

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO FUNGO CAUSADOR DA VASSOURA-DE-BRUXA VISANDO DETERMINAR OS NÍVEIS ACEITÁVEIS DE SEMENTE DE CACAU DANIFICADAS PARA O APROVEITAMENTO INDUSTRIAL

PATRÍCIA H. MITIYUE¹; PRISCILLA EFRAIM²; VALDECIR LUCCAS³, MARTA H. TANIWAKI⁴

Nº 0801014

Resumo

Pela dificuldade de se eliminar a doença vassoura-de-bruxa e evitar prejuízos econômicos, os produtores de cacau da Bahia têm misturado sementes de cacau danificadas pela vassoura-de-bruxa com sementes sadias na etapa de fermentação em proporções que variam de 30 a 50%. Pela falta de pesquisas nesta área, o presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da utilização dessas misturas à qualidade dos produtos (*liquor*, manteiga e pó de cacau) e avaliar o nível aceitável para aproveitamento industrial. Desta forma, foram realizadas fermentações misturando-se 0, 30, 50 e 100 % de sementes de cacau danificadas pelo fungo de vassoura-de-bruxa e os produtos obtidos dessas amostras foram caracterizados química, física e físico-quimicamente. Não foram observadas diferenças entre as amostras quanto as características da manteiga de cacau (teor de gordura sólida e composição de ácidos graxos), bem como ao teor de cotilédones das amêndoas fermentadas e secas. A amostra com 30 % de amêndoas danificadas pelo fungo apresentou-se similar à amostra normal quanto ao perfil de fermentação, prova de corte, teor de lipídeos, proteínas e viscosidade. No entanto, as amostras com 30, 50 e 100 % de sementes danificadas apresentaram alteração na composição dos voláteis de importância ao sabor do cacau (alquilpirazinas), possivelmente prejudicando a qualidade sensorial dos produtos finais.

Abstract

Due to the difficulty to eliminate the witches' broom disease and to prevent economic damages, the Bahia's cocoa producers are using 30 to 50 % of cocoa seeds infected by the fungus mixing with healthy seeds in the fermentation stage. There is no researches that have studied these

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas-SP, ✉ patricia.harumi@yahoo.com.br

² Orientador: Pesquisador, CEREAL CHOCOTEC/ITAL, Campinas-SP, ✉ efrain@ital.sp.gov.br

³ Colaborador: Pesquisador, CEREAL CHOCOTEC/ITAL, Campinas-SP

⁴ Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP

mixtures of seeds, so this study aimed to analyze the fungus influence on cocoa's products obtained by these mixtures (*liquor*, cocoa butter and cocoa powder) and evaluate the acceptable levels for industrial utilization. Fermentations were carried out mixing 0, 30, 50 and 100% of cocoa seeds with witches' broom with healthy seeds. The samples obtained were processed in cocoa products (liquor, butter and powder cocoa), which were characterized chemically, physically and physico-chemically. The cocoa butter characteristics (solid fat content and fatty acid composition) of all samples and the cotyledon content of fermented and dried cocoa beans were similar. The mixture with 30 % of damaged seeds didn't show differences in relation with the healthy samples on the fermentation parameters evaluated, cut test, total lipids and protein content and viscosity. However, the use of seeds with witches' broom on the studied proportions (30, 50 and 100%) decreased the pyrazines concentration on *liquor*, decreasing the flavor quality of the obtained products.

Introdução

Desde 1989 o setor cacauero no Brasil, principalmente o Estado da Bahia, maior produtor nacional, vem sofrendo uma grave crise causada principalmente pela presença do fungo *Moniliophthora perniciosa*, responsável pela doença denominada vassoura-de-bruxa. Uma vez que o fungo tem apresentado alto poder de mutação, o setor cacauero da Bahia vem enfrentando uma grande dificuldade para erradicar a doença. Desse modo, pesquisas sobre as bases genéticas de cultivares de cacau resistente ou até mesmo sobre o fungo; produtos químicos ou elementos biológicos que atuem contra o fungo estão paralelamente em andamento para a melhoria da situação atual da cacauicultura brasileira (PIRES, 2003; SCARPARI *et al.*, 2005). No entanto, devido à demanda constante e à baixa produtividade dos cacaueros da região, tem-se verificado a utilização de 30 a 50 % de sementes de cacau danificadas pelo fungo causador da doença junto com sementes de cacau sadias nas etapas de fermentação e secagem a fim de evitar prejuízos econômicos. Até o momento, não foram reportados trabalhos científicos publicados que avaliaram microbiológica, química, física e físico-quimicamente misturas de sementes de cacau danificadas pelo fungo vassoura-de-bruxa.

Material e Métodos

Foram utilizadas amêndoas de cacau provenientes de frutos de cacau da Bahia danificados e não danificados pela VB. Para a fermentação, foram preparados quatro lotes de sementes contendo 0, 30, 50 e 100 % de sementes danificadas pelo fungo da vassoura-de-bruxa. A

fermentação foi realizada em caixas de isopor de 5 L com orifícios no fundo. Após 48 horas do início da fermentação foram feitos revolvimentos para oxigenar e homogeneizar as sementes, repetindo-se a cada 24 h até o final da etapa de acordo com a evolução dos parâmetros temperatura e pH medidos. A secagem das amêndoas foi realizada em estufa a 35 °C durante 2 a 3 dias, até umidade inferior a 8,0% (BRASIL, 1988).

As amêndoas fermentadas e secas foram quebradas em moinho de facas RIETZ. Testa e gérmen foram removidos por diferença de densidade em coluna de ar para obtenção dos *nibs*. Estes foram torrados em forno elétrico rotativo PROBAT, a 140°C/36 min, triturados e refinados em moinho de 3 cilindros DRAISWERKE GMBH, até tamanho máximo de partículas de 25 µm para obtenção do *liquor* de cacau. Este foi prensado em uma prensa hidráulica manual CARVER, durante 5 min a 3 toneladas, 15 min a 6 t e 10 min a 9 t. Após a separação da manteiga de cacau, a torta foi moída em um miniprocessador BLACK & DECKER obtendo-se o pó de cacau.

As amêndoas foram avaliadas de acordo com a massa de 100 unidades; densidade aparente, através do deslocamento volumétrico de sementes do tipo colza em um determinador de volume específico; composição das frações das amêndoas e prova de corte (BRASIL, 1988). Os *nibs* e *liquores* foram avaliados através de medidas de pH, acidez titulável, teor de proteínas e lipídeos de acordo com Freeman (2005) e teor de compostos fenólicos (EFRAIM *et al.*, 2006); No *liquor* foram determinados a umidade (FREEMAN, 2005), a viscosidade plástica e o limite de escoamento (GILABERT ESCRIVÁ, 1997); o teor de teobromina e cafeína (ALVES & BRAGAGNOLO, 2002); e o teor de compostos voláteis através da técnica de micro extração em fase sólida utilizando-se fibra CARBOXEN e um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de massas GC-MS marca HP, modelo HP5890/5970 com condições de processo de acordo com Pini *et al.* (2005). Analisou-se a manteiga de cacau pelo teor de gordura sólida (FIRESTONE, 1998) e pela composição de ácidos graxos de acordo com AOCS (2004). No pó de cacau analisou-se a cor pelo sistema L a*b*, de acordo com Bispo (1999).

Resultados e Discussão

Durante a etapa de fermentação verificou-se similaridades na progressão da temperatura da massa em fermentação das amostras com 0 e 30 % de sementes com vassoura-de-bruxa sendo que a faixa máxima de temperatura (40 a 45 °C) foi atingida após 72 h. As amostras

contendo 50 e 100 % de sementes danificadas atingiram sua temperatura máxima (36 e 41 °C, respectivamente) antes das 72 horas, e em seguida apresentaram uma diminuição drástica, dessa forma, sua fermentação foi interrompida em 96 horas. As amostras VB 0 e VB 30 tiveram a fermentação interrompida em 120 horas. O comportamento distinto observado nas fermentações das amostras VB 50 e VB 100 em relação à VB 0 estão possivelmente associados à presença de maior teor de sementes danificadas pela vassoura-de-bruxa, uma vez que estas apresentavam reduzido teor de polpa. É possível ainda que as sementes danificadas tenham sofrido reações e alterações químicas no interior do fruto ainda no cacauero (SCARPARI *et al.*, 2005; PEREIRA, 1996).

Ao analisar os resultados da prova de corte, verificou-se similaridade entre as amostras com 0 e 30 % de sementes danificadas, sendo que as mesmas não apresentaram diferenças estatísticas significativas ao nível de 5% para os parâmetros avaliados. É interessante ressaltar que a prova de corte é uma técnica utilizada na compra de amêndoas de cacau pelas indústrias processadoras, então apenas pela avaliação da prova de corte, não seria possível diferenciar amostras VB 0 e VB 30.

Pelos resultados da análise física realizada nas amêndoas de cacau fermentadas e secas (Tabela 1) foram observadas diferenças entre as amostras devido à presença das sementes danificadas. A massa de 100 amêndoas, a densidade aparente e a porcentagem de gérmen das amostras foram menores conforme o aumento da porcentagem de sementes danificadas. No entanto, é importante ressaltar que a quantidade de cotilédone permaneceu a mesma entre as amostras, sendo a partir dele que se obtêm os *nibs*, *liquor*, manteiga e pó de cacau.

TABELA 1. Características físicas das amêndoas fermentadas e secas

Determinações*	VB 0	VB 30	VB 50	VB 100	MDS**
Massa 100 amêndoas (g)	101,20 ± 0,88 ^a	97,10 ± 0,44 ^b	97,96 ± 2,11 ^b	92,36 ± 0,69 ^c	3,18
Densidade aparente (g/cm ³)	0,641 ± 0,000 ^a	0,599 ± 0,010 ^b	0,577 ± 0,010 ^c	0,532 ± 0,006 ^d	0,020
Testa (%)	14,52 ± 1,20 ^a	15,77 ± 1,44 ^a	16,09 ± 0,86 ^a	15,39 ± 0,26 ^a	2,72
Gérmen (%)	0,98 ± 0,05 ^a	0,87 ± 0,03 ^b	0,80 ± 0,01 ^b	0,61 ± 0,03 ^c	0,08
Cotilédone (%)	84,5 ± 1,16 ^a	83,36 ± 1,4 ^a	83,12 ± 0,86 ^a	84,01 ± 0,27 ^a	2,65

VB 0, VB 30, VB 50 e VB 100 representam a porcentagem que a amostra contém de sementes danificadas pelo fungo da vassoura-de-bruxa. *Média ± desvio padrão; **Mínima Diferença Significativa. Valores de uma mesma linha com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância - Teste de Tukey

Os teores de proteínas e lipídeos dos *nibs* foram próximos entre as amostras estudadas, em torno de 13,7 % e 51 %, respectivamente. Em relação ao pH observou-se o aumento dos valores quanto maior a proporção de sementes danificadas, de 4,92 (VB 0) para 6,28 (VB 100) e inversamente, a acidez foi de 9,42 meq NaOH/100g (VB 0) para 2,10 meq NaOH/100 g (VB 100). As diferenças entre as amostras quanto ao pH e acidez podem ter sido causadas pelo teor reduzido de polpa que envolvia as sementes danificadas pela vassoura-de-bruxa no início da fermentação, prejudicando o desenvolvimento dos microorganismos responsáveis pela formação de ácidos láctico e acético, que ocorrem em uma fermentação normal e influenciam fortemente os valores de pH e acidez titulável.

Os resultados físico-químicos obtidos para o *liquor* foram similares aos dos *nibs* nas determinações de pH, acidez titulável e teor de proteínas (nitrogênio total). Os valores de viscosidade plástica do *liquor* apresentaram-se maiores quanto maior a proporção de sementes danificadas pela vassoura-de-bruxa (Tabela 2), sendo que a amostra VB 100 apresentou um valor 60% maior em relação a amostra VB 0. Como a temperatura durante o processo foi controlada a 40 °C e os resultados de umidade, teor de lipídeos e tamanho de partícula foram bem próximos, em torno de 1 %, 57 % e 22 µm respectivamente, provavelmente a utilização de sementes danificadas pela vassoura-de-bruxa provocou um substancial aumento da viscosidade dos *liquores*. As amostras VB 0 e VB 30 não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de significância para viscosidade plástica, porém apresentaram diferença para o limite de escoamento.

TABELA 2. Caracterização dos *liquores*

Determinações*	VB 0	VB 30	VB 50	VB 100	MDS**
Viscosidade Plástica (P)	25,92 ± 0,99 ^c	25,37 ± 0,95 ^c	33,76 ± 0,22 ^b	41,6 ± 1,46 ^a	2,01
Lim. de escoamento (D/cm ²)	0,58 ± 0,04 ^b	0,75 ± 0,05 ^a	0,67 ± 0,02 ^{ab}	0,66 ± 0,02 ^{ab}	0,09
Teobromina (mg/100g)	1,164 ± 0,006 ^b	1,216 ± 0,036 ^{ab}	1,215 ± 0,005 ^{ab}	1,283 ± 0,012 ^a	0,08
Cafeína (mg/100g)	0,193 ± 0,002 ^b	0,196 ± 0,002 ^b	0,196 ± 0,001 ^b	0,207 ± 0,000 ^a	0,01

VB 0, VB 30, VB 50 e VB 100 representam a porcentagem que a amostra contém de sementes danificadas pelo fungo da vassoura-de-bruxa. * Média ± desvio padrão; **Mínima Diferença Significativa. Valores de uma mesma linha com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância – Teste de Tukey

De acordo com a Tabela 2, verificou-se diferença estatística significativa ao nível de 5% entre as amostras VB 0 e VB 100 quanto aos teores de metilxantinas, sendo que esta última apresentou valores 10,22 e 7,25 %, respectivamente maiores de teobromina e cafeína em relação ao VB 0. De acordo com Aneja & Gianfagna (2001), a infecção dos tecidos das plantas

pelo fungo causador da vassoura-de-bruxa pode gerar mecanismos bioquímicos de defesa, evidenciados pelo aumento dos níveis de metilxantinas e de compostos fenólicos.

A curva de sólidos e a composição dos ácidos graxos da manteiga de cacau de todas as amostras apresentaram grande similaridade. Este resultado é um bom indicativo de que a manteiga de cacau não sofreu danos causados pelo fungo.

O pó de cacau da amostra VB 0 apresentou valores, no sistema de leitura CIE (Commission Internationale d' Eclairage) de $L = 55,5$, $a^* = 12,12$, $b^* = 16,55$; a VB 30 apresentou $L = 56,94$, $a = 11,19$, $b = 16,96$; a VB 50 apresentou $L = 55,08$, $a = 11,64$, $b = 17,36$; e a VB 100 apresentou $L = 53,81$, $a = 11,27$, $b = 17,47$. As amostras apresentaram-se estatisticamente diferentes entre si em todos os parâmetros (L^* , a^* e b^*), sendo que a amostra VB 30 apresentou-se mais clara; VB 0 mais vermelha e VB 100 mais amarela em comparação com as demais.

TABELA 3. Teor de compostos fenólicos totais (mg/100g)

Amostras	VB 0	VB 30	VB 50	VB 100	MDS**
<i>Nibs*</i>	103,34 ± 6,15a	81,16 ± 0,74b	80,80 ± 2,25b	76,45 ± 2,28b	9,12
<i>Liquor*</i>	80,26 ± 0,55a	71,46 ± 0,89b	66,88 ± 1,27c	60,34 ± 0,98d	2,53

VB 0, VB 30, VB 50 e VB 100 representam a porcentagem que a amostra contém de sementes danificadas pelo fungo da vassoura-de-bruxa. * Média ± desvio padrão; **Mínima Diferença Significativa. Valores de uma mesma linha com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância - Teste de Tukey

O teor de compostos fenólicos totais das sementes de cacau sadias (VB 0) e das danificadas pela vassoura-de-bruxa (VB 100) não fermentadas que foram utilizadas para a mistura das sementes com 30 e 50% (VB 30 e VB 50) foi respectivamente de 133,34 e 174,77 mg/100g, sendo que as sementes VB 100 apresentaram teor 26,96 % maior em relação a VB 0, confirmando os dados descritos por Scarpari *et al.* (2005). No entanto, verificou-se uma expressiva perda destes compostos nos materiais contendo sementes danificadas pela vassoura-de-bruxa devido às etapas de processamento (fermentação, secagem e torração), de forma que, o teor de compostos fenólicos totais dos *nibs* e *liquores* (Tabela 3), foi menor com o aumento da quantidade de amêndoas danificadas. Mitiyue & Efraim (2007) encontraram teores de compostos fenólicos totais 135 e 60% maiores, respectivamente em *nibs* e *liquores* 100% danificados pela vassoura-de-bruxa em relação ao material normal (não danificado pelo fungo). As profundas diferenças observadas entre o presente trabalho e os dados reportados por Mitiyue & Efraim (2007), ambos realizados sob os mesmos protocolos de fermentação, secagem e torração, com frutos colhidos de cacauzeiros do tipo Comum de um mesmo local,

refletem a necessidade de aprofundamento dos estudos sobre este aspecto. Trabalhos futuros deverão levar em consideração questões como o período de colheita dos frutos, o grau de danos de um fruto pela vassoura-de-bruxa e o grau de contaminação do cacau pelo fungo durante o período de maturação dos frutos, o que poderia alterar consideravelmente sua composição química, uma vez que nas plantas, os compostos fenólicos atuam como protetores.

Na análise de compostos voláteis das sementes não fermentadas danificadas pela vassoura-de-bruxa verificou-se a presença de dois compostos identificados geralmente durante a fermentação de sementes de cacau (dimetilsulfeto e 3-metil butanal), de acordo com Pezoa-García (1989). Os mesmos compostos não foram encontrados nas sementes sadias. A presença desses compostos pode ser um indicativo de que ocorra algum tipo de fermentação das sementes quando ainda estão dentro dos frutos contaminados e no cacau. Na avaliação dos compostos voláteis nos liquores, foram identificados diversos compostos normalmente encontrados na fração volátil de cacau, porém as diferenças substanciais estavam na presença ou ausência e nos teores das alquilpirazinas: metil, 2,5-dimetil, 2-etil-5-metil, 3-etil-2,5-dimetil, trimetil e tetrametilpirazina. Foi possível observar que no liquor VB 50 e VB 100, a tetrametilpirazina não foi identificada. Através dos resultados observados neste estudo verificou-se que importantes pirazinas responsáveis pelo sabor desejável de produtos de cacau, como por exemplo a tetrametilpirazina, trimetilpirazina, 2,5-metilpirazina, 2-etil-5-metilpirazina e 3-etil-2,5-dimetilpirazina não se formaram ou se formaram em quantidades reduzidas nos materiais danificados com 30, 50 e 100 % pela vassoura-de-bruxa.

Conclusão

A amostra com 30 % de sementes danificadas apresentou-se muito similar à amostra VB 0 na etapa de fermentação e nas determinações de prova de corte, teor de lipídeos, proteínas e viscosidade plástica. Estes são parâmetros importantes para o processamento na indústria de cacau. No entanto, verificou-se uma perda dos compostos voláteis de importância ao sabor característico de chocolate devida à utilização de sementes danificadas pela vassoura-de-bruxa. Isso interfere na qualidade sensorial do produto final, de forma que as porcentagens estudadas (30 e 50 e 100 % de sementes danificadas pela vassoura-de-bruxa) não são recomendadas para o aproveitamento industrial visando a obtenção de produtos sensorialmente de qualidade. Outras formas de utilização deste material podem ser estudadas, como o aproveitamento da manteiga de cacau, extração de polifenóis das sementes não fermentadas.

Referências Bibliográficas

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 2002, v. 38, n. 2, p. 237-243.

AOCS, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the AOCS. 4a. Ed. Campaign, 1997; 2004.

ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. Induction and accumulation of caffeine in young actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *Crinipellis pernicioso*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. 59; p. 13-16; 2001.

BISPO, E. da S. **Processo de alcalinização dos nibs de cacau (*Theobroma cacao* L.) e avaliação da qualidade do pó**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1999, 198p.

BRASIL. Resolução CONCEX nº 160, de 28 de junho de 1988. Especificações da padronização do cacau em amêndoas (*Theobroma cacao* L.) visando a sua classificação e fiscalização na exportação. Diário Oficial da União, Brasília, 29 set. 1988. Seção, 8p.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. Campinas, 2004. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004

FREEMAN, *et al.*, In: HORWITZ, W. ed. **AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 18ª ed., 2005.

GILBERT ESCRIVÁ, M. V. **Comparação das propriedades reológicas da massa de cacau torrada convencionalmente e por microondas**. Campinas, 1997. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

MITIYUE, P. H., EFRAIM, P. Aproveitamento de frutos de cacau danificados pela vassoura-de-bruxa – obtenção e avaliação de licor, manteiga e pó de cacau. **Relatório Final de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq/ITAL**, 2007 (no prelo)

PEREIRA, J. L. Renewed advance of Witches' broom disease of cocoa: 100 years later. In **Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference**. Salvador, Brasil, Cocoa Producers' Alliance.p. 287-292. 1996.

PEZOA-GARCÍA, N. H. **Contribution a l'étude d'un capteur por controlar em continu procede de torrificación**. Londres, these (Docteur) – Université de Technologie de Compiègne, 170p. 1989.

PINI, G. F., de BRITO, E. D., GARCÍA, N. H. P., VALENTE, A. L. P., AUGUSTO, F. A headspace solid phase microextraction (HS-SPME) method for chromatographic determination of alkylpyrazines in cocoa samples. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n.2, p. 267-271, 2004.

PIRES, J.L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento de cacau com ênfase na produtividade, qualidade dos frutos e resistência à doenças**. Viçosa, 2003. Tese (Doutor em Engenharia Agrônoma) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

SCARPARI, L.M.; MEINHARDT, L.W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A.W.V.; SCHIAVINATO, M.A.; CASCARDO, J.C.M.; PEREIRA, G.A.G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis Pernicioso*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56; n. 413; p. 865-877, 2005.