

DIVERSIDADE GENÉTICA DA COMPOSIÇÃO E DUREZA DE MANTEIGA DE GENÓTIPOS DE *Theobroma cacao*, HERANÇA E EFEITO DO PÓLEN

José Luis Pires¹, Júlio César de Mattos Cascardo^{2*}, Cosme Nascimento³, Ruy Delmondes³, Ednailza Miranda Carvalho Aboboreira³, Smilja Vidmar Lambert³, Antonio Figueira⁴

¹CEPLAC, Centro de Pesquisa do Cacau, CP 07, Itabuna, 45600-000, Bahia, Brasil. E-mail: zezoea@gmail.com;

²Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 45650-000, Brasil (*in memoriam*);

³Mars Center for Cocoa Studies, Barro Preto, BA, 45630-000, Brasil;

⁴Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil;

A manteiga de cacau é o principal subprodutos comercial obtido a partir das amêndoas de *Theobroma cacao* L. (cacau). Essa relevância deriva do perfil único de ácidos graxos e triacilgliceróis dos lipídios armazenados, que define a sua dureza e a temperatura de fusão. A seleção e o melhoramento para perfis superiores de ácidos graxos e triglicerídeos são importantes para produzir genótipos superiores menos sensíveis às temperaturas mais baixas de cultivo reduzindo a dureza da manteiga de cacau, o que é não desejável no processo industrial de produção de chocolate. No entanto, a relação direta entre o perfil de ácidos graxos e triacilgliceróis como agente para determinar a dureza da manteiga de cacau não foi explorada de forma abrangente, nem o foi a diversidade genética na espécie. Sementes coletadas de 456 acessos da coleção de germoplasma do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Bahia, Brasil, foram analisadas quanto aos perfis de ácidos graxos e triacilgliceróis e quanto à dureza da manteiga de cacau, por ‘Differential Scanning Calorimetry’ (DSC). As relações entre ácidos graxos e triacilgliceróis e dureza e as diferenças entre grupos de genótipos foram investigadas para esses acessos, juntamente com a capacidade geral de combinação para dureza de manteiga de cacau para alguns deles. Usando cruzamentos em dialelo completo, o efeito do pólen (xenia) também foi investigado para a dureza da manteiga de cacau e a composição de ácidos graxos e triacilgliceróis. Diferenças entre os grupos de acesso foram determinadas. Os níveis relativos dos ácidos esteárico (S; C18:0), oleico (O; C18:1) e linoléico (L; C18:2) e dos triacilgliceróis SOS, SOO e PLO foram os componentes mais importantes para a determinação da dureza da manteiga de cacau. Para dureza, foi constatada uma forte associação entre médias de acessos parentais per se e médias das progênies. O efeito do pólen deve ser considerado na avaliação de genótipos quanto às características da manteiga de cacau. Os descendentes do clone Scavina 6 mostram dureza inferior à média geral da coleção avaliada, sendo que a maior parte das variedades atualmente indicadas para cultivo comercial na Bahia são descendentes deste clone.

Palavras-chave: Chocolate, calorimetria diferencial de varredura, lipídeo, triglicerídeos.

Genetic diversity of butter composition and hardness of *Theobroma cacao* genotypes, inheritance and pollen effect. Cocoa butter is the primary commercial product derived from the seeds of *Theobroma cacao* L. (cacau). Its importance lies in the unique fatty acid and triacylglycerol profiles of cacao storage lipids, which determine cocoa butter’s hardness and melting temperature. Selection and breeding for superior fatty acid and triacylglycerol profiles are critical to developing genotypes that are less sensitive to cooler growing temperatures, which can reduce cocoa butter hardness—an undesirable trait in industrial chocolate production. However, the direct relationship between fatty acid and triacylglycerol profiles as proxies for determining cocoa butter hardness has not been fully explored, nor has the genetic diversity within the species. In this study, seeds from 456 accessions of the germplasm collection at the Cacao Research Center (CEPEC) in Bahia, Brazil, were analyzed for fatty acid and triacylglycerol profiles, as well as cocoa butter hardness using differential scanning calorimetry (DSC). The relationships between fatty acid and triacylglycerol composition and hardness, along with differences among genotype groups, were investigated. Additionally, the general

combining ability for cocoa butter hardness was assessed for selected genotypes. Using a complete diallel cross, the effect of pollen (xenia) on cocoa butter hardness and the fatty acid and triacylglycerol composition was also evaluated. Significant differences between accession groups were identified. The relative levels of stearic acid (S; C18:0), oleic acid (O; C18:1), linoleic acid (L; C18:2), and the triacylglycerols SOS, SOO, and PLO emerged as key factors influencing cocoa butter hardness. A strong correlation was observed between the characteristics of parental accessions and the mean hardness of their progeny. The pollen effect was found to be an important consideration when evaluating genotypes for cocoa butter traits. Notably, the descendants of the Scavina 6 clone exhibited lower hardness compared to the overall average of the evaluated collection, as most cacao varieties currently recommended for commercial cultivation in Bahia are derived from this clone.

Key words: Chocolate, differential scanning calorimetry, lipid, triglycerides.

Introdução

A manteiga de cacau é o principal produto comercial obtido a partir de sementes de *Theobroma cacao* L. (cacau). No entanto, devido ao uso de sólidos de cacau para a produção de chocolate e confeitaria, o cultivo geralmente não é considerado como de semente oleaginosa. Amêndoas de cacau não fermentadas contêm em média 53% de gordura (Pires et al., 1998; Khan et al., 2008). Como lipídio de armazenamento, a manteiga de cacau é composta por cerca de 97% de triacilgliceróis, mas seu perfil de ácidos graxos difere completamente de outros óleos e gorduras comerciais, consistindo principalmente de ácido palmítico (16:0; P), esteárico (18:0; S) e oleico (18:2D9,12; L), em partes equivalentes, mais uma pequena proporção de ácido linoléico (Gunstone et al., 1994; Carpenter et al., 1994; Escrive et al., 2002). Os triacilgliceróis POS, SOS e POP representam mais de 75% dos triacilgliceróis da manteiga de cacau (Gunstone et al., 1994; Carpenter et al., 1994). E as propriedades físico-químicas únicas da manteiga de cacau derivam do incomum alto teor de estearato (Harwood, 1996). A manteiga de cacau é uma gordura sólida à temperatura ambiente, com ponto de fusão próximo à temperatura do corpo humano. O perfil de fusão de uma manteiga de cacau específica é determinado pelo comprimento da cadeia dos ácidos graxos, grau de dessaturação e posicionamento na estrutura do glicerol (Dimick, 1991).

Temperaturas mais baixas causam um aumento da dessaturação de ácidos graxos nos lipídios da membrana, para manter o grau de fluidez (Slabas e Fawcett, 1992), e nos lipídios de armazenamento das sementes, para equilibrar a quantidade total de energia armazenada e a taxa de produção de energia durante

a germinação (Linder, 2000). O cacaueiro é tipicamente tropical sendo cultivado principalmente dentro de 5° N-S ao redor do Equador, e é uma espécie altamente sensível a baixas temperaturas (Wood e Lass, 2001). No entanto, algumas regiões produtoras estão localizadas em latitudes mais elevadas e são propensas a invernos mais frios; além disso, as alterações climáticas em curso também poderão levar o cultivo do cacaueiro a áreas marginais com temperaturas sazonais mais baixas. Por exemplo, a região produtora de cacau no sul da Bahia, Brasil, está localizada em torno de 15°S, tendo temperaturas medianamente baixas durante o inverno, quando as sementes estão se desenvolvendo para o período principal de colheita (Wood e Lass, 2001). Temperaturas baixas aumentam a dessaturação, com maiores teores de ácidos oleico e linoléico, amolecendo a manteiga de cacau nas amêndoas colhidas durante parte da safra principal (agosto a outubro) na Bahia (Berbert e Alvim, 1972; Berbert, 1976; Lehrian et al., 1980). A manteiga de cacau mais macia pode ser inadequada para certos usos (McHenry e Fritz, 1987), e apresenta maior proporção de POO e SOO, com níveis de SOS mais baixos do que aquelas originadas no Sudeste Asiático e na África Ocidental (Chaiseiri e Dimick, 1989; 1995a). O SOS parece estar fortemente correlacionado com a rápida nucleação dos cristais de sementes durante a cristalização da manteiga de cacau e com a dureza final (Chaisieri e Dimick, 1995b).

Durante a maior parte da história do cultivo do cacaueiro, desde a domesticação, as amêndoas foram utilizadas apenas para preparar bebida (Coe e Coe, 1996) e, conseqüentemente, a dureza não foi fator importante. No entanto, o desenvolvimento da barra de chocolate sólida em meados do século XIX tornou

a manteiga de cacau um componente crítico, responsável pelas propriedades físicas do chocolate (Dimick, 1991). O melhoramento genético do cacaueiro, em moldes científicos, começou no final da década de 1920 em vários países, mas concentrado principalmente na produtividade de amêndoas secas e na resistência a doenças, com pouca ou nenhuma ênfase na qualidade das sementes (Kennedy et al., 1987; Khan et al., 2008). Determinações abrangentes do teor de gordura das sementes de cacau começaram apenas no final das décadas de 1990 e 2000 (Pires et al., 1998; Khan et al., 2008); e pouca atenção foi dada à qualidade da manteiga de cacau.

A falta de seleção direta para a composição da manteiga de cacau sugere que ainda pode existir variabilidade significativa, a menos que haja associações importantes entre a composição da gordura e outros caracteres sob seleção. Mustiga et al. (2019) investigaram uma população segregante para conteúdo de gordura e perfil de ácidos graxos, para identificar loci de características quantitativas (QTLs), e o efeito ambiental sobre esses caracteres. Foi observada uma forte associação negativa entre temperatura e a proporção dos ácidos oleico e linoléico, enquanto uma forte associação linear positiva foi encontrada entre a temperatura e os ácidos palmítico e esteárico (Mustiga et al., 2019).

Assim, os objetivos deste trabalho foram caracterizar a diversidade disponível para ácidos graxos, composição de triacilgliceróis e dureza de manteiga de amêndoas de cacau, em uma expressiva amostra de genótipos de uma importante coleção de germoplasma de cacau na Bahia, Brasil; identificar as diferenças entre grupos de acessos; estudar a associação entre os valores dos genótipos *per se* e sua capacidade geral de combinação como genitor para as características de gordura; e investigar o efeito do pólen na composição de ácidos graxos e triacilgliceróis e na dureza da manteiga de cacau. Isto sob as hipóteses de ocorrência destes fatores.

A identificação de potenciais determinantes da dureza da manteiga de cacau foi pesquisada entre triacilgliceróis e ácidos graxos para facilitar a seleção de genótipos desejáveis e para auxiliar na identificação dos genes e reguladores mais relevantes para determinar a qualidade da manteiga de cacau. A avaliação da diversidade genética disponível e da

herdabilidade visaram a análise da viabilidade do melhoramento genético para a dureza da manteiga, e o estudo dos efeitos do pólen tiveram como objetivo a análise da necessidade de polinizações controladas para a seleção de genótipos com melhores características de manteiga.

Materiais e Métodos

Material

Quatrocentos e cinquenta e seis genótipos, representantes de várias origens (Tabela 1) e previamente analisados quanto ao teor de gordura, em Pires et al., 1998, foram avaliados quanto à dureza da

Tabela 1 - Grupos considerados nas análises (ordenados pela média dureza)

Código	Séries
SPA	SPA
NA	Na
VE	Genótipos da Venezuela - Chuao, Choroni, PQTO, Playa Alta
IMC	IMC
CJ	CJ
PA	Pa
SC	SC
CFF	CEPEC - Híbridos Forastero x Forastero
POU	Pound
OC	Ocunary
CC	CC
CSU	Cruzeiro do Sul
CA	Ca
RIM	RIM
UF	UF
ICS	ICS
BAH	Seleções em variedades da Bahia e E. Santo - SIC, SIAL, EEG, CEPEC
CTF	CEPEC - híbridos Trinitário x Forastero
CAS	CAS
PAR	Genótipos do Estado do Pará, Brasil, - Mocorongo, Ob, CAB
SGU	SGu
MA	Ma
SDE	Genótipos descendentes do clone Scavina 6
CHC	CEPEC - Híbridos de Criollo
RB	RB
BE	Be
P	P
SCA	Scavina

manteiga de cacau e composição de ácidos graxos e triacilgliceróis. A variabilidade da dureza da manteiga de cacau, expressa em unidades DSC, representando o percentual de gordura sólida a 16°C, não havia, ainda, sido relatada para genótipos específicos de cacau, mas apenas para amostras comerciais de diversas origens (Chaisieri e Dimick, 1989). Todos os frutos considerados, obtidos em maior número possível, foram colhidos em um curto espaço de tempo, durante o mês de novembro, em até 10 plantas de cada um dos 456 acessos estudados da Coleção de Germoplasma do Centro de Pesquisa do Cacau, em Ilhéus, BA (CEPEC/CEPLAC). Frutos colhidos entre agosto e outubro apresentam a máxima proporção de ácidos graxos insaturados (Berbert, 1976; Berbert and Alvim, 1972), mas o efeito de baixas temperaturas na insaturação também pode ser detectado em frutos colhidos em novembro (Berbert, 1976), quando a disponibilidade destes é maior, por ser este período, normalmente, parte do pico da safra. Foram, também, obtidas amostras de sementes em duas das repetições em campo de ensaios de avaliação de progênes híbridas conduzidos no CEPEC, denominados 40, 41 e 42, que são constituídos, conjuntamente, pelos cruzamentos entre as mães AB 1, Be 2, Be 3, Be 4 e Be 5, Ca 2, Ma 12 e Ma 14, RB 40 e RB 48 e os pais ICS 1, ICS 8, SIAL 325 e SIC 19, e as testemunhas SIC864 x ICS1 e SIC19 x ICS1 presentes nos três ensaios.

Foram, ainda, obtidas amostras de sementes de polinização controlada na forma de um dialelo completo (incluindo recíprocos) entre genótipos de elevado (Cruzeiro do Sul 7, Pa 17 e CAS 1) e baixo teor de gordura (SIC 4, CC 39, ICS 9) (Pires et al., 1998).

Preparação das amostras de semente

Todas as amostras de sementes, nos três processos descritos, foram coletadas em um curto período de tempo, para evitar grandes diferenças ambientais no desenvolvimento dos frutos. Foram coletadas sementes de um grande número de frutos de cada tratamento, que foram misturadas para a extração de cada amostra. As sementes foram despulpadas mecanicamente e secas artificialmente em estufa a 60°C e armazenadas até serem analisadas. A extração de gordura foi realizada conforme descrito em Pires et al. (1998).

Cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)

FAMEs foram preparados por transmetilação catalisada por álcali (Helrichs, 1990). Amostras de FAME de 0,5 ml (em relação 60:1) foram separadas em uma coluna capilar de sílica fundida de 30 m x 0,25 mm i.d. SP2340 (Supelco Co.; Bellefonte, PA, EUA), a 90°C por 3 min, seguido de elevação de 5°C min⁻¹ até 210°C, e mantido por 10 min, em cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard 5890 (Palo Alto, CA, EUA). A temperatura do injetor e do detector de ionização de chama foi ajustada em 220°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste, na velocidade linear de 30 cm s⁻¹.

Cromatografia gasosa de derivados de éter triacilglicerol-trimetilsilílico

Amostras de manteiga de cacau (10 mg) contendo os triacilgliceróis e padrões internos [ácido mirístico; 1-monomiristoil-glicerol; 1,3 dimiristina (Sigma Chemical Co.; Saint Louis, MO, EUA); e trimiristina (Supelco)] foram submetidos à derivatização de trimetilsilil pela adição de 125 ml de piridina seca, seguida por um volume igual de N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de trimetilclorossilano (TMCS) [Supelco] (Carpenter e outros, 1994). Os derivados de triacilglicerol-éter trimetilsilílico foram separados numa coluna capilar de sílica fundida de 15 m x 0,25 mm d.i. revestida de poliimida de alta temperatura (65% metilfenil silicone) da Quadrex Corp. (New Haven, CT, EUA), programada para permanecer a 150°C por 3 min, seguido de aumentos de 10°C min⁻¹ até 320°C, e, então, de 5°C min⁻¹ até 360°C, por 7 min, em cromatógrafo gasoso HP 5890, conforme Geerart e Sandra (1987). A temperatura do injetor e do detector de ionização de chama foram ajustadas para 370° e 380°C, respectivamente. Hélio foi utilizado como gás de arraste, na velocidade linear de 20 cm s⁻¹. Injeções de 1 ml foram divididas em 90:1. A quantificação foi realizada pela técnica do padrão interno e a identificação dos picos foi baseada em Geerart e Sandra (1987).

Dureza da manteiga de cacau

Todas as amostras foram analisadas em calorímetro diferencial de varredura DSC-7, da Perkin-Elmer (Norwalk, CT, EUA). Amostras de cerca de 3 mg de manteiga de cacau, fundidas a 60°C, foram re-

fundidas no detector, e, em seguida, submetidas a ciclos de endurecimento de acordo com os padrões de fabricação (têmpera). A análise foi obtida pelo aquecimento da amostra de -6°C a 45°C a uma taxa de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. As unidades DSC representam a fração de manteiga de cacau sólida a 16°C .

Analises Estatísticas

Para o estudo da associação entre dureza de gordura e proporções de ácidos graxos e triacilgliceróis, foram conduzidas, para estas variáveis, Análises de Correlações (SAS Institute, 1988) e Análises de Trilha (Cruz, 1997). Para o estudo das distinções entre grupos de genótipo de origens distintas, foram considerados os valores de DSC e proporções dos ácidos graxos e triacilgliceróis mais importantes na determinação do DSC, e utilizadas as metodologias: Análise de Variância Univariada e Multivariada, Análise de Variáveis Canônicas (SAS Institute, 1988) e Agrupamento pela metodologia de Tocher (CRUZ, 1997). Análises dos cruzamentos em dialelo, para a determinação de efeitos do pólen, foram conduzidas tendo como fontes de variação as mães e os pais, e seguiram procedimentos univariados e multivariados (SAS Institute, 1988). A avaliação das relações entre o desempenho “per se” de clones e sua capacidade geral de combinação foi conduzida pela análise das correlações entre médias de alguns clones, conforme a avaliação de germoplasma, e as médias destes clones como progenitores em ensaios de avaliação de progênies híbridas, estas últimas obtidas em Análise de Variância Univariada para DSC (SAS Institute, 1988).

Resultados e Discussão

Associação entre dureza e proporções de ácidos graxos

Foram constatadas correlações significativas, a 1% de probabilidade de erro, da dureza (DSC) com os ácidos graxos, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:1, 22:0, 24:0, e a 5% de probabilidade de erro com o 14:0, sendo os maiores valores observados para os ácidos esteárico (18:0), oleico (18:1) e linoléico (18:2), todos, porém inferiores a 0,51 (respectivamente 0,40; -0,51 e -0,45). No entanto, as associações são maiores quando considerando apenas os genótipos extremos (25 maiores e 25 menores valores de DSC). Neste caso,

os três ácidos graxos mostram correlações superiores a 65% (respectivamente 0,70; -0,78 e -0,66) o que indica que seu auxílio na seleção para DSC não deve ser negligenciado. A correlação entre a composição de ácidos graxos e a dureza da manteiga de cacau corroborou o efeito negativo há muito estabelecido dos ácidos graxos não saturados oleato (18:1) e linolato (18:2), e o efeito positivo do teor de estearato (18:0) na dureza da manteiga de cacau. Níveis aumentados de estearato são benéficos para a dureza da manteiga de cacau (Chaisieri e Dimick, 1995a).

Considerando-se os ácidos graxos com correlações significativas (a até 5% de probabilidade) com DSC como variáveis explicativas e DSC como variável básica em uma análise de trilha, apenas os ácidos graxos 18:0 (estearato), 18:1 (oleato) e 18:2 (linolato) mostraram efeitos diretos superiores a 20% e os efeitos indiretos mais importantes para 18:0 foram via 18:1 e 18:2, para o 18:1 via 18:0 e 18:2 e para o 18:2 via 18:0 e 18:1 o que comprova serem estes três os mais importantes na determinação do DSC. Ainda, o ácido graxo 20:1 (Gadoléico), quarta maior correlação total, apresenta maior parte desta correlação determinada pelos efeitos indiretos de 18:0; 18:1; 18:2. Também os demais possuem estes ácidos graxos determinando grande parte de sua correlação com DSC, por meio de efeitos indiretos (dados não apresentados). O coeficiente de determinação da análise foi de 0,47 e o diagnóstico indicou colinearidade fraca (Cruz 1997), o que indica ausência de limitações na condução da análise de trilha.

Quando considerados todos os ácidos graxos, a colinearidade é severa, com um autovalor da matriz de correlações e o determinante desta próximos de zero (0,001951 e 0,000073, respectivamente) o que torna os resultados dependentes da inversa comum desta matriz imprecisos. Neste caso, a análise de trilha foi conduzida efetuando-se previamente a soma de uma constante aos elementos da diagonal da matriz de correlações (Cruz 1997), e esta análise não mostrou, para os ácidos graxos não considerados na análise anterior, efeitos diretos merecedores de atenção (todos os valores foram inferiores a 0,03).

Confirma-se, então o efeito negativo dos ácidos graxos insaturados oléico e linoléico na determinação da dureza e o efeito favorável do esteárico.

Diferenças entre grupos de acessos para dureza e ácidos graxos

Definidos os ácidos graxos mais importantes na determinação da dureza, estes, juntos ao DSC, foram usados para analisar as diferenças entre séries ou grupos de genótipos de origem relacionada (códigos e grupos descritos no Quadro 1 para simplificar a visualização gráfica foram agrupadas algumas séries, de origem comum, e para a consideração de um mínimo de três genótipos por grupo, algumas series de genótipos foram desconsideradas).

Considerando individualmente os 456 genótipos, foram observadas variações da ordem de 41,6 % (SPEC 54-2) a 91,0 % (acesso SPA 12 S₁) e média de 74,2 % para a fração de gordura sólida a 16°C, DSC; de 23,5 (SE 1) a 38,2 (Pa 88) e média de 32,8% para a proporção do 18:0; de 31,9 (CEPEC 521) a 39,1 (TSA 656) e média de 35,4% para o 18:1; e de 2,0 (OC 67) a 5,3 (SIC 813) e média de 3,5% para 18:2.

Por sua vez, considerando os grupos, há diferenças significativas entre médias para DSC, ao nível de 0,08 % de probabilidade de erro para esta hipótese, e diferenças ao nível de erro de 0,01% para 18:0, 18:1 e 18:2, pelo teste de F em análises de variância univariadas; DSC e 18:1 tiveram distribuição não distinta da normal e as distribuições dos ácidos graxos 18:0 e 18:2 diferiram significativamente da normal, a 1%, mas foram bastante aproximadas desta - pela ordem: W = 0,978; 0,987; 0,969 e 0,973 - Shapiro-Wilk. A análise multivariada, contemplando os quatro

caracteres, mostrou diferenças significativas entre grupos ao nível de 0,01% de probabilidade de erro para esta afirmação pelos testes de Wilks.

As três primeiras variáveis canônicas acumularam 95,55% do total de variação das quatro variáveis originais, respectivamente 44,22; 35,10 e 16,23%, e foram significativas a 0,01%, valores que podem ser considerados muito satisfatórios para a interpretação gráfica (Figura 1). Ainda, para facilitar esta interpretação, também foi utilizada a metodologia de agrupamento não hierárquico de Tocher (Cruz e Regazzi, 1997) a partir da matriz de distâncias de Mahalanobis (agrupamentos ilustrados na Figura 1).

Na situação em que todas as séries listadas são incluídas, a visualização dos agrupamentos na figura não é muito adequada e a análise de agrupamento forma apenas quatro grupos: um grupo incluindo somente a série Scavina, outro apenas a série RB, outro apenas a Pound, e um quarto todas as demais. A série Scavina que, embora com apenas dois representantes, foi incluída na análise pela sua importância no melhoramento, notadamente como fonte de resistência a doença vassoura-de-bruxa, tem, junto com a RB, as menores médias de 18:0 e valores acima da média geral para 18:1 e 18:2, o que condiz com sua reduzida dureza (Tabela 2). Seus descendentes (SDE) embora apresentem incrementos favoráveis para as quatro variáveis, ainda mostram dureza inferior à média geral. A série RB tem valores mais reduzidos de 18:1 e 18:2, em relação aos Scavinas, o que é coerente com o DSC

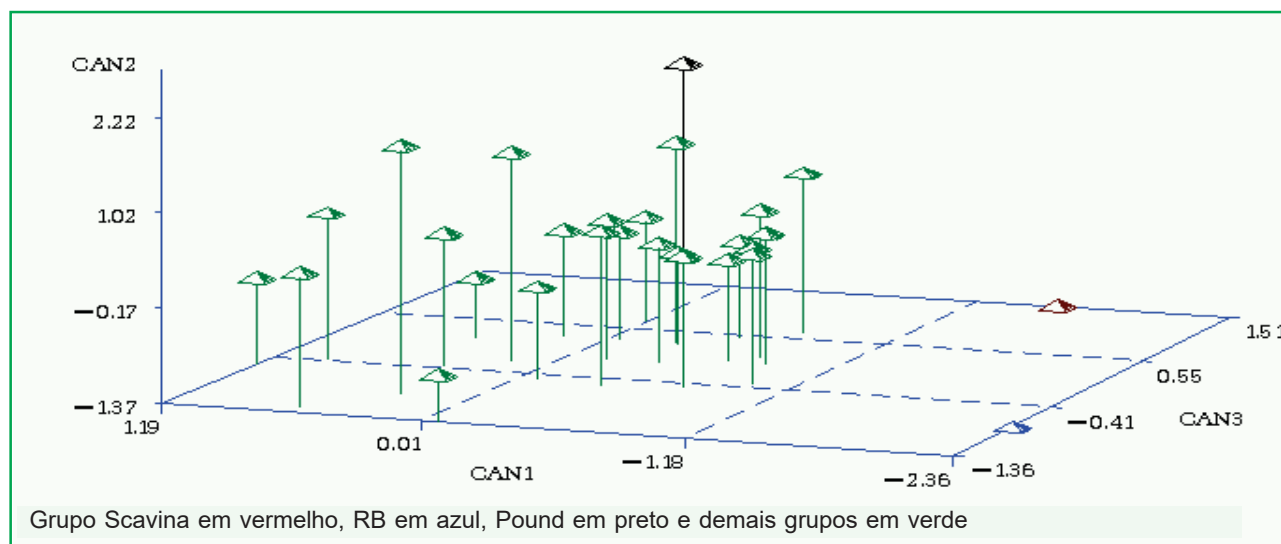


Figura 1. Dispersão gráfica de grupos de genótipos conforme Variáveis Canônicas para DSC e Ácidos Graxos.

Tabela 2- Médias de séries para DSC, para os ácidos graxos esteárico (18:0), oléico (18:1) e linoléico (18:2), em %, e valores das três primeiras variáveis canônicas, para a análise com a exclusão dos grupos extremos SCA e RB (variáveis canônicas relativas à Figura 2) (ordenado pelo DSC)

GRUPO	CAN1	CAN2	CAN3	DSC	18:0	18:1	18:2
SPA	-1,04	1,71	-0,09	80,63	34,39	33,31	3,45
NA	0,19	1,17	-0,79	80,58	34,27	34,39	3,05
VE	-0,76	-0,14	-0,79	80,37	31,93	35,00	3,45
IMC	-0,86	0,94	0,23	80,15	33,73	34,25	3,62
CJ	-0,74	0,31	-0,56	79,57	32,63	34,63	3,45
PA	0,99	0,78	-0,16	78,70	34,69	35,42	3,13
SC	0,04	0,56	-0,11	78,20	33,73	35,01	3,38
CFF	0,28	1,03	0,21	77,51	34,65	34,81	3,36
POU	-1,84	0,86	0,93	76,96	33,24	33,80	4,05
OC	0,52	0,11	-1,52	76,88	32,81	35,23	2,91
CC	-0,92	-0,36	-0,71	76,43	31,57	34,98	3,54
CSU	-0,47	-0,61	-0,39	76,29	31,75	35,62	3,58
CA	-1,10	-0,48	0,37	75,46	31,82	35,31	3,92
RIM	-0,44	-0,22	-0,24	74,82	32,33	35,26	3,56
UF	-0,85	-0,47	-0,30	74,23	31,68	35,20	3,66
ICS	-0,46	0,10	-0,03	74,15	32,82	35,00	3,58
BAH	0,78	-0,22	0,13	73,66	33,42	36,15	3,41
CTF	0,08	0,01	-0,54	73,21	32,85	35,23	3,32
CAS	0,09	-0,12	0,31	73,15	33,13	35,65	3,60
PAR	-0,14	-0,57	-0,02	73,07	32,21	35,81	3,61
SGU	-0,09	-0,28	0,22	72,78	32,74	35,63	3,63
MA	-1,14	0,32	0,56	72,48	32,88	34,49	3,87
SDE	-0,05	-0,45	0,55	71,73	32,72	35,90	3,75
CHC	-0,50	-0,68	-0,12	70,81	31,76	35,56	3,67
RB	.	.	.	70,76	28,95	35,99	3,27
BE	-0,32	-0,76	0,13	70,64	31,92	35,84	3,72
MEX	-0,93	-0,32	0,04	68,55	31,96	34,91	3,76
SCA	.	.	.	64,95	29,54	37,52	3,97

um pouco superior. A série Pound (POU) destaca-se pela elevada média de 18:2, que parece ser compensada pelo baixo 18:1, resultando em DSC elevado.

Para facilitar o estudo, as análises foram refeitas excluindo-se os grupos mais extremos: Scavina e RB. Nesta situação, as análises univariadas continuaram mostrando diferenças significativas entre grupos (a 0,26%, para DSC, e 0,01%, para as demais, de probabilidade de erro para a afirmação de diferenças), assim como a análise multivariada (0,01% de probabilidade de erro). As três primeiras variáveis canônicas acumularam 94,23% da variação total (respectivamente, 50,87; 28,86 e 14,54; e novamente as três foram significativas, a 1%) e o agrupamento por Tocher resultou em 9 grupos. Neste método, a definição dos grupos, para os quais as distâncias

dentro são menores que as entre grupos, tem o incremento na média das distâncias dentro do grupo como fator de aceitação ou não do novo componente e o valor de corte é a maior distância entre as menores distâncias para cada grupo. Há, portanto, efeito dos componentes analisados na definição do número de grupos (Figura 2).

Os 10 grupos preliminares com maior DSC distinguiram-se dos demais, constituindo 5 agrupamentos distintos. Além do grupo composto exclusivamente pelos Pounds, já discutidos, formaram-se os agrupamentos CJ e materiais venezuelanos (VE); SPA e IMC; CEPECs do tipo Forastero x Forastero, SC, Pa e Na ; e Ocumare. Houve agrupamentos de materiais de origem e tipos totalmente distintos, como, por exemplo, CJ, tipo

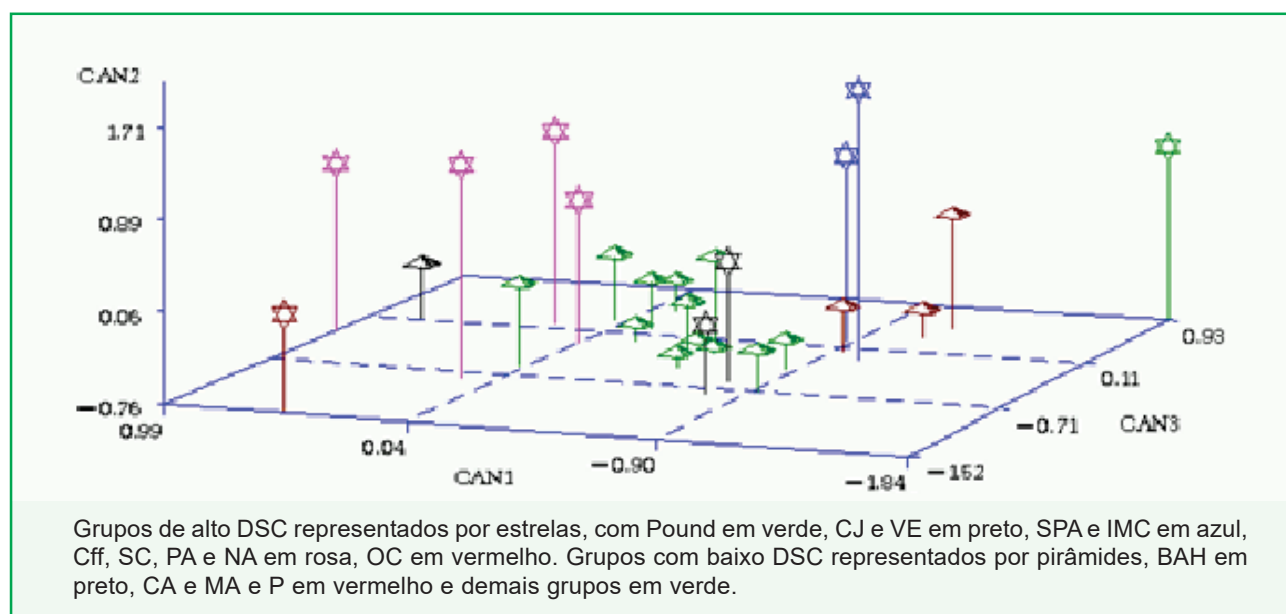


Figura 2 - Dispersão gráfica de grupos de genótipos conforme Variáveis Canônicas para DSC e Ácidos Graxos.

Forastero da Amazônia brasileira e genótipos do tipo Criollo da Venezuela. Não há, então, uma tendência geral conforme origem ou tipo, sendo que materiais predominantemente do tipo Criollo, como os venezuelanos, Ocumare (também da Venezuela), RIM, P ou Trinitários como ICS são intercalados na sequência de valores de DSC por materiais Forastero.

Os membros do grupo CJ e Venezuelanos (5º e 3º na ordem DSC) possuem 18:0 abaixo da média, o que se contrapõe à correlação positiva deste com dureza. No entanto apresentam, também, 18:1 e 18:2 abaixo da média, fatores que podem estar equilibrando o baixo 18:0. O grupo SPA e IMC, 1º e 4º na ordem de DSC, caracterizam-se pelo 18:0 acima da média, 18:1 abaixo e 18:2 em torno da média. Pode, então, ser promissora a seleção dentro de progênies segregantes do cruzamento destes com os anteriores ou com materiais da série Ocumare, que se destaca pelo reduzido nível de 18:2, e tem os outros ácidos graxos em níveis próximos à média geral. Também o grupo Na, Pa, SC e CEPEC dos tipos Forastero x Forastero mostra valores de 18:2 inferiores à média, enquanto que seus valores para 18:1 estão em torno da média e para 18:0 acima da média. Tal combinação é coerente com o DSC elevado e, aparentemente, também promissora para cruzamentos com o grupo SPA-IMC.

Entre os agrupamentos que incluem grupos com DSC menores são observados os seguintes: seleções

das variedades locais da Bahia ; Ca; Ma e P e um último que inclui todos os demais. As seleções da Bahia (BAH) apesar do 18:0 acima da média e 18:2 abaixo, tem o maior valor médio de 18:1. A série CA demonstra 18:0 abaixo da média e 18:2 acima e o grupo Ma e P apresenta 18:2 elevado. O agrupamento com os grupos preliminares restantes mostra valores para os três ácidos graxos em torno das médias gerais.

A princípio, os resultados citados podem parecer excessivamente coerentes com o sentido (sinal) das correlações dos três ácidos graxos com DSC, tendo em conta que o coeficiente de determinação da análise de trilha, considerando todos os ácidos com correlação positiva e todos os genótipos, foi baixo: 0,47 (0,44 considerando apenas 18:0, 18:1 e 18:2). No entanto, usando-se as médias dos grupos pré-determinados, o coeficiente de determinação chega a 0,70, com apenas os três ácidos graxos 18:0, 18:1 e 18:2, de modo que estes explicam de forma consistente a variação de DSC entre estes grupos.

Associação entre dureza e proporções de triglicerídeos

As proporções dos triglicerídeos PLP, POS, POO, PLO, SOS, SOO, OOO, SLS, SLO, SOA e AOO mostraram correlações significativas, a 1%, e SSS, a 5% de probabilidade de erro, com o DSC. Considerando estes triglicerídeos, constata-se

colinearidade severa, com a determinante da matriz de correlação próxima de zero (0,00179). Neste caso, novamente, a análise de trilha, foi conduzida efetuando-se previamente a soma de uma constante aos elementos da diagonal da matriz de correlações (CRUZ 1997) e com esta foram observados valores baixos para os efeitos diretos de todas as variáveis. Os maiores valores observados estiveram entre 0,064 e 0,118: triglicerídeos, PLP, POO, PLO, SOS, SOO, SLS, SLO e AOO sendo estes, também, os principais elementos quanto aos efeitos indiretos (efeitos diretos baixos indicam necessidade de inclusão das variáveis importantes em respeito aos efeitos indiretos na seleção conjunta). Ocorre então, a princípio, uma estrutura mais complexa que a observada com os ácidos graxos, para a utilização dos valores de triglicerídeos no auxílio a seleção para dureza. Ainda, o coeficiente de determinação foi baixo: 0,36.

Quando consideradas as médias dos grupos pré-estabelecidos e apenas os oito triglicerídeos, de maiores efeitos diretos na análise anterior, as correlações totais com DSC passam a ser altas, principalmente para POO, PLO, SOO, SLS E AOO (maiores que 0,7 – desconsiderando-se o sinal) e há correlações entre os triglicerídeos, superiores a 0,90 de modo que POO e SLS podem ser descartados como redundantes. Para as variáveis restantes, DSC, PLP, PLO, SOS, SOO, SLO e AOO, há colinearidade fraca e, pela análise de trilha, os seis triglicerídeos, explicam 79,92 % da variação de DSC. O AOO tem efeito direto desprezível e o PLP, apesar de seu efeito direto razoavelmente elevado (0,31) tem este em sentido oposto à correlação total (-0,37) com a maior parte de seus efeitos sendo produzidos via PLO e SOS. Assim, a exclusão de ambos causa redução mínima no coeficiente de determinação (passa a 78,09%). Ainda, a variável SLO tem a maior parte de seus efeitos determinados por PLO e SOS, de modo que sua exclusão também resulta em pouca alteração no coeficiente de determinação (passa a 76,75% - coeficientes de correlação direta de SOS, SOO e PLO: 0,59; -0,78 e -0,76, respectivamente). Assim, foram selecionados os triglicerídeos, SOS, SOO e PLO para o estudo das diferenças entre os grupos pré-definidos, e estes triglicerídeos, mostram correlações elevadas com os ácidos graxos 18:0 (0,91), 18:1 (0,91) e 18:2 (0,78), respectivamente, que

foram usados nas análises anteriores, o que leva a previsão de resultados semelhantes.

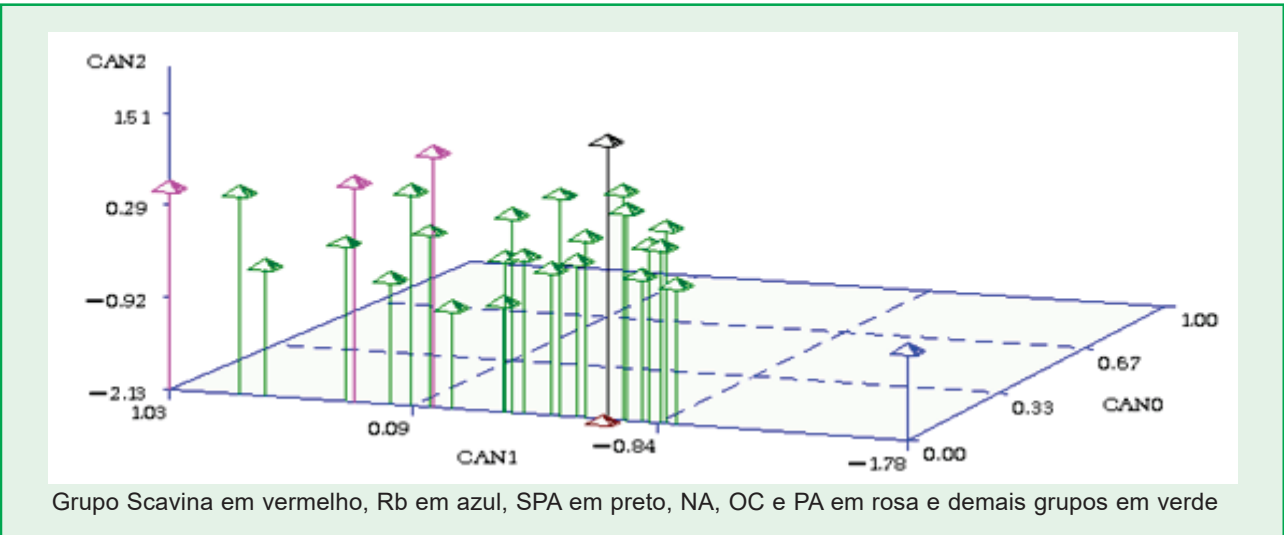
Diferenças entre grupos de acessos para dureza e proporções de triglicerídeos

Há diferenças significativas entre médias dos grupos pré selecionados pelo teste F ao nível de 0,01% de probabilidade de erro, para SOO e SOS, e a 0,15%, para PLO, nas análises de variância univariadas. SOO e SOS tiveram distribuição não distinta da normal, a 5% e a distribuição do PLO diferiu significativamente, a 1%, mas sua distribuição foi bastante próxima da normal - pela ordem: $W = 0,979$; $0,978$; e $0,935$ - Shapiro-Wilk. A análise multivariada contemplando estes três triglicerídeos e o DSC mostrou diferenças significativas entre grupos em nível de 0,01% de probabilidade pelo teste de Wilks. As duas primeiras variáveis canônicas foram as únicas significativas e acumularam 83,22% do total de variação das quatro variáveis originais.

A representação gráfica por estas variáveis canônicas (Figura 3 - foi preservada a mesma estrutura de gráfico, mas agora só duas dimensões são consideradas) destaca, novamente, as séries Scavina e RB, duas das séries com menores DSC, tendo ambas os menores valores para SOS e, ainda, os Scavinas as maiores médias de SOO e PLO, aspectos concordantes com os baixos DSC (Tabela 3).

O agrupamento por Tocher, além destes dois grupos, forma, de modo distinto da análise anterior, um terceiro grupo incluindo apenas a série SPA (maior DSC), com o mais baixo SOO e SOS acima da média, outro com três dentre os 10 grupos preliminares com maiores DSC, Na (2°), Oc (10°) e Pa (6°), destacados pelas menores médias de PLO e médias de SOS entre os maiores valores; e um quinto incluindo todos os demais, sem separação para a série Pound (ocorrida na análise com os ácidos graxos).

Novamente com a exclusão dos grupos mais extremos: Scavina e RB, as análises univariadas continuaram mostrando diferenças significativas entre grupos (a 0,01% para SOO e SOS e a 0,25% para PLO) assim como a análise multivariada (0,01% de probabilidade). As duas primeiras variáveis canônicas, as únicas significativas, acumularam 84,02% da variação total e os grupos considerados são apresentados na Figura 4, de acordo com as



Grupo Scavina em vermelho, Rb em azul, SPA em preto, NA, OC e PA em rosa e demais grupos em verde

Figura 3. Dispersão gráfica de grupos de genótipos conforme Variáveis Canônicas para DSC e Triglicerídeos.

Tabela 3 - Médias de séries para DSC, para os ácidos triglicerídeos, SOO, SOS e PLO, em %, e valores das duas primeiras variáveis canônicas, para a análise com a exclusão dos grupos extremos SCA e RB (variáveis canônicas relativas à figura 4) (ordenado pelo DSC)

GRUPO	CAN1	CAN2	DSC	SOO	SOS	PLO
SPA	-1,31	0,86	80,63	3,65	21,57	0,81
NA	-0,49	1,21	80,58	4,04	22,61	0,54
VE	-0,99	0,18	80,37	4,87	19,86	0,75
IMC	-0,78	0,54	80,15	4,62	21,08	0,72
CJ	-0,94	0,34	79,57	4,65	20,39	0,74
PA	0,69	0,90	78,70	5,71	23,93	0,64
SC	-0,28	0,51	78,20	5,10	22,20	0,80
CFF	0,44	0,79	77,51	5,46	23,40	0,64
POU	-1,09	0,32	76,96	4,31	20,75	0,83
OC	0,00	0,96	76,88	4,60	22,75	0,50
CC	-0,87	-0,08	76,43	5,00	19,65	0,75
CSU	-0,48	-0,19	76,29	5,61	20,00	0,78
CA	-0,35	-0,27	75,46	5,84	20,45	0,88
RIM	-0,69	-0,11	74,82	5,15	20,33	0,85
UF	-0,86	-0,20	74,23	4,99	19,78	0,82
ICS	-0,58	-0,01	74,15	5,13	21,18	0,93
BAH	0,71	-0,18	73,66	6,76	22,14	0,82
CTF	-0,08	0,15	73,21	5,32	21,52	0,71
CAS	0,25	-0,07	73,15	6,07	21,93	0,85
PAR	0,25	-0,64	73,07	6,78	20,19	0,82
SGU	-0,29	-0,37	72,78	5,80	20,60	0,91
MA	-0,66	-0,49	72,48	5,46	19,40	0,82
SDE	0,27	-0,51	71,73	6,56	21,06	0,91
CHC	-0,39	-0,50	70,81	5,66	20,13	0,87
RB	.	.	70,76	5,70	16,75	0,82
BE	-0,03	-0,83	70,64	6,54	19,94	0,93
MEX	-0,83	-0,98	68,55	5,65	19,06	1,06
SCA			64,95	8,39	17,51	1,19

médias para estas variáveis. Os agrupamentos por Tocher são influenciados pela seleção inicial, que no caso foi CJ e Venezuelanos, seguidos pela serie CC, o que dirigiu o processo ao agrupamento entre materiais com maiores e menores DSC situados na parte central direita da figura (não apresentado). Não houve, portanto, uma boa separação entre os grupos preliminares com maiores e menores médias de DSC por este método, e para facilitar a comparação visual entre as figuras representantes da dispersão gráfica entre os grupos pré-definidos, conforme a consideração dos ácidos graxos ou triglicerídeos (Figura 2 e Figura 4), a ilustração dos agrupamentos por Tocher foi omitida na segunda, que preservou a codificação de cores da primeira (notar que a tendência de agrupamento seria bem diferente).

Em ambas as figuras, no entanto, os grupos de menores DSC ocupam a parte inferior e os de maiores DSC ocupam principalmente a parte superior, com o grupo dos venezuelanos e as séries CJ e IMC, com SOS em torno e PLO e SOO abaixo das médias gerais, Pound, com SOO abaixo da média, e SPA em posição oposta a ocupada pelos CEPEC descendentes de cruzamentos Forastero x Forastero e as series Na, SC, Ocumary e Pa, que mostram as 5 maiores médias de SOS. Para os grupos de menores DSC, há também coincidência no posicionamento à direita ou esquerda com

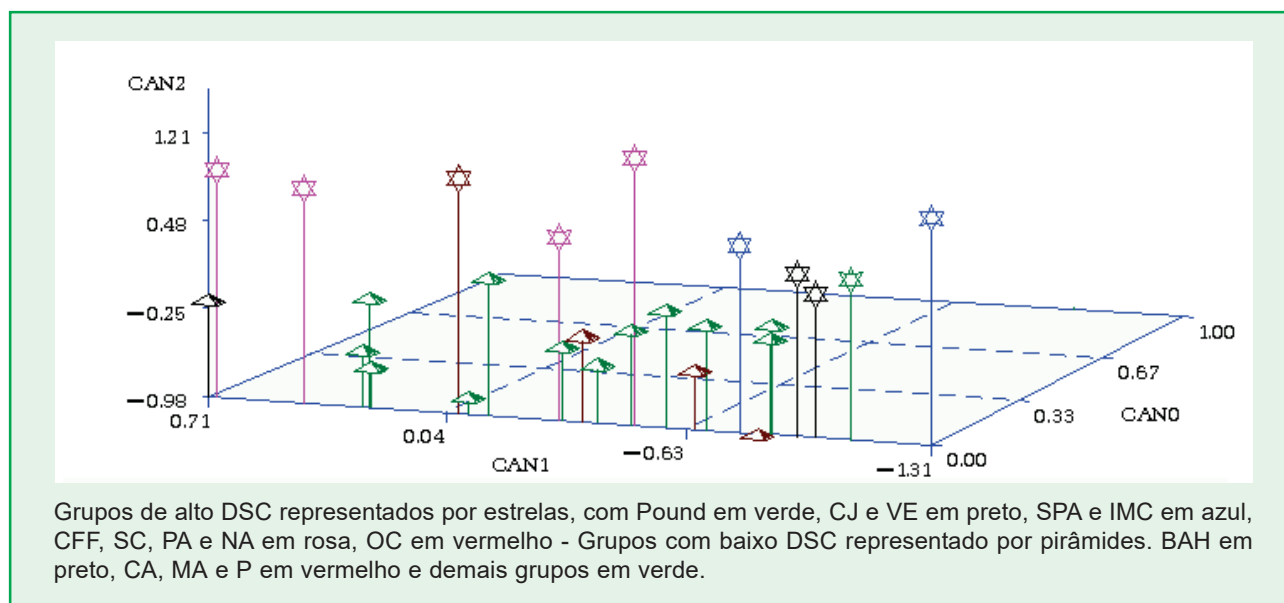


Figura 4. Dispersão gráfica de grupos de genótipos conforme Variáveis Canônicas para DSC e Triglicerídeos.

exceção da série SGU, que troca de posição, e um posicionamento intermediário da série Be. Assim, os triglicerídeos selecionados mostram adequação semelhante à apresentada pelos ácidos graxos na diferenciação entre grupos (podendo ser igualmente úteis se considerados para a seleção simultânea com enfoque na dureza).

Efeito do pólen na determinação da dureza de gordura

De cada um das combinações de um processo de polinização controlada na forma de um dialelo completo (incluindo recíprocos) entre genótipos de elevado (Cruzeiro do Sul 7, Pa 17 e CAS 1) e baixo teor de gordura (SIC 4, CC 39, ICS 9) (Pires et al. 1998), foi obtida uma única amostra, que foi avaliada em duas repetições. Deste modo, o efeito das combinações específicas é influenciado pelo efeito da amostra e, assim, foram analisados só os efeitos de pai e mãe, com base em um resíduo formado pelas diferenças entre medições de cada amostra inflacionado pela interação pai x mãe.

Tendo-se os ácidos graxos selecionados anteriormente, 18:0 18:1 e 18:2, e a avaliação de dureza, foram constatadas diferenças significativas entre mães, ao nível de 0,01% de probabilidade de erro, para as quatro variáveis, o que mostra, mais uma vez, a possibilidade de seleção para dureza. Já os efeitos paternos, foram constatados como significativos, ao

nível de 0,1% de probabilidade para os três ácidos graxos, mas o nível de distinção entre os materiais avaliados e a precisão experimental alcançada não permitiram a observação de significância nas diferenças para DSC. A ocorrência de efeito paterno para dureza, no entanto, pode ser intuída pela diferença entre os níveis de ácidos graxos e pela relação destes com o DSC, conforme já apresentado.

Considerando as quatro variáveis conjuntamente, foram constatadas diferenças significativas a 0,01% para mãe e para efeito do pólen, pelo teste de Wilks. De todos os contrastes possíveis entre mães, duas a duas, apenas CC 39 e Cruzeiro do Sul 7 não foram significativamente diferentes (CC 39 e SIC 4 diferiram a 3% de probabilidade de erro para esta afirmação e as demais combinações a 0,05% ou menos) (médias ajustadas mães e pais são apresentadas na Tabela 4). O agrupamento das mães mais similares, por Tocher, usando-se a matriz de distâncias Euclidianas das médias de mães ajustadas para efeito de pai distingue os genótipos CAS 1 e SPA 17 entre si e dos demais, que formam um terceiro grupo. Estes dois tem as maiores médias de DSC e de 18:0, SPA 17 tem a menor média de 18:1 e CAS 1 a menor de 18:2, aspectos coerentes com os altos DSC.

Dos contrastes possíveis entre doadores de pólen, as diferenças foram significativas a 5% de probabilidade ou menos, entre todas as combinações,

Tabela 4. Médias de dureza de gordura (DSC) e de ácidos graxos relacionados com a dureza (18:0, 18:1 e 18:2), relativas as mães e fornecedores de pólen, para sementes F1 de um cruzamento em Dialelo

MÃE	DSC	18:0	18:1	18:2	PAI	DSC	18:0	18:1	18:2
CAS1	91,09	37,66	33,09	2,38	CAS1	89,92	36,39	32,71	2,57
CC39	86,93	35,08	33,85	2,57	CC39	88,57	35,85	33,40	2,58
CSUL7	88,52	34,02	33,47	2,51	CSUL7	87,76	33,46	33,68	2,48
ICS9	85,72	31,39	33,35	2,50	ICS9	87,96	34,30	32,90	2,83
SIC4	87,93	36,32	33,17	2,70	SIC4	88,12	36,29	33,51	2,44
SPA17	90,69	37,19	31,93	2,83	SPA17	88,53	35,36	32,66	2,59

a exceção de CAS 1 e CC 39, CAS 1 e SPA 17 e CC 39 e SIC 4 (considerando-se as 4 variáveis conjuntamente). O CAS 1 preservou a posição de maior média numérica de DSC e 18:0, sendo significativamente diferente do Cruzeiro do Sul 7, para DSC (a 1% de probabilidade, na comparação entre médias ajustadas, apesar da análise de variância não ter identificado efeito de pai) e de Cruzeiro do Sul 7 e ICS 9 para 18:0 (1 % de probabilidade), que mostraram os menores valores para esta variável, também como mães. Por outro lado, o CAS 1 não produziu redução na média de 18:2 (cujo baixo valor era sua particularidade como mãe), enquanto que o ICS 9 teve média significativamente superior a todas os demais para este caráter, embora não tivesse destaque como mãe. Este também atuou na redução de 18:1 e, mais expressivamente, na de 18:0. O SPA 17, por sua vez não agiu fortemente na elevação do 18:0 e redução de 18:1, sendo significativamente diferente para estes caracteres apenas do Cruzeiro do Sul 7.

Numa abordagem geral, poder-se-ia inferir que os efeitos de pólen, apesar de complexos e pouco acentuados, devem ser considerados na avaliação de genótipos em respeito à dureza e variáveis relacionadas (a forma de amostragem aqui utilizada para o estudo destes caracteres é, então, um procedimento adequado - a mistura de um grande número de frutos para a retirada de amostras reduz os possíveis efeitos de fornecedores específicos de pólen).

Foram observados resultados análogos quando da consideração dos triglicédeos previamente selecionados. Houve diferenças significativas entre mães para SOO e SOS a 0,01%, o mesmo ocorrendo entre fornecedores de pólen a 1%; não foram constatadas diferenças para PLO; e os efeitos de pai e mãe foram altamente significativos na análise de variância multivariada com estas três variáveis e o DSC.

Relações entre as características “per se” de clones e a capacidade geral de combinação para dureza de gordura

Para valores de DSC, a análise de amostras de sementes obtidas em duas das repetições de três ensaios de avaliação de progênies híbridas conduzidos no CEPEC, constituídos, conjuntamente, pelos cruzamentos entre as mães AB 1, Be 2, 3, 4 e 5, Ca 2, Ma 12 e 14, RB 40 e 48, os pais ICS 1, 8, SIAL 325 e SIC 19, e as testemunhas SIC864 x ICS1 e SIC19 x ICS1, não mostrou efeitos significativos de ensaio, nem da interação entre tratamentos comuns e ensaios (a 5%) e apenas os efeitos de mãe e mãe x pai foram significativos (com 5 e 2%, respectivamente, de probabilidade de erro). As médias não ocuparam uma grande faixa de variação (de 75,74 a 80,59%, para as mães e de 77,98 a 79,59 para os pais), mas foi possível observar uma forte associação entre os desempenhos ‘per se’ dos clones e suas médias como progenitores: coeficientes de correlação de Pearson de 0,76, com significância de 1,8%, para mães, e de 0,79, com probabilidade de erro de 41,5% (não significativo), para pais; e coeficientes de correlação de Spearman de 0,77 a 1,6% para mães e de 1,00 a 0,01% para pais. E isto mostra que a seleção de clones para dureza de gordura é eficiente para a determinação da dureza em suas progênies.

Conclusões

Há diferenças entre grupos de genótipos de cacau de diferentes origens para a composição e dureza da manteiga. Os ácidos graxos esteárico, oléico e linoléico são os mais importantes na determinação da dureza de gordura e importantes variáveis auxiliares do DSC para se alcançar uma melhor diferenciação entre grupos de genótipos. Os triglicerídeos SOS, SOO e

PLO são igualmente efetivos como variáveis auxiliares do DSC para a diferenciação entre grupos de genótipos. Há uma forte associação entre as características 'per se' e as médias como progenitores para dureza de gordura, mostrando a importância da avaliação de germoplasma quanto a este caráter para o propósito de seleção de genótipos para introdução nos programas de melhoramento. Os efeitos de pólen devem ser considerados na avaliação de genótipos em respeito à dureza e variáveis relacionadas. Os descendentes do clone Scavina 6 mostram dureza inferior à média geral da coleção avaliada, sendo que a maior parte das variedades atualmente indicadas para cultivo comercial na Bahia são descendentes deste clone.

Literatura Citada

- BERBERT, P. R. F.; ALVIM, P. T. 1972. Fatores que afetam o índice de iodo da manteiga de cacau do Brasil. *Theobroma* (Brasil) 2(1): 3-16.
- BERBERT, P. R. F. 1976. Influência das condições climáticas na composição química e características físicas da manteiga do cacau. *Theobroma* (Brasil) 6(3): 67-76.
- CARPENTER, D. R. et al. 1994. Lipid composition of *Herrania* and *Theobroma* seeds. *Journal American Oil Chemists Society* (USA) 71:845-851.
- CHAISIERI, S.; DIMICK, P. S. 1989. Lipid and hardness characteristics of cocoa butters from different geographic regions. *Journal American Oil Chemists Society* (USA) 66: 1771-1776.
- CHAISIERI, S.; DIMICK, P. S. 1995a. Dynamic crystallization of cocoa butter. 1. Characterization of simple lipids in rapid- and slow-nucleating cocoa butters and their seed crystals. *Journal American Oil Chemists Society* (USA) 72:1491-1496.
- CHAISIERI, S.; DIMICK, P. S. 1995b. Dynamic crystallization of cocoa butter. 2. Morphological, thermal, and chemical characteristics during crystal growth. *Journal American Oil Chemists Society* (USA) 72:1497-1504.
- COE, S. D.; COE, M. D. 1996. In *The true history of chocolate*. Thames and Hudson Inc. New York.
- CRUZ, C. D. 1997. Programa GENES. Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG, UFV. 442p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. 1997. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG, UFV. 390p.
- DIMICK, P. S. 1991. Principles of cocoa butter crystallization. *The Manufacturing Confectioner*. 109-114.
- ESCRIVA, M. V. G. et al. 2002. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behavior of fats from Brazilian *Theobroma* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (UK) 82(13):1425-1431.
- GEERART, E.; SANDRA, P. 1987. Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase. Part II. The analysis of chocolate fats. *Journal American Oil Chemists Society* (USA) 64: 100-105.
- GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. 1994. *The lipid handbook*. Chapman and Hall. London.
- HARWOOD, J. L. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Bioch. et Biophys. Acta* 1301:7-56.
- HELRICH, K. 1990. (Ed.) *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. vol. II, 15th edn., Arlington, EUA. pp. 963-965.
- KHAN, N. et al. 2008. Variability of butterfat content in cacao (*Theobroma cacao* L.): combination and correlation with other seed-derived traits. *International Cocoa Genebank, Trinidad. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 1-12. Doi:10.1017/S1479262108994132.
- KENNEDY, A. J. et al. 1987. Cocoa breeding: past, present and future. *Cocoa Growers' Bulletin* (UK) 38: 5-22.
- LEHRMAN, D. W.; KEENEY, P. G.; BUTLER, D. R. 1980. Triglyceride characteristics of cocoa butter from cacao fruit matured in a microclimate of elevated temperature. *Journal American Oil Chemists Society* (USA) 57: 66-69. Doi: 10.1007/BF02674362

- LINDER, C. R. 2000. Adaptive Evolution of Seed Oils in Plants: Accounting for the Biogeographic Distribution of Saturated and Unsaturated Fatty Acids in Seed Oils. *The American Naturalist* (USA) 156(4):442-458. Doi: 10.1086/303399. PMID: 29592140.
- MCHENRY, L.; FRITZ, P. J. 1987. Cocoa butter biosynthesis: effect of temperature on *Theobroma cacao* acyltransferases. *Journal American Oil Chemists Society* (USA) 64: 1012-1015.
- MUSTIGA, G. M. et al. 2019 Identification of Climate and Genetic Factors That Control Fat Content and Fatty Acid Composition of *Theobroma cacao* L. Beans. *Front. Plant Science* (USA) 10:1159. Doi: 10.3389/fpls.2019.01159
- PIRES, J. L. et al. 1998. Increasing cocoa butter yield through genetic improvement of *Theobroma cacao* L.: Seed fat content variability, inheritance and association with seed yield. *Euphytica* (USA) 103:115-121.
- SAS INSTITUTE INC. 1988. SAS/STAT User's Guide. Release 6.03. Cary, NC: SAS Institute Inc. 1028p.
- SLABAS, A. R.; FAWCETT, T. 1992. The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. *Plant Molecular Biology* (USA) 19: 169-191.
- WOOD, G. A. R; LASS, R. A. 2001. Cocoa. 4th. ed. London: Longman.
-