



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA

YNARA DA COSTA FONSECA

**DIVERSIDADE FUNCIONAL MICROBIANA DURANTE O PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO DE CACAU**

BELÉM

2023

YNARA DA COSTA FONSECA

**DIVERSIDADE FUNCIONAL MICROBIANA DURANTE O PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO DE CACAU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, para obtenção de título de mestre.

Área de Concentração: Biotecnologia aplicada ao metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Rafael Borges da Silva Valadares

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Luiza Helena da Silva Martins.

BELÉM

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F676d Fonseca, Ynara da Costa
Diversidade funcional microbiana durante o processo de fermentação de cacau /
Ynara da Costa Fonseca. - 2023.
79 f. : il. color.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Borges da Silva
Valadares Coorientador: Profa. Dra. Luiza Helena
da Silva Martins.

1. Cacau. 2. Fermentação espontânea. 3. Metaproteômica. 4. Metabarcoding. I.
Valadares, Rafael Borges da Silva, *orient.* II. Título

CDD 576.1192

YNARA DA COSTA FONSECA

DIVERSIDADE FUNCIONAL MICROBIANA DURANTE O PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO DE CACAU

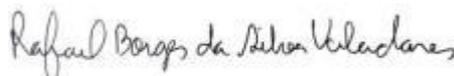
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, para obtenção de título de mestre.

Orientador: Dr. Rafael Borges da Silva Valadares
Coorientadora: Dra. Luiza Helena da Silva Martins

24/02/2023

Data de Aprovação

BANCA EXAMINADORA:



Orientador

Prof. Dr. Rafael Borges da Silva Valadares
(Instituto Tecnológico Vale)

Documento assinado digitalmente



Luiza Helena da Silva Martins
Data: 26/03/2023 19:12:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientadora

Prof^a. Dr^a. Luiza Helena da Silva Martins
(Universidade Federal Rural da Amazônia)

Documento assinado digitalmente



MARCUS DE BARROS BRAGA
Data: 26/03/2023 16:14:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro 1

Prof. Dr. Marcus de Barros Braga
(Universidade Federal Rural da Amazônia)



Dr. Jocinei Dognini

(Instituto SENAI de Tecnologia em Química e Meio Ambiente- Blumenau)



GILSON CELSO ALBUQUERQUE CHAGAS JU
Data: 25/03/2023 18:19:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro 3

Dr. Gilson Celso Albuquerque Chagas Junior
(Superintendência do Desenvolvimento da Amazônia - SUDAM)

Suplente

Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira
(Universidade Federal do Pará)

À minha bisavó Raimunda Mônica Coelho
Simões (*in memoriam*), a primeira a me
ensinar o valor do cacau amazônico com
tanto carinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter permitido que eu pudesse viver todos os momentos até aqui e pelo grande aprendizado que vivo todos os dias.

Agradeço a minha família por todo o suporte ao longo de toda minha jornada, por sempre me incentivarem nos estudos e acreditarem no meu potencial desde o jardim quando pintava os elefantes tudo coloridos, por nunca duvidarem da minha capacidade, por me educarem com princípios que valorizo tanto, por serem minha base e refúgio em todos os momentos e por todo o empenho, em especial nestes últimos dois anos para que eu concluísse esta tão sonhada etapa, mãe, avó e irmã, essa conquista é nossa. Amo vocês.

Obrigado, prof., Dr. Rafael Valadares por acreditar nesse projeto e a sua equipe do Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável pela realização do mesmo.

Obrigada, prof., Dr^a. Luiza Martins, por ter sido minha coorientadora, pelo apoio e incentivo desde a primeira vez que a conheci, pelas palavras de carinho ao longo desta trajetória e por me apresentar o LABIOTEC e o LaHiBio da UFPA.

Deixo um agradecimento especial a prof^a Dr^a. Alessandra Lopes e a M.a Evelyn Konagano por disporem da matéria-prima para realização deste projeto, além do carinho e conhecimento compartilhado.

Deixo outro agradecimento especial ao “mi amigo” Dr. Hector Herrera, pela paciência e por todos os ensinamentos compartilhados sobre metaprôteomica.

Agradeço aos profs Dr. Nelson Rosa e Dr. Johnatt Allan por me acolherem com tanto carinho em seus laboratórios, pelas conversas, pelos ensinamentos e por acreditarem no meu potencial.

Ao LABIOTEC por ter sido mais que um laboratório, por ter sido minha casa e refúgio em tantos momentos, e por tudo o que pude aprender nesse 1 ano e 2 meses. E agradeço à equipe deste laboratório, por terem me acolhido com tanto amor e carinho desde o meu primeiro dia, Jardilene Moura, Danusa Costa, Celina Bahule, Lucely Santos, Fernanda Durans, Jonilson Melo, Amanda Sousa, Ana Clara Batista, Lucas Mascarenhas, Larissa Alves, Eliane Oliveira, Kalebe Furtado, Alana Maciel, Alberto Neto, vocês foram minha base neste laboratório, pude aprender muito com cada um, agradeço por todo carinho que recebi, por todas as risadas e momentos bons que vivi com cada um, me auxiliaram a me tornar uma profissional melhor. Levarei seus ensinamentos, carinho e respeito para sempre.

Mas agradeço em especial a Celina Bahule por ter sido minha amiga, mãe e professora, por ter me ensinado a mexer no espectrofotômetro e tantas outras coisas e a

Lucely Santos por ter sido umas das melhores amigas para mim, sempre com uma palavra de conforto, um sorriso e um artigo para mim, vocês foram anjos na minha vida.

O meu muito obrigada, amor e carinho à equipe do LaHiBio, que me acolheram como uma grande amiga e mentora, agradeço por tantos momentos bons, risadas e conhecimento compartilhado, guardarei estes momentos com muito carinho, Lucas Figueiredo, Ana Carolina Crispino, Gabriela Pantoja, Jaqueline Teixeira, Moisés Lima e Eva Rodrigues espero levar a amizade de vocês por muito tempo.

Agradeço em especial as meninas do mestrado de engenharia química, Bianca Figueiredo obrigada por sempre ser esse doce de pessoa e por sempre permitir a utilização da centrífuga e a Sara Caroline por ser esse ser iluminado, ser essa amiga incrível, parceira, que sempre me faz rir com suas brincadeiras e por ser uma das minhas inspirações.

Agradeço aos alunos de PIBIC que me auxiliaram, vocês foram essências para mim, Magally Gonçalves, William Pantoja, Shirley Pinheiro, Eliziane Pantoja, Matheus Pinheiro, Sandro Almada e Gabriel Henriques me senti extremamente honrada em poder compartilhar meus conhecimentos com vocês, obrigada aos momentos vividos com cada um, pelas conversas, carinho e por acreditarem verdadeiramente no meu potencial, vocês sempre serão meus nenés.

À Magally Gonçalves e ao William Pantoja, um simples obrigado seria pouco para agradecer por todo o apoio, ajuda e carinho nos momentos que mais precisei neste período do mestrado, agradeço pela amizade verdadeira, pelas vezes que me fizeram rir quando queria chorar, pelas conversas, pelos abraços, pelos lanches, pelos puxões de orelha, pelas aventuras e por tudo o que vivemos na UFPA, vocês têm a minha eterna gratidão.

Gostaria também de demonstrar a minha gratidão a minha turma do mestrado, vocês foram a turma mais unida que tive a oportunidade de participar, e a mais gentil, torço pelo sucesso de cada um. Mas em especial agradeço a Sayure Raad, minha amiga, companheira e uma verdadeira irmã no constante aprendizado da proteômica, pelas palavras gentis e de incentivo quando precisei e pelo seu carinho genuíno comigo. Agradeço ao Erick Santos e ao Frank Lima, pelo carinho, companheirismo, incentivo e preocupação, vocês são muito especiais para mim.

Agradeço as secretarias do programa de pós-graduação, Lene e Val por todo carinho e paciência em sanarem todas as minhas dúvidas nesse período do mestrado.

Agradeço também aos meus irmãos de vida, Flaviana Oliveira e Marvin Garcia por sempre me apoiarem, incentivarem e estarem ao meu lado, vocês são anjos na minha vida e sempre será vocês por mim e eu por vocês.

RESUMO

Theobroma cacao (cacau), uma fruta amplamente cultivada no Brasil, é um componente essencial da bioeconomia amazônica. Uma etapa crucial na produção de cacau é a fermentação espontânea, na qual a atividade microbiana é vital para a produção de chocolate. No entanto, a diversidade de microrganismos ativos e seu papel atrelados as proteínas expressas pelos mesmos, nos atributos finais do chocolate é principalmente desconhecida. Este estudo avaliou a abundância relativa de bactérias e fungos e a diversidade de proteínas expressas por tais microrganismos em diferentes estágios de fermentação espontânea de grãos de cacau usando uma abordagem combinada de metabarcoding e metaproteômica. Os resultados do metabarcoding mostraram que *Saccharomyces*, *Torulospora*, *Weissella*, *Lactobacillus* e *Acetobacter* foram os gêneros mais abundantes detectados durante os seis dias de fermentação espontânea ocorrida em um município paraense que tem forte apelo econômico para a região e para a cultura do cacau. A diversidade de proteínas foi dinâmica ao longo do processo, pois a maior identificação de proteínas atribuídas a *T. cacao* e leveduras ocorreu nas primeiras etapas (T0 - T3) da fermentação. Em contraste, as proteínas atribuídas às bactérias foram mais abundantes nos estágios avançados (T4 - T7). No entanto, foram detectadas mudanças significativas nos táxons ativos ao longo dos dias, através da fermentação, onde além dos gêneros bem conhecidos envolvidos na fermentação (*Saccharomyces*, *Lactobacillus* e *Acetobacter*), alguns novos táxons microbianos pareciam ativos durante o processo, incluindo bactérias (*Ferruginibacter sp.*, *Dongia mobilis*, *Inquilinus spp.*, *Microvirga spp.*, *Rummeliibacillus spp.* e *Sphingopyxis spp.*), fungos semelhantes a leveduras (*Cyphellophora europaea*) e fungos filamentosos (*Acremonium chrysogenum*, *Ashbya gossypii*, *Candolleomyces aberdarensi*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Psathyrella spp.*). Esses resultados indicam uma mudança na abundância relativa de proteínas nas diferentes etapas, denotando que diversos microrganismos participam da fermentação espontânea, e sua atividade varia ao longo do processo. Esses resultados abrem oportunidades para pesquisas futuras que conectem o metabolismo microbiano à qualidade final do chocolate.

Palavras-chave: Bactérias. Cacau. Fermentação Espontânea. Metabarcoding, Proteômica.

ABSTRACT

Theobroma cacao (cocoa), a widely cultivated fruit in Brazil, is an essential component of the Amazonian bioeconomy. A crucial step in cocoa production is spontaneous fermentation, in which microbial activity is vital for chocolate production. However, the diversity of active microorganisms and their role linked to the proteins expressed by them in the final attributes of chocolate is mostly unknown. This study evaluated the relative abundance of bacteria and fungi and the diversity of proteins expressed by such microorganisms at different spontaneous fermentation stages of *cocoa* grains using a combined metabarcoding and metaproteomic approach. The metabarcoding results showed that *Saccharomyces*, *Torulospora*, *Weissella*, *Lactobacillus*, and *Acetobacter* were the more abundant genera detected through the six days of spontaneous fermentation occurred in a municipality in Pará that has a strong economic appeal for the region and for the cocoa culture. The diversity of proteins was dynamic throughout the process, as the higher identification of proteins assigned to *T. cacao* and yeasts was in the first stages (T0 - T3) of fermentation. In contrast, proteins assigned to bacteria were more abundant in advanced stages (T4 - T7). However, changes in active taxa were detected over days throughout fermentation, where of the well-known genera involved in fermentation (e.g. *Saccharomyces*, *Lactobacillus* and *Acetobacter*), some new taxa resident microbes beyond the process, including bacteria (*Ferruginibacter* sp., *Dongia mobilis*, *Inquilinus* spp., *Microvirga* spp., *Rummeliibacillus* spp., and *Sphingopyxis* spp.), yeast-like fungi (*Cyphellophora europaea*) and filamentous fungi (e.g., *Acremonium chrysogenum*, *Ashbya gossypii*, *Candolleomyces aberdarensi*, *Lasiodiplodia theobromae* and *Psathyrella* spp.). These results indicate a change in the relative abundance of proteins in the different stages, denoting that diverse microorganism participate in spontaneous fermentation, and their activity varies through the process. These results open opportunities for future research to connect microbial metabolism to the final quality of chocolate

Keywords: Bacterium. Cocoa. Spontaneous Fermentation. Metabarcoding. Proteomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cacaueiro (<i>Theobroma cacao</i>).....	21
Figura 2 - Cacau	22
Figura 3 - Amêndoa do cacau sem polpa	23
Figura 4 - Revolvimento das sementes no período de 72 horas de fermentação.....	24
Figura 5 - Dinâmica das comunidades microbianas (a), degradação do substrato e cinética de produção de metabólitos (b) de um processo de fermentação de grãos de cacau.....	27
Figura 6 - Formação de precursores de sabor do cacau, através de aminoácidos livres hidrofóbicos durante o processo de fermentação do cacau.	28
Figura 7 - Teste de Eigenvalue dos parâmetros de físico-química analisados durante o processo de fermentação do cacau.....	42
Figura 8 - Análise multivariada de PCA dos parâmetros de físico-química analisados durante o processo de fermentação do cacau.....	43
Figura 9 - Abundância relativa no nível de filo das principais sequências de rRNA (A) fúngica 18S e bacteriana 16S rRNA (B) obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 do estágio de fermentação espontânea	45
Figura 10 - Abundância relativa no nível do gênero das principais sequências de rRNA (A) fúngica 18S e bacteriana 16S rRNA (B) obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 do estágio de fermentação espontânea.....	45
Figura 11 - Índices de diversidade de Shannon e Simpson de sequências fúngicas de rRNA (A) e 16S rRNA (B) bacterianas obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 do estágio de fermentação espontânea	46
Figura 12 - Abundância relativa de peptídeos totais atribuídos a bactérias, leveduras e fungos filamentosos nos grãos de cacau nos dias 1 a 7 no estágio de fermentação espontânea	49
Figura 13 - Abundância relativa de peptídeos no nível de filo espontânea. fúngico (A) e bacteriano (B) obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 do estágio de fermentação	50
Figura 14 - Abundância relativa dos peptídeos no nível do gênero das principais sequências fúngicas (A) e bacteriana (B) obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 no estágio de fermentação	51
Figura 15 - Categorização funcional de peptídeos em termos de GO processo biológico (A) e número CE (B) através da fermentação espontânea de sementes de cacau.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Detalhamento dos primers bacteriano e fúngico, utilizados na PCR	33
Tabela 2 - Valores do teste de acidez total titulável (mEqNaOH/100g)	40
Tabela 3 - Valores do teste de Tukey para açúcares redutores totais.....	41
Tabela 4 - Abundância relativa de sequências de microrganismos identificadas no estágio de fermentação de cacau (dia 1 a dia 7). Valores expressos como percentagem.	44
Tabela 5 - Atividade dos microrganismos ativos identificados com proteômica e relação das notas de sabor e aroma	57

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Etapas da metodologia da análise de Metabarcoding.....	32
Esquema 2 - Etapas da metodologia da análise de Metaproteômica	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNS	Ácido Dinitrosalicílico
TFA	Ácido Trifluoroacético
ART	Açúcares Redutores Totais
ATT	Acidez Total Titulável
HCA	Análise de Agrupamento
PCA	Análise de Componentes Principais
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa
HPLC	Cromatografia Líquida de Ultra-Desempenho
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Dithiothreitol
CE	Enzymatic Committee
PSMs	Espectro de Peptídeos
GO	Gene Ontology
IAA	Iodoacetamida
IQC	Índice de Qualidade do Cacau
ITS	Internal Transcribed Spacer
ITV	Instituto Tecnológico Vale
LCA	Lowest Common Ancestor
LABIOTEC	Laboratório de Processos Biotecnológicos
NCBI	National Center of Biotechnoly Information
PA	Pará

pmol	Picomol
PIMBA	Pipeline for MetaBarcoding Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLGS	Proteinlynx Global Server
pH	Potencial Hidrogênionico
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
Rpm	Rotações por minuto
Sp	Species
Spp	Subspecies
SDS	Sulfato de Dodecil de Sódio
OTUs	Taxonomias Operacionais
<i>T. cacao</i>	<i>Theobroma cacao</i>
UFPA	Universidade Federal do Pará

LISTA DE SÍMBOLOS

HCl	Ácido clorídrico
H₂O	Água
Cm	Centímetro (s)
CaCl₂	Cloreto de cálcio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
CO₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
G	Gramma (s)
°C	Grau (s) Celsius
°	Grau (s)
H	Hora (s)
L	Litro (s)
-	Menos
M	Metro (s)
µg	Micrograma (s)
µl	Microlitro (s)
Mg	Miligrama (s)
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
'	Minuto (s)
min	Minuto (s)
M	Molar
Ng	Nanograma (s)
N	Normal
nM	Nanômetro
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
Kg	Quilograma (s)
”	Segundo (s)
S	Segundo (s)
S	South
v/v	Volume by volume

w/v

Weight by volume

W

West

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 O Cacau	21
3.2 Fermentação	23
3.3 Metaproteômica	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Fermentação e coleta de grãos de cacau	31
4.2 Métodos	31
4.2.1 Análises físico-química	31
4.2.2 Metabarcoding	32
4.2.2.1 Diversidade microbiana	33
4.2.2.1.1 Extração de DNA	33
4.2.2.1.2 Sequência Gênica 16S rRNA e 18S rRNA	33
4.2.3 Perfil metaproteômico	35
4.2.3.1 Extração de proteínas	36
4.2.3.2 Digestão de proteínas e dessalinização de amostras	37
4.2.3.3 Identificação de proteínas e análise de dados	37
4.3 Análise de dados	39
4.3.1 Análises físico-químicas	39
4.3.2 Metabarcoding e metaproteômica	39
5. RESULTADOS	40
5.1 Físico-química	40
5.2 Análise de Componentes Principais (PCA)	42
5.3 Metabarcoding fúngico e bacteriano	44
5.4 Metaproteômica	49
6. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

Theobroma cacao L. (cacau) é uma árvore frutífera tropical nativa cultivada na Ásia, África e América do Sul em áreas conhecidas como cinturão do cacau (DA SILVA *et al.*, 2016; WAHYUNI *et al.*, 2021). O Brasil é o maior produtor de cacau da América do Sul, com uma estimativa de 239.400 toneladas secas, correspondendo a quase 5% da produção mundial de cacau (ANDERS, 2020; GATEAU-REY *et al.*, 2018; ICCO, 2020). No norte do Brasil, a produção de cacau está concentrada principalmente nos estados do Pará, Rondônia e Amazonas (CUNHA, 2018; MENDONÇA *et al.*, 2019). O estado do Pará tem recebido atenção significativa desde que passou a ser o maior produtor do país, com uma produção média de 911 kg de amêndoas de cacau por hectare, convertendo o cacau na segunda maior *commodity* da bioeconomia paraense (ANDERS, 2020). Hoje, a produção de cacau é desafiadora, pois as plantações enfrentam estresses ambientais, que podem afetar a qualidade dos frutos e, portanto, a característica sensorial final do chocolate (LAHIVE *et al.*, 2019). Conhecer a diversidade microbiana associada à cadeia produtiva e as enzimas ativas por meio da fermentação é essencial para o reconhecimento de microrganismos ativos durante o processamento dos grãos de cacau.

Embora seja bem conhecido que microrganismos críticos estão envolvidos na fermentação do cacau, outros fatores como o componente microbiológico associado às sementes de chocolate, o processo de produção, o solo e fatores ambientais podem modificar a diversidade microbiana ao longo da fermentação (CHETCHIK *et al.*, 2017; BASTOS *et al.*, 2018). Portanto, é necessário conhecer a diversidade de microrganismos associados à produção local de cacau em diferentes condições ou locais. Além disso, a análise de proteínas diferencialmente expressas ao longo do tempo pode revelar aspectos críticos da atividade de microrganismos durante a fermentação, que podem influenciar na qualidade final do chocolate. “em outras palavras, alguns micróbios podem estar diretamente ligados a sabores especiais que conferem a cada chocolate de diferentes regiões (ou produtores) suas qualidades únicas.

Apesar de evidências científicas que analisam a mudança na diversidade microbiana em diferentes estágios de fermentação serem comumente relatadas, as

informações sobre microrganismos ativos na fermentação ainda são limitadas (SCHWAN *et al.*, 2004; ILLEGHEMS *et al.*, 2015). Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade e a atividade de microrganismos na fermentação espontânea usando uma abordagem combinada de metabarcoding e metaproteômica. A identificação da diversidade microbiana e das proteínas abrirá oportunidades para pesquisas futuras que conectem o metabolismo microbiano à qualidade final e às características sensoriais do chocolate.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Demonstrar as alterações sofridas pelas comunidades microbianas durante o processo fermentativo do cacau (*Theobroma cacao* L.).

2.2 Objetivos Específicos

- Obter a diversidade de microrganismos presentes ao longo do processo de fermentação do cacau utilizando sequencias das regiões 16S bacteriana e ITS fúngico;
- Identificar as proteínas expressas pelos microrganismos durante a fermentação do cacau através da metaproteômica.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O Cacau

Os cacaueiros (*Theobroma cacao*) (Figura 1) possuem altura mediana, ramificações proeminentes, folhas longas e pendentes, as quais podem atingir até 35 cm de comprimento, suas flores (brancas, amarelas ou róseas) são reunidas em grupos que surgem no caule, são hermafroditas e se desenvolvem no tronco ou nos ramos lenhosos, a flor abre 20 a 25 dias após o aparecimento de um pequeno botão floral, nas almofadas florais, de onde se desenvolvem e formam os frutos (FARREL *et al.*, 2018; LAHIVE *et al.*, 2019).

Figura 1 - Cacaueiro (*Theobroma cacao*)



Fonte: Autora (2022)

Os frutos ou vagens (Figura 2) são bagas indeiscentes com comprimento entre 15 a 20 cm do eixo maior, e que variam no seu formato, espessura, cor, tamanho e aspereza, dependendo de sua origem genética, em relação ao formato observa-se que alguns frutos são lisos e redondos, enquanto, outros possuem sulcos profundos, no

processo de amadurecimento do fruto ocorre mudanças na coloração, na sua fase imatura observa-se uma gama de formas e cores de tamanhos, podendo apresentar tons variados de verdes, avermelhados e marrons, no seu estágio maduro os tons variam de amarelo, marrom-amarelado a avermelhado-alaranjado (THI *et al.*, 2016).

Figura 2- Cacau



Fonte: Autora (2022)

Sua casca externa, denominado exocarpo, possui entre as suas funções a de proteção e de um ovário, contribuindo com 70% do peso total do fruto, seguido por uma camada ligeiramente lenhosa chamada mesocarpo e, finalmente, o endocarpo que envolve as sementes (RAMSEY, 2016).

As quais possuem forma que varia de elipsoide a ovoide, com 2 a 3cm de comprimento e estão organizadas em fileiras, em torno de um eixo central denominado placenta, e estão recobertas pela polpa branca, macia com tons rosados, uma mucilagem rica em açúcares fermentáveis, como a glicose, frutose e sacarose, e possui baixo pH (3.0-3.5), sendo o meio propício para o processo fermentativo deste fruto (Figura 3) (BECKETT, 2009; MAPA, 2020).

A amêndoa de cacau (Figura 3) após seca e fermentada é utilizada na fabricação de chocolate nas suas diversas formas, também dela se extrai a manteiga de cacau, a qual é utilizada na indústria farmacológica e na fabricação de cosméticos, por isso, as amêndoas são o principal produto comercializado do cacau (MAPA,

2020).

Figura 3- Amêndoa do cacau sem polpa



Fonte: Autora (2022)

3.2 Fermentação

Para ocorrer o processo de fermentação do cacau é necessário ocorrer o pré-processamento das amêndoas, pois nesta fase há o início de importantes transformações físicas e bioquímicas que contribuem para o desenvolvimento do sabor, aroma e cor característicos do chocolate (ALBERTINI *et al.*, 2015).

Durante este processo importantes fatores internos e externos devem ser considerados, por influenciarem a fermentação, os internos são: temperatura da massa em fermentação; microflora presente no meio; pH e acidez do cotilédone; e os externos são: sistema de fermentação (caixa de madeira, cesto, monte ou saco), temperatura e umidade ambiente; tempo de fermentação; revolvimento da massa, entre outros (LIMA *et al.*, 2011; SCHWAN; WHEALS, 2004).

Dentre os sistemas mais utilizados na fermentação são cestos e caixas de madeira, estes são conhecidos como cochos de fermentação, além de serem os mais utilizados. As caixas devem possuir divisórias removíveis, com a finalidade de facilitar o revolvimento da massa em fermentação, as dimensões dos cochos devem

varia de 0,90 a 1,20 m de largura, 0,90 a 1,00 m de altura e 2,00 a 6,00m de comprimento, o fundo deve possuir frestas com aproximadamente 0,5 cm, espaçados de 15 em 15 cm, para ocorrer a drenagem dos líquidos liberados durante a fermentação (MARTINS *et al.*, 2011).

O processo fermentativo deve ocorrer no período de cinco a sete dias, onde um tempo inferior a cinco dias resulta em sementes mal fermentadas (ou não fermentadas) e um período superior a sete dias resulta em um cacau de coloração escura e com odores de matérias em putrefação. Ainda, no processo a massa normalmente é coberta com folhas de bananeira, no intuito de diminuir a perda de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial de sementes, o uso das folhas de bananeira se dá devido a mesma atuar propiciando uma inoculação dos micro-organismos existentes na superfície da folha (DE VUYST; STEFAN, 2018; MARTINS *et al.*, 2011).

A massa de sementes deve ser revolvida ao longo dos dias de fermentação (Figura 5), na qual normalmente se dá a partir das 48h após o início do processo (SCHWAN; FLEET, 2014). Após o primeiro revolvimento, a massa é submetida a esse procedimento em intervalos de 24h (MARTINS *et al.*, 2011; SCHWAN; WHEALS, 2004). Esse processo é importante para que haja a aeração das sementes, o que controla o nível de acidez, temperatura da massa e influencia na atividade enzimática, a qual é importante para o desenvolvimento do sabor e aroma das amêndoas de cacau (JINAP; NAZAMID; JAMILAH, 2002).

Figura 4- Revolvimento das sementes no período de 72 horas de fermentação.



Fonte: Autora (2022)

Destaca-se a importância dos microrganismos ao longo do processo fermentativo, pois estes são responsáveis pela fermentação bem-sucedida da polpa de cacau, com a presença de: fungos filamentosos, leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas (Figura 6a) (ARDHANA; FLEET, 2003; HO; ZHAO; FLEET, 2015).

Contudo estes microrganismos dependem de fatores físico-químicos já citados, para que ocorra todas as transformações químicas e bioquímicas durante o processo. Com isso, a fermentação da massa de cacau é dividida em duas fases: anaeróbica e aeróbica, respetivamente (SCHWAN; PEREIRA; FLEET, 2014).

A fase anaeróbica ocorre nas primeiras 48h de fermentação, com a presença de leveduras e bactérias lácticas, contudo as leveduras são predominantes, sendo responsáveis pela liquefação da polpa das sementes de cacau através da atividade pectinolítica, devido a redução da viscosidade da polpa, ocorre a entrada de ar no

sistema (HO; ZHAO; FLEET, 2014).

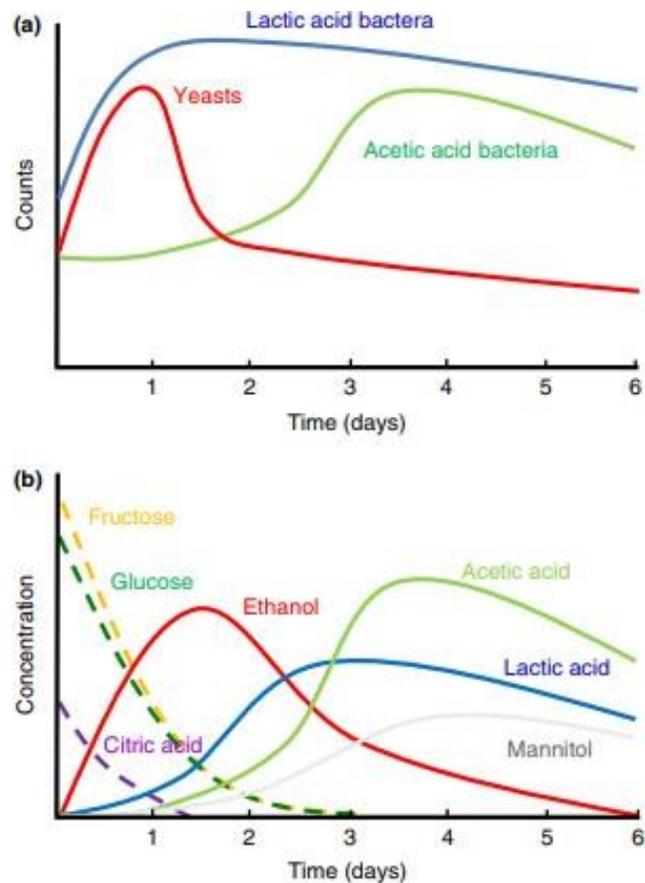
Além de metabolizarem a glicose e frutose para produzir etanol como produto primário, através de uma reação exotérmica, o que ocasiona o aumento de temperatura na massa de fermentação para 35-40°C, dióxido de carbono (CO_2) e glicerol como produtos secundários (Figura 6b) (DE VUYST; PAPALEXANDRATOU *et al.*, 2011; DE VUYST; WECKX, 2016; HAMDUCHE *et al.*, 2019).

Ainda durante a fase anaeróbica, nas primeiras 24h da fermentação, o ácido cítrico é utilizado como co-substrato por bactérias lácticas citrato-positivas, onde é convertido em ácido láctico ou ácido acético e/ou compostos aromáticos do metabolismo do piruvato, como diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol (Figura 6b), causando ligeiro aumento no pH da polpa, o que favorece o crescimento bacteriano (MOENS *et al.*, 2014).

Contudo devido ao aumento do etanol produzido pelas leveduras e fungos filamentosos, a elevação da temperatura e o declínio de fontes de energia, ocorre o decrescimento das bactérias lácticas durante o restante da fermentação, a partir do terceiro dia até final do processo fermentativo (SCHWAN; WHEALS, 2004; OUATTARA *et al.*, 2017). Consequentemente, ocorre a maior entrada de ar na massa de fermentação, durante as primeiras 24 horas do processo, ocasionando o crescimento de bactérias, como as lácticas e acéticas, em torno das 24-72h de fermentação (SCHWAN; WHEALS, 2004).

A fase aeróbica ocorre a partir das 48 horas, em consequência da entrada de ar no sistema, as bactérias acéticas predominam no processo fermentativo, e são responsáveis pela oxidação do etanol produzido pelas leveduras em ácido acético, e o ácido láctico produzido pelas bactérias lácticas em ácido acético e acetoína (ADLE *et al.*, 2014), ocasionando em uma ligeira diminuição do pH da massa de fermentação, posteriormente o ácido acético é oxidado em CO_2 e água (Figura 6b) (CAMU *et al.*, 2007).

Figura 5- Dinâmica das comunidades microbianas (a), degradação do substrato e cinética de produção de metabólitos (b) de um processo de fermentação de grãos de cacau.



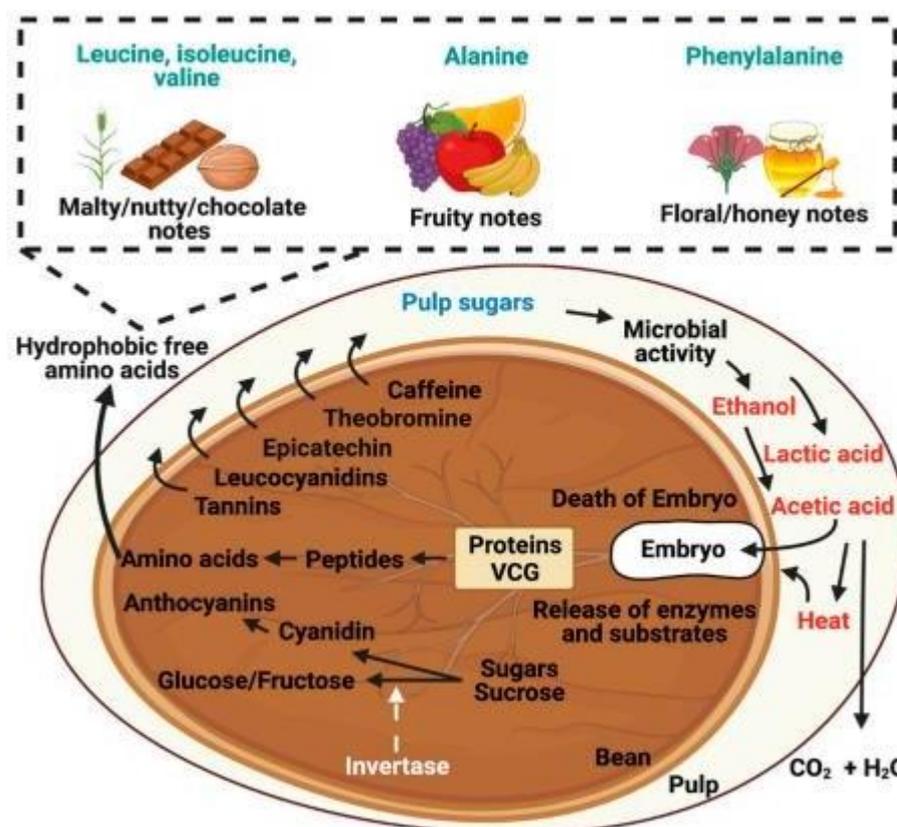
Fonte: de Vuyst; Weckx (2016).

Ocorrendo também o aumento da concentração dos ácidos presentes na massa, e estes causam a morte do germen e o rompimento das paredes celulares, permitindo que as substâncias constituintes do germen: lipídios, proteínas, carboidratos, compostos fenólicos, enzimas, sejam liberadas, ocasionando em diversas reações responsáveis pela mudança de coloração e formação de aroma e sabor das sementes (Figura 7) (JINAP; DIMICK, 1990; NIELSEN; SNITKJAER; BERG, 2008).

Dentre estas enzimas, destacam-se as enzimas proteolíticas, responsáveis pela formação de aminoácidos livres e peptídeos, os quais são precursores para a formação de sabor do cacau e chocolate, além, que, durante a degradação Strecker de

cada aminoácido específico irá produzir um aldeído único com um aroma único, por exemplo, de fenilalanina: notas doces, amargo e de amêndoa (benzaldeído), alanina: notas frutadas (acetaldeído), leucina, notas de malte/chocolate (3-metilbutanal), isoleucina; notas de malte/chocolate (2-metilbutanal), valina; notas maltadas/nozes/chocolate (2-metil propanal) e fenilalanina; notas florais/mel (fenilacetaldeído) (Figura 7) (DE VUYST, L.; LEROY, F., 2020; CASTRO-ALAYO *et al.*, 2019; VOIGT *et al.*, 2016). Nessa etapa, a temperatura das sementes alcança temperaturas em torno de 45-50°C (DOMÍNGUEZ-PÉREZ *et al.*, 2020).

Figura 6- Formação de precursores de sabor do cacau, através de aminoácidos livres hidrofóbicos durante o processo de fermentação do cacau.



Fonte: Gutiérrez-Ríos *et al* (2022).

O período do término da fermentação ocorre com a estabilização da temperatura do processo, além das sementes apresentam coloração vermelho-castanho e a massa de fermentada apresenta aroma de vinagre devido à formação do

ácido acético durante o processo (MARTINS *et al.*, 2011; THOMPSON; MILLER; LOPEZ, 2007).

3.3 Metaproteômica

Estudos relacionados a microbiota tem tido novos avanços em decorrência do desenvolvimento de técnicas moleculares baseadas no DNA, as quais permitem o estudo da estrutura microbiana, verificando a abundância de genes relacionados a um determinado grupo envolvido em uma via metabólica (BASTIDA *et al.*, 2009).

Dentre essas, destaca-se a metagenômica, a qual fornece um catálogo extenso de informações genômicas que podem ser traduzidas em uma lista de todos os produtos protéicos possíveis presentes na amostra (HETTICH *et al.*, 2012). Fornece, portanto, uma descrição fundamental dos genes funcionais e da filogenia de toda a comunidade microbiana, presente na amostra analisada, representando assim somente o seu "potencial funcional" (BASTIDA; JEHMLICH, 2016b) contudo, análises baseadas em DNA não produzem inferências em relação à atividade dos genes em questão.

Portanto, faz-se necessário o uso de diferentes técnicas moleculares para avaliar os táxons, função e a relação destes com a expressão de proteínas presentes durante a fermentação espontânea do cacau, como metabarcoding e metaproteômica.

O metabarcoding ou marcadores de código de barras, é uma técnica que possibilita a identificação de um grande conjunto de espécies em uma única amostra de DNA (DNA em massa) baseado no sequenciamento de alto rendimento (ITS) de marcadores de DNA específico (LIU *et al.*, 2020).

Devido a obtenção de fragmentos específicos de DNA, que permite a identificação das espécies, associado a disponibilidade dos bancos de dados de códigos de barra de DNA. Técnica amplamente utilizada, sobretudo em pesquisas realizadas ao monitoramento ambiental, microbiota relacionada ao solo, água devido a sua eficiência, e os resultados serem rápidos e confiáveis, em relação aos métodos convencionais de identificação de microrganismos (FAZEKAS, 2009; VAFEIADOU, 2019).

Contudo para a realização desta técnica, o DNA dos microrganismos deve passar

por algumas etapas, entre elas ser extraído, sequenciado utilizando primers e condições de PCR estabelecidas. Após isso, os dados obtidos são comparados com um banco de dados utilizado para cada táxon encontrado.

A metaproteômica é uma técnica utilizada para caracterizar em grande escala todo o complexo de proteínas de uma microbiota em um determinado momento, além de permitir a reconstrução dos processos e vias metabólicas que são centrais para o funcionamento do ecossistema (WILMES, BOND; 2004), sendo assim uma importante ferramenta utilizada para a caracterização funcional de uma ampla variedade de comunidades microbianas *in situ* (RODRIGUEZ-VALERA, 2004; WILMES; BOND, 2004), na metaproteômica as proteínas são medidas usando a abordagem proteômica de *shotgun* (SCHIEBENHOEFER *et al.*, 2019).

As proteínas são extraídas, isoladas e digeridas em peptídeos, separadas e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS/MS). Após isso, os espectros obtidos são comparados com espectro gerado *in silico* oriundos de um banco de dados de sequência de proteínas, levando a correspondências de espectro de peptídeos (PSMs). Os peptídeos então identificados são usados para inferir as proteínas presentes na amostra. Assim sendo, as proteínas podem ser anotadas com táxons e funções, fornecendo informações sobre os níveis de expressão gênica (SCHIEBENHOEFER *et al.*, 2019).

Ademais, utilizar estas técnicas moleculares em um processo fermentativo, que possui complexa microbiota que necessita de estudos, aliada às diversas mudanças bioquímicas e químicas que ocorrem durante este processo, trará às diversas respostas necessárias para se entender de forma sucinta o regimento total deste processo, e em toda sua cadeia produtiva, além da possibilidade de se assegurar o produto final de maior qualidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fermentação e coleta de grãos de cacau

A etapa de fermentação ocorreu no município de Tomé-Açu - PA (2°28'41,3"S e 48°16'50,7"W), no mês de maio de 2019, com temperatura em torno de 32°C (dia) e 23°C (noite), o processo foi conduzido de acordo com o descrito por Konagano *et al.* (2022), realizada em 2 cochos contendo cerca de 60 kg de sementes, e cobertos com folhas de bananeira.

A fermentação teve duração de 144h (seis dias corridos), sendo realizado o acompanhamento da temperatura ao longo dos dias do processo. Posteriormente, as amêndoas foram secas por 96 horas em uma estufa de secagem natural, e coletadas as amostras secas de cada fermentação e ao longo do processo nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144h dias corridos e ao cacau seco. Cerca de 100 g de cada amostra fermentada, foram armazenadas em embalagem de polietileno estéril nomeados T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7, correspondendo aos tempos de fermentação e ao cacau seco, necessariamente nesta ordem, e acondicionadas em temperatura de refrigeração (4 a 8°C).

Posteriormente foram encaminhadas para o Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABIOTEC/UFPA), onde foram realizadas as análises físico-químicas, Laboratório Genética Humana e Médica da UFPA, onde foi realizada a etapa de determinação da sequência gênica 16S rRNA bacteriano e 18S rRNA fúngico, da diversidade microbiana da análise de metabarcoding e para o Laboratório de Proteômica do ITV, onde foram realizadas a etapa da extração de DNA, da análise de metabarcoding e as análises de metaproteômica.

4.2 Métodos

4.2.1 Análises físico-química

As análises físico-químicas das amostras de amêndoas de cacau foram realizadas

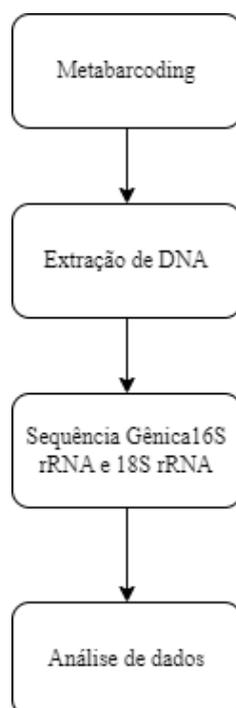
de acordo com os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), em triplicata, para isso, analisou-se os cotilédones previamente triturados em moinho manual de grãos. As análises realizadas foram: pH (método 970.21), acidez total titulável (método 31.06.06) e umidade (método 931.04), utilizou-se amostras secas e de todos os tempos de fermentação.

A análise de açúcares redutores totais (ART) foi realizada seguindo o método de ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), com modificações.

4.2.2 Metabarcoding

As etapas da metodologia de Metabarcoding, encontram-se no Esquema 1, e descritos abaixo.

Esquema 1 - Etapas da metodologia da análise de Metabarcoding.



Fonte: Autora (2022)

4.2.2.1 Diversidade microbiana

4.2.2.1.1 Extração de DNA

O DNA total foi isolado de 0,25 mg de grãos de cacau macerado tomados nas diferentes etapas de fermentação usando o Kit de Isolamento de DNA PowerSoil® (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração total de DNA foi estimada usando o Qubit™ dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific), e a qualidade do DNA foi verificada em eletroforese de gel agarose 1%.

4.2.2.1.2 Sequência Gênica 16S rRNA e 18S rRNA

O gene rRNA 16S foi amplificado pelo PCR usando o conjunto de primer bacteriano detalhados na Tabela 1, da mesma forma, a região ITS do gene rRNA 18S usando o conjunto de primer fúngico detalhados na Tabela 1, seguindo as condições de PCR detalhadas em Costa *et al.*, (2021).

Tabela 1 – Detalhamento dos primers bacteriano e fúngico, utilizados na PCR.

GENE		PRIMERS
Bactéria rRNA 16S	S-D-Bact-0341-b-S-17-N	(5"-TCGTCGGCAGCGTCAGTGTGTATAGA GAGAGACACGGGGGGCWGCAG-3")
	S-D-Bact-0785-a-A-21-N	(5"-GTCTCG TGGGGAGATGTGTATAAAGAGAGAGAGGACTACHVGGGTATCTA ATCC-3")
Fungo rRNA 18S	fITS7i	(5"- TCGTCGGCAGCGTCAGTGTGTATAAAGAGAGAGGTTGARTCATCG AATCTTTG-3")
	ITS4i	(5"-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAGAGAGA GAGTCCTCCCCCTCTTTGATATGC-30)

Fonte: Autora (2022)

Para a primeira PCR, foi utilizado 5 µL de 5x Buffer, 2,4 µL de 25 mM MgCl₂, 2 µL de 2 mM dNTP, 0,5 µL de primer1 10 pmol, 0,5 µL de primer2 10 pmol, 0,2 de

μL Taq, 11,4 de μL H_2O ultrapura e 3 μL de DNA totalizando um volume de 25 μL para cada amostra. As PCRs foram realizadas no termociclador Veriti 96 com o seguinte programa para fragmentos bacterianos: 3 minutos a 95 °C, seguida por 25 ciclos em 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e 72 °C por 5 minutos. A construção da biblioteca para fragmentos de fungos: de 94 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 30 segundos e 72 °C por 7 min. Logo, após a qualidade dos *amplicons* foi verificada quanto ao tamanho dos fragmentos por meio de eletroforese capilar.

Os produtos da PCR foram purificados com o kit de esferas magnéticas AMPure XP beads (Bechman Coulter) e indexado em uma nova PCR com o kit Nextera XT (Illumina) com adaptadores de sequências únicas (*indexes*) que foram adicionados a cada amostra. Para a segunda PCR, foi utilizado 2,5 μL de Nextera XT index Primer1, 2,5 μL de Nextera XT index Primer2, 12,5 μL de enzima 2x Kapa Hifi HotStart Ready Mix, 5 μL de água ultrapura e 2,5 μL de produto de PCR. Logo após, foi realizado novamente a purificação com as esferas magnéticas utilizando o kit Agencourt AMPure XP e quantificada através do Qubit ® 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, a biblioteca foi padronizada para concentração de 4 nM e o *pool* genômico foi agrupado de acordo com o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA). Após o preparo da biblioteca foi realizado o sequenciamento de *amplicons* na plataforma MiSeq-Illumina utilizando o kit de corrida MiSeq V3 600 ciclos.

O tamanho e a qualidade dos amplicons foram estimados em um Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) usando um chip DNA 1000. As bibliotecas foram purificadas com o kit de purificação AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) e processadas com o kit Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EUA). As bibliotecas genéticas foram sequenciadas em uma plataforma MiSeq-Illumina usando um kit de reagente MiSeq V3 (600 ciclos; Illumina) no laboratório de genética humana e médica da UFPA (Belém, PA).

As sequências de ITS e 16S obtidas foram analisadas utilizando-se o Pipeline for MetaBarcoding Analysis (PIMBA), estimando os valores descritos em

Nascimento *et al.*, 2022.

Resumidamente, as sequências de baixa qualidade foram filtradas e aparadas usando PRINSEQ v0.20.4, e sequências dianteiras e inversas foram mescladas usando PEAR v0.9.19 (ZHANG *et al.* 2014). As leituras foram desreplicadas, singletons removidos, e as sequências foram truncadas para 200 para fungos e 240 para bactérias. Quimeras foram filtradas, e as sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) usando VSEARCH v2.8.2. A atribuição taxonômica foi desenvolvida utilizando-se o banco de dados UNITE para fungos e o *Ribossômico Database Project* para bactéria (ABARENKOV *et al.*, 2010; COLE *et al.*, 2014).

Foram construídos gráficos considerando a diversidade alfa e beta no software R usando os pacotes ggplot2 e vegan. A diversidade beta foi calculada, e os gráficos principais de análise coordenada (PCoA) foram construídos usando as "distâncias UniFrac ponderadas" no software R usando o pacote phyloseq. Os heatmaps foram construídos com a abundância total de OTUs usando software R (pacotes fenoatmap e filoseq).

Estima-se que a diversidade alfa utilizasse o pacote vegano com os índices de diversidade de Shannon e Simpson. Além disso, as análises de agrupamento dos dados foram realizadas utilizando-se uma função "hclust" com as opções "métodos = ward.. D2" e "metodista = correlação" do pacote pvclust no software R. A análise multivariada permutacional de variância foi aplicada utilizando-se a função "adonis" (pacote vegano).

4.2.3 Perfil metaproteômico

As etapas da metodologia de Metaproteômica, encontram-se no Esquema 2, e descritos abaixo.

Esquema 2 - Etapas da metodologia da análise de Metaproteômica.



Fonte: Autora (2022)

4.2.3.1 Extração de proteínas

O isolamento proteico foi realizado de acordo com Wang *et al.* (2006), com modificações. Um total de 300 mg de sementes de cacau colhidas nas diferentes etapas de fermentação foram maceradas em nitrogênio líquido, depois 9,0 mL de tampão de extração [0,85 M de sacarose, 0,1 M Tris-HCl (pH 8.0), 2 % (w/v) sulfato de dodecil de sódio (SDS), 1 mM de flúor fenilmtilsulfonil e 2% (w/v) polivinylpolypyrrolidone] foram adicionados às sementes maceradas. Depois disso, foram adicionados 3 mM Protease *Inhibitor Cocktail Powder* (Merck., St. Louis, MO, EUA) e 70 mM dithiothreitol (DTT).

As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, sônicas cinco vezes (30s de duração para evento e intervalos de 30s). Cada amostra foi fracionada em oito microtubos e homogeneizada individualmente com 700 μ L de fenol saturado (pH 8.0).

Após a centrifugação a 14.000 rpm por 7 min a 4 °C, a fase fenólica de cada alíquota foi coletada e combinada em novos microtubos, seguida por outra centrifugação a 14.000 rpm por 7 min a 4 °C para remover qualquer resíduo de SDS ou a fase aquosa. A fase fenólica foi coletada, e as proteínas foram precipitadas incubando as amostras com acetato de amônio de 800 µL 0,1 M (preparado em metanol absoluto a -20°C) a -80°C durante a noite.

As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 4 min a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. A pelota de proteína restante foi lavada duas vezes com 1,5 mL 80 % (v/v) acetona gelada e etanol gelado. Finalmente, a pelota resultante foi seca em um concentrador de vácuo por 7 min, e extratos de proteína foram solubilizados adicionando 100 µl de 0,1% RapiGest™ Surfactant (Waters) e armazenados a -80 °C até a digestão proteica. A concentração proteica foi estimada pelo uso do Fluorômetro Qubit 3.0 (Invitrogen).

4.2.3.2 Digestão de proteínas e dessalinização de amostras

Cerca de 50 µg de proteínas foram quantificados por amostra. A preparação para a digestão envolveu redução de proteínas com dithiothreitol (DTT) 5 mM e incubação por 25 min a 56°C, seguida de alquilação com iodoacetamida (IAA) 14 mM para 30 min à temperatura ambiente. O IAA residual foi removido adicionando DTT (5 mM) e incubando por 15 min em temperatura ambiente, seguido pela adição de CaCl₂ (1 mM) e tratamento com tripsina (20 ng µL⁻¹) por 20h a 37°C. Posteriormente, o ácido trifluoroacético (TFA) foi adicionado a uma concentração final de 0,4 % para parar a reação enzimática. As amostras foram incubadas por 90 min a 37°C e centrifugadas a 14.000 rpm a 4°C por 30 min. Finalmente, o sobrenadante foi transferido para frascos apropriados. A solução de pH foi corrigida para 10 com hidróxido de amônio de 1 N para captura eficaz na coluna de primeira dimensão da Cromatografia Líquida de Ultra-Desempenho (HPLC).

4.2.3.3 Identificação de proteínas e análise de dados

A identificação e quantificação de proteínas foram realizadas de acordo com a metodologia descrita em Nascimento *et al.* (2022), com pequenas modificações. Para separação dos peptídeos foi utilizada cromatografia líquida de ultra-desempenho UHPLC® nanoACQUITY (Waters, Milford, MA, USA), configurada para operar em uma dimensão. Corrida Cromatográfica de 158.73 minutos totais com gradiente, condição inicial de *trap* 95:5. Foi injetado um volume de 1µL de amostra, passando inicialmente pela Coluna *Trap* ACQUITY UPLC M-Class Symmetry (Waters) C18, 100A, 5µm, 2D, v/m 180µm x 20mm, a um fluxo de 2µL/min. Posteriormente a amostra passa pela Coluna Analítica ACQUITY UPLC M-Class (Waters) HSS T3 1.8µm, 75µm x 150mm, com fluxo de 0.45 µL/min. O cromatógrafo é acoplado a um espectrômetro de massas ESI-Q-ToF SYNAPT G2S (Waters), configurado para operar em modo positivo, e fragmentação contínua (MS^E) com a energia de colisão oscilando entre 5 a 40 eV. Foram adquiridos espectros de massas dentro da faixa de 50 a 1200 Da, com scan de 0,5 segundos e um intervalo entre scans de 0,1 segundos. A largura do pico e resolução dos espectros de massas foram configurados no modo automático. O peptídeo (lockmass) [Glu-1]-fibrinopeptídeo, de massa 785.4827 Da e cargas +2, foi utilizado como referência e lido a cada 30 segundos (segundo configurações do lockmass spray).

Os dados brutos foram processados utilizando-se o Progenesis (Waters), e as buscas foram realizadas através do Progenesis com um banco de dados personalizado composto por sequências das bases de dados revisadas por bactérias e fungos UniprotKB e *Theobroma cacao* NCBI (contendo sequências bacterianas e fúngicas). Os peptídeos foram aceitos quando a taxa calculada de falsa descoberta foi inferior a 4%. A análise funcional das proteínas atribuídas foi obtida a partir do software Unipept v.4.0 utilizando parâmetros padrão (MESUERE *et al.*, 2015) (<http://unipept.ugent.be/datasets>, acessado em 15 de março de 2022) para obter termos de Ontologia Genética (GO), números da Comissão enzimática (CE) e classificação taxonômica. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método de menor ancestral comum (LCA) com base na lista de peptídeos identificados. As diferenças entre as amostras foram estimadas com base em uma composição funcional ou taxonômica utilizando o aplicativo de desktop Unipept (VERSCHAFFELT *et al.*, 2021).

4.3 Análise de dados

4.3.1 Análises físico-químicas

Foi realizado o teste de Shapiro Wilk para determinar a normalidade das variáveis estudadas, posteriormente foi realizado a ANOVA a 5% de significância junto com teste de Tukey e Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando o programa Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

4.3.2 Metabarcoding e metaproteômica

Diferenças significativas entre os estágios de fermentação para as variáveis total obtidas sequências, e peptídeos identificados totais foram detectados por ANOVA unidirecional. Comparações *post hoc pairwise* foram realizadas usando o teste de alcance múltiplo de Tukey. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software R (R Core Team 2018. <https://www.R-project.org>), considerando significância estatística em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Físico-química

Os resultados do teste de Tukey da análise de acidez total titulável estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores do teste de acidez total titulável (mEqNaOH/100g).

Tempo	Média							
	T7	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
T7		0,987679	0,854231	0,146542	0,000175	0,000175	0,397498	0,278579
T0	0,987679		0,999200	0,031791	0,000175	0,000175	0,859693	0,732967
T1	0,854231	0,999200		0,011272	0,000175	0,000175	0,988709	0,951915
T2	0,146542	0,031791	0,011272		0,000175	0,000175	0,002360	0,001490
T3	0,000175	0,000175	0,000175	0,000175		0,085923	0,000175	0,000175
T4	0,000175	0,000175	0,000175	0,000175	0,085923		0,000175	0,000175
T5	0,397498	0,859693	0,988709	0,002360	0,000175	0,000175		0,99995
T6	0,278579	0,732967	0,951915	0,001490	0,000175	0,000175	0,99995	

* Letras em outras cores diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey) em uma mesma análise.

Os valores de pH encontrados, encontram-se com similaridade ao de Konagano *et al.*, (2022), onde os valores médios aumentaram a partir das 72 horas de fermentação (T3), sendo este o período que ocorre o pico de produção de ácidos acético, pelas bactérias acéticas (VUYST; WECKX, 2016), e a partir do T4 ocorre a queda do pH, devido aos metabólitos excretados pelos micro-organismos presentes no meio, como: etanol, ácido lático e ácido acético (AFOAKWA, 2016) e ao elevado aumento de temperatura da amêndoa.

Araújo *et al.*, (2014) estabeleceram que o pH é um parâmetro importante utilizado para estabelecer o índice de qualidade do cacau- IQC, os valores devem estar na faixa de 5,60 a 6,57, tendo o valor ótimo de 6,01. As amêndoas deste trabalho obtiveram valor médio de pH de 5,98, estando dentro do estabelecido.

A acidez total titulável (ATT) aumenta durante o período da fermentação, ocorrendo um decréscimo em T5, como já relatado por Nazaruddin *et al.*, (2006). T0 e T1 não diferem estaticamente entre si ($p \leq 0,05$), assim como T7, nos períodos T4 e T5

ocorre uma elevação da ATT, devido a presença dos ácidos (acético, cítrico, láctico, málico), sintetizados através do metabolismo microbiano (AFOAKWA, 2016; PPALEXANDRATOU *et al.*, 2011), com isso, as amêndoas destes períodos diferem entre si estatisticamente ($p \leq 0,05$).

O valor médio da acidez total titulável das amêndoas fermentadas deste trabalho foi de 8,96 mEq NaOH/100 g, valor menor do estabelecido por Araújo *et al.*, (2014) para IQC, para este atributo que varia 10,53 a 19,37g/100g. Deve-se ao mal armazenamento desde o ano de 2019.

De acordo com os resultados de umidade, é possível observar que houve redução que variam de 39,66% a 43,11% de umidades final do processo, valores que destoam do encontrado por Konagano *et al.*, (2022) que foi de mais de 86%, o que é essencial para evitar o desenvolvimento de fungos toxigênicos, segundo Kedjebo *et al.* (2015), e proliferação da microbiota presente nas amêndoas. O armazenamento incorreto das amêndoas acarretou que as mesmas absorvessem água do meio em que se encontravam, e com isso, a proliferação da comunidade microbiana presente nas mesmas como pode-se observar no cacau seco (T7).

Os resultados do teste de Tukey das análises de açúcares redutores totais estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores do teste de Tukey para açúcares redutores totais.

Tempo	Média							
	T7	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
T7		0,000236	0,000236	0,001445	0,626419	0,976091	0,000239	0,000236
T0	0,000236		0,054997	0,000236	0,000236	0,000236	0,000236	0,000236
T1	0,000236	0,054997		0,000242	0,000236	0,000236	0,000236	0,000236
T2	0,001445	0,000236	0,000242		0,000431	0,003368	0,000236	0,000236
T3	0,626419	0,000236	0,000236	0,000431		0,236620	0,000260	0,000236
T4	0,976091	0,000236	0,000236	0,000236	0,236220		0,000237	0,000236
T5	0,000239	0,000236	0,000236	0,000236	0,000260	0,000237		0,000260
T6	0,000236	0,000236	0,000236	0,000236	0,000236	0,000260	0,000260	

* Letras em outras cores diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$, Teste de Tukey) em uma mesma análise.

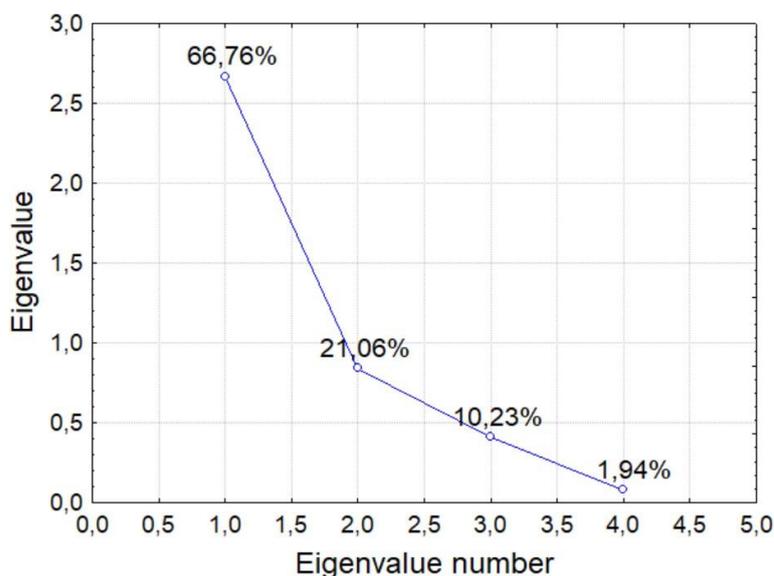
De acordo com dados obtidos, nota-se que a dinâmica das moléculas de açúcares

ocorreu de maneira muito distinta nos primeiros períodos de fermentação (T0 – T2), enquanto que a partir de T4, o consumo das moléculas de glicose e frutose apresentaram perfil semelhante, os quais, de acordo com Farah *et al.*, (2012), participam de reações de condensação com aminoácidos livres e peptídeos, através da reação de Maillard, gerando compostos responsáveis pelo sabor e aroma das amêndoas. No entanto, ao final do processo fermentativo (T5 – T6) a concentração de glicose e frutose apresentou diferença significativa entre os processos ($p \leq 0,05$), a concentração final de açúcares presentes ao final do processo fermentativo resulta em uma maior disponibilidade dessas moléculas para o desenvolvimento de compostos sensoriais importantes durante a secagem, sendo assim um importante parâmetro para a IQC.

5.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

Os dois primeiros componentes (PC1 + PC2) explicaram 87,82% da variância dos dados, durante a fermentação, levando em consideração os parâmetros analisados: pH; acidez total titulável, umidade e açúcares redutores totais (Figura 7).

Figura 7- Teste de Eigenvalue dos parâmetros de físico-química analisados durante o processo de fermentação do cacau.

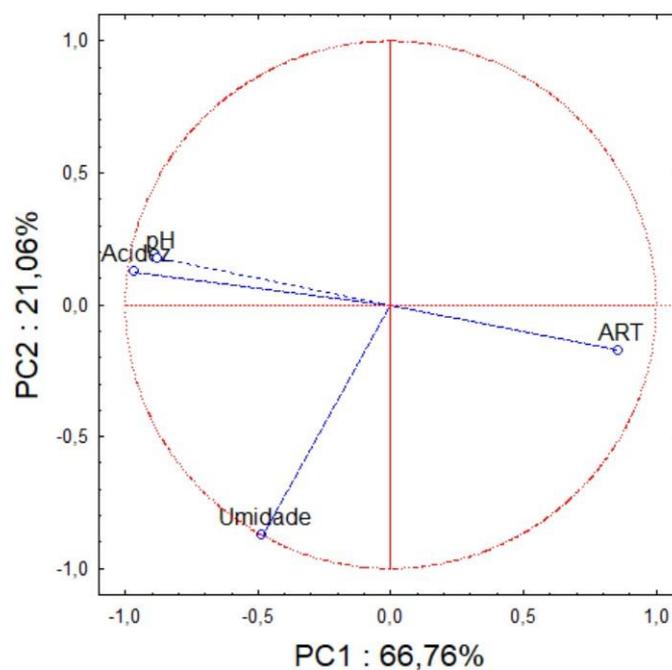


Fonte: Autora (2022)

Considerando os dados observados a partir da análise multivariada (Figura 8), é possível notar que os parâmetros que obtiveram maior variação nos dados foram de umidade e acidez. Apesar dos valores de acidez total titulável apresentarem valores similares aos encontrados por Koganago *et al.*, (2022), seu valor médio encontrou-se abaixo do estabelecido por Araújo *et al.*, (2014), ocasionando em possíveis mudanças organoléticas do chocolate final, visto que, a acidez está diretamente relacionada com a atividade das bactérias lácticas e acéticas das amêndoas.

Os valores encontrados para a análise de umidade das amêndoas de cacau fermentadas, estava abaixo dos valores encontrados por Konagano *et al.*, (2022), esse fato pode ser explicado pelo armazenamento das amêndoas em refrigeração desde o ano de 2019, sendo este um atributo importante de avaliação da qualidade do cacau, pois a atividade de água das amêndoas infere na atividade da microbiota presente, explicando a atividade fúngica e bacteriana elevada no cacau seco (T7).

Figura 8 - Análise multivariada de PCA dos parâmetros de físico-química analisados durante o processo de fermentação do cacau.



Fonte: Autora (2022)

5.3 Metabarcoding fúngico e bacteriano

O sequenciamento 16S produziu 321.492 leituras brutas em 7 bibliotecas de entrada. Após filtragem de qualidade, 42.190 sequências foram mantidas. As sequências variam de 88.244 no dia 5 a 11.726 no dia 3. Em relação às sequências bacterianas, os firmicutes e as proteobactérias foram os filos mais abundantes nos diferentes dias de fermentação. No caso dos firmicutes, os valores variaram de 98,2% (T0) a valores abaixo de 1% (T7). Da mesma forma, a abundância de proteobactérias variou de 94,1% (T7) a 1,8% (T0), (Figura 9B) (Tabela 4).

Weissella e *Lactobacillus* foram os mais abundantes no nível do gênero no primeiro dia (T1). Uma mudança na diversidade de bactérias foi identificada no período T1, sendo os gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacillus* os mais abundantes. Além disso, o gênero *Flavobacterium* é presente no período T5 e T6 (Figura 10B). No período T7, observou-se uma mudança significativa na diversidade de microrganismos identificados (Figuras 9 e 10). As taxas de diversidade de Shannon e Simpson foram maiores nas amostras no período T7 em comparação com os dias anteriores (Figura 11).

Tabela 4 - Abundância relativa de sequências de microrganismos identificadas no estágio de fermentação de cacau (dia 1 a dia 7). Valores expressos como percentagem.

Organismo	Filo	Dia1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
BACTERIA	Firmicutes	98,2	41,5	24,1	50,9	62,8	65,0	-
	Proteobacteria	1,8	58,5	75,9	49,1	32,7	35,0	94,1
	Gemmatimonadales	-	-	-	-	-	-	2,75
	Bacteroidetes	-	-	-	-	-	-	1,47
	Acidobacteria	-	-	-	-	-	-	1,37
FUNGO	Ascomycota	98,5	98,1	89,3	73,0	80,4	88,5	92,9
	Basidiomycota	1,5	1,01	7,73	5,7	15,9	9,25	1,65
	Chytridiomycota	-	-	2,95	-	-	-	0,95
	Mortierellomycota	-	-	-	21,3	3,77	1,65	3,35
	Glomeromycota	-	-	-	-	-	-	0,38
	Unidentified	-	0,92	-	-	-	0,64	0,19

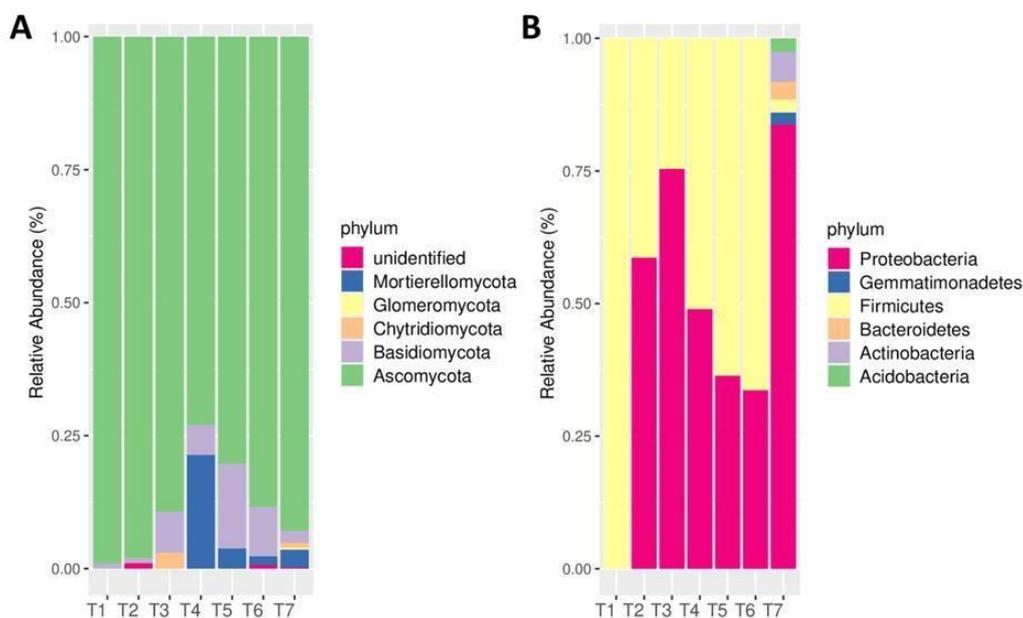
Fonte: Autora (2022)

O sequenciamento da região ITS2 produziu um total de 350.916 leituras brutas nas 7 bibliotecas de entrada. Após filtragem de qualidade, foram mantidas 75.745

sequências de amplicon. Os resultados mostraram que *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* e *Mortierellomycota* foram os filos mais abundantes. *Ascomycota* apresentou a maior abundância, variando de 98,5% (T1) a 80,4% (T5), (Figura 9A), (Tabela 4).

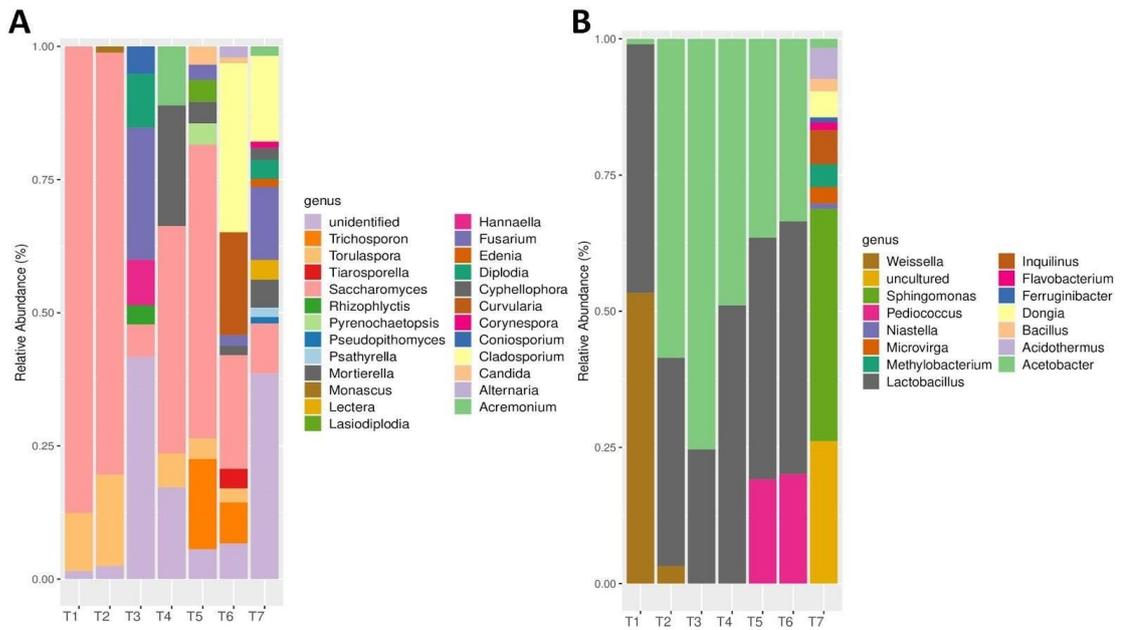
Saccharomyces e *Torulospora* foram os mais abundantes no nível do gênero (Figura 10A) nos períodos de fermentação T0 e T1. Uma mudança na abundância relativa de fungos foi identificada no período T3, sendo *Saccharomyces* identificados ao longo do processo e identificando outros gêneros abundantes como *Cladosporium*, *Curvularia* e *Trichosporon* (Figura 10A). Os índices de diversidade de Shannon e Chao1 foram mais elevados nos períodos T3 a T7 (Figura 10).

Figura 9- Abundância relativa no nível de filo das principais sequências de rRNA (A) fúngica 18S e bacteriana 16S rRNA (B) obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 do estágio de fermentação espontânea.



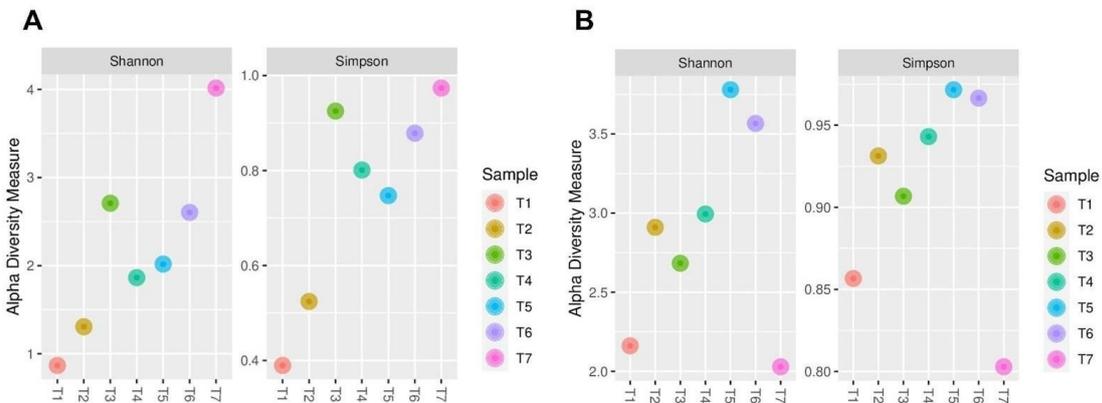
Fonte: Autora (2022)

Figura 10 - Abundância relativa no nível do gênero das principais sequências de rRNA (A) fúngica 18S e bacteriana 16S rRNA (B) obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 do estágio de fermentação espontânea.



Fonte: Autora (2022)

Figura 11 - Índices de diversidade de Shannon e Simpson de sequências fúngicas de rRNA (A) e 16S rRNA (B) bacterianas obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 do estágio de fermentação espontânea.



Fonte: Autora (2022)

Neste estudo, a identificação de microrganismos associados a diferentes estágios de fermentação utilizando a abordagem de *metabarcoding*, demonstra a alta abundância do filo Firmicutes (98,2%) no período inicial (T0) (Figura 9B) e do filo Protobacteria (58,5% a 94,1%) (Figura 9B) durante o período inicial e restante do processo (T1 a T7) apresentam semelhança aos estudos de Papalexandratou *et al.*, (2011), onde a coexistência destes filos está relacionada as fontes de carboidratos,

glicose, sacarose e glicerol presentes nos grãos de cacau, porém no período final (T7) (Figura 9B) a preponderância destes substratos é mínima devido ao consumo pela microbiota do cacau, ocasionando na queda dos Firmicutes (< 1%) (CAMU *et al.*, 2007).

Demuestra a preponderância do gênero *Saccharomyces* nos estágios iniciais de fermentação (T1 e T2) (Figura 10A). Espécies do gênero *Saccharomyces* têm sido descritas como essenciais na fermentação de grãos de cacau, estudos relatam a importância dessas leveduras na produção de compostos aromáticos importantes para o sabor do chocolate, como aldeídos, ésteres e cetonas (BASTOS *et al.*, 2018; BATISTA *et al.*, 2015; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2021), além de serem responsáveis pela degradação de açúcares fermentáveis presentes na polpa mucilagínosa a atividade das enzimas pectinolíticas no etanol, nos estágios iniciais de fermentação (BATISTA *et al.*, 2015; FIGUEROA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Da mesma forma, *Torulaspota* foi abundante nos períodos T1 e T2 (Figura 10A). Esta levedura tem sido descrita como essencial no processamento de grãos de cacau, tendo papéis potenciais na influência dos perfis sensoriais de produtos fermentados (FERNANDES *et al.*, 2021). A alta abundância desses gêneros de leveduras detectada neste estudo pode ter efeitos benéficos sobre o chocolate resultante, uma vez que a co-inoculação dessas mostrou um aumento nas propriedades químicas do produto final em alguns híbridos de cacau (VISINTIN *et al.*, 2017).

Assim como a levedura *Trichosporon* (Figura 10A) tem sido descrita como essencial na fermentação de oleaginosas, contudo, seu efeito direto na fermentação do cacau precisa ser decifrado (HUANG *et al.*, 2017).

Além de leveduras, destacam-se outros gêneros de fungos (fungos filamentosos) como *Cladosporium* e *Curvularia*, detectados nos estágios finais de fermentação (T6 e T7) (Figura 10A), cujo papel está relacionado à produção de enzimas amilase, pectinase, celulase e xilanase que são de interesse para o processamento de grãos de cacau e produção de compostos aromáticos do grupo pirazina, relacionados especialmente em chocolates finos (BATISTA *et al.*, 2015; DE ARAÚJO *et al.*, 2019; ARAUJO-MELO *et al.*, 2019) além disso, o fungo *Cladosporium* mostrou-se

uma opção válida como cultura inicial na fermentação do cacau, resultando em um cacau com baixa acidez e alta quantidade de aminas (KONAGANO *et al.*, 2022).

O *metabarcoding* de gêneros bacterianos também demonstra uma mudança significativa na diversidade dos microrganismos mais abundantes através dos diferentes estágios de fermentação, com bactérias dos gêneros *Weissella* abundante no período (T0) e *Lactobacillus* abundante durante todo o processo de fermentação (T0 - T6) (Figura 10B), representantes de bactérias do ácido láctico, responsáveis pela metabolização do cátion de carboidratos e ácido cítrico produtor de ácido láctico, e pela redução do açúcar frutose a manitol e consequente acidificação da amêndoa.

Além da alta abundância do gênero *Acetobacillus* durante o período de fermentação (T0 - T6) e do gênero *Flavobacterium* no período final (T5 e T6). O gênero *Acetobacillus* representa as bactérias acéticas, que promovem a oxidação do álcool presente e a produção de ácido acético, promovendo o aumento da acidificação da amêndoa, resultando na morte do embrião de cotilédones e nas demais reações bioquímicas do processo de fermentação (BATISTA *et al.*, 2015; KADOW *et al.*, 2015).

Os gêneros *Weissella*, *Acetobacter* e *Lactobacillus* têm sido descritos como essenciais para iniciar a fermentação espontânea do cacau, principalmente isolados e estudados por seus atributos benéficos, incluindo o biocontrole de microrganismos patogênicos, propriedades anti-inflamatórias, potencial protetor contra o câncer, probióticos, entre outros (DUŠKOVÁ *et al.*, 2013; KWAK *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SANDHYA *et al.*, 2016).

Da mesma forma, a produção de peptídeos antimicrobianos por cepas *Bacillus spp.* foram relatados em repolho fermentado artesanal (IRORITA FUGABAN *et al.*, 2021). Pelo contrário, o papel dos microrganismos pertencentes aos gêneros *Flavobacterium* durante a fermentação dos grãos de cacau tem sido menos explorado, mas espera-se que possa ser um endófito microbiano direto associado às estruturas vegetais (HERRERA *et al.*, 2022). Ainda assim, pode influenciar diretamente o conteúdo nutricional do produto fermentado (WEI *et al.*, 2018).

No cacau seco (T7), observou-se uma abundância relativa significativa em relação aos fungos e bactérias (Figuras 9 e 10) devido ao acondicionamento incorreto do mesmo, desde o ano de 2019, ocasionando na elevação da umidade aliada aos substratos presentes no cacau, resultando na proliferação de sua microbiota.

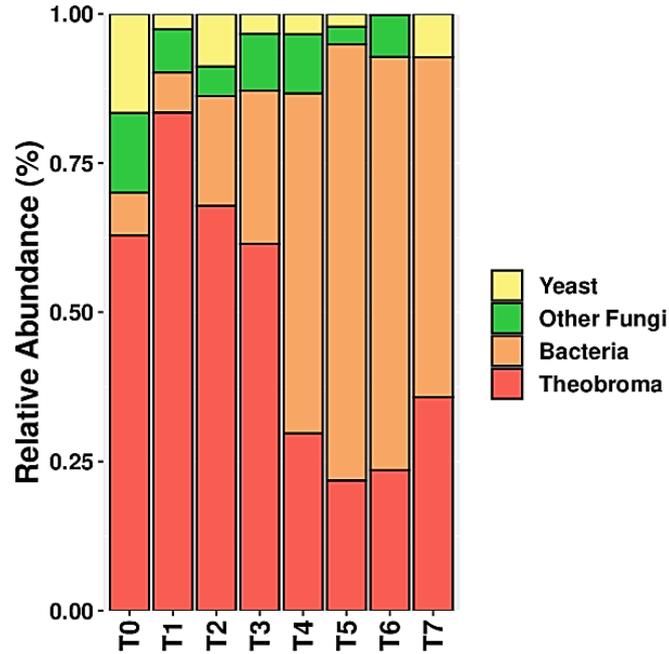
Portanto, leveduras diferentes de *Saccharomyces sp.*, leveduras e fungos filamentosos já relatados durante o processo fermentativo do cacau, devem ser considerados no manejo da fermentação espontânea, estudando seu papel como iniciadores e sua influência final na qualidade do chocolate.

5.4 Metaproteômica

No total, foram identificados 47.680 peptídeos atribuídos a 813 proteínas nos estágios de fermentação. Dessas proteínas, 250 foram atribuídas a *T. cacao*, 70 atribuídas a leveduras e 390 atribuídas a bactérias. Essas proteínas foram ligadas a 56 gêneros distintos, 30 a bactérias e 26 a fungos. A dinâmica das proteínas totais através da fermentação espontânea mostrou uma tendência clara. Nos primeiros estágios, as proteínas estavam principalmente relacionadas ao *T. cacao*, leveduras e outros fungos, enquanto, em estágios posteriores, estavam principalmente associadas a bactérias.

Essa mudança de tendência foi especialmente detectada nos períodos T3 e T4, onde a abundância relativa de peptídeos relacionadas às bactérias aumentou. Ao contrário, os peptídeos atribuídos à taxa fúngica foram menores nos estágios finais da fermentação, especialmente para peptídeos atribuídos a leveduras (Figura 12).

Figura 12 - Abundância relativa de peptídeos totais atribuídos a bactérias, leveduras e fungos filamentosos nos grãos de cacau nos dias 1 a 7 no estágio de fermentação espontânea.

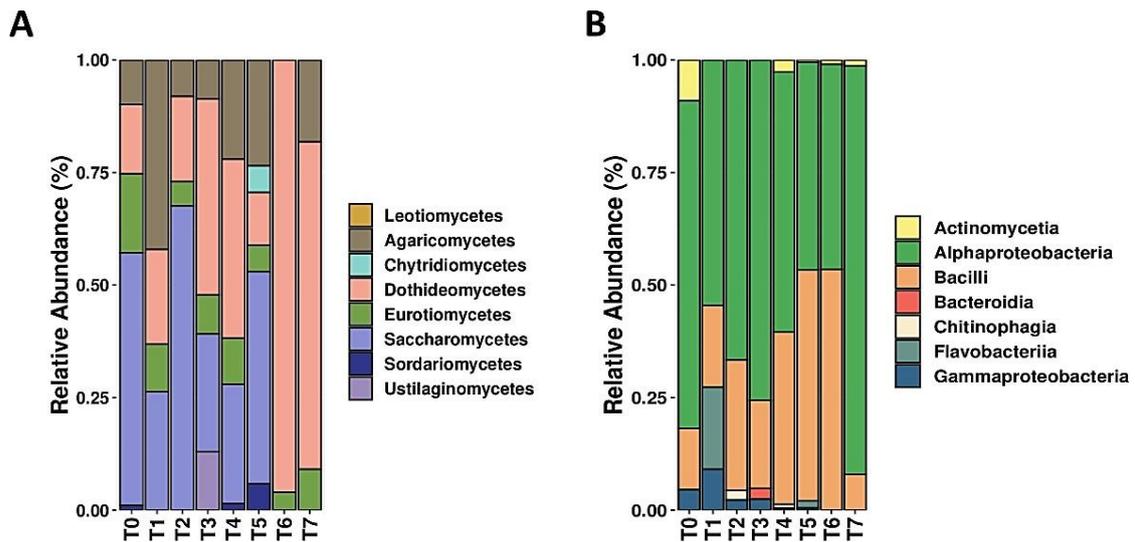


Fonte: Autora (2022)

A abundância relativa de proteínas mostrou que a classe *Alphaproteobacteria* e *Bacilli* (Figura 13B) eram as bactérias ativas dominantes, em contraste, os fungos ativos dominantes foram *Saccharomycetes*, *Dothideomycetes* e *Agaricomycetes* (Figura 13A). No nível do gênero, os táxons dominantes foram *Microvirga*, *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Lactobacillus*. Da mesma forma, *Saccharomyces*, *Candida*, *Candolleomyces* e *Psathyrella* foram os gêneros fúngicos dominantes.

Do total de microrganismos ativos, apenas seis cepas produziram proteínas com papel direto na fase de fermentação espontânea (glicealdeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, enolase, sintetizador pantotenato, isômerase de fosfato triosefosfato, e sulfato adenililtransferase) destacando o papel das leveduras *S. cerevisiae*, *K. marxianus* e *A.gossypii* durante toda a fermentação espontânea, contudo estas proteínas estão presentes em muitos proteomas, pois, são constituintes do metabolismo primário dos vegetais.

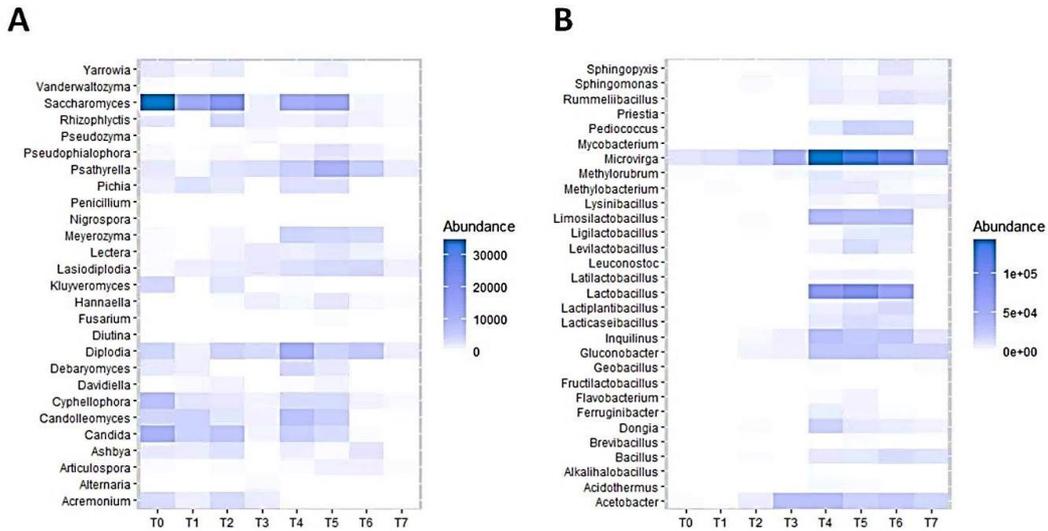
Figura 13 - Abundância relativa de peptídeos no nível de filo espontânea. fúngico (A) e bacteriano (B) obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 do estágio de fermentação.



Fonte: Autora (2022)

A análise de GO dos peptídeos mais abundantes identificados nas análises determina que os peptídeos atribuídos ao *T. cacao* estavam principalmente relacionados ao processo metabólico de carboidratos, redobramento de proteínas e tradução, assim como, os peptídeos atribuídos às bactérias estavam envolvidos no dobramento de proteínas e tradução. Os peptídeos atribuídos aos fungos estavam relacionados ao processo glicólítico, dobramento de proteínas e processo metabólico de glicose (Figura 14).

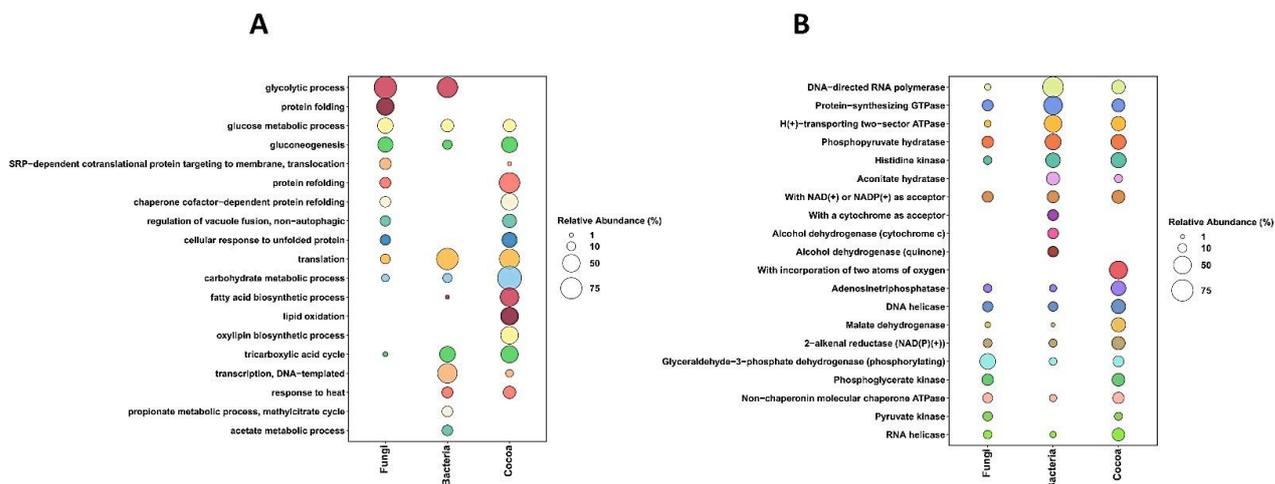
Figura 14 - Abundância relativa dos peptídeos no nível do gênero das principais sequências fúngicas (A) e bacteriana (B) obtidas a partir de grãos de cacau nos dias 1 a 7 no estágio de fermentação.



Fonte: Autora (2022)

Da mesma forma, a análise dos peptídeos associados aos números da comissão enzimática mostrou que eles estavam principalmente relacionados com as categorias "com incorporação de dois átomos de oxigênio", "histidina quinase" e "fosfopiruvato hidratase". As categorias atribuídas às bactérias estavam relacionadas ao "hidratado fosfopiruvate", "GTPase sintetizador de proteínas" e "H(+)-transportando ATPase de dois setores". Da mesma forma, os peptídeos fúngicos estavam principalmente relacionados ao "ATPase de dois setores" "fosfopiruvato hidratase" e "fosfopiruvato quinase" (Figura 15).

Figura 15 - Categorização funcional de peptídeos em termos de GO processo biológico (A) e número CE (B) através da fermentação espontânea de sementes de cacau.



Fonte: Autora (2022)

Quanto à diversidade de proteínas expressa pelos microrganismos, as principais atividades durante o processo de fermentação incluem aquelas relacionadas à atividade enolase, especialmente no período inicial da fermentação, da mesma forma, os genes constitutivos do metabolismo de diferentes espécies (por exemplo, acompanhantes, fatores de alongamento, proteínas ribossômicas) foram detectados juntamente com proteínas envolvidas na fermentação.

A importância dos microrganismos na fermentação do cacau tem sido amplamente relatada (AFOAKWA *et al.*, 2008, LEFEBER *et al.*, 2011). No entanto, em condições de produção padrão, um estudo não conclusivo relacionou a diversidade de microrganismos e a atividade metabólica na fermentação espontânea. Este estudo identificou as proteínas expressas pelos diferentes microrganismos ativos durante a fermentação espontânea (T0 - T7) e a diversidade de proteínas abundantes, que foram atribuídas a *T. cacao*, bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Figuras 12, 13 e 14).

No geral, essa mudança na abundância relativa de proteínas está diretamente relacionada às mudanças bioquímicas que ocorrem na fase de fermentação, pois as estruturas das sementes primeiro sofrem várias modificações enzimáticas e bioquímicas que permitem a morte do cotilédone, assim como modificações dos açúcares associados às sementes (SARBU, CSUTAK *et al.*, 2019).

A diversidade de proteínas associadas a *T. cacao* e proteínas relacionadas a *S. cerevisiae* começam a diminuir, mas o aumento significativo na abundância relativa

associada às bactérias destaca o papel essencial das bactérias nos estágios avançados da fermentação do cacau (CRUZ *et al.*, 2013). Entre os microrganismos, as leveduras são críticas nos estágios iniciais do processamento do grão de cacau, seja na fermentação espontânea ou induzida (DÍAZ-MUÑOZ, DE VUYST, *et al.*, 2021; KONÉ *et al.*, 2021).

Os resultados do estudo mostraram que muitas proteínas expressas durante a fermentação estão relacionadas a diferentes leveduras, incluindo *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* e *K. marxianus*, entre outros. Da mesma forma, a maior atividade de proteínas associadas a *Microvirga*, *Inquilinus*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Limosilactobacillus*, *Lactobacillus* e *Bacillus* foi em estágios posteriores de fermentação, denotando um papel essencial de esses microrganismos nas fases intermediária e final do processo de fermentação e que também podem influenciar na qualidade do chocolate. Estes resultados estão de acordo com estudos recentes que retratamos papel essencial das leveduras nas fases iniciais e a atividade adicional das bactérias do ácido láctico e acético nas fases posteriores da fermentação (HO, ZHAO, FLEET, 2014; ARANA-SÁNCHEZ *et al.*, 2015; CAMU, 2007).

Devido aos resultados obtidos, foi possível realizar uma inferência em relação a abundância de microrganismos (fungos e bactérias) e as possíveis notas de sabor e aroma do cacau (Tabela 5), esses resultados corroboram com estudos já realizados, Koné *et al.*, (2016) explica a importância dos microrganismos na formação do perfil aromático no cacau, sobretudo das leveduras, destacando a capacidade destas produzirem compostos chaves de cacau no início da fermentação (T0 - T3), pois convertem açúcares de diferentes substratos em álcoois e ácidos orgânicos, que mataram os cotilédones das amêndoas e produziram compostos orgânicos voláteis precursores do sabor do chocolate (SCHWAN, 1998), como álcoois, ácidos, cetonas, aldeídos, ésteres e pirazinas (CHAGAS-JUNIOR *et al.*, 2021).

Dentre os microrganismos encontrados na proteômica (Tabela 5), destacamos *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida* e *Pichia*, principais leveduras relacionadas as notas finas em chocolates como: frutas (Pêra, abacaxi), doce, vinho, malte, chocolate amargo, adstringente, vinagre, ácido e rançoso (RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.* 2011; RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2012; FRAUENDORFER,

SCHIEBERLE, 2006; BONVEHI, 2005; FRAUENDORFER e SCHIEBERLE, 2008).

Embora, tenha sido detectada mudanças significativas na abundância de microrganismos (fungos e bactéria) ao longo dos diferentes tempos analisados de fermentação espontânea utilizando a abordagem de *metabarcoding* essa abundância não significa um papel ativo, uma vez que a abordagem de metaproteômica revela que várias das proteínas expressas estavam relacionadas principalmente ao metabolismo interno de microrganismos e sem papel direto no processo de fermentação (Figura 15).

Diferentes enzimas envolvidas na fermentação foram detectadas, incluindo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enolase, trifosfato isomerase e fosfoglicerato quinase (BOULTON *et al.*, 1999; ZAMORA, 2009). Assim, os resultados demonstram a atividade conjunta de vários microrganismos ao longo do tempo de fermentação, uma vez que essas enzimas não foram produzidas para um grupo específico de microrganismos.

A glicólise é essencial na via metabólica da fermentação alcoólica, sendo as enzimas produzidas pela atividade metabólica dos microrganismos a chave (VALERA *et al.*, 2020). E detectou que vários microrganismos expressaram essas enzimas através dos diferentes tempos analisados (ou seja, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enolase, triosefosfato isomerase e fosfoglicerato quinase), que foram identificados ao longo do processo de fermentação, mas atrelada a taxas diferentes. Além da enolase ser descrita como essencial na via de Entner-Doudoroff, (AGYIRIFO *et al.*, 2019).

Os resultados encontrados em sua maioria concordam com vários estudos que relatam a atividade de microrganismos específicos na fermentação do cacau (por exemplo, *S. cerevisiae*, *Acetobacter spp.*, *Lactobacillus spp.*) mas também apontam para várias cepas que, apesar de serem usadas e detectadas na abordagem de *metabarcoding* não apresentam proteínas ativas, nem envolvidas na fermentação ou metabolismo interno (*Torulaspota*). Por exemplo, algumas cepas como *Levilactobacillus spp.*, *Gluconobacter spp.*, *Methylobacterium spp.* e *Diutina spp.*, entre outros, têm sido relatados para desempenhar papéis essenciais na fermentação ou são

usados como probióticos, mas são pouco relatados na produção de cacau (WANG, 2019; HUANG *et al.*, 2022).

Além disso, este estudo identificou vários táxons não relatados anteriormente no processamento de grãos de cacau (por exemplo, *Micrvirga* spp., *A. gossypii*, *Inquilinus* spp., *Cyphellophora europaea*, *Ashbya gossypii*, *Candolleomyces aberdarensi*, *Lasiodiplodia theobromae*) (Tabela 5) e não foram utilizados como iniciadores. Por conseguinte, novos estudos devem tentar isolar estas novas estirpes e implementar a inoculação específica com estes microrganismos, a fim de definir um papel particular na transformação do grão de cacau, a fim de determinar um papel positivo ou negativo na qualidade final do chocolate.

Tabela 5 - Atividade dos microrganismos ativos identificados com proteômica e relação das notas de sabor e aroma.

TAXA MICROBIANA	PAPEL RELATADO NA FERMENTAÇÃO	REFERÊNCIA	NOTAS DE SABOR E AROMA	REFERÊNCIA
<i>Acetobacter</i>	Sim.	MOENS <i>et al.</i> , 2014	Doce Amêndoas Amargo	MAGALHÃES DA VEIGA MOREIRA <i>et al.</i> , 2018
<i>Acidothermus</i>	Sim. Em fermentação sólida.	JAHURUL <i>et al.</i> , 2013	Desconhecido	-
<i>Alcalina</i>	Sim. Alimentos funcionais.	MAITY <i>et al.</i> , 2022	Desconhecido	-
<i>Bacilo</i>	Sim.	OUATTARA <i>et al.</i> , 2011	Doce Floral	CRAFACK <i>et al.</i> , 2014 ARDHANA, 2003
<i>Brevibacillus</i>	Sim.	VIESSER <i>et al.</i> , 2021	Desconhecido	-
<i>Torulaspota</i>			Floral	VISITIN <i>et al.</i> , 2017

			Amêndoas torradas Doce Manteiga	
<i>Cladosporium</i>	Sim		Frutado (banana) Floral Rançoso Azedo Doce Caramelo Café	BRICEÑO <i>et al.</i> , 2009
		KONAGANO <i>et al.</i> , 2022		
<i>Curvularia</i>	Sim	ARAUJO-MELO <i>et al.</i> , 2019	Desconhecido	-
<i>Dongia</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Ferruginibacter</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Flavobacterium</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Fructilactobacillus</i>	Sim. Geralmente em alimentos fermentados.	GUSTAW <i>et al.</i> , 2021	Desconhecido	-

<i>Geobacillus</i>	Sim. Comum de microflora de cacau.	PEREIRA <i>et al.</i> , 2020	Caramelo Doce	SUNAHARUN <i>et. al.</i> , 2014
<i>Gluconobacter</i>	Sim. Normalmente encontrado em produtos fermentados	SOMBOLESTA NI, <i>et al.</i> 2021.	Desconhecido	-
<i>Inquilius</i>	Desconhecido	-	Desconhecido	-
<i>Lacticaseibacillus</i>	Sim. Probiótico	OZER <i>et al.</i> , 2022	Desconhecido	-
<i>Lactiplantibacillus</i>	Sim. Probiótico	DAS NEVES SELIS, <i>et al.</i> , 2021	Desconhecido	-
<i>Lactobacillus</i>	Sim	MAGALHÃES DA VEIGA MOREIRA <i>et al.</i> , 2016.	Doce Amêndoas Amargo	MAGALHÃES DA VEIGA MOREIRA <i>et al.</i> , 2018
<i>Latilactobacillus</i>	Sim	VIESSER <i>et al.</i> , 2021	Desconhecido	-

<i>Leuconostoc</i>	Sim. Detectado	NIELSEN <i>et al.</i> , 2007	Desconhecido	-
<i>Levilactobacillus</i>	Sim. Mas no café	JUNQUEIRA <i>et al.</i> , 2021	Doce Amêndoas torradas Manteiga e óleo	JUNQUEIRA <i>et al.</i> , 2022
<i>Ligilactobacillus</i>	Sim. Detectado	VIESSER <i>et al.</i> , 2021	Desconhecido	-
<i>Limosilactobacillus</i>	Sim. Detectado.	VERCE <i>et al.</i> , 2022	Frutas Cítrico Herbal Manteiga e óleo	WANG <i>et al.</i> , 2023
<i>Lysinibacillus</i>	Sim.	MAGALHÃES DA VEIGA MOREIRA <i>et al.</i> , 2016	Desconhecido	-
<i>Metilobacterium</i>	Sim. Sabor.	SERRA <i>et al.</i> , 2019	Doce Caramelo Algodão doce	MOSCIANO, 1996

<i>Metilorubrum</i>	Sim. Mas em outra fermentação.	HUANG <i>et al.</i> , 2022	Desconhecido	-
<i>Microvirga</i>	Sem papel.	-	Desconhecido	-
<i>Mycobacterium</i>	Sim.	SERRA <i>et al.</i> , 2019	Desconhecido	-
<i>Pediococcus</i>	Sim.	VIESSER <i>et al.</i> , 2020	Frutado Herbal	MOTA-GUTIERREZ <i>et al.</i> , 2019 CEVALLOS- CEVALLOS <i>et al.</i> , 2018
<i>Sacardotisia</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Rummeliibacillus</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Sphingomonas</i>	Desconhecido. Talvez possa mudar o etanol para o ácido acético.	BIHN <i>et al.</i> , 2017	Desconhecido	-
<i>Sphingopyxis</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Acremonium</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Alternaria</i>	Desconhecido. Um provável papel em compostos	WEN <i>et al.</i> , 2021	Desconhecido	-

	orgânicos voláteis.			
<i>Articulospora</i>	Desconhecido. Talvez produção de amilaseses.	BODADE e LONKAR, 2022	Desconhecido	-
<i>Ashbya</i>	Desconhecido	SCHWECHHEI MER <i>et al.</i> , 2018	Desconhecido	-
<i>Candida</i>	Sim. Usado como partida.	MAHAZAR <i>et al.</i> , 2015	Frutas (pêra, abacaxi) Doce Vinho Malte Chocolate amargo Adstringente, Vinagre Ácido Rançoso	RODRIGUEZ-CAMPOS <i>et al.</i> (2011) RODRIGUEZ-CAMPOS <i>et al.</i> (2012). FRAUENDORFER, SCHIEBERLE (2006) BONVEHI (2005) FRAUENDORFER, SCHIEBERLE (2008)
<i>Candolleomyces</i>	Desconhecido	-	Desconhecido	-
<i>Cyphellophora</i>	Desconhecido	-	Desconhecido	-
<i>Davidiella</i>	Sim. Única presença.	DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 2019	Desconhecido	-
<i>Debaryomyces</i>	Sim. Única presença.	PAPALEXANDRATOU e DE	Desconhecido	-

		VOYST, 2011		
<i>Diplodia</i>	Desconhecido. Patógeno vegetal.	DELGADO-OSPINA <i>et al.</i> , 2021	Desconhecido	-
<i>Diutina</i>	Desconhecido. Talvez um probiótico.	WANG <i>et al.</i> , 2019	Desconhecido	-
<i>Fusarium</i>	Desconhecido. Talvez produção de proteases.	ALI e VIDHALE, 2013	Desconhecido	-
<i>Hannaella</i>	Desconhecido. Comum em folhas de cacau.	NETO <i>et al.</i> , 2021	Desconhecido	-
<i>Kluyveromyces</i>	Sim. Sabor.	CRAFAK <i>et al.</i> , 2013	Frutas (pêra, abacaxi) Doce Vinho Malte Chocolate amargo Adstringente, Vinagre Ácido Raçoso	RODRIGUEZ-CAMPOS <i>et al.</i> (2011) RODRIGUEZ-CAMPOS <i>et al.</i> (2012). FRAUENDORFER, SCHIEBERLE (2006) BONVEHI (2005) FRAUENDORFER, SCHIEBERLE (2008)
<i>Lectera</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-

<i>Meyerozyma</i>	Sim.	DANIEL <i>et al.</i> , 2009	Floral Frutado	LYTRA <i>et al.</i> , 2016
<i>Nigrospora</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Penicillium</i>	Sim, atividade lipase.	SILVA <i>et al.</i> , 2017	Desconhecido	-
<i>Pichia</i>	Sim. Sabor.	CRAFACK <i>et al.</i> , 2013	Frutas (pêra, abacaxi) Doce Vinho Malte Chocolate amargo Adstringente, Vinagre Ácido Raçoso	RODRIGUEZ-CAMPOS <i>et al.</i> (2011) RODRIGUEZ-CAMPOS <i>et al.</i> (2012). FRAUENDORFER, SCHIEBERLE (2006) BONVEHI (2005) FRAUENDORFER, SCHIEBERLE (2008)
<i>Psathyrella</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Pseudophialophora</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Pseudozyma</i>	Sim. Mas só presença.	ARANA- SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2015	Desconhecido	-
<i>Rizophlyctis</i>	Desconhecido.	-	Desconhecido	-
<i>Saccharomyces</i>	Sim.	KOUAMÉ <i>et</i>	Frutas (pêra, abacaxi) Doce	RODRIGUEZ-CAMPOS <i>et al.</i> (2011)

		<i>al.</i> , 2021	Vinho Malte Chocolate amargo Adstringente, Vinagre Ácido Rançoso	RODRIGUEZ-CAMPOS <i>et al.</i> (2012). FRAUENDORFER, SCHIEBERLE (2006) BONVEHI (2005) FRAUENDORFER, SCHIEBERLE (2008)
<i>Vanderwaltozyma</i>	Sim.	ILLEGHEMS <i>et al.</i> , 2012	Desconhecido	-
<i>Yarrowia</i>	Sim.	PAPANIKOLA OU <i>et al.</i> , 2001	Floral	CORDEIRO, 2019
<i>Lasiodiplodia</i>	Desconhecido. Principalmente relatos sobre doenças.	KUSWINANTI <i>et al.</i> , 2019	Desconhecido	-

Fonte: Autora (2022)

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra a mudança na diversidade de microrganismos através da fermentação espontânea usando metabarcoding e dados metaproteômicos. Gêneros fúngicos como *Saccharomyces* e *Candida* foram mais abundantes nos primeiros dias (T0-T3), e gêneros bacterianos como *Microvirga*, *Lactobacillus* e *Limosilactobacillus* nos últimos dias (T4-T7) de fermentação.

Além de ser possível realizar uma inferência sobre as notas de sabor e aroma relacionados aos fungos e bactérias encontrados no cacau através da metaproteômica, destacando o papel das leveduras como as principais produtoras dos precursores de notas como floral e frutada, encontradas em chocolates finos.

Apesar de uma diversidade considerável ter sido identificada, os microrganismos ativos representam uma porção menor, mas com novos táxons como *Microvirga*, *Inquilinus*, *Candolleomyces* e *Lasiodiplodia* mostrando ter um papel durante a fermentação do cacau nas amostras estudadas. Novos estudos devem tentar isolar e avaliar essas linhagens como *starters* e seus efeitos nas características sensoriais do chocolate resultante.

REFERÊNCIAS

ABARENKOV, K.; HENRIK NILSSON, R.; LARSSON, K. H.; ALEXANDER, I. J.; EBERHARDT, U.; ERLAND, S.; HÓILANDER, K.; KJÓLLER, R.; LARSON, E.; PENNANEN, T. The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. **New Phytologist**, v. 186, p. 281-285, 2010.

ADLE, P. et al. **The key to acetate: Metabolic fluxes of acetic acid bacteria under cocoa pulp fermentation simulating conditions**. 2014.

AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016.

AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, p. 840-857, 2008.

AGYIRIFO, D. S.; WAMALWA, M.; OTWE, E. P.; GALYUON, I.; RUNO, S.; TAKRANA, J., e NGERANWA, J. Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. **Heliyon**, v. 5, n. 7, e02170, 2019.

ALBERTINI, B. et al. Effect of Fermentation and Drying on Cocoa Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 45, p. 9948–9953, 2015.

ALI, S. S. e VIDHALE, N. N. Protease production by *Fusarium oxysporum* in solid-state fermentation using rice bran. **American Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 3, p. 45-47, 2013.

ANDERS, A. O. Estudo de viabilidade técnica e econômica-EVTE para implantação de uma agroindústria processadora de amêndoas de cacau no município de Medicilândia-Pará. **Ciências Econômicas-Unisul Virtual**, 2020.

ARAUJO, Q. R. et al. Cocoa Quality Index: A proposal. **Food Control**, v. 46, p. 49–54, 2014.

ARAUJO-MELO, R. d. O.; DE OLIVEIRA, T. H. B.; DE OLIVEIRA, C. V. J.; DE ARAÚJO, J. M.; DE SENA, K. X.; Coelho, L. C. B. B. Prospection of Endophyte Microorganisms from *Bauhinia monandra* Leaves with Mainly Identification of Actinobacteria. **Advances and Trends in Biotechnology and Genetics**, v. 91, 2019.

ARANA-SÁNCHEZ, A.; SEGURA-GARCÍA, L.; KIRCHMAYR, M.; OROZCO-ÁVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; GSCHAEDLER-MATHIS, A. Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 359-369, 2015.

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

2003.

BASTIDA, F. et al. Soil metaproteomic: A review of an emerging environmental science. Significance, methodology and perspectives. **European Journal of Soil Science**, v. 60, n. 6, p. 845–859, 2009.

BASTIDA, F.; JEHLICH, N. It's all about functionality: How can metaproteomic help us to discuss the attributes of ecological relevance in soil? **Journal of Proteomics**, v. 144, p. 159–161, 2016b.

BATISTA, N. N.; RAMOS, C. L.; RIBEIRO, D. D.; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, p. 221-227, 2015.

BASTOS, V. S.; SANTOS, M. F.; GOMES, L. P.; LEITE, A. M.; FLOSI PASCHOALIN, V. M.; DEL AGUILA, E. M. Analysis of the cocobiota and metabolites of *Moniliophthora perniciosa*-resistant *Theobroma cacao* beans during spontaneous fermentation in southern Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 4963-4970, 2018.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. 4 ed. London Edited by Stephen T. Beckett, Blackwell Publishing Ltd. 732p. 2009.

BINH, P. T. et al. Bacteria in wooden box fermentation of cocoa in daklak, Vietnam. **J Microbiol Exp**, v. 5, n. 7, p. 00176, 2017.

BODADE, R.; LONKAR, K. Extremophilic Fungal Amylases: Screening, Purification, Assay, and Applications. In: **Extremophilic Fungi**. Springer, Singapore, p. 465-487, 2022.

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

BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F.; KUNKEE, R. E. Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In Principles and practices of winemaking, **Springer**, p. 102-192, 1999.

BRICEÑO, E. X.; LATORRE, B. A.; SCHWARZE, E. B. Effect of *Cladosporium* rot on the composition and aromatic compounds of red wine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, n. 1, p. 119-128, 2009.

CAMU, N. et al. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. **2007**.

CASTRO-ALAYO, E. M.; IDROGO-VÁSQUEZ, G.; SICHE, R.; CARDENAS-

TORO, F. P. Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. **Heliyon**, v. 5, e01157, 2019.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; GYSEL, L.; MARIDUEÑA-ZAVALA, M. G., e MOLINA-MIRANDA, M. J. Time-related changes in volatile compounds during fermentation of bulk and fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao*) beans. **Journal of Food Quality**, 2018.

CHAGAS JUNIOR, G. C. A.; FERREIRA, N. R.; LOPES, A. S. The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: An overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 56, p. 544-552, 2021.

CHETCHIK, I.; KNEUBUHLÜ, M.; CHATELAIN, K.; SCHLUTERÜ, A.; BERNATH, K.; HÜHN, T. Investigations on the aroma of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L.) and its influence on the odor of fermented cocoa beans. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, p. 2467-2472, 2017.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 42, p. D633-D642, 2014.

CORDEIRO, A. C. P. **Seleção de estirpes de yarrowia lipolytica com potencial para produzir álcoois aromáticos**. 2019. Tese de Doutorado.

COSTA, P. H. d. O.; NASCIMENTO, S. V. d.; HERRERA, H.; GASTAUER, M.; RAMOS, S. J.; CALDEIRA, C. F.; OLIVEIRA, G.; VALADARES, R. B. d. S. Non-Specific Interactions of Rhizospheric Microbial Communities Support the Establishment of *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* in an Amazon Rehabilitating Mineland. **Processes** 2021, v. 9, n. 2079, 2021.

CRAFACK, M. et al. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 1, p. 103-116, 2013.

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

CUNHA, L. **Estudo de competitividade do cacau e chocolate no Brasil: Desafios na produção e comércio global**. 2018.

DANIEL, H. et al. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 5, p. 774-783, 2009.

DA SILVA, M. R.; CLÉMENT, D.; GRAMACHO, K. P.; MONTEIRO, W. R.; ARGOUT, X.; LANAUD, C.; LOPES, U. Genome-wide association mapping of sexual incompatibility genes in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Tree Genetics & Genomes**, v. 12, p. 1-13, 2016.

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

DAS NEVES SELIS, Nathan et al. Lactiplantibacillus plantarum strains isolated from spontaneously fermented cocoa exhibit potential probiotic properties against *Gardnerella vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **BMC microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2021.

DE ARAÚJO, J. A.; FERREIRA, N. R.; DA SILVA, S. H. M.; OLIVEIRA, G.; MONTEIRO, R. C.; ALVES, Y. F. M.; LOPES, A. S. Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 975-987, 2019.

DELGADO-OSPINA, J. et al. The role of fungi in the cocoa production chain and the challenge of climate change. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 202, 2021.

DE VUYST, L.; STEFAN, W. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. In: **Animal Genetics**. [s.l: s.n.]. v. 39, p. 561–563, 2018.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. **FEMS Microbiol**, v. 44, p. 432–453, 2020.

DE VUYST, L.; WECKX, S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. **Journal of Applied Microbiology**, v.121, p. 5-17, 2016.

DÍAZ-MUÑOZ, C.; DE VUYST, L. Functional yeast starter cultures for cocoa fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, 2021.

DOMÍNGUEZ-PÉREZ, L. A. et al. Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 73, n. 46, p. 104134, out. 2020.

DUŠKOVÁ, M.; KAMENÍK, J.; KARPÍŠKOVÁ, R. *Weissella viridescens* in meat products—a review. **Acta Veterinaria Brno**, v. 82, p. 237-241, 2013.

FARAH, D. M. H. et al. Effect of Roasting Process on the Concentration of Acrylamide and Pyrazines in Roasted Cocoa Beans from Different Origins. **APCBEE Procedia**, v. 4, p. 204– 208, 2012.

FARREL A. D.; RHINNEY K.; EITZINGER A.; UMAHARAN P. **Agroecol. Sust.**

Food, n.42, p. 812-833, 2018.

FAZEKAS, A. J. et al. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 130-139, 2009.

FERNANDES, T.; SILVA-SOUSA, F.; PEREIRA, F.; RITO, T.; SOARES, P.; FRANCO-DUARTE, R.; SOUSA, M. J. Biotechnological Importance of *Torulasporea delbrueckii*: From the Obscurity to the Spotlight. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 712, 2021.

FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C.; MOTA-GUTIERREZ, J.; FERROCINO, I.; HERNÁNDEZ-ESTRADA, Z. J.; GONZÁLEZ-RÍOS, O.; COCOCLIN, L., e SUÁREZ-QUIROZ, M. L. Os desafios e perspectivas da seleção de culturas iniciais para grãos de cacau fermentados. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, n. 42, p. 41-50, 2019.

FRAUENDORFER, F.; SCHIEBERLE, P. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5521-5529, 2006.

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

GATEAU-REY, L.; TANNER, E. V.; RAPIDEL, B.; MARELLI, J.-P.; ROYAERT, S. Climate change could threaten cocoa production: Effects of 2015-16 El Niño-related drought on cocoa agroforests in Bahia, Brazil. **PloS one**, v. 13, ed. 0200454, 2018.

GUSTAW, K. et al. New insight into bacterial interaction with the matrix of plant-based fermented foods. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1603, 2021.

GUTIÉRREZ-RÍOS, H. G.; SUÁREZ-QUIROZ, M. L.; HERNÁNDEZ-ESTRADA, Z. J.; CASTELLANOS-ONORIO, O. P.; ALONSO-VILLEGAS, R.; RAVAS-DUARTE, P.; GONZÁLEZ-RÍOS, O. Yeasts as Producers of Flavor Precursors during Cocoa Bean Fermentation and Their Relevance as Starter Cultures: A Review. **Fermentation**, v. 8, n. 7, ed. 331, 2022.

HAMDOUCHE, Y. et al. Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. **Food Research International**, v. 119, n. March 2018, p. 477–491, 2019.

HETTICH, R. L. et al. Microbial metaproteomics: Identifying the repertoire of proteins that microorganisms use to compete and cooperate in complex environmental communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 373–380, 2012.

HERRERA, H.; FUENTES, A.; ORTIZ, J.; SOTO, J.; DA SILVA VALADARES, R. B.; Salas-Eljatib, C.; Arriagada, C. Root-associated endophytes isolated from juvenile *Ulex europaeus* L. (Fabaceae) plants colonizing rural areas in South-Central Chile.

Plant and Soil, p. 1-13, 2022.

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

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

HUANG, C.; LUO, M.-T.; CHEN, X.-F.; QI, G.-X.; XIONG, L.; LIN, X.-Q.; WANG, C.; LI, H.-L.; CHEN, X.-D. Combined “de novo” and “ex novo” lipid fermentation in a mix-medium of corncob acid hydrolysate and soybean oil by *Trichosporon dermatis*. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 1-11, 2017.

HUANG, W.; ZHANG, C.; GU, Z.; LI, C.; FANG, Z.; ZENG, Z.; ZHANG, Z.; HU, B.; CHEN, H.; WU, W. Effect of microbial fermentation on the sensory characteristics and chemical compositions of Chinese sweet tea (*Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun). **Food Bioscience**, v. 46, p. 101567, 2022.

ICCO (International Cocoa Organization) February 2020: **Quarterly bulletin of cocoa statistics**. <https://www.icco.org/produit/quarterly-bulletin/>. 2020.

ILLEGHEMS, K.; DE VUYST; L.; PAPALEXANDRATOU, Z.; & WECKX, S. Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. **Plos one**, v. 7, n. 5, 2012.

ILLEGHEMS, K.; WECKX, S.; DE VUYST, L. Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. **Food microbiology**, v. 50, p. 54-63, 2015.

IRORITA FUGABAN, J. I.; VAZQUEZ BUCHELI, J. E.; HOLZAPFEL, W. H.; TODOROV, S. D. Bacteriocinogenic *Bacillus* spp. isolated from Korean fermented cabbage (Kimchi)—Beneficial or hazardous? **Fermentation**, v. 7, n. 56, 2021.

JAHURUL, M. H. A.; ZAIDUL, I. S. M.; NORULAINI, N. A. N.; SAHERA, F.; JINAP, S.; AZMIR, J.; SHARIF, K. M.; MOHD OMAR, A. K. Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. **J Food Eng.** p.117467-76, 2013.

JINAP, S.; DIMICK, P. S. Acidic Characteristics of Fermented and Dried Cocoa Beans from Different Countries of Origin OF FOOD SCIENCE-547. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 2, p. 547-550, 1990.

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

JUNQUEIRA, A. C. O. et al. Isolation and selection of fructose-consuming lactic acid bacteria associated with coffee bean fermentation. **Food Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 58-75, 2022.

JUNQUEIRA, A. C. D. O.; VINÍCIUS DE MELO PEREIRA, G.; VIESSER, J. A.; DE CARVALHO NETO, D. P.; QUERNE, L. B. P., e SOCCOL, C. R. Isolation and selection of fructose-consuming lactic acid bacteria associated with coffee bean fermentation. **Food Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 58-75, 2022.

KADOW, D.; NIEMENAK, N.; ROHN, S.; LIEBEREI, R. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) – reconstruction and guidance of the fermentation process. **LWT - Food Sci. Technol.** v. 62, p. 357–361, 2015.

KONAGANO, E. M. H.; FERREIRA, N. R.; CHAGAS-JUNIOR, G. C. A.; GLORIA, M. B. A.; ANDRADE, E. H. A.; LIDIANE, D. N.; MARTINS, L. H. S.; LOPES, A. S. *Cladosporium cladosporioides* starter culture can positively influence flavour and bioactive compounds of fermented and dried cocoa beans from the Amazon biome. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 61, n. 3, 2022.

KEDJEBO, K. B. D. et al. Effect of post-harvest treatments on the occurrence of ochratoxin a in raw cocoa beans. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 33, n. 1, p. 157–166, 2015.

KONÉ, K. M.; ASSI-CLAIR, B. J.; KOUASSI, A. D. D.; YAO, A. K.; BAN-KOFFI, L.; DURAND, N.; LEBRUN, M.; MARAVAL, I.; BONLANGER, R.; GUEHI, T. S. Pod storage time and spontaneous fermentation treatments and their impact on the generation of cocoa flavour precursor compounds. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 56, p. 2516-2529, 2021.

KONÉ, M. K.; GUÉHI, S. T.; DURAND, N.; BAN-KOFFI, L.; BERTHIOT, L.; TACHON, A. F., e MONTET, D. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. **Food Research International**, v. 89, p. 910-917, 2016.

KOUAMÉ, C.; LOISEAU, G.; GRABULOS, J.; BOULANGER, R.; & MESTRES, C. Development of a model for the alcoholic fermentation of cocoa beans by a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, p. 108917, 2021.

KUSWINANTI, T.; JUNAID, M.; & SURAPATI, U. A promising microbial use on cocoa: decomposing cocoa waste and controlling *Lasiodiplodia theobromae* in-vitro. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012256, 2019.

KWAK, S.-H.; CHO, Y.-M.; NOH, G.-M.; OM, A.-S. Cancer preventive potential of kimchi lactic acid bacteria (*Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum*). **Journal of**

cancer prevention, v. 19, n. 253, 2014.

LAHIVE, F.; HADLEY, P.; DAYMOND, A. J. The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 39, p. 1-22, 2019.

LEFEBER, T.; GOBERT, W.; VRSNCKEN, G.; CAMU, N.; DE VUYST, L. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation a vessel. **Food microbiology**, v. 28, p. 457-464, 2011.

LIMA, LÍ. J. R. et al. Theobroma cacao L., “the food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 8, p. 731–761, 2011.

LIU, M., CLARKE, L. J., BAKER, S. C., JORDAN, G. J., e BURRIDGE, C. P. A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. **Ecological entomology**, v. 45, n. 3, 373-385, 2020.

LYTRA, G.; TEMPERE, S.; MARCHAND, S.; DE REVEL, G.; BARBE, J. C. How do esters and dimethyl sulphide concentrations affect fruity aroma perception of red wine? Demonstration by dynamic sensory profile evaluation. **Food Chem**, v. 194, p. 196–200, 2016.

MAGALHÃES DA VEIGA MOREIRA, I. et al. Influence of cocoa hybrids on volatile compounds of fermented beans, microbial diversity during fermentation and sensory characteristics and acceptance of chocolates. **Journal of food quality**, v. 39, n. 6, p. 839-849, 2016.

MAHAZAR, N. H. et al. Candida sp. as a starter culture for cocoa (Theobroma cacao L.) beans fermentation. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 5, p. 1783, 2015.
849, 2016.

MAITY, C.; BAGKAR, P.; DXIT, Y.; & TIWARI, A. Alkalihalobacillus clausii 088AE as a functional and medical food ingredient: assessment of in vitro protein digestibility and food calorie reduction. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 57, n. 6, p. 3440-3455, 2022.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Meio Ambiente). **Cartilha de boas práticas nalavoura cacauera no estado do Pará**. ed. 1, p. 64p, 2020.

MARTINS, J. M. et al. Melhoria da Qualidade do Cacau. **CEPLAC/CENEX**, p. 48, 2011.

MENDONÇA, M. V.; PEDROZA FILHO, M. X. Análise do cacau orgânico de São Felix do Xingu (PA) através da cadeia global de valor. **Revista Agroecossistemas**., v. 11, p. 20-42, 2019.

MESUERE, B.; DEBYSER, G.; AERTS, M.; DEVREESE, B.; VANDAMME, P.; DAWRYNDT, P. The Unipept metaproteomics analysis pipeline. **Proteomics**, v. 15, p. 1437-1442, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOENS, F. et al. Oxidation of Metabolites Highlights the Microbial Interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during Cocoa Bean Fermentation. **Food Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1848–1857, 2014.

MOENS, F.; LEFEBER, T.; DE VUYST, L. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1848-1857, 2014.

MOSCIANO, G.; FASANO, M.; CASSIDY, J.; CONNELLY, K.; MAZEIKO, P.; MONTENEGRO, A., e SADURAL, S. Organoleptic characteristics of flavor materials. **Perfumer and flavorist**, v. 21, p. 47-49, 1996.

MOTA-GUTIERREZ, J.; BARBOSA-PEREIRA, L.; FERROCINO, I., e COCOLIN, L. Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated cocoa fermentation and its potential health benefits. **Nutrients**, v. 11, n. 4, ed. 884, 2019.

NASCIEMNTO, S. V.; OLIVEIRA COSTA, P. H.; HERRERA, H.; CALDEIRA, C. F.; GASTAUER, M.; RAMOS, S. J.; OLIVEIRA, G.; VALADARES, R. **Proteomic Profiling and Rhizosphere-Associated Microbial Communities Reveal Adaptive Mechanisms of *Dioclea Apurensis* Kunth in Eastern Amazon's Rehabilitating Minelands**. 2022.

NAZARUDDIN, R. et al. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 1, p. 87–94, 2006.

NETO, A. A. P.; SANTOS, T. R.; DUARTE, E. A. A.; DE OLIVEIRA, T. A. S.; DE ANDRADE SILVA, E. M.; UETANABARO, A. P. T.; ... & LARANJEIRA, D. Yeasts associated with aerial parts of *Theobroma cacao* L. in southern Bahia, Brazil, as prospective biocontrol agents against *Moniliophthora perniciosa*. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 109-128, 2021.

NIELSEN, D. S. et al. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International journal of food microbiology**, v. 114, n. 2, p. 168-186, 2007.

NIELSEN, D. S.; SNITKJAER, P.; BERG, F. VAN DEN. Investigating the fermentation of cocoa by correlating Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiles and Near Infrared spectra. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p.

133–140, 2008.

OLIVEIRA, J.; COSTA, K.; ACURCIO, L.; SANDES, S.; CASSALI, G.; UETANABARO, A.; COSTA, A.; NICOLI, J.; NEUMANN, E.; Porto, A. In vitro and in vivo evaluation of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation (*Theobroma cacao* L.). **Journal of Functional Foods**, 47, 184-191, 2018.

OUATTARA, H. G. et al. Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2011.

OUATTARA, H. D. et al. Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 256, n. May, p. 11–19, 2017.

OZER, M. et al. Development of a functional chocolate using gamma-amino butyric acid producer *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442. **Food Bioscience**, v. 47, p. 101678, 2022.

PAPALEXANDRATOU, Z.; VRANCKEN, G.; DE BRUYNE, K.; VANDAMME, P.; DE VUYST, L. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1326-1338, 2011.

PAPALEXANDRATOU, Z.; DE VUYST, L. et al, Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS yeast research**, v. 11, n. 7, p. 564-574, 2011.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; HEVALOT, M.; KOMAITS, G.; AGGELIS, I. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 80, n. 3-4, p. 215-24, 2001.

PEREIRA, A. P. M.; STELLARI, H. A., VITELA, L. F., SCHWAN, R. F., e SANT'ANA, A. S. Dynamics of *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus* spores inoculated in different time intervals during simulated cocoa beans fermentation. **Lwt**, v. 120, p. 108941, 2020.

RAMSEY, D. **Chocolate: indulge your inner chocoholic**. London: Dorling Kindersley, 2016.

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

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; CONTRERAS-RAMOS, S. M.; OROZCO-AVILA, I.; JARAMILLO-FLORES, E.; e LUGO-CERVANTES, E. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. **Food chemistry**, v. 132, n. 1, p. 277-288, 2012.

RODRIGUEZ-VALERA, F. Environmental genomics, the big picture? **FEMS Microbiol. Lett.** v. 231, p. 153–158, 2004.

SUNAHARUM, W. B; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E. Complexity of coffee flavor: a compositional and sensory perspective. *Food Research International*, v. 62, p. 315–325, 2014.

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

SARBU, I.; CSUTAK, O. The microbiology of cocoa fermentation. In *Caffeinated and cocoa based beverages*. **Elsevier**, p. 423-446, 2019.

SCHIEBENHOEFER, H. et al. Challenges and promise at the interface of metaproteomics and genomics: an overview of recent progress in metaproteogenomic data analysis. **Expert Rev. Proteom.** v. 16, p. 375–390, 2019.

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

SCHWAN, R.; PEREIRA, G.; FLEET, G. H. Microbial Activities during Cocoa Fermentation. **Cocoa and Coffee Fermentations**, n. January 2014, p. 129–192, 2014.

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

SCHWECHHEIMER, S. K. et al. Improved riboflavin production with *Ashbya gossypii* from vegetable oil based on ¹³C metabolic network analysis with combined labeling analysis by GC/MS, LC/MS, 1D, and 2D NMR. **Metabolic engineering**, v. 47, p. 357-373, 2018.

SERRA, J. L. et al. Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. **Lwt**, v. 106, p. 229-239, 2019.

SILVA, T. P. et al. Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, n. 3, p. 745-756, 2017.

SOMBOLESTANI, A. S. et al. Characterization of novel *Gluconobacter* species from fruits and fermented food products: *Gluconobacter cadivus* sp. nov., *Gluconobacter vitians* sp. nov. and *Gluconobacter potus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 004751, 2021.

THI, V. H.; THI, H. P.; EVERAERT, H.; ROTTIERS, H.; PHAN, T.; NHAN, D. T.; DUE, P. P.; TOÀN, H. T.; DEWETTINCK, K.; MESSENS, K. Characterization of leaf, flower, and pod morphology among Vietnamese cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v.48, p.2375-2383, 2016.

THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S. Cocoa and coffee. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, v. 3, p. 837–850, 2007.

TRINDADE, F. C.; RAMOS, S. J.; GASTAUER, M.; SARAIVA, A. M. M.; CALDEIRA, C. F.; OLIVEIRA, G.; DA SILVA VALADARES, R.B. Metaproteomes reveal increased capacity for stress tolerance of soil microbes in ferruginous tropical rocky outcrops. **Pedobiologia**, v. 81, p. 150664, 2021.

VAFEIADOU, A.; MOENS, T. Effects of temperature range changes and interspecific competition to population development and behaviour of marine nematodes. **In: International Meiofauna Conference**, v. 17., p. 57-58, 2019.

VALERA, M. J.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F. Comparison of the glycolytic and alcoholic fermentation pathways of *Hanseniaspora vineae* with *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Fermentation**, v. 6, n, 78, 2020.

VERCE, M. et al. A combined metagenomics and metatranscriptomics approach to unravel costa rican cocoa box fermentation processes reveals yet unreported microbial species and functionalities. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 641185, 2021.

VERSCHAFFELT, P.; VAN DEN BOSSCHE, T.; MARTENS, L.; DAWYNDT, P.; MESUERE, B. Unipept desktop: a faster, more powerful metaproteomics results analysis tool. **Journal of Proteome Research**, v. 20, p. 2005-2009, 2021.

VIESSER, J. A. et al. Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: isolation, selection and evaluation. **Food Research International**, v. 136, p. 109478, 2020.

VIESSER J. A. et al. Global cocoa fermentation microbiome: revealing new taxa and microbial functions by next generation sequencing technologies. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 37, n. 7, p. 118, 2021.

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

VOIGT, J.; JANEK, K.; TEXTORIS-TAUBE, K.; NIEWIENDA, A.;

- WÖSTEMEYER, J. Partial purification and characterisation of the peptide precursors of the cocoa-specific aroma components. **Food Chem**, v. 192, p. 706–713, 2016.
- WAHYUNI, N.; SUNARHAUM, W.; MUHAMMAD, D.; SAPUTRO, A. Formation and development of flavour of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivar Criollo and Forastero: a review. In Proceedings of the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, p. 012078, 2021.
- WANG, J. et al. Identification and characterization of *Diutina rugosa* SD-17 for potential use as a probiotic. **LWT**, v. 109, p. 283-288, 2019.
- WANG, L.; LUO, Y. Y.; ZHANG, Y.; ZOU, C. X.; WANG, P. J.; QIN, L. K., e JIA, Y. L. Quality analysis of ultra-fine whole pulp of bamboo shoots (*Chimonobambusa quadrangularis*) fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Limosilactobacillus reuteri*. **Food Bioscience**, v. 52, ed. 102458, 2023.
- WANG, W.; VIGUANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, p. 2782-2786, 2006.
- WEI, H.; WANG, L.; ZHAO, G.; FANG, Z.; WU, H.; WANG, P.; ZHENG, Z. Extraction, purification and identification of menaquinones from *Flavobacterium meningosepticum* fermentation medium. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 245-253, 2018.
- WEN, R. et al. The potential correlations between the fungal communities and volatile compounds of traditional dry sausages from Northeast China. **Food Microbiology**, v. 98, p. 103787, 2021.
- WILMES, P.; BOND, P. L. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms **Environ Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 911-920, 2004.
- ZAMORA, F. Biochemistry of alcoholic fermentation. In Wine chemistry and biochemistry. **Springer**, p. 3-26, 2009.
- ZHANG, J.; KOBERT, K.; FLOURI, T.; STAMATAKIS, A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read merger. **Bioinformatics**, v. 30, p. 614-620, 2014.