foi muito inferior quando comparado aos outros tratamentos com o inóculo.

O pH esteve com a máxima em 3.8 e mínima em 3.2 esses resultados corroboram para com os apresentados por LLERENA (2016) e GARCÍA, MORETA (2013) que estiveram, respectivamente, entre 3,85 e 3,59.

**Tabela 3** - Caracterização do Exsudado do cacau para todos os ensaios.

Ensaio	Tempo(Dias)	Temperatura (°C)	SST* (° Brix)	pH
f <sub>0</sub>	0	26	11	3,44
f <sub>0</sub>	1	21	11	3,8
f <sub>1</sub>	0	30	20	3,2
f <sub>1</sub>	1	39	10	3,31
f <sub>3</sub>	0	29	23	3,74
f <sub>3</sub>	1	28	20	3,21
f <sub>3</sub>	4	24	0	-

**Legenda:** f<sub>0</sub>: Fermentação *in loco*; f<sub>1</sub> - Fermentação inicial e f<sub>3</sub>- Fermentação com indução do coquetel *start*;- (não foi realizado análise), \*Sólidos Solúveis Totais.

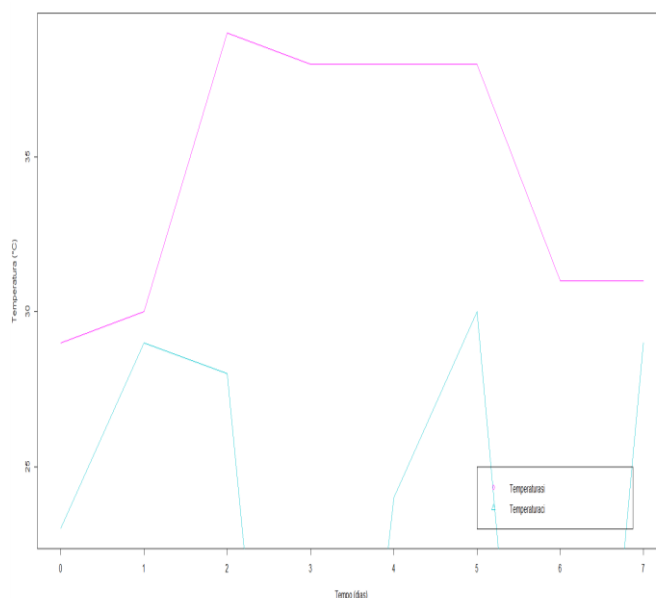
Nota-se que o teor de Sólido Solúveis Totais máximo do exsudado foi de 23,0 °

Brix. Estando estes resultados entre os valores apontados por GARCÍA e MORETA (2013) que encontrou exsudado com teor de Sólidos Solúveis Totais de 15,0 ° Brix. Observa-se que os valores de pH determinados estão no intervalo de 3,2 a 3,8 o que podemos inferir que a fermentação aconteceu por conta da redução desse pH. Estes resultados são similares aos encontrados por LLERENA (2016) e GARCÍA e MORETA (2013) com valores médios de 3,85 e 3,59, respectivamente.

### 5.5 Fermentação sem inóculo ( $f_1$ ) e com inóculo ( $f_3$ )

A prática de revolvimentos durante a Fermentação é também uma forma de controlar a elevação excessiva da temperatura além do nível de ácidos (DE ALMEIDA, 2013; DOMINGUES, 2010). Os revolvimentos são necessários para que ocorra a aeração das amêndoas durante a Fermentação, nesse estudo, foi aplicado manualmente, com as mãos calçadas com luvas, sendo esta operação essencial para evitar conglomerados na massa e fazer com que a degradação dos açúcares contidos nas sementes aconteça de forma homogênea para uniformizar a taxa de Fermentação.

É possível observar na figura 19 o perfil da temperatura da massa de cacau em Fermentador sustentável ( $f_1$ ).



**FIGURA 19** - Valores médios e desvios padrão da temperatura de fermentação feita em fermentador sustentável ( $f_1$ ) e ( $f_3$ ).

Percebe-se que a temperatura inicial do processo fermentativo é de 29 °C, máxima de 39 °C no segundo dia, declínio para 38 °C no terceiro dia e manteve-se constante a 31 °C até a finalização do processo, após sete dias de fermentação. Estes

resultados assemelham-se aos obtidos nos estudos de SANTOS (2010), em que a fermentação também apresentou aumento da temperatura em 48 horas, e manteve-se constante até o fim do processo.

Na pesquisa de RAMÔA JÚNIOR (2011), o processo de fermentação foi de sete dias e atingiu temperatura iniciais e finais de 24,83 e 45,50 °C respectivamente. Em estudos feitos por BRITO (2013) durante sete dias de fermentação, as temperaturas iniciais e finais de 22,1 e 34,0 °C, respectivamente. No entanto, SERRA e colaboradores (2016) reportaram que a temperatura inicial da fermentação de cacau estabeleceu-se em torno de 29 °C.

A temperatura é um dos fatores que influenciam no crescimento e sobrevivência dos organismos envolvidos no processo de fermentação. Temperaturas muito baixas dificultam o crescimento, pois desaceleram os processos vitais da célula, entretanto, temperaturas elevadas poderão ocasionar a desnaturação térmica das proteínas, em especial das enzimas, além de favorecer a contaminação bacteriana (BARROS, 2013; LIMA, 2001).

A temperatura inicial do processo fermentativo feito com coquetel *start* ( $f_3$ ) foi de 23° C, com aumento da temperatura no primeiro dia atingindo 29 °C, seguido do declínio desta até o quarto dia de fermentação, e máxima de 30 °C no quinto dia de fermentação. Resultados similares foram encontrados por OLIVEIRA (2015), no qual, os autores utilizaram cultura *start* no processo fermentativo do cacau na Bahia, e obtiveram aumento da temperatura no primeiro dia de fermentação.

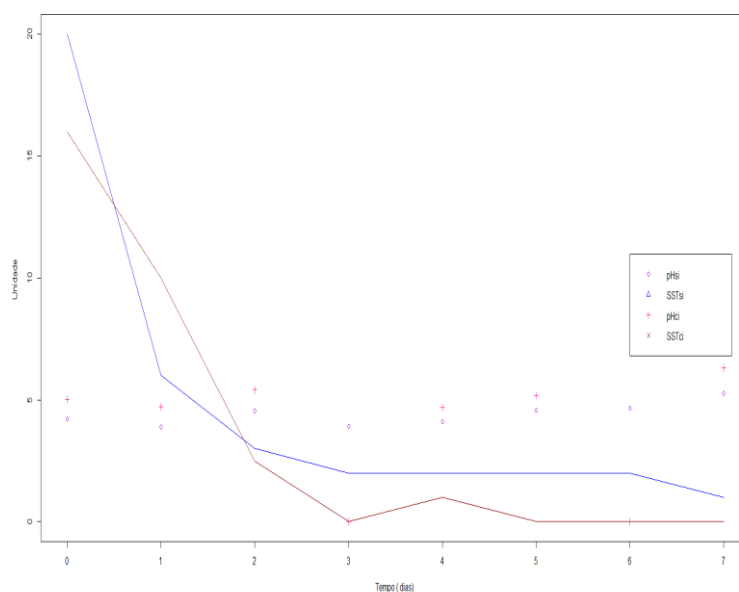
A elevação da temperatura na fermentação ( $f_3$ ) logo no primeiro dia é resultado do intenso consumo dos substratos das sementes pela atividade das leveduras adicionadas, o que não se observou na Fermentação ( $f_1$ ), onde, a elevação da temperatura aconteceu após o segundo dia, dessa forma, podemos concluir que houve a diminuição da fase de adaptação das leveduras selecionadas, uma vez que essas estavam mantidas em caldo nutritivo na sua faixa ótima de pH e que o declínio dessa atividade se deve ao aumento da produção de álcool que atua como substrato para os demais microrganismos que utilizam o subproduto expelido pelas leveduras como fonte de carbono.

O acompanhamento do, pH e teor de Sólidos Solúveis Totais em função do tempo - de fermentação, sem inóculo e com inóculo, está apresentado na figura 20. O pH indica o grau de deterioração ocasionado pela acidez desenvolvida através da

atividade de certas reações bioquímicas que ocorrem e alteram o pH do meio que por comparação com padrões são utilizados no controle e qualidade dos alimentos (GOMES, 2011).

Para as amêndoas do processo fermentativo ( $f_1$ ), o pH inicial e final foi de 4,20 e 5,26 respectivamente, estando entre os valores observados por CRUZ (2013), que foi de 4,1 para pH inicial e pH 5,0 ao final do processo da fermentação. SANTOS (2013), mostrou em seu estudo que no início da fermentação, o pH foi de 6,4 com quedas no quarto e sétimo dia de fermentação, atingindo valores de pH 5,2 e 5,7 respectivamente.

As amêndoas de cacau apresentaram teor de sólidos solúveis totais inicial e final de 20,0 e 1,0 ° Brix, respectivamente. Esses resultados estão entre os obtidos por EFRAIM (2004) no decorrer do primeiro e segundo dia com valores médios de 22,11 e 19,07 ° Brix.



**FIGURA 20** - Valores médios dos parâmetros Físico-Químicos (pH e SST\*) no processo fermentativo em fermentador sustentável ( $f_1$ ) e ( $f_3$ ). \*Sólidos Solúveis Totais.

A Fermentação com inóculo *start*, obteve pH inicial de 5,02, ocorrendo a diminuição para 4,71 no primeiro dia e aumento para pH 6,3 no sétimo dia. O teor de sólidos solúveis inicial das amêndoas para o ensaio final ( $f_3$ ) esteve a 16 ° Brix com queda após o segundo dia para 2,5 e finalizando a 0 ° Brix no quinto dia, esses resultados significam que a fermentação realmente aconteceu, pois houve o decréscimo do SST durante os dias de fermentação.

Através dos parâmetros monitorados durante a fermentação com inóculo *start*

( $f_3$ ) podemos concluir que houve elevação da temperatura de 23° C para 29° C concomitante a redução do pH de 5,02 para 4,71 logo no primeiro dia de fermentação, enquanto que na fermentação sem inóculo ( $f_1$ ) observações foram identificadas somente após o segundo dia de processo, ou seja, a redução do tempo de fermentação com inóculo ( $f_3$ ) pode ser evidenciado com o aumento do pH de 4,70 para 5,19 referente ao quarto e quinto dia de fermentação com a queda do teor de SST para 0,0 ° Brix e da temperatura para 30° C. portanto, verificou-se que ocorreu a diminuição do tempo de fermentação com inóculo ( $f_3$ ) em relação a fermentação sem inóculo ( $f_1$ ). De acordo com OETTERER et al. (2006) períodos longos de fermentação deterioram as proteínas, ocorrendo a liberação de amônia, odor desagradável.

A Tabela 4 apresenta os resultados quantos às análises aplicadas nos *Nibs* obtida após cominuição das amêndoas torradas ( $Mc_1$  e  $Mc_3$ ) e na Massa 100 % cacau Amazônico obtido *in loco* após prensa em pilão ( $Mc_0$ ) que possui a vantagem de ter sua estrutura homogênea no que diz respeito à granulometria das partes sólidas obtidas de acordo com LEITE (2012) e aqui nesta observa-se os maiores parâmetros de pH, Lipídios e Cinzas respectivamente, o que podemos inferir que as amêndoas secas em *Pallet* influenciou para com a retenção e manutenção desses componentes.

**Tabela 4** – Caracterização Centesimal da Massa 100 % cacau obtido *in loco* e dos *Nibs* cominuídos em *Sire Cutter*

Análises	$Mc_0$	$Mc_1$	$Mc_3$
pH	5.99	5.1	5.67
Lipídios (%)	40.13	32.96	25.70
Proteína (%)	15.18	14.72	17.45
Cinzas (%)	3.04	2.27	1.17
HMF (mg/Kg)	2,84	2,52	2,87
Fenólicos (mg.AG.g <sup>-1</sup> )	-	127.3	331.5
ABTS (μmol.Trollox.g)	-	128.2	148.5

**Legenda:**  $Mc_0$ : Fermentação *in loco*;  $Mc_1$ : Fermentação inicial;  $Mc_3$ : Fermentação com indução do coquetel *start*.

O pH médio de 5,58 encontrados nos *Nibs* estão acima do pH médio apontado nos estudos realizados por DE OLIVEIRA (2013); LEITE (2012) e DA SILVA (2011)

que variou de 5,0 a 5,40, as diferenças observadas no pH podem ser justificadas pelas condições edafoclimáticas do fruto de origem.

A gordura corresponde à fração do alimento solúvel em solventes orgânicos e inclui diferentes classes de substâncias (DE SOUZA et al., 2016). As amêndoas torradas apresentaram teor médio de 32,93 % de lipídios, estando acima da média apontada por RIBEIRO (2014) de 31,0 % de lipídeos.

As frações proteicas dos alimentos além de conferir valor nutricional, pelo fornecimento de aminoácidos essenciais e peptídeos bioativos, contribuem para suas propriedades sensoriais como textura, aroma e sabor, e sua adequada quantificação é requisito essencial para moldar condições de processamento, garantir a qualidade dos produtos e, para fins de rotulagem (SOUZA et al., 2016). A média para o teor de proteína na massa 100 % cacau ( $Mc_0$ ) e *Nibs* ( $Mc_1$  e  $Mc_3$ ) foi de 15,78 %, onde a maior porcentagem encontrada foi no *nibs* resultante do beneficiamento com inóculo de cepas leveduriformes, estando este resultado acima do exposto por EMBRAPA (2004); RIBEIRO (2014) e NOGUEIRA (2015) no *líquor* de cacau, possui 12,27 % e 15,53 % de proteína, respectivamente, esse foi um dos parâmetros positivos para a fermentação com inóculo pois obteve *nibs* com maior quantidade de proteínas.

A determinação do teor de cinzas é importante por diversos parâmetros, tais como: fortificação de alimentos; identificação da presença de alguns contaminantes inorgânicos (toxicidade); indicativo de pureza e de adulteração dos produtos. A média para cinzas esteve a 2,16 % resultado esse levemente acima do mencionado por EMBRAPA (2003) que foi de 2,13 % de cinzas em base seca. Já NOGUEIRA (2015) encontrou valores acima da média igual a 3,2 % valor este próximo ao encontrado na ( $Mc_0$ ).

Podemos inferir a partir dos resultados nos parâmetros bioquímicos abaixo que o melhoramento da Fermentação do cacau Amazônico mediante a inserção de cepas *starts* metabolicamente selecionada se torna viável, pois, apresenta um produto final melhor, o *Nibs*, não só no *flavor*, mas também, bioquímico. A concentração média para HMF foi de 2,74 (mg/Kg). RIBEIRO (2014) apresentou em seus estudos 2,68 (mg/Kg).

Os compostos fenólicos são os produtos do metabólito secundário das plantas e possuem na sua estrutura pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila (Santos 2013). Os valores encontrados na determinação dos compostos fenólicos totais no ensaio sem inóculo foi de 127,3 (mg.AG.g<sup>-1</sup>) já na Fermentação com

inóculo ( $Mc_3$ ) foi elevada de 331,5 ( $mg.AG.g^{-1}$ ) resultado este superior ao encontrado por PIMENTEL (2016) no “nibs” cacau, em que os valores variam entre 125 e 168 ( $mg.AG.g^{-1}$ ). Comente a importância dos seus resultados. O teor de compostos fenólicos encontrado foi baixo, médio ou alto segundo a classificação para estes compostos? Porque sua amostra tem essa concentração, qual os fatores que influenciam? Explique.

As espécies reativas do oxigênio são importantes nos processos fisiológicos como na produção de energia podendo vir até compor produtos fármacos. O efeito antioxidante se deve a um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos, enzimas e outros compostos vegetais que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres, no qual, o ácido ascórbico e compostos fenólicos são antioxidantes hidrofílicos e os carotenóides, antioxidante lipofílico (EMBRAPA, 2007).

A capacidade antioxidante para os extratos do *nibs* com inóculo *start* ( $Mc_3$ ) 148,5  $\mu mol.Trollox/g$  foi superior ao encontrado na Fermentação sem inóculo 128,2  $\mu mol.Trollox/g$  (será mesmo? Houve diferença significativa das médias? resultado esse levemente acima do mencionado por SALVADOR (2011) em cacau geneticamente modificado que foi de 141,27  $\mu mol.Trollox.g^{-1}$ . A partir dos resultados da tabela, podemos concluir que os *Nibs* das amêndoas fermentadas com coquetel *start* ( $f_3$ ) alcançaram níveis maiores que os *Nibs* ( $f_1$ ) para os parâmetros Proteínas, HMF, Fenólicos Totais e Determinação da atividade antioxidante, ou seja, a Fermentação com inóculo, mostrou-se potencialmente responsável por intensificar o *flavor* e elevar a disponibilidade dos parâmetros bioquímicos do produto final do Beneficiamento proposto.

## 5.6 Perfil da Umidade das amêndoas na Fermentação

As amêndoas de cacau após o ensaio da ( $f_1$ ) alcançou umidade inicial de 53,70 % e final 3,5 % em estufa a Temperatura  $\pm 60^\circ C$  durante  $\pm 96 h$ ; estando a umidade próximo ao mencionado por RAMÔA JÚNIOR (2011) no sétimo dia de fermentação com 42,80 % e ao final atingiu 5,42 %.

Para a Fermentação com inóculo ( $f_3$ ) a umidade inicial e final, respectivamente, foi de 21,51 % e 9,82 %, estando esse resultado inicial abaixo do mencionado por SANTOS (2013) cuja umidade inicial dos cotilédones de cacau esteve a 33,88 % e umidade final próximo a 8,0 % de acordo com (BRASIL, 2008). O resultado final da umidade das amêndoas está próximo aos padrões estabelecidos pela norma vigente, em

que é necessário reduzir a umidade para 7 a 8 % ao final da secagem (CEPLAC, 2011).

### 5.7 Atividade enzimática na Fermentação do cacau

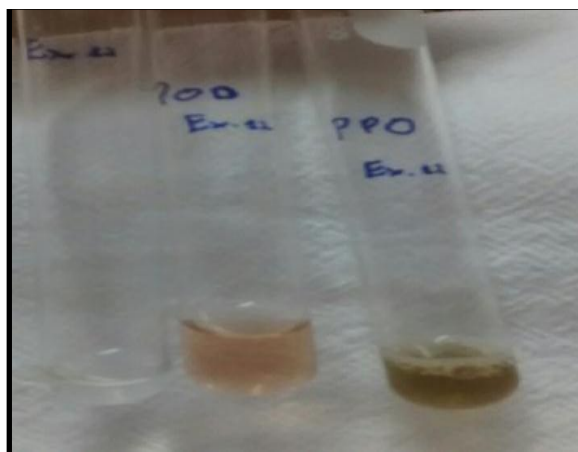
As enzimas são consideradas moléculas biológicas, pois atuam na catálise de reações para digerir alimentos, enviar sinais nervosos ou contrair músculos que não ocorrem na velocidade adequada sem catálise enzimática (NELSON e COX, 2014). A enzima peroxidase (PO) está relacionada com o aparecimento de sabores estranhos nos alimentos, sendo que a atividade ótima desta enzima se encontra em pH 4,5 (ARAÚJO, 1995).

A tabela 5 apresenta os resultados a atividade das enzimas Polifenoloxidase e Peroxidase analisadas após extração das amostras coletadas durante os sete dias de Fermentação, para a Polifenoloxidase (PPO) a maior atividade 2497 (U/g) ocorreu no primeiro dia, com a Temperatura a 30° C, a enzima (PO) alcançou absorvância máxima no segundo dia de Fermentação, atingiu 5608 (U/g), quando o pH das sementes estavam a 4.5. FLURKEY e JEN (1979) apresentou atividade polifenoloxidase 900 U/g na semente de cacau. SAKAROV e ARILA (1999) relataram que a amêndoa e a casca de cacau apresentaram atividade da Peroxidase de 5.700 U/g.

**Tabela 5** - Análise Quantitativa das Enzimas Polifenoloxidase (PPO), Peroxidase (PO) e Pectina-Metilesterase (PME) durante o ensaio da Fermentação ( $f_I$ )

Tempo (dias)	Temperatura (° C)	pH	PPO (U/g)	PO (U/g)	PME (U/mL)
Af.°	29	4,2	1765	1322	946
Af.1	30	3,8	2497	1708	756
Af.2	39	4.5	1412	5608	646
Af.3	38	3,9	1228	4639	673
Af.4	38	4,1	1151	3198	526
Af.5	38	4,5	945	2312	459
Af.6	31	4,6	692	860	287
Af.7	31	5,2	554	716	256

Nas amostras do exsudado do início da Fermentação do cacau, foi analisado qualitativamente a presença da PO, com mudanças de coloração do meio, variando de translúcido a alaranjado tendendo a vermelho. Já os resultados das análises qualitativas para PPO também foi positiva para o exsudado com aparecimento da coloração verde escuro do meio reacional de acordo com a figura 21.



**FIGURA 21** - Teste qualitativo positivo para a presença das enzimas PO e PPO em exsudado do cacau.

A enzima PPO está envolvida na descoloração das antocianinas (Aa), atuam na presença de O-difenol e  $O_2$  oxidando as antocianinas. Na fermentação as amêndoas de cacau estão submetidas a esse efeito ocasionado pelas enzimas (PO) e (PPO), onde estas aceleram o processo de pigmentação das sementes, acentuando a coloração marrom das amêndoas.

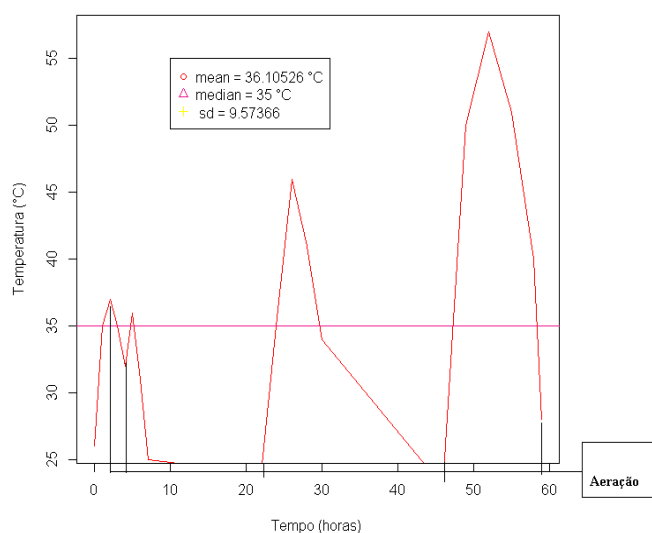
As enzimas pectinases hidrolisam ligações glicosídicas ao longo da cadeia de pectina, sendo este o principal carboidrato contido na polpa que possui características de mucilagem que envolve as sementes de cacau produzindo ácidos monogalacturônicos (DOMINGUES, 2010). A atividade máxima para Pectina-Metilesterase durante a etapa da fermentação, foi no primeiro dia (946,0 U/g), a partir do quarto dia, a atividade dessas enzimas reduziram até finalizar a etapa de fermentação das sementes, sendo esse resultado apresentado, maior que o exposto por PINTO *et al.*, (2013) o valor máximo para PME encontrado no 30º dia de armazenamento para os mamões foi de (365,42 U/mL).

#### 5.8 Monitoramento da temperatura em função do tempo de Secagem Natural em *Pallet*

A secagem das amêndoas de cacau e dos diversos alimentos que são submetidos a este tipo de tratamento térmico visa uma alternativa de comercialização das amêndoas para um armazenamento prolongado, uma vez que o processo de Secagem culmina na diminuição da atividade de água das amêndoas (PEREIRA, 2013). De acordo com IMBERTI (2017), há a necessidade de buscar novas técnicas de Secagem com o intuito de otimizar a eficiência energética e melhorar a qualidade da amêndoa de cacau seca

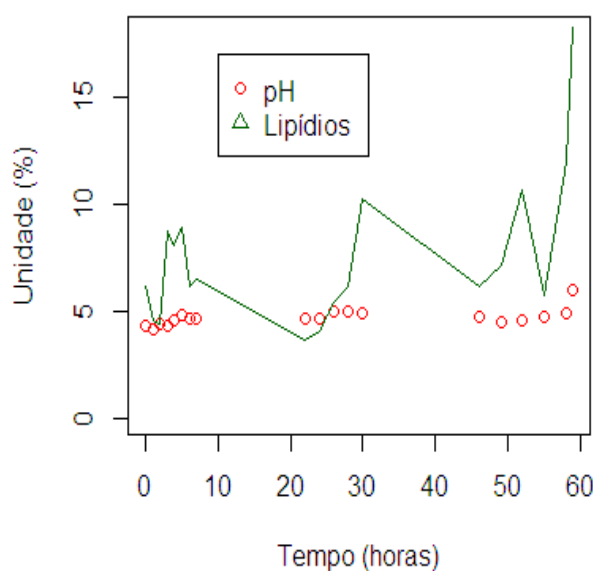
preservando ao máximo os compostos fenólicos.

O monitoramento da temperatura de secagem natural em *pallet* está na figura 22. A temperatura média do processo de secagem natural foi de 35 °C. Devido a ausência de incidência solar que interferem diretamente no seguimento do processo de Secagem natural durou cerca de 31 h.



**FIGURA 22** - Valores médios e desvio padrão para a temperatura das amêndoas secas *in loco*.

A figura 23 apresenta os resultados das análises efetuadas nas amêndoas de cacau quando submetidas a Secagem natural *in loco*.



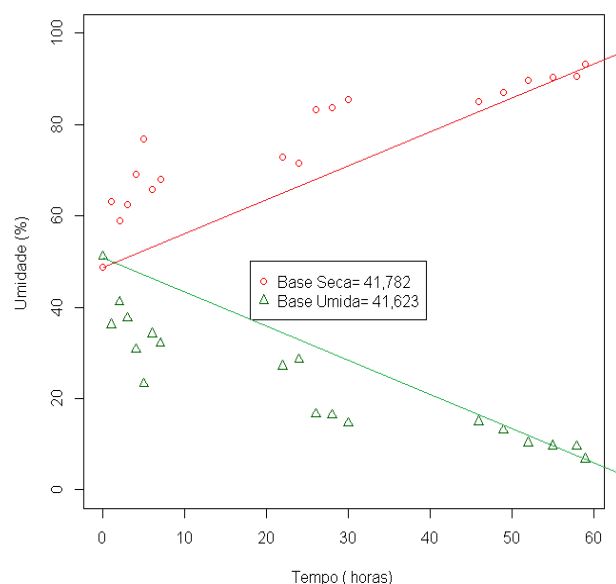
**FIGURA 23** - Valores medianos para os parâmetros físico-químicos (pH e lipídios) *in loco*.

O resultado da mediana do pH das amêndoas submetidas à Secagem em *pallet*

foi 4,34 resultado esse abaixo do encontrado por EFRAIM, PEZOA-GARCÍA E JARDIM (2010) pH 5,43. Em estudos efetuados por SANTOS (2013) o pH médio foi de 5,37.

É possível observar o aumento da porcentagem de lipídios no decorrer da etapa de Secagem onde as amêndoas iniciaram com teor de 6,13 %, finalizaram a Secagem com 18,21 % e após prensagem em moinho o teor de lipídios alcançou 40,13 %. O que permite concluir que o aumento da temperatura, as amêndoas eleva a quantidade de lipídios das mesmas. O resultado final para lipídios está próximo ao encontrada por CRUZ (2013), o valor médio de lipídios em sementes de cacau estão em 47,57 %. EFRAIM, PEZOA-GARCÍA, E JARDIM (2010) encontrou 55,78 % de lipídios para amêndoas submetidas a Secagem natural durante 3 dias de Fermentação e para os 7 dias de Fermentação alcançou 55,60 %.

A figura 24 apresenta o resultado da umidade das amêndoas quando submetidas à Secagem natural em *Pallet* onde a umidade final média de 6,704 % em base úmida, seguido de 93,2 % em base seca. DE ALMEIDA (2018); MARTINHO, DA SILVA, DE SOUZA (2012) e EFRAIM, PEZOA-GARCÍA, E JARDIM (2010) encontraram valores de umidade igual a 7 %, 6 % e 6,38 % umidade respectivamente após Secagem.



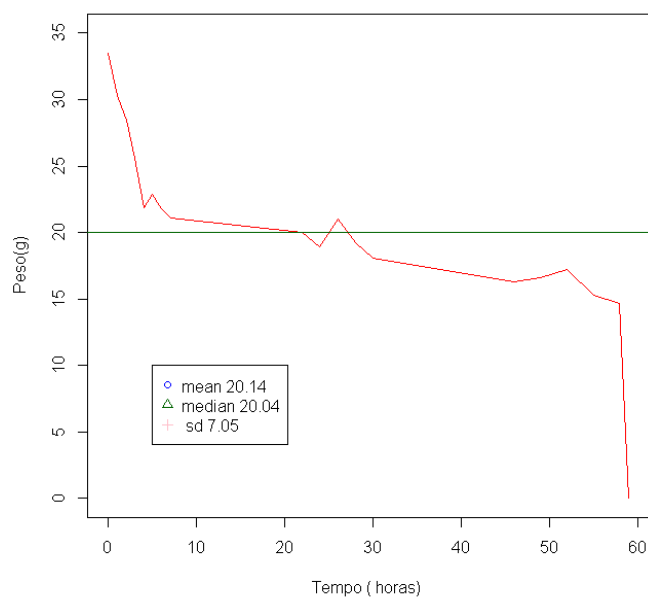
**FIGURA 24 -** Valores da perda de umidade das amêndoas *in loco*.

As amostras codificadas nos intervalos especificados no decorrer das 59 horas, contendo 20 amêndoas, por amostragens, obtiveram as seguintes especificações expressas na tabela 6.

**Tabela 6** - Caracterização na Secagem das amêndoas dispostas em *Pallet in loco*.

Tempo (h)	Temperatura °C	Massa (g)	b.s (%)	b.u (%)	Lipídios(%)
0	26	33,492	48.713	51.128	6.134
1	35	30,2653	63.196	36.803	4.555
2	37	28,4665	58.923	41.093	4.380
3	35	25,6059	62.383	37.616	8.740
4	32	21,8708	69.185	30.815	8.108
5	36	22,8385	76.78	23.22	8.909
6	31	21,79	65.855	34.145	6.147
7	25	21,0573	67.97	32.03	6.531
22	24	20,0411	72.915	27.085	3.661
24	35	18,9314	71.445	28.555	4.073
26	46	21,0378	83.35	16.65	5.393
28	41	19,2103	83.615	16.26	6.158
30	34	18,08	85.395	14.605	10.251
46	23	16,28	85.05	14.95	6.158
49	50	16,6108	86.96	13.04	7.176
52	57	17,1917	89.69	10.31	10.618
55	51	15,3231	90.365	9.635	5.772
58	40	14,6517	90.495	9.505	12.019
59	28	-	93.262	6.737	18.212

A figura 25 apresenta a perda da massa inicial das 20 amêndoas ao iniciar a etapa de Secagem natural que foi de 30,2653 g finalizando a Secagem com 14,6517 g, em média ocorreu perda equivalente a 18,840 g da massa inicial. O revolvimento das sementes ocorreram de forma constante para evitar aglomerado das sementes, por este motivo, foram realizados um total de 6 revolvimentos nas sementes por 30 segundos cada, por entre as frestas do *Pallet*, com o auxílio de utensílio inox higienizado.



**FIGURA 25** - Variação da média em relação massa das amêndoas secas *in loco*.

## 6. CONCLUSÃO

A inserção do Fermentador sustentável, Pallet e do coquetel de cepas previamente isoladas, foram inovadores, pois foram inseridos meios para o acréscimo da qualidade final das amêndoas visando agregação de valor e diversidade na oferta de derivados da cadeia produtiva do cacau.

O experimento foi eficiente, pois ocorreu a tendência na redução do tempo da Fermentação de sete para cinco dias, sustentado com aumento da temperatura logo no primeiro dia de processo, aumento do pH e diminuição do °Brix no quinto dia, além de obter *Nibs* com disponibilidade bioquímicas maiores que o ensaio de Beneficiamento convencional.

## 7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Caroline., ROCHA, Jessica., CARITÁ, Juliana., SOUZA, Tamyres., SOUZA, Paulo Vitor. Biotecnologia na Produção de Alimentos. DOSSIÊ TÉCNICO. SP: Universidade de São Paulo, 2011.

AMORIM, H. V. Fermentação alcoólica: ciência & tecnologia. Fermentec. Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO). Piracicaba, 2005.

ANDRADE, Adrielly Silva. Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e

celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. João Pessoa: Universidade Federal de PB, 2016.

ARAÚJO, Julio Maria. Química de alimentos: teoria e prática. MG: Universidade Federal de Viçosa., p. 335., 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 18th ed. Gaithersburg, M.D, USA, 2005.

BARROS, Ana Paula. Influência da cepa de levedura na composição fenólica e aromática de vinhos da cv. Syrah no vale do submédio são francisco. Universidade de Santa Catarina, Florianópolis. (Dissertação de mestrado), 2013.

BASTOS, Aline. Enzimas: a chave da biotecnologia. 2015. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8504625/enzimas-a-chave-da-biotecnologia>. Acesso em 12/11/2018.

BOBBIO, Florinda., BOBBIO, Paulo. Introdução à química de alimentos. 3 ed. São Paulo: Varela. 238 p., 2003.

BORGES, Larissa. Análise de qualidade microbiológica (bolos e leveduras) em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) E identificação dos fungos potencialmente micotoxigênicos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. monografia. 1999.

BRASIL, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Radar Técnico. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau>. \_\_\_\_\_. JORNAL DA CEPLAC. Acesso em 30/04/2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº38. Secretaria de vigilância sanitária. 23 de junho de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 57, de 12 de nov. de 2008. Regulamento Técnico da Amêndoa de Cacau. Diário Oficial da União, Brasília, 13 nov. 2008. Seção I, pg.2.

BRITO, Brenda. Aminas bioativas e compostos fenólicos no cacau (*Theobroma cacao* L.): influência do processo de fermentação. Universidade Federal, Belém-PA. (Dissertação de mestrado), 2013.

CAPRINI, Geisa. Metabolômica de plantas: análise fitoquímica de *Pentas lanceolata*,

estudos com culturas celulares e experimentos iniciais de biossíntese com precursores marcados utilizando uma espécie de *Mentha* como sistema modelo. CAMPOS DOS GOYTACAZES. Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ. (Dissertação de mestrado), 2007.

CARPER, Jean. Alimentos: o melhor remédio para boa saúde: como os alimentos podem prevenir e curar mais de 100 sintomas e problemas com base em mais de 10.000 estudos científicos. 10º Ed. Editora: Campus, Rio de Janeiro, 1995.

CAVALCANTE, Paulo. “Frutas comestíveis na Amazônia”. 7º Ed. Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém-PA, 2010

CHAICOUSKI, Adeline., SILVA, Marcio., CANTERI, Maria Helene. Estudo da atividade da enzima pectinametilesterase obtida a partir do albedo de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), fresco e liofilizado, em diferentes graus de maturação. R. bras. Tecnol. Agroindustr., v. 10, n. 1, p. 2026-2038, Ponta Grossa, jan/jun, 2016.

CRUZ, Jaqueline. Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem. Universidade Federal, BAHIA. (Dissertação de mestrado), (2012).

COHEN, K. O., LUCCAS, V., SOUSA, M. V., JACKIX, M. N. H. Processamento tecnológico das amêndoas de cacau e de cupuaçú. Belém: Embrapa Amazônia Oriental - EMBRAPA, 2003.

DA SILVA, Ivone. Enterobactérias na cadeia produtiva do cacau ao chocolate. Universidade Estadual, CAMPINAS. (Dissertação de mestrado), 2011.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3º ed. São Paulo: Varela, 2007.

DE ALMEIDA, Mariana. Produtos de Confeitaria: Investigação e desenvolvimento. Universidade, Porto, 2018.

DE ALMEIDA, Silvana. Isolamento e identificação bioquímica de bactérias acéticas durante a fermentação do cacau (*Theobroma cacao* L.). Universidade Federal, PA. (Dissertação de mestrado), 2013.

DE SOUZA, Gilberto., SOBRINHO, Roberto., BOZA, Yolanda., OLIVARES, Ygor., PACCES, Vitor Hugo. Validação de métodos para análise de alimentos: enfoque em análise centesimal. Editora: REMESP. Ed.1º. São Paulo, 2016.

DEUS, WALTER. Influência dos métodos de secagem nas propriedades antioxidantes de cacau (*Theobroma cacao* L.). Universidade Federal, BAHIA. (*Dissertação de mestrado*), 2015.

DE ARAÚJO, Miguel. Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado. Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande: Mato Grosso do Sul. (*Dissertação de mestrado*), 2015.

DE OLIVEIRA, Ingrid. “Avaliação e adequação do comportamento de gorduras equivalentes de manteiga de cacau para chocolates”. Universidade Estadual, CAMPINAS. (*Dissertação de mestrado*). 2013.

DIAS, Alberto. Sucessão microbiana durante a fermentação espontânea do cacau para a caracterização e isolamento de linhagens starter. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus: Bahia. (*Dissertação de mestrado*), 2016.

DOMINGUES, Elisa. Seleção de linhagens de leveduras pectinolíticas para fermentação de sementes de cacau (*Theobroma cacao*). ESALQ/USP: Piracicaba. (*Dissertação de mestrado*). 2010.

EFRAIM, P. GARCÍA, N. H. P., JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A., HADDAD, R. EBERLIN, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol.30, supl.1 Campinas May, 2010.

EFRAIM, P., TUCCI, M. L., GARCÍA, N. H. P. HADDAD, R., EBERLIN, M. N. *Teores de compostos fenólicos de sementes de cacau de diferentes genótipos. Revista Brazilian Journal of Food Technology.* 2006.

EFRAIM, Priscilla. Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate. Universidade Estadual, CAMPINAS. (*Dissertação de mestrado*), 2004.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - Parque Estação Biológica

- PqEB s/nº, conforme Lei no. 9.610. **Fungos**. acesso em Belém 12 de junho 2018: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CO\\_NTAG01\\_52\\_210200792814.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CO_NTAG01_52_210200792814.html).

ENGELHARDT, Bruna. Análise da secagem de amêndoas de cacau por convecção forçada a partir de diferentes secadores. Revista **Brazilian Journal of Production Engineering**, v.2, 2016.

FENNEMA, O. R., PARKIN, K. L., DAMODARAN, S. Química de Alimentos. Artimed. 4ª Ed. 2010.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. ENZIMAS: Natureza e ação nos alimentos. Nº 16. [www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com). 2011.

FLURKEY, Willian; JEN, Joseph., Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. Journal of Food Science, v.43, n.6, p. 1826-1831, 1978.

GAIO, Iloir. Avaliação da atividade e estabilidade de pectinases comerciais imobilizadas e submetidas ao tratamento com gás liquefeito de petróleo. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. (Dissertação de Doutorado), 2016.

GOMES, Jose Carlos. Análises Físico-Químicas De Alimentos. Universidade Federal de Viçosa: UFV. - pág 166, 2013.

GARCIA, S. V., MORETA, F. A. Optimización y aprovechamiento del residuo exudado del mucílago de la almendra fresca del cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN 51 En La Elaboracion de Vinagre. *Revista de Investigacion Científica*. 2013.

GUTIÉRREZ, L. A. U. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colômbia. 2007.

Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Edição: IV. Revista eletrônica eletrônica - 1ª edição, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos

físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976.

IMBERTI, R. M. Estudo da secagem artificial de amêndoas de cacau visando ao aproveitamento na indústria de chocolate: otimização estrutural do processo e eficiência energética. UFES. SÃO MATEUS – ES. 2017. (Dissertação de mestrado).

LEITE, Paula. Caracterização de chocolates provenientes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L resistentes a vassoura de bruxa Universidade Federal, BAHIA. (Dissertação de mestrado), 2012.

LLERENA, Willian Fabían. Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao *Theobroma cacao* L. Variedad Nacional y Variedad CCN51. UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCÍA. Equador, 2016.

LIMA, Urgel. Biotecnologia Industrial: **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. vol 3. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001.

MACHADO, Eduarda. Desenvolvimento e caracterização de cerveja artesanal com adição de cacau. Universidade Federal, Santa Maria: RS. (Dissertação de mestrado), 2017.

MENDOZA, Jorge Luis. "Obtencion de pectina a partir del exudado de cacao *Theobroma cacao* Sp. Universidad Nacional Agraria de La Selva, TINGO MARIA: PERU, 1997.

MIGLIARI, Patricia. Classificação das cepas de leveduras dominantes de processos fermentativos utilizando parâmetros fermentativos e taxonomia numérica Universidade Estadual, Campinas: São Paulo. (Dissertação de mestrado), 2001.

MARTINHO, Joana., DA SILVA, Nathália., DE SOUZA, Paula. Indústria de chocolate. Projetos da indústria de alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2012.

MARTINS, J. M., SANTOS, J. H. F., da SILVA, W. S., SILVA, V. B., DE ARRUDA, J. A. P., NASCIMENTO, J. A. R., DORTAS, L. C., FREITAS, A. J. A., RAMOS, A. A. Melhoria da Qualidade do Cacau. MAPA. CEPLAC. Itabuna, Bahia, Brasil, 2011.

MAKI, Cristina. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). Catálogo. Universidade de São Paulo: Piracicaba. (Doctoral dissertation), 2006.

NELSON, David E COX, Michael. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NESPOLO, C. R., PINTO, F. S. T., OLIVERA, F. C. **Práticas em Tecnologia de Alimentos**. Editora: Artmed, 2015.

NOGUEIRA, Bruna. **Processamento do cacau: avaliação do teor nutricional do chocolate e dos outros derivados do cacau**. Universidade de São Paulo: Lorena, 2015.

OLIVEIRA, Marcos. *Seleção de leveduras pectinolíticas para melhoria da fermentação do cacau*. Universidade de São Paulo: Piracicaba. (Dissertação de mestrado), 2015.

OETTERER, M.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Fundamentos de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Barueri: Manole, 2006. 612 p.

PALUDO, Michelly.; KRÜGER, Roberta. Ação da enzima pectinase na extração do suco de jabuticaba. Arq. **Ciênc. Saúde UNIPAR, Umuarama**, v. 15, n. 3, p. 279-286, set./dez, 2011.

PAZ, Janai Cristiane. *Caracterização bioquímica da polifenoloxidase e da peroxidase de ameixa rubimel, polpa de cacau e estudo do efeito de agentes anti-escurecimento*. Universidade Estadual, Campinas : SP. (Dissertação de doutorado). 2010.

PETRILLI, Aline. Efeito dos compostos fenólicos do cacau e chá mate no perfil inflamatório de indivíduos com HIV/aids em terapia antirretroviral. Universidade de São Paulo. (Dissertação de mestrado), 2015.

PEREIRA, Ivan. Viabilidade da utilização da casca de cacau como combustível no aquecimento de ar para secagem de amêndoas de cacau. Universidade Federal, VIÇOSA: MINAS GERAIS. (Doctor Scientiae), 2013.

PIMENTEL, Alexandre. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES FENÓLICOS DE NIBS E CHOCOLATE DE VARIEDADES CLONAIAS DE CACAUEIRO. Universidade Estadual do Sudoeste,

ITAPETINGA: BAHIA. (Magister Scientiae), 2016.

PINTO, Luciana., MARTINS, Meire., RESENDE, Eder, THIÈBAUT, José., MARTINS, Marco Antônio. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS PECTINA METILESTERASE E  $\beta$ -GALACTOSIDASE EM MAMÕES cv. GOLDEN ARMAZENADOS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal** - SP, v. 35, n. 1, p. 015-022, Março, 2013.

PRADO, Flávera. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de bebida probiótica à base de água de coco. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. (Dissertação de doutorado), 2007.

RAMÔA JÚNIOR, A. G. A. Comportamento cinético de compostos polifenólicos e enzimas oxidativas na fermentação de cacau da Amazônia. Universidade Federal, PARÁ. (Dissertação de mestrado), 2011.

RIPPER, Beatriz. Efeito da torrefação sobre a composição química das melanoidinas do café por clae-dad-em e rmn e sua relação com a atividade antioxidante da bebida . Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Dissertação de mestrado), 2015.

RIBEIRO, Margareth. Avaliação do 5-hidroxiacetilfurfural como produto de reação de maillard durante o processo de torração de amêndoas de cacau Theobroma cacao L. Universidade Federal, Bahia. (Dissertação de Mestrado), 2014.

RUFINO, M. do S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., DE MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. de G., JIMÉNEZ, J. P., CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. Fortaleza: Embrapa Amazônia Oriental - EMBRAPA, 2007.

SALVADOR, Izabela. Atividade antioxidante e teor de resveratrol em cacau, chocolates, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas. Universidade de São Paulo: Piracicaba. (Dissertação de mestrado), 2011.

SANTI, Lucélia. PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PREPARADOS PECTINOLÍTICOS PRODUZIDOS POR *Penicilliumoxalicum* UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre. (Dissertação de mestrado), 2005.

SAKHAROV, I.Y.; ARDILA, G.B., Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying. **Food Chemistry**, v.65, p.51-54, 1999.

Sbravatti Junior, J. A., AUER, C. G., PIMENTEL, I. C., SANTOS, Á. F., SCHULTZ, B. SELEÇÃO IN VITRO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. FLORESTA, Curitiba, PR, v. 43, n. 1, p. 145 - 152, jan./mar. 2013.

SERRA, J. L., MOUCHRECK, A. N., ROGEZ, H., DARNET, S. Quantificação de leveduras associadas a fermentação de cacau no estado do Pará. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. UFRGS. Porto Alegre - RS. Q, 2016.

SANTOS, C. C. Influência dos processos de fermentação e secagem no teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de amêndoas de cacau amazônico (*Theobroma cacao* var. *Forasteiro*). UFPA. Belém-PA. (Dissertação de mestrado), 2013.

SANTOS, D. S. Inoculação de leveduras start na fermentação do cacau para melhoria do *flavor*. UESC, IHÉUS - Bahia. (Dissertação de mestrado), 2010.

SHIBAO, J., BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. Rev. Nutr., Campinas, 24(6):895-904, nov./dez., 2011.

SILVA, C. F., dos REIS, K. C., LOPES, N. A., DIAS, M., BATISTA, L. R., SCHWAN, R. F. Potencial enzimático e antagonista de bactérias isoladas de fruto típico do Cerrado em Minas Gerais, Brasil. **Acta Sci., Agron.** vol. 37 no.3 Maringá July/Sept, 2015.

SILVA, R. R.; BOCHI, N.; ROCHA FILHO, R. C., MACHADO, P. F. L. **Introdução à Química Experimental**. Ed: 2º. Editora: UFSCAR, 2014.

SOUZA, M. L., PASSAMANI, F. R. F., ÁVILA, C. L. S Use of wild yeasts as a biocontrol agent against toxigenic fungi and OTA production. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 39, n. 3, p. 349-358, July-Sept, 2017.

SKOOG, D. A.; WEST D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de**

**química analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learnin, 1068 p, 2015.

SOUZA, Marcelo Dias de., OTÁVIO, P. F., CALDEIRA, S. F., DORVAL, A., SOUSA, N. J. Desenvolvimento *in vitro* do fungo simbionte de *Atta sexdensrubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: *Formicidae*) em meio de cultura com diferentes extratos vegetais. *Cienc.Rural* [online]. 2012, vol.42, n.9, pp.1603-1609. Epub July 19, 2012.

SILVA, A. B. Efeitos da inoculação de bactérias endofíticas em cacau: Promoção de crescimento e aumento da resistência à podridão-parda. Ilhéus – BAHIA. (Dissertação de mestrado), 2010.

SILVA, A. F., Pinto, J. M., França, C. R. R. S., Fernandes, S. C., GOMES, T. D. A., da SILVA, M. S. L., & ANB, M. Preparo e uso de biofertilizantes líquidos. *Embrapa Semi-Árido. Comunicado técnico*, 2007.

SILVA, M. C. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate USP, Piracicaba -São Paulo. (Dissertação de mestrado)., 2002.

UCKO, D. *A Química Para Ciências da Saúde uma introdução à química geral e biológica* (Segunda Edição). Manole., 1992.

VIEIRA, D. G.; SILVA, R. M.; SILVA, O. F.; FONSECA, M. J. O.; SOARES, A. G.; COSTA, R. A. Crescimento *in vitro* de fungos (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Cladosporium cladosporioides*) isolados de frutos do mamoeiro, sob atmosfera controlada e refrigeração. *Rev. Bras. Frutic.* vol.28 no.3 Jaboticabal Dec., 2006.

WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. Ed (6°). Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. pg 289, 1058, 2014.

<https://g1.globo.com/pa/para/noticia/2019/04/20/lider-nacional-na-producao-de-cacau-para-ainda-nao-e-reconhecido-pelo-chocolate-que-produz.ghtml>. Acesso em: 28/102019.

## ANEXOS



Universidade do Estado do Pará  
Centro de Ciências Naturais e Tecnologia  
Curso de Tecnologia de Alimentos  
Travessa Enéas Pinheiro, 2626 – Marco  
66095-490. Belém – PA