

JEFFERSON CARLOS DIAS

PERMEABILIDADE DA CASCA DA SEMENTE DE CACAU AO ÁCIDO ACÉTICO: EVOLUÇÃO NA FERMENTAÇÃO E EFEITO DA ADIÇÃO DE CELULASES, ANTES DA SECAGEM, NA ACIDEZ DO PRODUTO FINAL.

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1987

JEFFERSON CARLOS DIAS

PERMEABILIDADE DA CASCA DA SEMENTE DE CACAU AO ÁCIDO ACÉTICO: EVOLUÇÃO NA FERMENTAÇÃO E EFEITO DA ADIÇÃO DE CELULASES, ANTES DA SECAGEM, NA ACIDEZ DO PRODUTO FINAL.

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do grau de "MESTRE".

cat
1/12
T633.92

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1987

JEFFERSON CARLOS DIAS

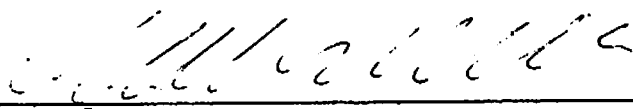
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Fora apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciências das Alimentações para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1987

PERMEABILIDADE DA CASCA DA SEMENTE DE CACAU AO ÁCIDO ACÉTICO :
EVOLUÇÃO NA FERMENTAÇÃO E EFEITO DA ADIÇÃO DE CELULASES, ANTES
DA SECAGEM, NA ACIDEZ DO PRODUTO FINAL.

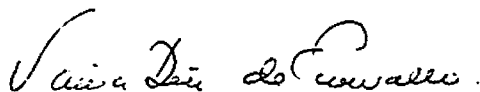
APROVADA:



PROF. DR. RAUL JORGE HERMAN CASTRO GOMEZ
ORIENTADOR



PROF. DR. JOSÉ CAL-VIDAL



PESQ. DR^a VÂNIA DÉA DE CARVALHO

À minha esposa LIGIA

Aos meus filhos ANDRÉIA,

LEANDRA e THIAGO

Aos meus pais NÉO E ROSÁLIA

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) pela oportunidade concedida para a realização do curso de mestrado;

à Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), especialmente aos Departamentos de Ciência dos Alimentos (DCA), e de Agricultura (DAG), pelos ensinamentos recebidos;

ao Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC), através da Divisão de Tecnologia e Engenharia Agrícola (DITEC), pelo apoio recebido durante a realização dos experimentos;

ao Departamento Especial da Amazônia (DEPEA / CEPLAC), através de seus dirigentes e demais colegas de trabalho que, direta ou indiretamente me apoiaram durante o curso;

à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), por intermédio da pesquisadora Vânia Déa de Carvalho pela concessão de equipamentos de laboratório utilizados em análises químicas;

ao professor orientador Raul Jorge Herman Castro Gomez, pela orientação segura, conhecimentos transmitidos e incenu

tivo durante o curso;

ao professor José Cal-Vidal e aos pesquisadores Sebastian Alex Francis Lopez e Vânia Déa de Carvalho, pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para o êxito deste trabalho;

ao professor Augustinho Roberto de Abreu, pela orientação prestada na realização das análises estatísticas;

ao professor Paulo Roberto Clemente, pela orientação prestada na condução da avaliação sensorial;

à professora Marli dos Santos Pothin, pela revisão de português;

aos funcionários Eliane Mara Alcântara, Maria Aparecida Correa, Maristela C.S. Malves, Nilton Maciel (DCA/ESAL), Eliane Botelho, Ismael Silva e Samuel Rosa de Brito (EPAMIG), pela participação no painel de avaliação sensorial;

aos estudantes Andréia F. Castro Dias (Instituto Gammon) e José Angelo W. Goes (DCA/ESAL), pela participação no painel de avaliação sensorial;

à minha esposa Ligia, pelo apoio e incentivo e aos meus filhos Andréia, Leandra e Thiago, pela compreensão que manifestaram durante o curso;

ao colega Zeuler Soares de Navarro pelo apoio recebido durante a realização do curso;

à Oficina Maciel através do Sr. Jorge Maciel, pela valiosa colaboração recebida na construção do aparelho utilizado na determinação da permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético;

finalmente, aos meus colegas de mestrado, pela amizade e convívio agradável durante o curso.

Em especial:

A DEUS, por tudo.

JEFFERSON CARLOS DIAS

PERMEABILIDADE DA CASCA DA SEMENTE DE CACAU AO ÁCIDO ACÉTICO: EVOLUÇÃO NA FERMENTAÇÃO E EFEITO DA ADIÇÃO DE CELULASES, ANTES DA SECAGEM, NA ACIDEZ DO PRODUTO FINAL.

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1987

alizou trabalhos em Ipiatú, Bahia e em junho de 1978 foi transferido para Ouro Preto em Rondonia, com o encargo de orientar a construção de centrais de beneficiamento primário de cacau programadas para aquela unidade da federação.

Em fevereiro de 1980, foi transferido para a Sede Regional da CEPLAC na Amazônia, em Belém-Pará e lotado na Divisão de Engenharia com a função de prestar assessoria na área de engenharia rural às divisões estaduais de extensão do Departamento Especial da CEPLAC na Amazônia, DEPEA.

Remanejado em fevereiro de 1983 para a Coordenadoria de Pesquisas - COPES do DEPEA, na sede regional, recebeu a responsabilidade de desenvolver pesquisas visando a melhoria da qualidade do cacau produzido na Amazônia.

Reenquadrado como pesquisador, foi designado pela CEPLAC para realizar o curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, na Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, iniciando-o em março de 1985.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Beneficiamento das Sementes de Cacau	3
2.1.1. Fermentação	3
2.1.2. Secagem	13
2.2. Permeabilidade de Filmes Plásticos e de Materiais Biologicamente Ativos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Sistema de Fermentação	18
3.2. Sistema de Secagem	19
3.3. Amostragens	20
3.3.1. Na fase de Fermentação	20
3.3.2. Na fase de Secagem	20
3.4. Tratamento das Sementes de Cacau com Celulases.	21
3.4.1. Produção das enzimas	21
3.4.1.1. Determinação da atividade C_1 celulase	22
3.4.1.2. Determinação da atividade Cx - celulase	23

	Página
3.4.1.3. Determinação da atividade enzimática na casca da semente de cacau fermentada e seca	23
3.4.2. Aplicação das enzimas	24
3.5. Determinações Físicas, Químicas e Fisiológicas	25
3.5.1. Temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação	25
3.5.2. Teor de umidade das sementes de cacau ..	25
3.5.3. Acidez e valores do pH da polpa e cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação e secagem	26
3.5.4. Morte das sementes de cacau durante a fermentação	28
3.5.5. Permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação	28
3.5.6. Celulose, hemicelulose e lignina da casca da semente de cacau durante a secagem	30
3.6. Análises do Produto Final	32
3.6.1. Classificação das sementes de cacau por prova de corte	32
3.6.2. Avaliação sensorial	33
3.7. Tratamento Estatístico dos Dados	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação	36
4.2. Acidez e valores do pH da polpa e dos cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação	38

	Página
4.2.1. Acidez da polpa e dos cotiledones	38
4.2.2. Valores do pH da polpa e dos cotiledo - nes	44
4.3. Morte das sementes de cacau no curso da fermenta <u>ç</u> <u>ã</u> o	47
4.4. Permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação	50
4.5. Acidez e valor do pH dos cotiledones das semen- tes de cacau tratadas e não tradadas com celula- ses antes da secagem	55
4.6. Biopolímeros da casca da semente de cacau duran- te a secagem	58
4.7. Análises do produto final	60
4.7.1. Classificação das sementes de cacau por prova de corte	60
4.7.2. Avaliação sensorial	61
5. CONCLUSÕES	64
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
7. RESUMO	68
8. SUMMARY	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
10. APÊNDICE	86

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Açúcares constituintes da polpa da semente de cacau de frutos colhidos no Centro de Pesquisas do Cacau (BA) em setembro de 1974 (% em relação à <u>ma</u> téria úmida), BERBERT (3)	5
2 Variações nos valores do pH da polpa e cotiledones durante a fermentação de sementes de cacau, LOPEZ (42) e SHEPHERD (73)	6
3 Correlações entre: valores do pH da polpa e dos cotiledones das sementes de cacau versus acidez durante a fermentação	47
4 Correlações entre as variáveis: morte das sementes versus temperatura da massa e acidez da polpa e cotiledones das sementes de cacau durante a <u>fer</u> mentação	49
5 Comportamento da permeabilidade da casca da <u>semen</u> te de cacau ao ácido acético frente à morte das sementes no curso da fermentação	52

Tabela	Página
6 Correlações entre as variáveis: permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético versus temperatura, acidez e valor do pH da polpa e morte das sementes durante a fermentação	54
7 Análise estatística (teste t) para verificar o efeito da adição de celulases antes da secagem sobre a acidez e o valor do pH das sementes de cacau	56
8 Perdas de acidez durante a secagem das sementes de cacau tratadas e não tratadas com celulases	57
9 Análise estatística (teste t) para verificar o efeito da adição de celulases antes da secagem sobre os teores dos biopolímeros da casca da semente de cacau	59
10 Resultado da classificação por prova de corte das amostras de sementes de cacau tratadas e não tratadas com celulases, fermentadas e secas, realizada pelo Posto de Classificação da CEPLAC	62

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Aparelho utilizado para a destilação a vapor dos ácidos voláteis	27
2	Aparelho utilizado na determinação da permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação	30
3	Curva representativa das variações da temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação	37
4	Curvas representativas das variações nos teores de ácidos voláteis livres da polpa e cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação	39
5	Curvas representativas das variações nos teores de ácidos voláteis fixos da polpa e cotiledones das sementes de cacau, durante a fermentação	40
6	Curvas representativas das variações nos teores de ácidos livres totais na polpa e cotiledones das sementes de cacau, durante a fermentação	42

Figura		Página
7	Curvas representativas das variações nos valores do pH da polpa e dos cotilédones das sementes de cacau, durante a fermentação	45
8	Gráfico representativo da evolução da morte das sementes de cacau, no curso da fermentação	48
9	Gráfico representativo das variações na permeabilidade da casca da semente de cacau, durante a fermentação	51

1. INTRODUÇÃO

As sementes de cacau, fermentadas e secas, se constituem a matéria prima utilizada pela indústria chocolateira na fabricação de vários produtos, dentre os quais, se destacam o cacau em pó e o chocolate, BRAUDEAU (7) e HARDY (26).

O fruto do cacauzeiro (Theobroma cacao L.) quando maduro, apresenta de 30 a 40 sementes que se acham envolvidas por uma polpa mucilaginosa de cor branca, ácida e rica em açúcares, BRAUDEAU (7) e ROHAN (67). Elas são constituídas basicamente pela casca, que representa 10 a 14%, do peso seco total e pelos cotiledones, com 86 a 90%, ROHAN (67).

A casca da semente, praticamente não tem valor, sendo considerada um resíduo industrial, enquanto que, os cotiledones, são a parte empregada na preparação do cacau em pó e chocolate (20, 23, 67).

A fermentação das sementes de cacau é uma condição indispensável para que se desenvolvam os precursores do sabor e aroma de chocolate (27, 41, 66, 76). É nesta etapa do beneficiamento na fazenda, que a polpa aderente à semente é metabolizada pe-

los microorganismos, resultando principalmente na produção de calor, etanol e ácido acético, os quais, ao serem absorvidos pelos cotiledones promovem a morte da semente, MORETON (52) e QUESNEL (59).

O ácido acético e seus esteres retidos no interior das sementes, depois de secas, são responsáveis pelos "flavor" de fruta ou passa de alguns produtos de cacau, porém, quando em excesso, produzem um "flavor" ácido desagradável que os deprecia, LOPEZ & McDONALD (38). Este é o ácido mais importante relacionado com a acidez elevada do cacau produzido no Brasil, por consequência, o nosso produto sofre restrições de alguns mercados importadores, LOPEZ (41) e PASSOS et alii (55).

Os objetivos deste trabalho foram determinar o efeito de alguns fatores sobre a permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação e verificar o efeito da adição de celulases, antes da secagem, sobre a acidez e a qualidade do produto final.

...principalmente na produção de ca-
...ácido acético, os quais, ao serem absorvidos pelas
...MORISON (22) e OUSNET

O ácido acético e seus ésteres retidos no interior
...depois de serem absorvidos pelos "flavors" de
...alguns produtos de cacau, porém, quando em ex-
...um "flavor" ácido de cacau, devido ao fato de
...há o ácido mais importante relacionado
...no Brasil, por consequên-
...alguns mercados importantes

... (23)

Os objetivos deste trabalho foram determinar a
...sobre a possibilidade de cacau de ser
...durante a fermentação e verificação
...antes de serem utilizados, sobre a

... (24)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Beneficiamento das Sementes de Cacau

2.1.1. Fermentação

A fermentação das sementes de cacau é feita usualmente das seguintes formas:

- a) fermentação em montes,
- b) fermentação em cestas tecidas de fibras vegetais e
- c) fermentação em caixas de madeira.

O processo de fermentação em montes é usado principalmente por cacauicultores de Gana, Nigéria e Costa do Marfim, quando as sementes, depois de extraídas dos frutos, são amontoadas diretamente sobre o chão em cima de folhas de bananeira e recobertas com o mesmo material. O método em cestas é praticado em Gana e Nigéria, para fermentar de 10 a 150 Kg de sementes úmidas, as quais, permanecem cobertas com folhas de bananeira durante todo o processo, BRAUDEAU (7) e ROHAN (67).

O sistema em caixas de madeira é o recomendado pe-

lo serviço de extensão rural da CEPLAC para os produtores de cacau do Brasil, MACEDO & SERRA (44). As caixas, mais conhecidas entre nós com o nome de cochos de fermentação, são construídas medindo de 0,90 a 1,20 m de largura por 0,90 a 1,00 m de altura e comprimento variável de 2,00 a 6,00 m. Elas são dotadas de paredes divisórias removíveis no sentido da maior dimensão para facilitar o revolvimento da massa em fermentação e o fundo deve conter orifícios com 0,6 a 1,0 cm de diâmetro espaçados de 15 em 15 cm para a drenagem dos líquidos liberados durante o processo e para aeração, MACEDO & SERRA (44) e MARAVALHAS (47).

Os cochos devem ser abastecidos até a altura de 90 cm e a massa de sementes coberta com folhas de bananeira ou sacos de aniagem, permanecendo assim por todo o período da fermentação, variável de cinco a sete dias. Os revolvimentos, feitos por transferência da massa de sementes de um compartimento do cocho para outro contíguo, devem ser realizados às 48,0; 72,0; 96,0; 120,0 e 144,0 horas após o início do processo, MACEDO & SERRA (44).

A fermentação das sementes de cacau é uma etapa essencial do processamento, sem a qual, não se desenvolvem os precursores do sabor e aroma de chocolate (27, 41, 66).

O sucesso de uma fermentação convencional depende inicialmente da chance de contaminação por microorganismos, da extensão e natureza dos microorganismos contaminantes e de fatores físicos e químicos que regem a atividade metabólica deles, GRIFFITHS (25) e KENTEN & POWELL (32).

A polpa que envolve a semente de cacau fresca é uma substância mucilaginosa, de cor branca, ácida e rica em açúca-

res, BRAUDEAU (7) e GREENWOOD-BARTON (23). A composição da polpa é importante, visto que, é a partir dos açúcares nela contidos que se inicia o processo fermentativo, BERBERT (3) e LOPEZ (35).

Os dados analíticos da Tabela 1 se referem aos açúcares da polpa da semente de cacau, obtidos em trabalho realizado no Centro de Pesquisa do Cacau (Ilhéus-BA).

TABELA 1 - Açúcares constituintes da polpa da semente de cacau de frutos colhidos no Centro de Pesquisas do Cacau (BA) em setembro de 1974 (% em relação à matéria úmida), BERBERT (3).

Açúcar	Intervalo entre a colheita e a quebra do fruto	
	0 dia	6 dias
Pentitol	0,01	traços
Frutose	2,94	3,62
Sorbose	0,08	0,10
Glicose	2,67	4,50
Inositol	0,05	traços
Sacarose	8,50	6,56

Na fase inicial da fermentação, as leveduras que se desenvolvem na polpa da semente de cacau, convertem os açúcares a etanol e CO₂ e a massa torna-se anaeróbica em poucas horas. Com a degradação da polpa, e a drenagem dos resíduos líquidos o

oxigênio começa a penetrar na massa, favorecendo a multiplicação das bactérias produtoras de ácido acético que oxidam o etanol a ácido acético, CO₂ e água, FORSYTH & QUESNEL (20) e QUESNEL (60).

As intensidades dessas oxidações desempenham papel importante para determinar o valor do pH e a temperatura dos cotiledones, sendo que, o controle da fermentação parece depender principalmente do controle do arejamento, QUESNEL (58).

As informações contidas na Tabela 2 se referem ao valor do pH da polpa e cotiledones das sementes de cacau no curso da fermentação e resultam de trabalhos desenvolvidos no Brasil e na Malásia.

TABELA 2 - Variações nos valores do pH da polpa e cotiledones durante a fermentação de sementes de cacau, LOPEZ (42) e SHEPHERD (73).

Especificação	Tempo de Fermentação (dias)							Autor
	0	1	2	3	4	5	6	
pH da polpa	3,80	3,94	3,84	4,15	4,22	4,27	4,34	b
pH dos cotiledones	6,42	6,40	5,54	4,81	4,57	4,50	4,44	b
	6,39	6,32	5,37	4,49	4,60	4,80	4,74	a

(a) LOPEZ (42) (b) SHEPHERD (73)

O valor baixo para o pH da polpa verificado no início da fermentação pode ser atribuído quase que à presença do aci

estudo começa a penetrar na massa, favorecendo a multiplicação das células produtoras de ácido acético que oxidam o etanol a ácido acético. CO₂ e água, FORSYTH & QUINN (30) e QUINN (31). As informações dessas oxidações descompõem a polpa e permitem para determinar o valor do pH e a temperatura dos colônias, sendo que, o controle da fermentação parece depender principalmente do controle do oxigênio, QUINN (32).

As informações contidas na Tabela 2 se referem ao valor do pH da polpa e condições das sementes de cacau no curso da fermentação e resultados de trabalhos desenvolvidos no Brasil e no México.

TABELA 2 - Variações nos valores do pH da polpa e condições durante a fermentação de sementes de cacau, FORSYTH (30) e SHEPHERD (32).

Autor	Tempo de fermentação (dias)						Observações
	0	1	2	3	4	5	
F	6,80	6,75	6,70	6,65	6,60	6,55	Valor da polpa
F	6,47	6,40	6,34	6,28	6,22	6,16	Valor das colônias
S	6,30	6,25	6,20	6,15	6,10	6,05	

(30) FORSYTH (30) (31) QUINN (31) (32) SHEPHERD (32)

O valor baixo para o pH da polpa verificada no início da fermentação pode ser atribuído quase que à presença de

do cítrico. Como resultado do metabolismo dos microorganismos na polpa, o ácido cítrico é substituído pelos ácidos menos dissociados lático e acético (o primeiro numa extensão muito limitada) . Ao mesmo tempo, verifica-se um aumento gradual no valor do pH da polpa que, nos estágios subseqüentes da fermentação, irá refletir a concentração do ácido acético em particular, ROELOFSEN (64) e SHEPHERD (73).

O ácido acético ao ser absorvido pelos cotiledones é o principal responsável pela queda no valor do pH observado nos cotiledones, durante a fermentação das sementes de cacau, QUESNEL (58).

WEISSBERGER et alii (79) trabalhando com sementes de cacau não fermentadas (secas sem a polpa) e, com sementes fermentadas, constataram, em ambas, a presença dos ácidos não voláteis: lático, oxálico, succínico, málico e cítrico. Os autores verificaram que, com a fermentação, a concentração do ácido lático aumentou, a do ácido oxálico praticamente não se alterou enquanto que a dos ácidos succínico, málico e cítrico decresceram.

LOPEZ (41) em trabalho realizado no CEPEC e utilizando sementes de cacau sem a casca, além dos ácidos lático, oxálico, succínico, málico e cítrico, observou também a presença do ácido fosfórico durante a fermentação. O ácido cítrico esteve presente em pequenas quantidades nos cotiledones das sementes não fermentadas, mas, aumentou o seu nível até o terceiro dia da fermentação, decrescendo entretanto, no período subsequente. O autor sugere que o ácido cítrico observado nos cotiledones, é uma sim-

ples consequência da absorção deste ácido que ocorre de forma natural na polpa. O ácido lático apresentou teores máximos entre o terceiro e o quinto dia, enquanto que, o ácido fosfórico teve um aumento nas quarenta e oito horas iniciais do processo fermentativo, não havendo mudança significativa no restante do período. Foi sugerido que o aumento nos teores de ácido fosfórico pode ser decorrente do metabolismo da semente que inicia a germinação nos estágios iniciais da fermentação. Os outros ácidos não voláteis se apresentaram em pequenas quantidades, e dentre eles, o mais abundante, foi o oxálico, aumentando sua concentração até o terceiro dia da fermentação, caindo em seguida para um nível relativamente baixo. Entretanto, nas sementes totalmente fermentadas (seis dias), o ácido acético é o principal apresentando-se com até 1,5%. Os ácidos lático, cítrico e fosfórico estão presentes com 0,8; 0,3 e; 0,02% respectivamente, conclui o autor.

O desenvolvimento da temperatura da massa durante a fermentação depende não somente do grau de aeração, mas também do método de cobertura, frequência dos revolvimentos, temperatura ambiente, além de outros fatores, ROELOFSEN (64).

A temperatura alcançada pela massa é um indicador muito útil para se acompanhar o progresso de uma fermentação. Em boas fermentações comerciais, a temperatura de 45 a 48°C é atingida no espaço de aproximadamente três dias, devendo se manter nestes níveis por mais alguns dias, QUESNEL & LOPEZ (61).

Se o aumento da temperatura for muito lento ou se não for alcançada uma temperatura suficientemente alta, o produto obtido será constituído de sementes germinadas e mal fermentadas.

A maior parte do calor obtido, durante a fermentação, provém da atividade dos microorganismos na polpa da semente, KENTEN & POWELL (32).

O potencial energético dos açúcares da polpa da semente de cacau é suficiente para elevar a temperatura acima dos valores frequentemente observados, sendo importante, o controle da aeração para uma produção de calor adequada, QUESNEL (60).

Vários pesquisadores informam que as sementes de cacau morrem, entre o segundo e o terceiro dia de fermentação, em consequência da ação do etanol e do ácido acético absorvidos pelos cotiledones e da temperatura alcançada pela massa naqueles momentos (28, 59, 80).

QUESNEL (59) afirma que em caixas de madeira ou no centro de grandes montes onde a temperatura se eleva com relativa lentidez, o calor não é um agente importante da morte e que, nestas circunstâncias, o principal responsável é o ácido acético. Entretanto MORETON (52) observa que o ácido acético, etanol e o calor agem sinergicamente provocando a morte da semente de cacau.

HOLDEN (28) trabalhando com fermentação em caixas de madeira com capacidade para aproximadamente 800 kg de sementes úmidas e, coletando amostras da parte de cima da massa, verificou que com vinte horas de fermentação todas as sementes germinaram, com quarenta e quatro horas, 33% delas se encontravam mortas e que com sessenta e oito horas todas as sementes estavam inviáveis. As temperaturas registradas naqueles momentos foram 36°C; 41°C e 47°C respectivamente.

O tempo requerido para a morte das sementes durante a fermentação é importante, visto que, é a partir deste momento, que ocorrem várias reações enzimáticas necessárias ao desenvolvimento dos precursores do "flavor" de chocolate (19, 71, 72, 80).

No curso da fermentação das sementes de cacau, os polifenóis sofrem intensas modificações, as quais, só se iniciam, depois da morte das sementes quando as substâncias fenólicas e as enzimas são liberadas de seus respectivos locais de armazenamento na célula (50, 59, 68).

Os principais constituintes fenólicos, identificados por FORSYTH (18) em sementes de cacau não fermentadas, pertencem a três categorias de compostos: catequinas, leucocianidinas e antocianinas. Eles compreendem de 12 a 18% do peso seco total da semente e, desde muito, têm sido associados com o "flavor" e a cor de chocolate, KIM & KEENEY (33).

CROSS et alii (12) constataram um decréscimo de aproximadamente 70% do conteúdo em compostos fenólicos extraídos entre um cacau não fermentado e outro fermentado por oito dias.

Interações complexas entre os polifenóis para formar taninos de alto peso molecular e suas interações com proteínas são importantes para a qualidade das sementes de cacau destinadas à produção de chocolate, KIM & KEENEY (33). Estes autores trabalhando com sementes de cacau provenientes de regiões onde o produto é bem fermentado, constataram que elas apresentaram menor concentração de (-)-epicatequina do que as sementes oriundas de locais onde a fermentação é menos extensiva.

Catequinas e leucocianidinas são parcialmente perdidas durante a fermentação por exsudação através da testa, quando então, são oxidadas enzimicamente sob as condições aeróbicas que prevalecem na casca da semente (17, 50, 68).

Existem dois estágios possíveis para a destruição das antocianinas durante o processo fermentativo:

a) morte dos cotiledones com a liberação dos pigmentos das células e

b) imediata hidrólise enzimática destes componentes, resultando na descoloração dos pigmentos violeta dos cotiledones. A presença de sementes de cacau de cor violeta é característica de um produto mal fermentado e está relacionado com um "flavor" pobre de chocolate (19, 36, 69).

A qualidade parece estar mais relacionada com a concentração de antocianinas do que com a dos outros fenóis. Material de boa qualidade foi obtido de sementes com 60% dos polifenóis iniciais, mas somente quando a concentração das antocianinas foi abaixo de 10% do valor original. Estes pigmentos não exercem influência marcante no "flavor" de chocolate e as transformações que ocorrem são somente indicativo de mudanças importantes que acontecem durante o processo fermentativo, FORSYTH & QUESNEL (19) e ROHAN (69).

Durante a fabricação do chocolate, os açúcares reductores presentes nos cotiledones das sementes de cacau participam na formação dos compostos voláteis do aroma de chocolate, através de reações de escurecimento não enzimático (63, 66, 70, 72).

HOLDEN (28) trabalhando com sementes de cacau frescas, germinadas e, em processo fermentativo, constatou a presença de enzimas com habilidade para hidrolisar carboidratos, dentre as quais, amilases, celulasas, pectina esterase e poligalacturonase. As celulasas foram detectadas somente em sementes frescas e nas germinadas, entretanto, apresentaram uma atividade muito baixa em sódio de carboximetil celulose.

Já a inversão da sacarose nos cotiledones das sementes de cacau, durante a fermentação é informada por diversos autores (5, 63, 72). Entretanto, resultados de trabalho realizado por LOPEZ et alii (37) evidenciaram, em sementes de cacau frescas, que a inversão da sacarose só ocorreu quando foi utilizada enzima pô preparada a partir de sementes, na qual, a casca foi incluída.

BERBERT (3) verificou que nos cotiledones das sementes frescas de cacau, 91,5% dos açúcares totais era sacarose. taxa que caiu para apenas 1,25% no sexto dia da fermentação.

Enzimas proteolíticas também foram detectadas em sementes de cacau durante a fermentação por FORSYTH et alii (21). No estudo, foi evidenciado que as proteínas se tornaram insolúveis pela formação de complexos proteínas-polifenóis, imediatamente após a morte da semente.

Proteólises durante a fermentação das sementes de cacau é uma atividade biológica importante, visto que, os produtos da degradação da proteína (aminoácidos e peptídeos) também contribuem para a formação do "flavor" de chocolate, BAREL et alii (2) e ROHAN & STEWART (71).

ZAK & KEENEY (80) constataram que a fração proteica extraível tornou-se progressivamente menos pura no curso da fermentação, o que estaria indicando, uma contaminação da proteína por polifenóis.

Em trabalho posterior BAREL et alii (2) comprovaram que durante a fermentação as proteínas totais extraíveis cresceram de forma linear e explicam esse fato como resultado da formação de complexos insolúveis proteínas-polifenóis e das reações de hidrólise com liberação de aminoácidos e peptídios.

2.1.2. Secagem

A finalidade principal da secagem é eliminar o excesso de umidade que, nas sementes de cacau ao término da fermentação contém mais de 50%, taxa que deve ser reduzida para menos de 8% a fim de preservar melhor o produto no armazenamento, MARAVALHAS (48) e ROHAN (67).

A secagem de sementes de cacau pode ser feita de forma natural, quando o produto é exposto diretamente ao sol ou, artificialmente com o emprego de secadores que utilizam o calor proveniente da queima de madeira ou outros combustíveis, ou ainda, pela combinação dos dois sistemas quando as sementes são submetidas inicialmente ao sol por um a dois dias seguido de uma secagem complementar por processos artificiais (13, 47, 74).

Qualquer que seja o método utilizado, o controle da umidade final deve ser feito com critério. Os fabricantes de chocolate preferem sementes com 6 a 7% de umidade, visto que, aci

ma de 8% há o risco de contaminação por mofos no armazém e abaixo de 5% a casca se torna excessivamente quebradiça, ficando o produto vulnerável a danos no manuseio e transporte, THE COCOA, CHOCOLATE AND CONFECTIONERY ALLIANCE (9) e ROHAN (67).

A secagem não deve se processar demasiadamente rápida, com o emprego de temperaturas elevadas, para não desativar as enzimas responsáveis pelas reações que ocorrem nos estágios iniciais do processo, HARDY (26).

É nessa fase do beneficiamento que as sementes de cacau desenvolvem a cor castanha característica, quando as substâncias fenólicas nelas contidas são oxidadas por um sistema polifenoloxidase que é ativo somente quando o oxigênio tem acesso aos cotiledones, FORSYTH (17) e FORSYTH & QUESNEL (19).

A extensão do acastanhamento, depende da quantidade de oxigênio dissolvido que difunde nos tecidos cotiledonares antes que a enzima seja desativada. A casca da semente é a principal barreira à penetração do O_2 durante a secagem e sementes que tiveram a casca perfurada ou uma agulha de injeção inserida sob a mesma, raramente deixaram de ser oxidadas, ROELOFSEN (64).

FORSYTH & QUESNEL (20) informam que quando as sementes de cacau são secas na ausência do oxigênio, não desenvolvem a cor marrom característica.

A secagem também influencia na acidez das sementes de cacau. Resultados de trabalho desenvolvido por PASSOS & LOPEZ (54) evidenciaram que quando o produto foi seco de forma natural em barçaças, a perda de acidez, tanto a volátil quanto a total, foi maior quando comparado com sementes secas por processos arti-

ficiais.

2.2. Permeabilidade de Filmes Plásticos e de Materiais Biologicamente Ativos.

A permeabilidade a gases e ao vapor d'água, de materiais plásticos flexíveis utilizados na embalagem de alimentos, tem sido objeto de estudos por parte de diversos autores (30, 31, 34). Características tais como tamanho, forma e o arranjo das cadeias dos polímeros afetam profundamente a permeabilidade destes materiais e qualquer processo que modifique a densidade, a orientação ou o grau de cristalização, provocará uma alteração nessa propriedade, MADI et alii (45).

Assim sendo, de acordo com KAREL (30), os materiais utilizados em embalagens de alimentos são todos semi-cristalinos ou amorfos. Nos materiais semi-cristalinos, parte do volume é ocupado por agregados das cadeias poliméricas, chamadas cristallitos, sendo que estes cristallitos são considerados impermeáveis a gases e vapores. O resto do volume é ocupado por regiões amorfas, isto é, cadeias poliméricas em estado desordenado.

A permeabilidade de filmes plásticos a gases e ao vapor d'água pode ser determinada experimentalmente, conforme descrevem KAREL (30) e MADI et alii (45) e os resultados podem ser expressos em $\text{cm}^3 \text{gás. m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{atm.}^{-1}$ e, $\text{g. m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$, respectivamente. De acordo com estes autores, a transmissão de gases e vapores, através de plásticos flexíveis utilizados em embalagens de alimentos, se dá por um mecanismo conhecido como difu-

são ativada e se processa no sentido da superfície de maior concentração para a outra de concentração inferior.

Por outro lado, em materiais biologicamente ativos como as cascas de sementes, por exemplo, a permeabilidade à água, depende da sua estrutura e das impregnações presentes nas membranas celulares tais como lignina, gordura, suberina ou tanino, POPINIGIS (57).

Em trabalho realizado por MARBACH & MAYER (49), com sementes de plantas do gênero Pisum, foram observadas diferenças estruturais entre cascas de sementes permeáveis à água e cascas não permeáveis. Nas espécies, cujas sementes são normalmente impermeáveis à água, as cascas exibiram um teor elevado de substâncias fenólicas e de catecol oxidase, enquanto que, naquelas espécies que apresentaram sementes permeáveis, o conteúdo em constituintes fenólicos e catecol oxidase das cascas, foi baixo. Com base nessas observações, os autores sugerem uma relação entre a permeabilidade da casca das sementes à água, com a oxidação enzimática dos compostos fenólicos da casca, durante o processo de secagem.

O estágio de maturação do fruto, também influencia na permeabilidade, ao nível da membrana celular. Trabalhos desenvolvidos por CROOKES & GRIERSON (11) com tomate e por PAULL & CHEN (56) com mamão, mostraram que com o avanço do grau de maturação, ocorreram degradações enzimáticas de carboidratos estruturais da parede celular, acarretando modificações na textura do fruto e conseqüente amolecimento.

Resultados experimentais de LOPEZ et alii (43), demonstram que o estágio de maturação do fruto do cacauzeiro, influencia na permeabilidade da casca da semente ao acetato de etila. A velocidade de difusão desta substância através das cascas de sementes provenientes de frutos verdoengos, maduros e sobre-maduros, foi diretamente proporcional ao estágio de maturação dos frutos. Em trabalho posterior com sementes de cacau submetidas a fermentação, LOPEZ (40), observou uma queda na permeabilidade da casca da semente ao ácido acético a partir do terceiro dia do processo. O autor sugere que as substâncias fenólicas liberadas após a morte da semente, ao migrarem para a casca, reageriam com os tecidos da mesma, tornando-a menos permeável.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) em Ilhéus, BA durante os meses de outubro e novembro de 1986.

As análises foram realizadas em laboratórios do CEPEC e do Departamento de Ciência dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras (DCA/ESAL) em Lavras, MG.

Foram utilizados frutos de cacaueiros do tipo comum, de plantações do CEPEC, colhidos no estágio maduro e quebrados um dia depois.

3.1. Sistema de Fermentação

Depois de removidas dos frutos, as sementes de cacau, foram fermentadas em caixas de madeira com capacidade para 1 m^3 (1,0 x 1,0 x 1,0 m) dotadas de furos no fundo com 1 cm de diâmetro e, espaçados de 15 em 15 cm, para permitir a drenagem do suco liberado durante o processo, LOPEZ (41) e VILLENEUVE (78).

A caixa foi abastecida até a altura de 90 cm e a massa de sementes foi coberta com folhas de bananeira, permanecendo assim, por todo o período da fermentação. Os revolvimentos foram feitos por transferência das sementes de um compartimento da caixa para outro contíguo, o primeiro, quarenta e oito horas após o início da fermentação e os seguintes, a cada vinte e quatro horas até o final do processo que teve a duração de seis dias, MACEDO & SERRA (44).

Um metro cúbico de sementes de cacau úmidas, não fermentadas, pesa 800 Kg, CUNHA et alii (14).

3.2. Sistema de Secagem

Terminada a fermentação, foram pesadas duas porções de sementes de cacau com 30 Kg cada, sendo uma, a testemunha, levada diretamente ao secador, e a outra, submetida a um tratamento com enzimas celulolíticas de Trichoderma reesei QM9414 antes da secagem.

As sementes foram secas de forma contínua, por 116 horas, num secador de lâmpadas incandescentes com lastro de 1,0 x 2,0 m, subdividido ao meio para receber as porções com e sem tratamento enzimático.

3.3. Amostragens

3.3.1. Na fase de fermentação

As amostragens foram feitas em vários pontos, 30 cm abaixo da superfície da massa de sementes e entre 15 e 35 cm das paredes laterais da caixa de fermentação, LOPEZ (41).

As amostras, com aproximadamente 5,0 kg de sementes úmidas, foram coletadas a cada vinte e quatro horas, sendo na ocasião homogeneizadas, subdivididas em sub-amostras, embaladas em sacos plásticos e encaminhadas ao laboratório para preparo e análises.

3.3.2. Na fase de secagem

As amostragens das sementes de cacau, tratadas e não tratadas por celulases, foram realizadas em vários pontos do lastro de secagem, às 8,00; 20,00; 32,00; 44,00; 68,00 e 116,00 horas a partir do início da secagem. A amostra inicial corresponde à última coletada na fase de fermentação.

As amostras, com aproximadamente 1,5 kg de cada tratamento, depois de homogeneizadas foram subdivididas em sub-amostras, acondicionadas em sacos plásticos e conduzidas ao laboratório para preparo e análises.

Terminada a secagem, também foram coletadas amostras de ambos os tratamentos para classificação das sementes por

prova de corte (1,0 kg de cada) e fabricação de chocolate para avaliação sensorial (4,0 kg de cada).

3.4. Tratamento das Sementes de Cacau com Celulases

3.4.1. Produção das enzimas

As enzimas foram produzidas pelo fungo Trichoderma reesei QM 9414 em cultivo semi-sólida de farelo de trigo conforme descrito por URIETA et alii (75).

O fungo foi mantido em meio de agar-batata-dextrose, sendo transferido regularmente para preservar a sua viabilidade.

Em frascos Roux de 800 ml para cultura de fungos, foram colocados 20 g de farelo de trigo mais 20 ml de água destilada e, em seguida, misturados. Os frascos, depois de tampados, foram conduzidos a autoclave para esterilização a 121°C por trinta minutos.

Depois de resfriado, o meio foi inoculado com T. reesei e mantido em estufa regulada a 30°C por um período de quatro a cinco dias.

As enzimas foram extraídas com água destilada, na proporção de 1:10 (farelo fúngico:água), por uma hora, no curso da qual o sistema foi agitado frequentemente com um bastão de vidro, sendo em seguida filtrado em tecido de flanela. O filtrado, contendo as enzimas celulósicas dissolvidas, teve o valor do pH ajustado para 6,0 com HCl 2,0 N, recebeu NaCl na proporção de

1,0 % (p/v) e etanol a 96,0 % na proporção de 1:2,5 (filtrado : etanol). A mistura foi homogeneizada com um bastão de vidro e logo depois conduzida a um refrigerador a 4,0°C onde permaneceu em repouso por uma noite. No dia seguinte, depois que as enzimas foram precipitadas no fundo do vaso, o sobrenadante foi drenado, o precipitado filtrado com o auxílio de papel de filtro a fim de eliminar o excesso de líquidos, as enzimas foram transferidas para uma placa de petri e secadas à temperatura ambiente. Depois de secas, foram moídas e guardadas num frasco bem vedado em geladeira até uso.

As enzimas apresentaram uma atividade de C_1 - Celulase igual a 0,212 mg de açúcares redutores por mg de enzima bruta por hora e uma atividade de Cx-celulase igual a 0,162 mg de açúcares redutores por mg de enzima bruta por hora.

A atividade enzimática em substrato constituído pela casca da semente de cacau fermentada e seca foi igual a 0,266 mg de açúcares redutores por mg de enzima bruta por hora.

3.4.1.1. Determinação da atividade de C_1 -Celulase

A atividade de C_1 - Celulase foi determinada pela capacidade apresentada pela enzima, em degradar papel de filtro (Whatman nº 1), Toyama, citado por URIETA et alii (75). A metodologia utilizada foi a descrita por MANDELS & STEMBERG (46).

Num tubo de ensaio foram colocados 0,5 ml da solução de enzimas ($1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ em tampão citrato 0,05 M e pH 4,8), 1,0 ml de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8 e, uma tira de papel de

filtro Whatman nº 1 de 1,0 x 6,0 cm (50 mg). O tubo foi incubado em banho-maria a 50°C por uma hora e os açúcares redutores produzidos, foram quantificados pelo método de SOMOGYI-NELSON (53). Uma unidade de atividade C_1 - Celulase foi definida como os mg de glicose liberados por mg de enzima bruta por hora.

3.4.1.2. Determinação da atividade de Cx-Celulase

A atividade de Cx-Celulase foi determinada em substrato de sódio de carboximetil celulose (CMC) conforme metodologia proposta por REESE et alii (62).

Num tubo de ensaio contendo 4 ml de uma solução de CMC (6,0 mg.ml⁻¹ em tampão acetato 0,1 M e pH 4,5) foi adicionado 1 ml da solução de celulases (1,0 mg.ml⁻¹ em tampão acetato 0,1 M e pH 4,5) e incubado em banho-maria a 40°C por trinta minutos. Ao final da incubação foram retiradas alíquotas para determinação dos açúcares redutores, utilizando o método de SOMOGYI-NELSON (53).

Uma unidade de atividade Cx-celulase foi expressa como os mg de glicose liberados por mg de enzima bruta por hora.

3.4.1.3. Determinação da atividade enzimática na casca da semente de cacau fermentada e seca

A atividade enzimática foi determinada em substrato constituído por cascas de sementes de cacau fermentadas e secas.

Num tubo de ensaio contendo 50 mg de cascas de sementes de cacau trituradas foi adicionado 10 ml de uma solução de celulasas ($0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$ em tampão citrato $0,05 \text{ M}$ e $\text{pH } 4,8$) e incubado em banho-maria a 50°C por uma hora.

Ao final da incubação, foram retiradas alíquotas para determinação dos açúcares redutores, através do método de SOMOGYI-NELSON (53).

Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como os mg de açúcares redutores produzidos por mg de enzima bruta por hora.

3.4.2. Aplicação das enzimas

Os parâmetros utilizados foram:

- relação peso de sementes secas/
peso úmido 53,8%,
GARCIA (22).
- teor de casca da semente 12,8%,
THE COCOA CHOCOLATE AND CONFECTIONERY ALLIANCE
(9).
- relação enzima/substrato 1,0%,
DIAS & CASTRO GOMEZ (15).

Numa caixa de madeira ($0,60 \times 0,60 \times 0,60\text{m}$) forrada por um filme plástico, foram colocados 30 kg de sementes de cacau úmidas, recém-fermentadas, onde foi realizado o tratamento

enzimático.

A solução de enzimas celulolíticas de T. reesei foi preparada pela dissolução de 20,65 g de enzimas em 1.000 ml de água destilada e a aplicação foi feita com o auxílio de um pulverizador manual, do tipo utilizado para plantas em vaso. A aplicação das enzimas foi acompanhada por um revolvimento constante das sementes que, antes de serem encaminhadas para a secagem, permaneceram em repouso na caixa por trinta minutos.

3.5. Determinações Físicas, Químicas e Fisiológicas

3.5.1. Temperatura da massa de sementes de cacau durante a fermentação

Com o auxílio de termopares acoplados a um registrador (Grants Instruments London, U.K.), foram realizadas duas leituras diárias, às 8:00 e às 16:00 horas, em três alturas diferentes no centro da massa de sementes: 10 cm abaixo da superfície, no meio e 10 cm acima do fundo da caixa, LOPEZ (35).

A temperatura considerada foi a média das seis leituras diárias feitas pela manhã e à tarde.

3.5.2. Teor de umidade das sementes de cacau

Foi utilizado método gravimétrico, baseado na determinação da perda de peso das sementes submetidas a aquecimento em estufa graduada a 105°C por vinte e quatro horas conforme é realizado pela Divisão de Tecnologia e Engenharia Agrícola do CEPEC,

ITURBE et alii (29).

3.5.3. Acidez e valores do pH da polpa e cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação e secagem

Foram utilizadas metodologias descritas por LOPEZ (35. 41).

A casca, juntamente com a polpa aderente de cinquenta sementes, foram retiradas, os cotiledones moídos e 20 g destes materiais foram pesados separadamente em beakers de 500ml.

O becker, contendo os 20 g de casca mais polpa depois de receber 200 ml de água destilada, foi levado a um homogenizador (CONTRAC - MOD 100 da FANEN), cuja hélice fora modificada para promover apenas a retirada da polpa sem danificar a casca da semente. Decorridos cinco minutos, o conteúdo do becker foi coado numa peneira de malha bem fina e o extrato bruto da polpa foi coletado. O becker, com os 20 g de cotiledones moídos depois de receber 200 ml de água destilada, foi conduzido a um misturador emulsificador (SILVERSON MODEL L2R) onde o conteúdo foi homogenizado por dois minutos.

Os extratos brutos da polpa e cotiledones foram centrifugados por cinco minutos a 13.500 g e alíquotas de 20 ml dos sobrenadantes foram tomadas para as determinações a seguir relacionadas: valor do pH - por potenciometria

ácidos livres totais - por titulometria com NaOH 0,025 N, até pH 7,0 com potenciômetro. Os resultados foram expressos como ácido acético.

ácidos voláteis - a extração foi feita por destilação a vapor (Fig. 1) e o doseamento por titulometria com NaOH 0,025 N até pH 7,0 com potenciômetro, em duas porções sucessivas de 50 ml do destilado. Na primeira fração de 50 ml do destilado foram dosados os ácidos voláteis livres e, na seguinte, coletada após a adição de 1 ml de H_2SO_4 5N ao resíduo da primeira destilação, os ácidos voláteis fixos.

Na fase de secagem foram feitas as mesmas determinações, apenas para os cotiledones.

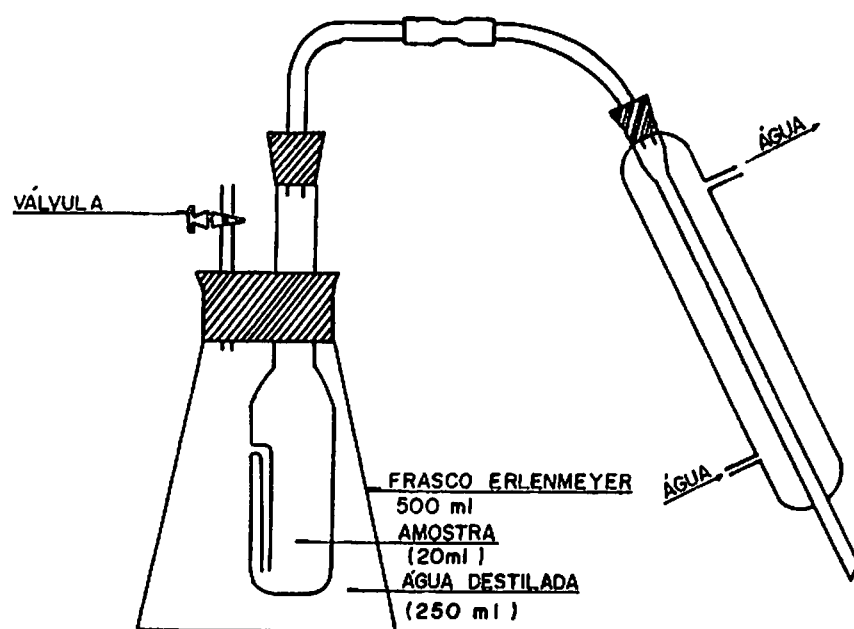


FIGURA 1 - Aparelho utilizado para a destilação a vapor dos ácidos voláteis.

As análises de laboratório foram realizadas em duplicatas e no mesmo dia da coleta da amostra.

O único ácido volátil importante produzido durante a fermentação de sementes de cacau é o acético, por isso, os resultados foram expressos dessa forma, GRIFFITHS (24) e LOPEZ (35).

3.5.4. Morte das sementes de cacau durante a fermentação

Foram tomadas sub-amostras com 500 g de sementes para a realização dos testes de germinação durante a fermentação.

Inicialmente, as sementes receberam um tratamento para liberação da polpa aderente, MORETON (52). Para tanto, foi utilizado serragem de madeira seca, bem fina, seguido de lavagens com água corrente.

Os testes de germinação foram feitos em germinadores de câmara, em número de duas repetições de 100 sementes, em substrato de papel de acordo com as normas da DISEM (6).

As câmaras foram reguladas a 35°C e a semente foi considerada morta quando perdeu a capacidade de emitir a radícula no espaço de sete dias, HOLDEN (28) e MORETON (52).

3.5.5. Permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação

A determinação da permeabilidade da casca da semente ao ácido acético foi realizada segundo metodologia descrita

por LOPEZ et alii (43), modificada pelo autor.

O aparelho utilizado foi contruído em resina de poliêster transparente e consta, basicamente, de dois blocos A e B, dotados de celas de 16 mm de diâmetro por 50 mm de profundidade. Na montagem do aparelho, os blocos são afixados, um ao lado do outro com parafusos, permitindo que as celas se comuniquem através de um orifício de 12 mm de diâmetro, o qual é interceptado pela casca da semente que se quer determinar a permeabilidade. A vedação foi feita com o emprego de anéis de borracha de silicone circundando os orifícios de 12 mm nas faces dos blocos que se unem (Fig. 2).

Em número de cinco, a casca da semente de cacau sem a polpa aderente, foi colocada obstruindo o orifício de 12 mm de diâmetro entre os blocos A e B, os parafusos foram apertados e a cela do bloco A recebeu 5 ml de uma solução de ácido acético a 1% (v/v) e a do bloco B, 5 ml de água destilada. As celas foram tampadas e seis horas depois, o material do bloco B foi coletado e titulado com NaOH 0,01 N com o emprego de fenolftaleína como indicador.

A permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético foi expressa como μg de ácido acético por cm^2 de casca por hora.

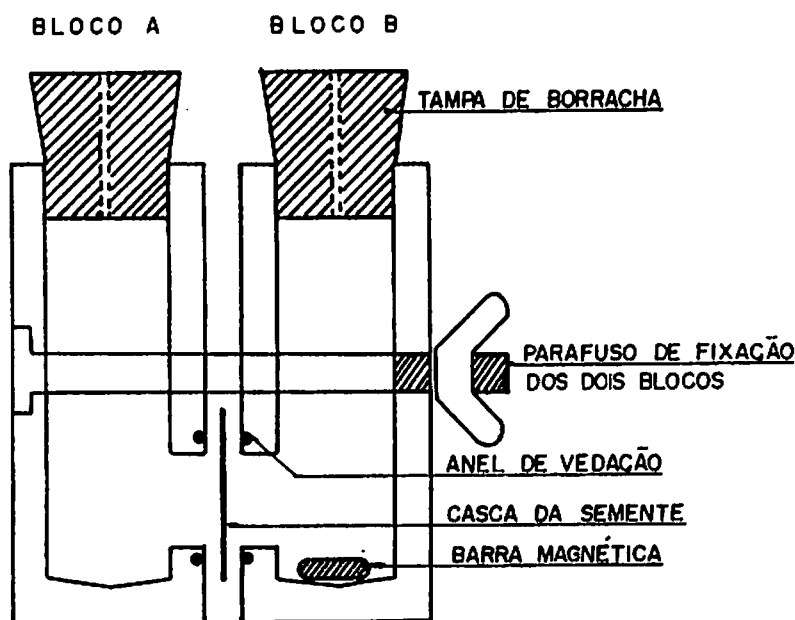


FIGURA 2 - Aparelho utilizado na determinação da permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação.

3.5.6. Celulose hemicelulose e lignina, da casca da semente de cacau durante a secagem

A extração foi feita de acordo com metodologia descrita por BAILEY (1) e o doseamento pelo método fenol/sulfúrico, DUBOIS et alii (16).

Preparo das amostras: duzentas sementes de cacau foram cortadas longitudinalmente, submetidas a tratamento com etanol absoluto, quente por cinco minutos, na proporção de 1:4 (p/v) e, em seguida, foram secas em estufa ventilada a 50°C. BAILEY (1) e VAN SOEST (77).

Depois de secas, as cascas foram separadas manualmente dos cotiledones e trituradas. O tamanho da partícula da amostra foi tal que passou por peneira ABNT 10 (2,00 mm) e ficou retida em peneira ABNT 40 (0,42 mm).

Extração: em duplicata, foram pesadas 200 mg da casca da semente de cacau triturada e seca e colocada em frascos Erlenmeyer de boca larga com capacidade para 250 ml. Em seguida, foram submetidas à fervuras sucessivas em chapa quente com 50 ml etanol a 80% (v/v) - duas vezes por cinco minutos; 100 ml de água destilada durante cinco minutos e; 100 ml oxalato de amônio a 0.5% (p/v) por duas horas. Depois de cada tratamento, foram realizadas filtrações com papel de filtro, descartando-se os líquidos.

Hemicelulose - o resíduo da última filtração referida anteriormente foi transferido para um Erlenmeyer com o auxílio de 100 ml de H_2SO_4 1,0 N e submetido a refluxo em chapa quente por duas horas. Em seguida foi realizada uma filtração em cadinho de vidro filtrante, sendo o hidrolisado coletado e diluído até um volume final de 500 ml, com água destilada em balão volumétrico, para determinação da hemicelulose.

Celulose - o resíduo anterior retido no cadinho, foi lavado com acetona e depois de seco recebeu 20 ml de H_2SO_4 a 72% (p/p) permanecendo sob hidrólise por quatro horas à temperatura ambiente. Após este período, o material foi transferido para o Erlenmeyer com 100 ml de água destilada e conduzido para refluxo em chapa quente por duas horas. O conteúdo do frasco foi filtrado em cadinho de vidro filtrante previamente tarado e o hidrolisado foi diluído para 1000 ml com água destilada em balão volumétrico

para determinação da celulose.

Lignina - o cadinho de vidro filtrante com o resíduo da determinação da celulose foi submetido à secagem em estufa regulada a 105°C até peso constante. O teor de lignina da amostra foi calculado como sendo o peso do resíduo dessecado.

Doseamento - num tubo de ensaio foram colocados 1 ml do hidrolisado, mais 1 ml de uma solução de fenol a 5% (p/v) e misturados. Em seguida, foi adicionado ao tubo 5 ml de H_2SO_4 concentrado ($d = 1,84$), o conteúdo foi agitado e deixado em repouso por dez minutos, à temperatura ambiente. Depois deste período, o tubo foi agitado novamente e conduzido para um banho de água a 25 - 30°C por vinte minutos.

A leitura para hemicelulose foi feita a 480 nm, utilizando-se xilose como padrão e para celulose a 490 nm tendo-se glicose como padrão.

3.6. Análises do Produto Final

3.6.1. Classificação das sementes de cacau por prova de corte

Amostras contendo 1 kg de sementes secas de cacau, tratadas e não tratadas com celulases, foram encaminhadas ao posto de classificação de cacau da CEPLAC, para classificação por prova de corte, conforme a resolução 42 do CONCEX (10).

3.6.2. Avaliação sensorial

Amostras de cacau, com 4 kg de sementes secas, com e sem tratamento com celulases, foram encaminhadas à fábrica piloto do CEPEC para a preparação do chocolate destinado à avaliação sensorial.

Preparo do chocolate em barras:

As sementes secas de cacau foram colocadas em bandejas de alumínio com fundo perfurado, em camadas de apenas uma semente e submetidas à torração em estufa, primeiramente a 105° C por trinta minutos, e em seguida, a 125° C por mais quinze minutos.

Depois de resfriadas, as sementes foram quebradas e o nib separado da casca.

A formulação utilizada foi a seguinte:

Cacau (nib)	120 g
Açúcar (sacarose)	100 g
Manteiga de cacau	20 g

Depois de pesados, o cacau juntamente com o açúcar, foram misturados mecanicamente por quinze minutos sob aquecimento de uma lâmpada incandescente de 250 W. A pasta resultante foi passada duas vezes num sistema refinador constituído por três rolos, após o que, foi adicionada a manteiga de cacau e realizada a conchagem por duas horas.

Em seguida, a massa de chocolate foi derramada sobre uma mesa de mármore e, cinco minutos depois, foi colocada nas formas e compactada em mesa vibratória. As formas foram guardadas num refrigerador para o chocolate solidificar e no dia seguinte as barras foram desenformadas, embaladas em folhas de alumínio e mantidas sob refrigeração até o momento do transporte para o laboratório de análise sensorial do DCA/ESAL.

O transporte do chocolate foi feito numa caixa de isopor e, ao chegar ao laboratório, foi guardado em geladeira até o início dos testes.

Testes Organolépticos:

Os testes organolépticos foram iniciados quinze dias depois da fabricação do chocolate e teve como objetivo detectar possíveis diferenças entre os produtos preparados com sementes de cacau com e sem tratamento com celulasas antes da secagem.

O método de diferença utilizado foi o teste triangular, conforme descrito por MORAES (51). Os provadores, em número de nove, foram selecionados entre funcionários do DCA/ESAL, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e estudantes de pós-graduação em Ciência dos Alimentos e do Instituto Gammon que, antes da avaliação, receberam um treinamento.

Cada degustador, realizou uma série de seis provas, sendo as amostras apresentadas em grupos de três, na seguinte ordem: ABA; AAB; ABB; BBA; BAB e; BAA. Esta sequência foi organizada por sorteio e as amostras identificadas individualmente por um

número código conhecido somente do aplicador do teste.

Os provadores, ao serem admitidos nas cabines de provas, receberam as amostras em pratinhos e foram informados de que, em cada grupo, duas eram iguais e uma diferente, sendo-lhes pedido então, para que identificassem a amostra diferente, Ficha 1 A.

3.7. Tratamento Estatístico dos Dados

Os modelos matemáticos para estimar as temperaturas, acidez e valores do pH durante a fermentação das sementes de cacau foram obtidos pelo método dos polinômios ortogonais.

Determinou-se coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas na fermentação das sementes de cacau.

As diferenças entre médias das amostras das sementes de cacau tratadas e não tratadas com celulasas antes da secagem, com referência à acidez, valor do pH e aos teores dos biopolímeros da casca, foram avaliadas através do teste t.

Os resultados do teste triangular realizado para detectar possíveis diferenças entre as amostras de chocolate preparadas com sementes de cacau com e sem tratamento enzimático antes da secagem, foram avaliados de acordo com o trabalho de ROESSLER et alii (65).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Temperatura da Massa de Sementes de Cacau durante a Fermentação

As temperaturas registradas na massa de sementes de cacau durante a fermentação são mostradas na Tabela 1 A, enquanto que, a curva representativa das variações das temperaturas no curso do processo pode ser vista na Figura 3. Observa-se que a temperatura começa a subir a partir do primeiro dia da fermentação, aproximando-se de 43°C no terceiro dia e que apresenta tendência de se estabilizar em torno dos 50°C , nos últimos três dias do processo. Estes resultados estão de acordo com informações de QUESNEL & LOPEZ (61), segundo as quais, em boas fermentações comerciais a temperatura da massa de sementes deve atingir 45 a 48°C em aproximadamente três dias, devendo manter-se próxima a estes valores no restante do período fermentativo.

Por outro lado, a temperatura da massa de sementes se eleva porque as principais reações metabólicas na polpa são exotérmicas, sendo importante o controle da aeração para uma produção adequada de calor (8, 32, 60).

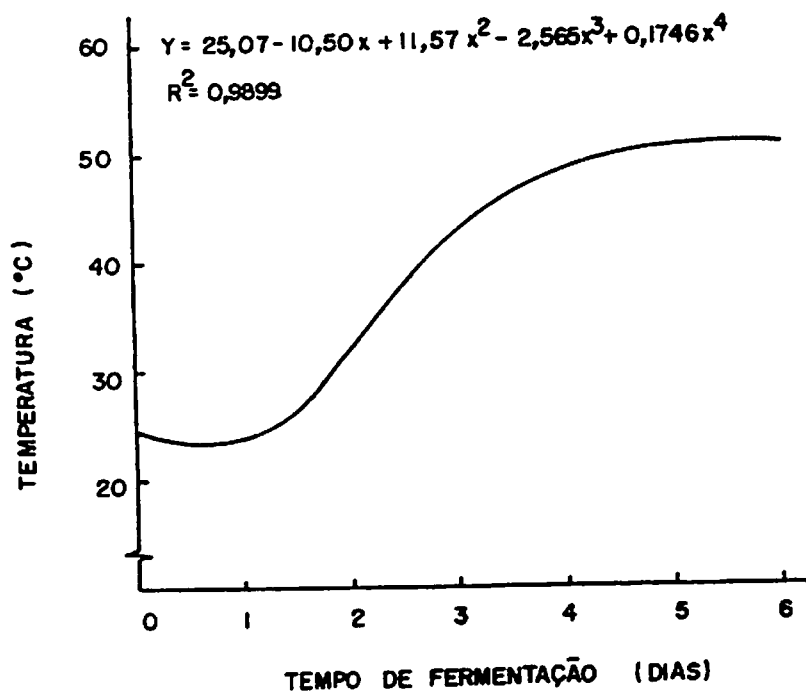
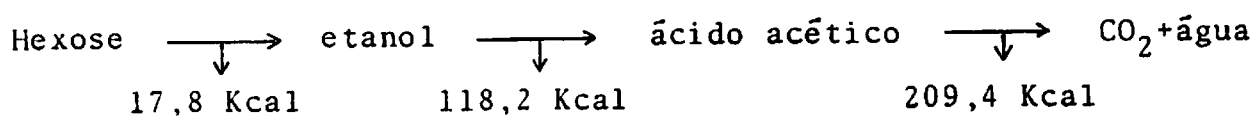


FIGURA 3 - Curva representativa das variações da temperatura da massa de sementes de cacau, durante a fermentação.

Assim sendo, de acordo com FORSYTH & QUESNEL (20), o calor liberado para cada grama de molécula de substância oxidada na degradação da glicose a CO_2 e água, se comporta da seguinte forma:



Estas informações demonstram que a produção de calor na fase inicial da fermentação, dominada pelas leveduras, é baixa, só aumentando quando as bactérias produtoras de ácido acético se tornam dominantes. Com efeito, os dados das Tabelas 1A e 2A. permitem determinar um coeficiente de correlação $r = 0,91$ ($p < 0,01$) entre a temperatura da massa de sementes e os ácidos voláteis totais (acético) da polpa o que significa dizer que 82,81% das variações observadas na temperatura podem ser atribuídas às variações nos teores de ácido acético na polpa durante o processo fermentativo.

4.2. Acidez e Valores do pH da Polpa e dos Cotiledones das Sementes de Cacau durante a Fermentação

4.2.1. Acidez da polpa e dos cotiledones

As variações nos teores dos ácidos voláteis livres, ácidos voláteis fixos e ácidos livres totais da polpa e cotiledones das sementes de cacau no curso da fermentação, estão representadas pelas curvas mostradas nas Figuras 4, 5 e 6 respectivamente, ajustadas a partir dos dados da Tabela 2A. Já as análises de variância das regressões polinomiais se acham resumidas na Tabela 3A.

Observa-se uma tendência para crescimento nos teores dos ácidos voláteis livres tanto na polpa quanto nos cotiledones (Figura 4) até o sexto dia da fermentação, enquanto que, os ácidos voláteis fixos da polpa e cotiledones (Figura 5) crescem

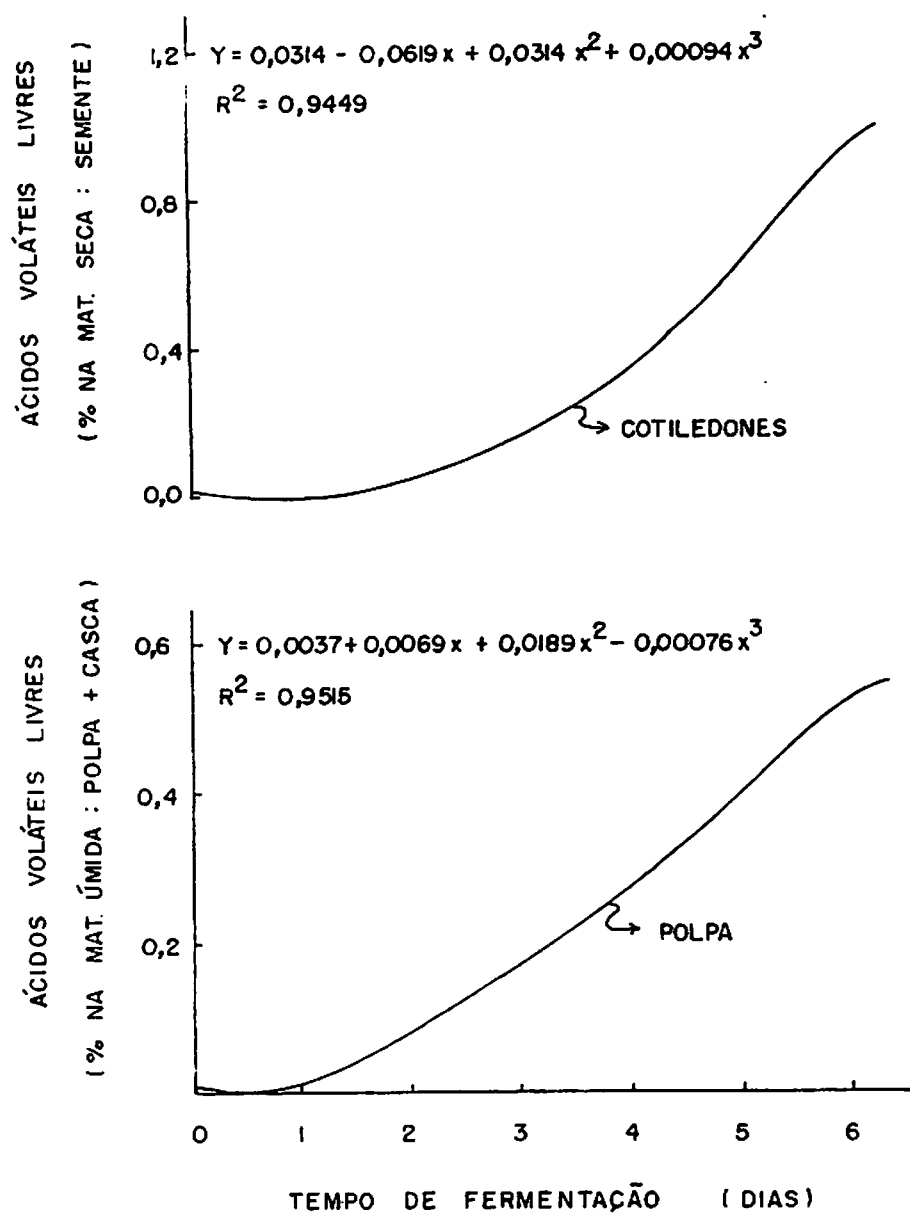


FIGURA 4 - Curvas representativas das variações nos teores de ácidos voláteis livres da polpa e cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação.

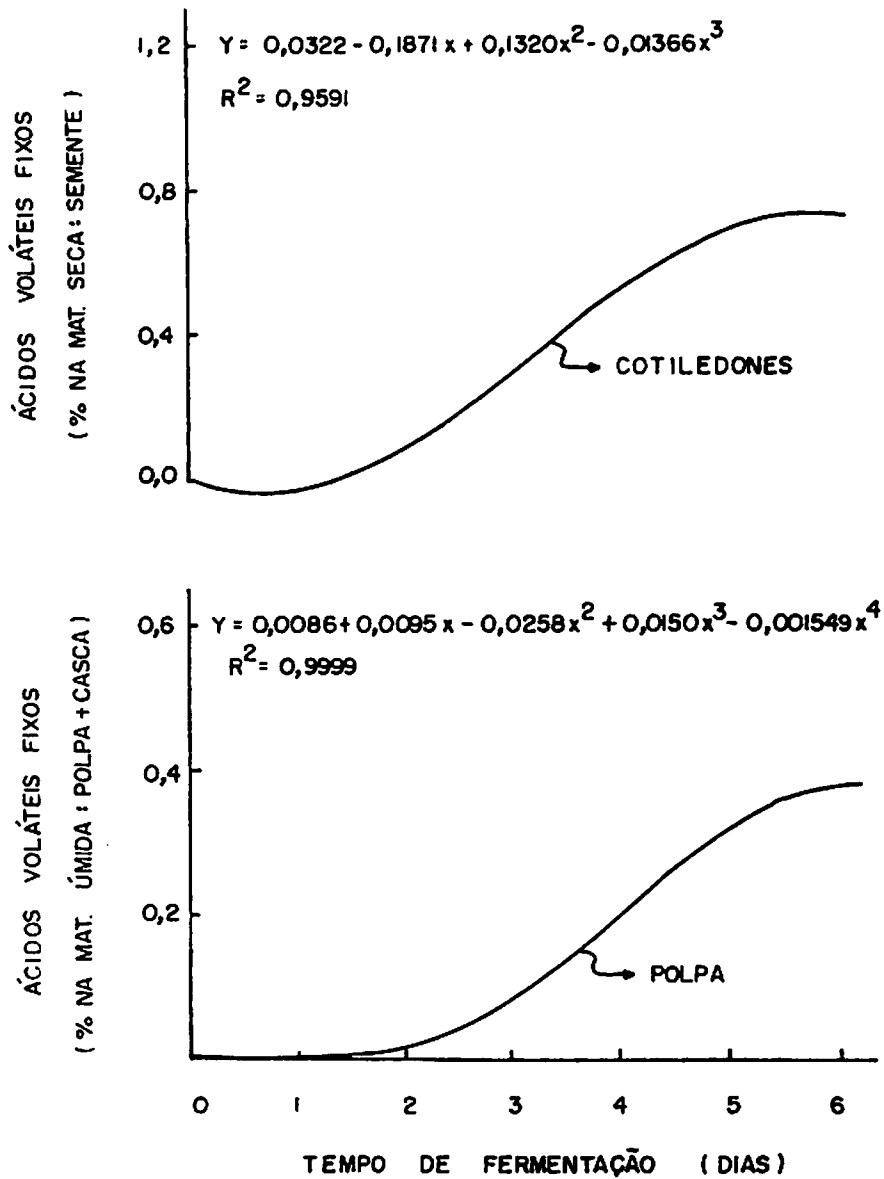


FIGURA 5 - Curvas representativas das variações nos teores de ácidos voláteis fixos da polpa e cotiledones das sementes de cacau, durante a fermentação.

com tendência a se estabilizarem no final do processo fermentativo. Por outro lado, os teores dos ácidos livres totais da polpa e cotiledones (Figura 6) depois de passarem por um mínimo próximo ao segundo e ao primeiro dia da fermentação respectivamente, manifestaram tendência a aumentar até o último dia do processo.

Os teores dos ácidos: voláteis livres, voláteis fixos e livres totais da polpa e cotiledones das sementes de cacau no final da fermentação foram: 0,591 e 1,020%; 0,373 e 0,721% e; 1,142 e 2,216% respectivamente, conforme podem ser vistos na Tabela 2A. Entretanto, depois de secas, os teores destes ácidos nos cotiledones das sementes de cacau caíram para: 0,790%; 0,649% e 1,818% respectivamente, conforme demonstram os dados da Tabela 4A.

Por falta de padronização dos métodos, cada pesquisador expressa a acidez em sementes de cacau da forma que desejar, o que dificulta muito a comparação de dados. LOPEZ (41) em trabalho realizado no CEPEC, expressou seus resultados em miliequivalentes (meq.) de NaOH por 100 g de cotiledones. O produto seco, após seis dias de fermentação, apresentou os seguintes teores de ácidos: voláteis livres, 14,75 meq.; voláteis fixos, 3,94 meq. e; livres totais, 21,0 meq. por 100 g de cotiledones. Já nas nossas condições experimentais, a acidez das sementes fermentadas e secas (7,0 a 8,0% de umidade) expressa da mesma forma foi: ácidos voláteis livres, 12,25 meq.; ácidos voláteis fixos, 10,06 meq. e; ácidos livres totais, 28,19 meq. de NaOH por 100 g de cotiledones. Assim sendo, o produto obtido caracteriza-se como ácido, uma vez

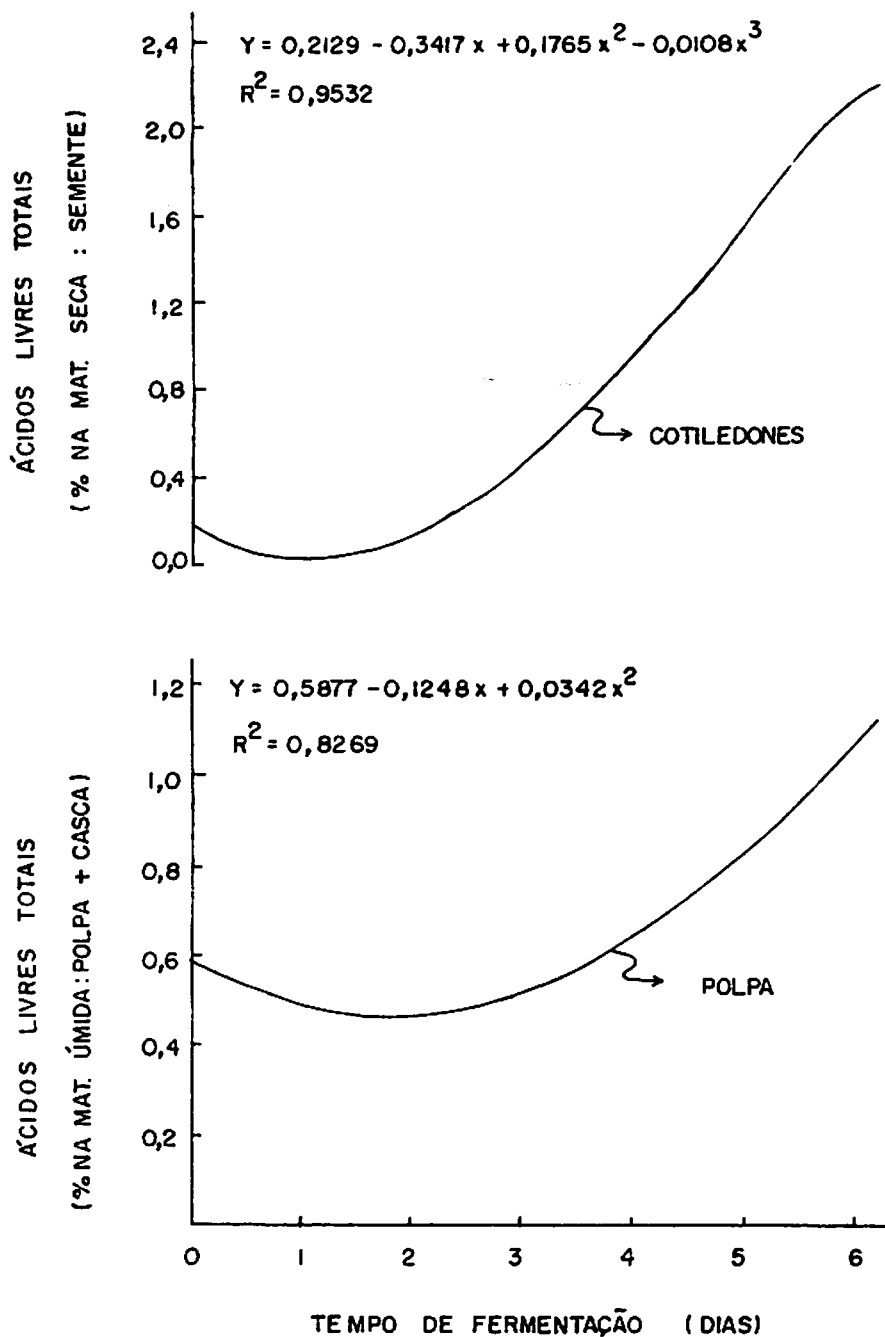


FIGURA 6 - Curvas representativas das variações nos teores de ácidos livres totais na polpa e cotiledones das sementes de cacau, durante a fermentação.

que, de acordo com informações de LOPEZ & PASSOS (39) e de LOPEZ (42), a faixa de acidez desejada pelos fabricantes de chocolate situa-se de 12 a 15 meq. de NaOH por 100 g de cotiledones de ácidos livres totais.

Entretanto, de acordo com BIEHL (4), a quantidade de ácido acético acumulada nos cotiledones das sementes de cacau depende da concentração deste ácido na parte de fora e do tempo gasto para difundir para dentro da semente. Dessa forma, em trabalho realizado por GRIFFITHS (24) foi observado que a produção máxima de ácido acético situou-se entre o quarto e o quinto dia do processo fermentativo, caindo depois, e que, toda vez que o ácido acético aumentava na polpa, havia um aumento correspondente deste ácido nos cotiledones. Assim sendo, a partir dos dados da Tabela 2A, determinou-se um coeficiente de correlação $r = 0,987$ ($p < 0,001$), entre as quantidades de ácido acético no interior da semente e as quantidades na polpa, significando que 97,24% das variações nos teores de ácido acético dos cotiledones se devem às variações nos teores deste ácido na polpa durante a fermentação.

Por outro lado, BERBERT (3) chama a atenção sobre a importância da composição da polpa da semente de cacau para o processo fermentativo. O autor argumenta sobre a conveniência de se aguardar alguns dias entre a colheita e a quebra dos frutos (três a seis), justamente para que haja uma redução na quantidade de líquidos em torno das sementes e se processem algumas modificações nos açúcares da polpa, transformações, que seriam responsáveis pelas fermentações mais rápidas, observadas nas circunstân-

cias referidas.

Sendo assim, nas nossas condições experimentais, com frutos quebrados com apenas um dia pós-colheita, pode-se admitir uma fermentação mais moderada das sementes de cacau, entretanto, não há indícios de prejuízos para o processo. Durante os seis dias da fermentação, não houve queda na produção de ácidos, indicativo de que o substrato não foi totalmente consumido pelos microorganismos no período em questão.

4.2.2. Valores do pH da polpa e dos cotiledones

As informações sobre as variações nos valores do pH da polpa e cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação estão contidas na Tabela 2A e na Figura 7, enquanto que, as análises de variância das regressões polinomiais podem ser vistas na Tabela 3A.

As curvas da Figura 7 indicam que o valor do pH dos cotiledones apresentou uma tendência a cair de 6,22 para 4,59 entre a fase inicial do processo e o sexto dia da fermentação, enquanto que, o valor do pH da polpa manifestou tendência a aumentar de 3,61 para 4,51 no mesmo período. Tendências semelhantes foram observadas por SHEPHERD (73), ao constatar durante o processo fermentativo que o valor do pH dos cotiledones caiu de 6,42 para 4,74 e o da polpa aumentou de 3,80 para 4,34 no espaço de seis dias.

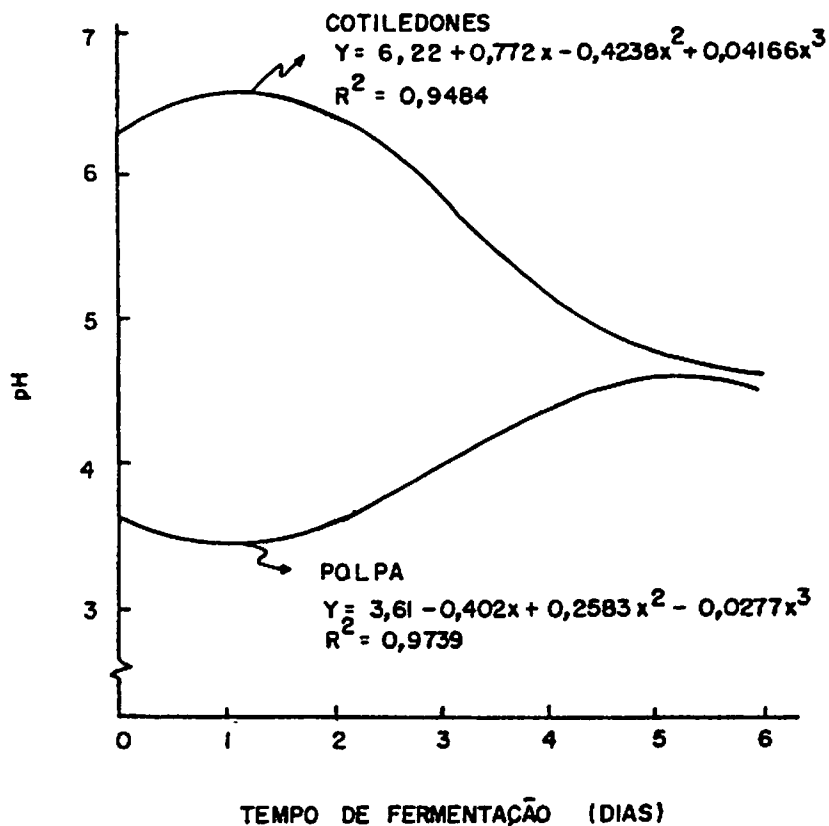


FIGURA 7 - Curvas representativas das variações nos valores do pH da polpa e dos cotilédones das sementes de cacau, durante a fermentação.

Na Tabela 3 podem ser apreciadas as correlações entre os valores do pH da polpa e dos cotilédones das sementes de cacau versus acidez, no curso da fermentação.

O valor baixo para o pH da polpa na fase inicial da fermentação de acordo com informações de ROELOFSEN (64) e de SHEPHERD (73) deve-se quase que exclusivamente à presença do ácido cítrico que é encontrado de forma natural na polpa da semente

de cacau. Segundo os autores, em consequência da atividade dos microorganismos na polpa, o ácido cítrico vai sendo substituído pelos ácidos menos dissociados lático (numa extensão muito limitada) e acético, o que determina um aumento gradual no valor do pH da polpa, o qual, nos estágios subsequentes do processo fermentativo, irá refletir a concentração do ácido acético em particular. Já a queda no valor do pH dos cotiledones de acordo com BIEHL (4) e QUESNEL (58), deve-se principalmente ao ácido acético que é absorvido pelas sementes durante a fermentação.

Os dados da Tabela 3 indicam que a melhor correlação apresentada, em ordem de importância, foi com o grupo de ácidos voláteis e, dentre estes, com os fixos. Também observou-se um alto grau de correlação entre o valor do pH dos cotiledones e os ácidos livres totais dos cotiledones, enquanto que, um baixo grau entre o valor do pH da polpa e os ácidos livres totais da polpa. Constata-se ainda, que o coeficiente de correlação entre os valores do pH e a acidez da polpa foi positivo, enquanto que, entre os valores do pH e a acidez dos cotiledones foi negativo.

Assim sendo, os resultados evidenciam que, os valores do pH da polpa e cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação foram altamente correlacionados com os teores de ácido acético da polpa e cotiledones, respectivamente.

TABELA 3 - Correlações (R) entre: valores do pH da polpa e dos cotiledones das sementes de cacau versus acidez durante a fermentação

Variáveis		R	Nível de Significância
Dependente	Independente		
pH da polpa	Ac.vol.livres polpa	0,899	<0,01
pH da polpa	Ac.vol.fixos polpa	0,942	<0,01
pH da polpa	Ac.vol.totais polpa	0,928	<0,01
pH da polpa	Ac.livres tot. polpa	0,589	<0,20
pH dos cotiledones	Ac.vol.livres cotil.	-0,930	<0,01
pH dos cotiledones	Ac.vol.fixos cotil.	-0,991	<0,001
pH dos cotiledones	Ac.vol.totais cotil.	-0,978	<0,001
pH dos cotiledones	Ac.livres tot.cotil.	-0,963	<0,001

4.3. Morte das Sementes de Cacau no Curso da Fermentação

Na Figura 8 pode-se observar que nas nossas condições experimentais, com um dia de fermentação todas as sementes continuavam vivas, com dois dias, 15% se achavam mortas, enquanto que, com três dias, 96% delas haviam morrido.

Estes resultados se comparam com os obtidos por HOLDEN (28) que, trabalhando com amostras coletadas na parte de cima da caixa, constatou após vinte horas de fermentação, que to-

das sementes se achavam viáveis, com quarenta e quatro horas, 33% estavam mortas e com sessenta e oito horas, todas as sementes haviam morrido. Em trabalho posterior, QUESNEL (59) confirmou estas tendências com relação ao tempo necessário para a morte das sementes quando verificou, após dezoito horas de fermentação, que todas as sementes continuavam vivas, com quarenta e duas horas, 25% haviam morrido e depois de sessenta e seis horas, todas as sementes se encontravam mortas.

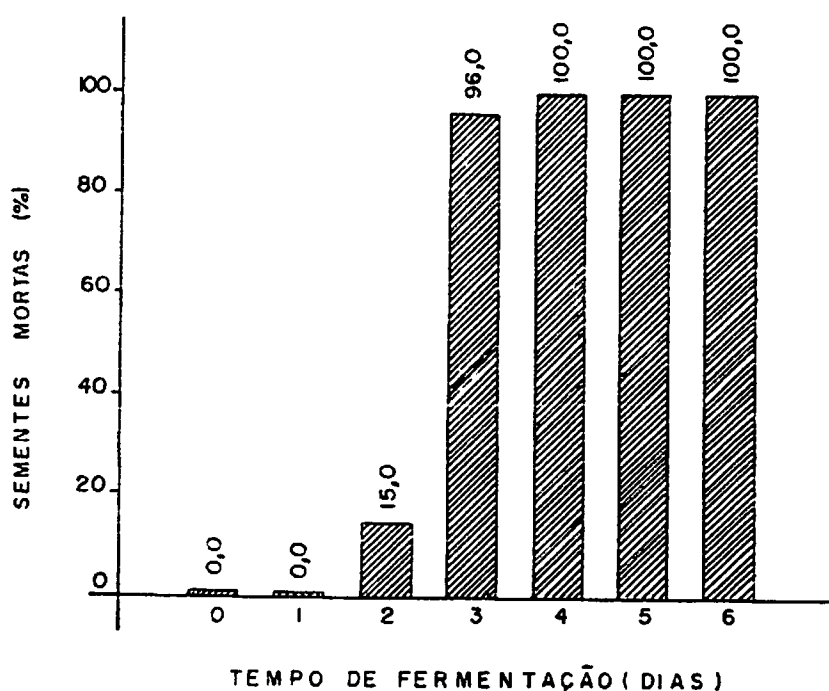


FIGURA 8 - Gráfico representativo da evolução da morte das sementes de cacau, no curso da fermentação.

Na Tabela 4 são mostradas as correlações entre: morte das sementes versus temperatura da massa e acidez da polpa e cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação.

TABELA 4 - Correlações (R) entre as variáveis: morte das sementes versus temperatura da massa e acidez da polpa e cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação.

Variáveis		R	Nível de Significância
Dependente	Independente		
Morte sementes	Temperatura da massa	0,986	< 0,001
Morte sementes	Ac.voláteis livres polpa	0,851	< 0,02
Morte sementes	Ac.voláteis fixos polpa	0,820	< 0,05
Morte sementes	Ac.livres totais polpa	0,439	< 0,40
Morte sementes	Ac.voláteis liv.cotil.	0,702	< 0,10
Morte sementes	Ac.voláteis fix.cotil.	0,885	< 0,01
Morte sementes	Ac.livres tot.cotil.	0,743	< 0,10

Os dados da Tabela 4 evidenciam que os fatores que mais se correlacionaram, em ordem de importância, com a morte das sementes foram: temperatura da massa ($r=0,986$), ácidos voláteis fixos dos cotiledones ($R=0,885$) e ácidos voláteis livres da polpa ($R=0,851$). Também foram observadas boas correlações com os ácidos: voláteis fixos da polpa, livres totais dos cotiledones e voláteis livres dos cotiledones, entretanto, verificou-se um baixo grau de correlação com os ácidos livres totais para polpa. Estes resultados confirmam informações de MORETON (52) e de QUESNEL (59) que, além do etanol consideram o ácido acético (voláteis)

produzidos pelos microorganismos e a temperatura alcançada pela massa de sementes como os agentes responsáveis pela morte das sementes de cacau no curso da fermentação.

Sendo assim, as informações contidas na Figura 8 mostram que o tempo em que ocorreu maior porcentagem de sementes sendo mortas situa-se entre o segundo e o terceiro dia do processo fermentativo e que, os fatores que mais se correlacionaram com a morte das sementes, em ordem de importância, foram: temperatura da massa de sementes, ácidos voláteis fixos dos cotiledones e ácidos voláteis livres da polpa.

4.4. Permeabilidade da Casca da Semente de Cacau ao Ácido Acético durante a Fermentação

Na Figura 9, pode-se constatar que a casca da semente de cacau mostrou-se francamente permeável ao ácido acético até o segundo dia da fermentação, e que, entre o segundo e o terceiro dia do processo, a permeabilidade caiu abruptamente de 442,18 para 48,62 μg de ácido acético por cm^2 de casca por hora, mantendo-se em níveis baixos até o final do processo fermentativo.

Esta queda acentuada na permeabilidade da casca da semente coincidiu com o tempo em que se observou maior porcentagem de sementes sendo mortas, conforme demonstram os dados da Tabela 5. Tendência semelhante já havia sido constatada por LOPEZ (40), entretanto, a permeabilidade foi expressa em unidades de área obtidas em cromatogramas.

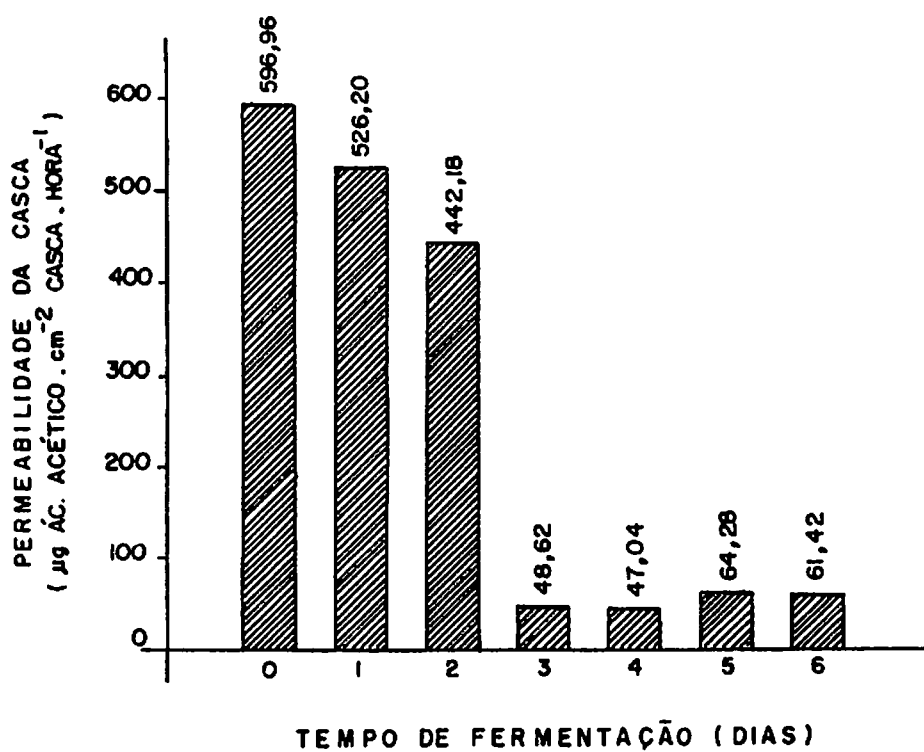


FIGURA 9 - Gráfico representativo das variações na permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação.

TABELA 5 - Comportamento da permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético frente à morte das sementes no curso da fermentação.

Tempo de Fermentação (dias)	Variáveis	
	Permeabilidade ^{1/}	Sementes Mortas ^{2/}
0	596,96	0,00
1	526,20	0,00
2	442,18	15,00
3	48,62	96,00
4	47,04	100,00
5	64,28	100,00
6	61,42	100,00

^{1/} em μg de ácido acético, cm^{-2} casca.hora⁻¹

^{2/} em percentagem

Na Tabela 6, são apresentadas as correlações entre as variáveis: permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético versus temperatura, morte das sementes e acidez e valor do pH da polpa durante a fermentação.

De acordo com informações de FORSYTH (17) e de QUESNEL (59), com a morte das sementes de cacau os polifenóis e as enzimas são liberadas das células onde se encontram armazenadas, catequinas são parcialmente perdidas por exsudação através da

testa e o exsudato e a casca da semente tomam a coloração marrom quando as catequinas são oxidadas enzimicamente sob as condições aeróbicas que prevalecem na testa. Em trabalho posterior KIM & KEENEY (33) constataram em sementes de cacauzeiros híbridos "Trinidad-Jamaicano", coletadas em vários estágios da fermentação um declínio acentuado de (-)-epicatequina entre o segundo e o terceiro dia da fermentação e que, a essa diminuição correspondia um aumento desta catequina na casca da semente, o que vem reforçar a informação anterior. Por outro lado, MARBACH & MAYER (49), estabeleceram uma relação entre a permeabilidade de cascas de sementes de plantas do gênero Pisum à água, com o conteúdo de fenólicos nelas existentes e o nível de oxidação desses compostos. Eles constataram que naquelas espécies cujas sementes são normalmente impermeáveis à água, as cascas contêm um alto conteúdo de fenólicos e de catecol oxidase. Quando essas sementes foram secas na ausência de oxigênio, as cascas se mostraram totalmente permeáveis à água e não mudaram a coloração de verde para marrom. Os autores sugerem então que a oxidação enzimática dos constituintes fenólicos na fase de secagem pode tornar a casca da semente impermeável à água e, além disso, informam que os processos oxidativos podem causar mudanças estruturais.

De forma semelhante, pode-se admitir que a oxidação enzimática dos compostos fenólicos na casca que se verifica após a morte das sementes, poderia contribuir de alguma forma para reduzir a permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação.

TABELA 6 - Correlações (R) entre as variáveis: permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético versus temperatura, acidez e valor do pH da polpa e morte das sementes durante a fermentação.

Variáveis		R	Nível de Significância
Dependente	Independente		
Perm. casca	Temperatura	-0,977	< 0,001
Perm. casca	Ac.voláteis livres polpa	-0,829	< 0,05
Perm. casca	Ac.voláteis fixos polpa	-0,786	< 0,05
Perm. casca	Ac.livres totais polpa	-0,411	< 0,40
Perm. casca	Valor pH da polpa	-0,909	< 0,01
Perm. casca	Morte das sementes	-0,994	< 0,001

Os dados da Tabela 6 mostram que a melhor correlação apresentada, em ordem de importância, foi com a morte das sementes ($r=-0,994$), indicando que 98,30% das variações ocorridas na permeabilidade da casca podem ser atribuídas às transformações ocorridas com a morte das sementes durante a fermentação. Verifica-se também um alto grau de associação com a temperatura, valor do pH da polpa e com o grupo de ácidos voláteis da polpa, enquanto que, um baixo grau com os ácidos livres totais da polpa. Entretanto, consultando-se os dados da Tabela 4, pode-se constatar que as variáveis: temperatura da massa, ácidos voláteis livres e fi-

xos da polpa e ácidos livres totais da polpa manifestaram a mesma tendência em relação ao grau de correlação com a morte das sementes. Por outro lado, o alto grau de associação entre a permeabilidade da casca e o valor do pH da polpa, reflete as correlações entre o valor do pH da polpa com o grupo de ácidos voláteis da polpa (Tabela 3) e entre estes e a morte das sementes (Tabela 4). Por conseguinte, a permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação foi afetada pela morte das sementes. Sugere-se, uma associação entre a queda na permeabilidade com a oxidação enzimática de compostos fenólicos na casca, que acontece após a morte das sementes de cacau.

4.5. Acidez e valor do pH dos Cotiledones das Sementes de Cacau Tratadas e não Tratadas com Celulases antes da Secagem

As informações sobre a acidez e o valor do pH dos cotiledones das sementes de cacau, com e sem tratamento enzimático antes da secagem, encontram-se na Tabela 4A, enquanto que, a análise estatística dos dados é mostrada na Tabela 7.

Os resultados indicam que as diferenças entre as variáveis foram não significativas por efeito do tratamento realizado com as enzimas antes da secagem das sementes de cacau.

Os dados da Tabela 8 evidenciam que houveram perdas de ácidos durante a secagem das sementes de cacau, o que confirma informações de ROELOFSEN (64) com relação ao ácido acético

e de PASSOS & LOPEZ (54) não são com relação ao ácido acético, como também, aos livres totais.

TABELA 7 - Análise estatística (teste t) para verificar o efeito da adição de celulases antes da secagem sobre a acidez e o valor do pH das sementes de cacau.

Variáveis	Médias dos Tratamentos ^{1/}		G.L.
	Com celulases	Sem celulases	
Ácidos voláteis livres	0,8720 a	0,9316 a	12
Ácidos voláteis fixos	0,6676 a	0,6974 a	12
Ácidos livres totais	1,8976 a	2,0006 a	12
Valor do pH	4,5420 a	4,5000 a	12

As médias seguidas por letras iguais na mesmalinha não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,10$).

^{1/} Ácidos: em percentagem com relação à matéria seca (semente).

TABELA 8 - Perdas de acidez durante a secagem das sementes de cacau tratadas e não tratadas com celulases.

Variáveis	Perdas de Acidez ^{1/}	
	Com celulases	Sem celulases
Ácidos voláteis livres	24,12	22,55
Ácidos voláteis fixos	12,76	9,98
Ácidos livres totais	22,29	17,96

^{1/} em percentagem com relação ao conteúdo inicial.

Apesar de que, do ponto de vista estatístico, as diferenças tenham sido não significativas por efeito da adição de celulases, observa-se que a perda de ácidos sempre foi maior nas sementes que receberam o tratamento enzimático, o que estaria indicando, alguma modificação na estrutura da casca, facilitando a eliminação dos ácidos.

Por outro lado, constatou-se que durante a secagem a umidade das sementes caiu de 90,04% para 7,58% e 7,53% (base seca) respectivamente, para as amostras com e sem tratamento pelas enzimas. Juntamente com a água perdida devem ter sido arrastados alguns ácidos, que assim também contribuiu para a redução da acidez das sementes de cacau no processo de secagem.

4.6. Biopolímeros da Casca da Semente de Cacau durante a Secagem

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina da casca da semente, das amostras com e sem tratamento por celulases coletadas durante a secagem, são mostradas na Tabela 5A.

Na Tabela 9 são apresentados os resultados da análise estatística realizada para verificar o efeito do tratamento enzimático sobre os teores dos biopolímeros da casca da semente de cacau na fase de secagem.

Observa-se que há diferenças significativas para celulose e lignina aos níveis de 6% e 1% de probabilidade respectivamente. Entretanto, não foi constatada diferença significativa para a hemicelulose. A perda de celulose verificada na casca das sementes tratadas com celulases antes da secagem, estaria indicando uma atividade destas enzimas na casca. Entretanto, a diferença não significativa nos teores de hemicelulose entre as duas amostras demonstra que o sistema enzimático do T. reesei utilizado praticamente não apresentou atividade xilanase.

Por outro lado, foram constatadas atividades C1 e Cx por estas enzimas em substratos puros, como também, atividade na casca da semente de cacau fermentada e seca conforme foi descrito no sub-item 3.4. deste trabalho.

Já a diferença significativa nos teores de lignina, entre as duas amostras, pode ser atribuída principalmente à degradação da celulose na casca das sementes que receberam o tratamento enzimático.

Além disso, pode-se admitir que o teor mais elevado de lignina na casca das sementes que foram tratadas com celulases antes da secagem, teria também alguma relação com modificações no metabolismo dos fenólicos, acarretando lignificação.

TABELA 9 - Análise estatística (teste t) para verificar o efeito da adição de celulases antes da secagem sobre os teores dos biopolímeros da casca da semente de cacau.

Variáveis	Médias de Tratamentos ^{1/}		G.L.
	Com celulases	Sem celulases	
Celulose*	15,6086 a	17,3000 b	12
Hemicelulose	7,6929 a	7,8757 a	12
Lignina**	15,3500 a	12,2486 b	12

As médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,10$).

* t significativo ao nível de 6% de probabilidade.

** t significativo ao nível de 1% de probabilidade.

^{1/} em percentagem com relação à matéria seca.

4.7. Análises do Produto Final

4.7.1. Classificação das sementes de cacau por porva de corte

Os resultados da classificação das amostras de sementes de cacau, tratadas e não tratadas com celulasas antes da secagem, feita pelo Posto de Classificação de Cacau da CEPLAC, en contram-se transcritos na Tabela 10.

Os dados mostram que não houve diferença na classificação entre as amostras com e sem tratamento enzimático antes da secagem. Em ambos os casos o cacau foi classificado como do tipo I (Superior) de acordo com a resolução 42 do CONCEX (10) que define o produto em questão como constituído de amêndoas fermentadas, secas, com o máximo de 8% de umidade, com aroma natural, não contaminado com odores estranhos, admitindo-se a tolerância dos seguintes defeitos:

a) Amêndoas mofadas e danificadas por insetos, total máximo de 4% contadas (e não pesadas) e não mais de 2% de cada defeito isoladamente, sem que a soma ultrapasse aquele máximo;

b) Amêndoas ardósias, máximo de 2% contadas;

c) Amêndoas germinadas, achatadas e/ou com outros defeitos, não ultrapassando sua soma, o total máximo de 2% contadas.

Entretanto, pode-se constatar pelo ensaio de corte, algumas diferenças na coloração dos cotiledones entre as duas amostras. Resultados experimentais obtidos por LOPEZ (36), mos-

tram uma série de limitações desse sistema de classificação, justamente por não considerar a característica cor dos cotiledones. Assim sendo, de acordo com FORSYTH (17) e FORSYTH & QUESNEL (19) as reações que determinam a cor das sementes de cacau se iniciam na fermentação, com a hidrólise enzimática dos pigmentos antociânicos violeta dos cotiledones, que assim adquirem uma coloração mais clara e se complementam na secagem quando a cor marrom característica é desenvolvida pela ação de um sistema polifenoloxidase que é ativo quando o oxigênio tem acesso aos cotiledones. Por conseguinte, as modificações provocadas pelas enzimas celulósicas na casca da semente durante a secagem, podem ter interferido de alguma forma na oxidação enzimática dos polifenóis nos cotiledones, já que, as percentagens de sementes totalmente marrom e parcialmente marrom vistas na Tabela 10, foram menores na amostra que recebeu o tratamento enzimático antes da secagem. Mesmo assim, a adição de celulasas não interferiu no resultado final da classificação das sementes de cacau através da prova de corte, sendo ambas classificadas como do tipo I (Superior) para exportação.

4.7.2. Avaliação sensorial

Os resultados do teste triangular realizado com amostras de chocolate em barras, preparadas com sementes de cacau tratadas e não tratadas com celulasas antes da secagem são mostrados na Tabela 6A.

De um total de cinquenta e quatro julgamentos, a

TABELA 10 - Resultado da classificação por prova de corte das amostras de sementes de cacau tratadas e não tratadas com celulasas, fermentadas e secas, realizada pelo Posto de Classificação da CEPLAC.

I T E M	Amostra	
	Com celulasas	Sem celulasas
Características gerais:		
- peso médio de uma semente (g)	1,03	1,03
- teor de umidade (%)	7,8	7,4
- aspecto externo	bom	bom
- aroma	natural	natural
Ensaio de corte (média 300 sementes):		
- sementes totalmente marrom (%)	21,0	30,0
- sementes parcialmente marrom (%)	45,0	50,0
- sementes de cor violeta (%)	34,0	20,0
Classificação (tipo)	Superior	Superior

a amostra diferente foi identificada quinze vezes, indicando que não houve diferença significativa nas características organolépticas entre as duas amostras, ao nível de 5% de probabilidade, ROESSLER et alii (65).

Este resultado confirma os obtidos anteriormente

através das análises químicas para acidez e da classificação das sementes por prova de corte, que demonstraram não existir diferenças entre as sementes de cacau com e sem tratamento enzimático antes da secagem.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que este trabalho foi desenvolvido e com base nos resultados experimentais, são feitas as seguintes conclusões:

5.1. A permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação foi afetada pela morte das sementes.

5.2. Os fatores que mais se correlacionaram com a morte das sementes de cacau, em ordem de importância, foram: temperatura da massa de sementes, ácidos voláteis fixos dos cotiledones e ácidos voláteis livres da polpa.

5.3. A perda na permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético observada durante o processo fermentativo não prejudicou a absorção pelos cotiledones, do ácido acético, nem a dos ácidos livres totais, portanto admite-se a existência de outro fator controlando a absorção destas substâncias.

5.4. O tratamento feito com celulases de Trichoderma reesei QM 9414 às sementes de cacau antes da secagem, promoveu mudanças nos teores dos biopolímeros da casca da semente, entretanto, não foi capaz de reduzir a acidez do produto final aos níveis desejados pelo mercado importador.

5.5. Os chocolates produzidos com sementes de cacau com e sem tratamento enzimático antes da secagem, não apresentaram diferenças significativas em suas características organolépticas.

5.6. O tratamento enzimático não afetou a qualidade das sementes de cacau com vistas à exportação. Ambas as amostras foram classificadas como do tipo I (superior).

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visto que, não são conhecidos ainda os fatores responsáveis pela acidez elevada do cacau produzido no Brasil, seria interessante desenvolver novas pesquisas direcionadas aos seguintes aspectos:

1. Influência do período pós-colheita e do estágio de maturação do fruto na acidez do produto final;

2. Fermentação das sementes de cacau com a utilização de aditivos;

3. Levantamento da microflora envolvida na fermentação das sementes de cacau;

4. Transformações bioquímicas dos carboidratos das sementes no período entre a colheita e a quebra dos frutos de cacau e durante o processo fermentativo;

5. Avaliação dos materiais genéticos existentes nas estações experimentais da CEPLAC, com relação à acidez das sementes no curso da fermentação, e

6. Desenvolvimento de novos sistemas de fermenta-

ção, visando reduzir a acidez das sementes de cacau durante o pro
cesso.

7 RESUMO

Este trabalho teve como objetivos determinar o efeito de alguns fatores sobre a permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético durante a fermentação e verificar o efeito da adição de celulases, antes da secagem, sobre a acidez e a qualidade do produto final.

As sementes de cacau, depois de extraídas dos frutos colhidos no estágio maduro, foram fermentadas em caixas de madeira por seis dias e amostras foram coletadas diariamente para determinações do momento da morte das sementes, acidez e valores do pH da polpa e cotiledones e permeabilidade da casca da semente ao ácido acético. Também foram feitas leituras diárias da temperatura da massa de sementes em fermentação.

Concluída a fermentação, 30 kg de sementes úmidas foram tratadas com celulases de Trichoderma reesei QM 9414 e submetidas a secagem contínua num secador de lâmpadas incandescentes por 116 horas. Outra porção de igual peso sem receber qualquer tratamento foi secada de igual forma como testemunha. Durante a secagem, foram retiradas amostras para determinações do teor de

umidade, acidez e valor do pH dos cotiledones e biopolímeros da casca da semente. Amostras, de ambos os produtos, fermentados e secos também foram colhidas para classificação das sementes por prova de corte e fabricação de chocolate para avaliação sensorial.

A acidez da polpa e cotiledones das sementes de cacau mostrou uma tendência a aumentar durante o processo fermentativo. Entretanto, o valor do pH dos cotiledones caiu de 6,3 para 4,6 enquanto que o da polpa, aumentou de 3,6 para 4,5. As análises demonstraram que a permeabilidade da casca da semente de cacau ao ácido acético caiu de uma média de 442,18 para 48,62 μg de ácido acético por cm^2 de casca por hora entre o segundo e o terceiro dia do processo. Esta queda foi altamente correlacionada com a morte das sementes no curso da fermentação.

A adição de celulases antes da secagem modificou os teores dos biopolímeros da casca da sementes, entretanto, não foi suficiente para reduzir a acidez do produto final aos níveis desejados pelo mercado importador, conforme demonstram os resultados das análises químicas. Mesmo assim, ambas as amostras foram classificadas por prova de corte como do tipo I (Superior) para exportação e o painel organoléptico não detectou diferenças significativas entre os chocolates com elas preparados. Os teores de acidez dos cotiledones das sementes fermentadas e secas, com e sem tratamento enzimático, foram: ácidos voláteis livres, 0,774 e 0,790%; ácidos voláteis fixos, 0,629 e 0,649% e; ácidos livres totais, 1,722 e 1,818%, respectivamente.

8. SUMMARY

The objective of this work was to determine the effect of some factors on the permeability of the seed coat of cacao to acetic acid during fermentation, and to verify the effect of the addition of cellulases before drying on the acidity and the quality of the final product.

The cacao beans, after being extracted from fruits harvested in the mature state, were fermented in wooden boxes for six days and samples were taken daily to determine the moment in which seed death occurred, the acidity and pH values of the pulp and cotyledones and permeability of the seed coat to acetic acid. Daily temperature readings of the mass of fermenting seeds were also taken.

At the conclusion of fermentation, 30 kg of moist seeds were treated with cellulases of Trichoderma reesei QM 9414, and submitted to continuous drying in a dryer with incandescent lamps for 116 hours. Another portion of equal weight not subjected to any treatment was dried in the same manner as a control. During drying samples were removed for the determinations of

moisture level, acidity, and pH value of the cotyledons and seed coat biopolymers. Samples of both of the cured cacao beans were also taken for the classification of the beans by the cut test and fabrication of chocolate for sensorial evaluation.

The acidity of the pulp and cotyledons of the cacao beans showed a tendency to increase during the fermentation process. However, the pH value of the cotyledons decrease from 6,3 to 4,6 whilst that of the pulp increased from 3,6 to 4,5. The analyses demonstrated that the permeability of the cacao seed coat to acetic acid decreased from a mean of 442,18 to 48,62 μg acetic acid/cm² of seed coat/hour between the second and third day of the process. This decrease was highly correlated with the death of the seeds during the course of fermentation.

The addition of cellulases before drying modified the level of the seed coat biopolymers, however, it was not sufficient to reduce the acidity of the final product to the levels desired by the import market, as shown by the results of the chemical analyses. Despite this both of the samples were classified by the cut test as grade I (Superior) for export and the taste panel did not detect significant differences between the chocolate prepared from them. The levels of acidity of the cotyledons of the cured beans, with and without enzyme treatment were: free volatile acids, 0,774 and 0,790%; fixed volatile acids, 0,629 and 0,649% and; total free acids, 1,772 and 1,818% respectively.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAILEY, R.W. Quantitative studies of ruminant digestion.
II. Loss of ingested plant carbohydrates from the reticulo rumen. New Zealand Journal of Agricultural Research, Wellington, 10:15-32, 1967.
2. BAREL, M.; GUYOT, R. & VINCENT, J.C. Les fractions protéiques du cacao avant et après torréfaction. Influence de la fermentation. Café Cacao Thé, Paris, 27(2):127-44, avr./juin 1983.
3. BERBERT, P.R.F. Contribuição para o conhecimento dos açúcares componentes da amendoa e do mel de cacau. Theobroma, Ilhéus, 9(2):55-61, abr./jun. 1979.
4. BIEHL, B. Cocoa fermentation and problem of acidity, over-fermentation and low cocoa flavor. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COCOA AND COCONUTS, Kuala Lumpur, 1984. Souvenir... Kuala Lumpur, Incorporated Society of Planters and the Malaysian Cocoa Growers Council. Cap.31, p.1-8.

5. BRACO, U.; GRAILHE, N.; ROSTAGNO, W. & EGLI, H. Analytical evaluation of cocoa curing in the Ivore Coast. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 20:713-7, Dec. 1969.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Divisão de Sementes e Mudas. Regras para análise de sementes. Brasília, 1976. 188p.
7. BRAUDEAU, J. El cacao. Barcelona, Blume, 1975. 297p.
8. CAMARGO, R. de; LEME Jr., J. & MARTINELLI FILHO, A. General observation on the microflora of fermenting cocoa beans (Theobroma cacao) in Bahia (Brazil). Food Technology, Chicago, 17(10):116-8, Oct. 1963.
9. THE COCOA, CHOCOLATE AND CONFECTIONERY ALLIANCE. Cocoa beans; chocolate manufacturers' quality requirements. 3.ed. London, 1984. 19p.
10. CONSELHO NACIONAL DE COMÉRCIO EXTERIOR. Resolução nº 42. Rio de Janeiro, 1968. 9p.

11. CROOKES, P.R. & GRIERSON, D. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. Plant Physiology, Washington, 72(4):1088-93, Aug. 1983.
12. CROSS, E.; VILLENEUVE, F. & VINCENT, J.C. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. I. Evolution des tanins et des phénols totaux de la fève. Café Cacao Thé, Paris, 26(2):109-14, avr./juin 1982.
13. CUNHA, J. & GHOSH, B.N. Estudo do clima na secagem natural do cacau em barcaças. Cacau Atualidades, Ilhéus, 12(1):14-7, jan./mar. 1975.
14. _____; PASSOS, F.J.V. & FREIRE, E.S. Densidade do cacau durante a fermentação e secagem. In: CEPLAC. Informe de pesquisas de 1983. Ilhéus, 1985. p.165-7.
15. DIAS, J.C. & CASTRO GOMEZ, R.J.H. Atividade de enzimas celulósicas de Trichoderma reesei QM 9414 em casca de semente de cacau: estudo cinético. Ciência e Prática, Lavras, 1987. (no prelo).
16. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, Washington, 28(3):350-5, Mar. 1956.

17. FORSYTH, W.G.C. Cacao polyphenolic substances. 2. Changes during fermentation. Biochemical Journal, London, 51(4): 516-20, 1952.
18. _____. Cacao polyphenolic substances. 3. Separation and estimation on paper chromatograms. Biochemical Journal, London, 60(1):108-11, 1955.
19. _____ & QUESNEL, V.C. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 8:505-9, Sept. 1957.
20. _____ & _____. The mechanism of cacao curing. Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry, New York, 25:457-92, 1963.
21. _____; _____ & ROBERTS, J.B. The interaction of polyphenols and proteins during cacao curing. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 9:181-4, Mar. 1958.
22. GARCIA, J. de J. da S., coord. Beneficiamento, armazenamento e padronização do cacau. In: _____. Sistema de produção do cacaueiro na Amazônia Brasileira. Belém, CEPLAC/DEPEA, 1985. Cap.9, p.86-104.

23. GREENWOOD-BARTON, L.H. Utilization of cocoa by-products. Food Manufacture, London, 40(5):52-6, 109, May 1965.
24. GRIFFITHS, L.A. The formation of acetic acid in cacao fermentation and its relationship to antocyanin breakdown. In: THE UNIVERSITY COLLEGE OF THE WEST INDIES. Imperial College of Tropical Agriculture. A report on cacao research, 1959-1960. Trinidad, 1961. p.42-6.
25. _____. The significance of current research on cacao fermentation. In: INTER-AMERICAN CACAO CONFERENCE, 8, Trinidad and Tobago, 1960. Proceedings... Trinidad, Government Press, 1960. p.56-64.
26. HARDY, F. Cacao manual. Turrialba, IICA, 1960. 395p.
27. HELFENBERGER, A. La fermentacion de pequenas muestras en investigaciones sobre el processado del cacao. Turrialba, Turrialba, 12(1):42-4, ene./mar. 1962.
28. HOLDEN, M. Processing of raw cocoa. III. Enzimic aspects of cocoa fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 10:691-700, Dec. 1959.

29. ITURBE, J.R.; SERODIO, R. dos S. & PRADO, E.P. do. Estudo comparativo entre métodos laboratoriais para a determinação do teor de umidade do cacau. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 11, Brasília, 1981. Anais... Brasília, Editerra, 1983. v.1, p.369-73.
30. KAREL, M. Protective packaging of foods. In: FENNEMA, O.R. Physical principles of food preservation. New York, Marcel Dekker, 1975. v.4, pt.2, cap.12, p.399-466.
31. _____; PROCTOR, B.E. & WISEMAN, G. Factors affecting water-vapor transfer through food packaging films. Food Technology, Chicago, 13(1):69-74, Jan. 1959.
32. KENTEN, R.H. & POWELL, B.D. Production of heat during fermentation of cocoa beans. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 11:396-400, July 1960.
33. KIM, H. & KEENEY, P.G. (-) - Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. Journal of Food Science, Chicago, 49(4):1090-2, July/Aug. 1984.
34. LIMA, A.W.O. Predição de vida de prateleira de banana (Musa cavendish, Lambert) liofilizada com base na análise da cinética de transferência do vapor d'água em filmes flexíveis. Lavras, ESAL, 1981. 140p. (Tese MS).

35. LOPEZ, A.S. Fermentation and organoleptic quality of cacao as affected by partial removal of pulp juices from the beans prior to curing. Theobroma, Ilhéus, 9(1):25-37, jan./mar. 1979.
36. _____. Limitação da "prova de corte" no controle de qualidade do cacau comercial. Theobroma, Ilhéus, 14(3):199-207, jul./set. 1984.
37. _____; LEHRMAN, D.W. & LEHRMAN, L.V. Optimum temperature and pH of invertase of the seeds of Theobroma cacao L. Theobroma, Ilhéus, 8(3):105-12, jul./set. 1978.
38. _____ & McDONALD, C.R. Preliminary test of a simple and inexpensive system for the mechanical aeration of box-type cacao fermentation. Theobroma, Ilhéus, 12(2):57-83, abr./jun. 1982.
39. _____ & PASSOS, F.M.L. Factors influencing cacao bean acidity-fermentation, drying and the microflora. In: CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LA RECHERCHE CACAOYERE, 9, Lomé, 1984. Actes... Lagos, Cocoa Producers' Alliance, 1985. p.701-4.

40. LOPEZ, S.A.F. Efeito da fermentação na difusão de substâncias químicas através da testa das amêndoas de cacau. In: CEPLAC/CEPEC. Informe técnico 1981. Itabuna, 1982. p. 215, 217.
41. _____. Factors associated with cacao bean acidity and the possibility of its reduction by improved fermentation. Theobroma, Ilhéus, 13(3):233-48, jul./set. 1983.
42. _____. Influência da profundidade da massa de cacau em fermentação na produção de ácidos. In: CEPLAC/CEPEC. Informe técnico 1981. Itabuna, 1982. p.211-2, 215.
43. _____; FAJARD, L. & HUFENÜSSLER, M. Difusão de substância química da testa de amêndoas de cacau. In: CEPLAC/CEPEC. Informe técnico 1980. Itabuna, 1982. p.168-74.
44. MACEDO, L.F.V. & SERRA, W.S. Manual do beneficiador de cacau. s.1, CEPLAC, 1985. 20p.
45. MADI, L.F.C.; GAZETA, E. de F.; SOLER, R.M.; CABRAL, A.C.D. & ALVIM, D.D. Características dos atuais materiais flexíveis nacionais para embalagem de alimentos. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 57:35-67, maio / jun. 1978.

46. MANDELS, M. & STEMBERG, D. Recent advances in cellulase technology. Journal of Fermentation Technology, Osaka, 54(4): 267-86, 1976.
47. MARAVALHAS, N. Considerações sobre o beneficiamento do cacau na Bahia. Cacau Atualidades, Itabuna, 8(4):12-5, out./dez. 1971.
48. _____. Secagem mecânica do cacau fermentado. Novos tipos de secadores. Cacao, Turrialba, 13(1):13-8, ene./mar. 1968.
49. MARBACH, I. & MAYER, A.M. Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. Plant Physiology, Washington, 54(6):817-20, Dec. 1974.
50. MARTELLI, H.L. Fermentação de cacau. VIII - Bioquímica da fermentação interna e transformação dos polifenóis. Ciência e Cultura, São Paulo, 13(4):231-8, dez. 1981.
51. MORAES, M.A.C. Métodos para avaliação sensorial de alimentos. 5. ed. Campinas, UNICAMP, 1985. 85p.
52. MORETON, R.S. Inactivation of cocoa seeds after treatment by heat, acetic acid and ethanol. Journal of Food Technology, London, 20(1):79-82, Feb. 1985.

53. NELSON, N.A. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 153:375-80, 1944.
54. PASSOS, F.J.V. & LOPEZ, S.A.F. Investigação dos processos de secagem sobre a acidez das amêndoas de cacau. In: CEPLAC/CEPEC. Informe técnico 1982. Itabuna, s.d. p.123.
55. PASSOS, F.M.L.; LOPEZ, A.S. & SILVA, D.O. Aeration and its influence on the microbial sequence in cacao fermentations in Bahia, with emphasis on lactic acid bacteria. Journal of Food Science, Chicago, 49(6):1470-4, Nov./Dec. 1984.
56. PAULL, R.E. & CHEN, N.J. Postharvest variation in cell wall-degrading enzymes of papaya (Carica papaya L.) during fruit ripening. Plant Physiology, Washington, 72(2):382-85, June 1983.
57. POPINIGIS, F. Fisiologia da germinação. In: _____. Fisiologia da semente. 2.ed. Brasília, s.ed., 1985. cap.3, p. 39-74.
58. QUESNEL, V.C. Aeration and the technology of cacao fermentation. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE PESQUISAS EM CACAU, 2, Salvador/Itabuna, 1967. Memórias... São Paulo, s.ed., 1969. p.503-9.

59. QUESNEL, V.C. Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 16:441-7, Aug. 1965.
60. _____. Oxigen consumption and heat production during the fermentation of cacao. Turrialba, Turrialba, 18:(2): 110-4, abr./jun. 1968.
61. _____ & LOPEZ, A. A sweat-box for fermenting small samples of cacao. Tropical Agriculture, Trinidad, 52(4):309-16, Oct. 1975.
62. REESE, E.T.; SIU, R.G.H. & LEVINSON, H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hidrolisis. Journal of Bacteriology, Washington, 59:485-97, 1950.
63. REINECCIUS, G.A.; ANDERSON, D.A.; KAVANAGH, T.E. & KEENEY, P. G. Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 20(2):199-202, 1972.
64. ROELOFSEN, P.A. Fermentation, drying, and storage of cocoa beans. Advances in Food Research, New York, 8:225-96, 1958.
65. ROESSLER, E.B.; WARREN, J. & GUYMON, J.F. Significance in triangular taste tests. Food Research, Chicago, 13(6): 503-5, Nov./Dec. 1948.

66. ROHAN, T.A. The precursors of chocolate aroma: a comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. Journal of Food Science, Chicago, 29(4):456-9, July/Aug. 1964.
67. _____. Processing of raw cocoa for the market. Rome, 1963. 207p. (FAO Agricultural Studies, 60).
68. _____. Processing of raw cocoa. I. - Small-scale Fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 9:104-11, Feb. 1958.
69. _____. Processing of raw cocoa. II. - Uniformity in heap fermentation and development of methods for rapid fermentation of West African amelonado cocoa. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 9:542-51, Sept. 1958.
70. _____ & STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: changes in the sugars during the roasting of cocoa beans. Journal of Food Science, 31(2):206-9, Mar./Apr. 1966.
71. _____ & _____. The precursors of chocolate aroma: production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. Journal of Food Science, Chicago, 32(4):395-8, July/Aug. 1967.

72. ROHAN, T.A. & STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. Journal of Food Science, Chicago, 32(4):399-402, July/Aug. 1967.
73. SHEPHERD, R. Large scale processing of cocoa beans temperature and acidity trends. The Planter, Kuala Lumpur, 52(605): 311-22, Aug. 1976.
74. SOBRAL, L.M. Emprego do sistema de centrais de beneficiamento primário do cacau. Ilhéus, CEPLAC-Departamento de Extensão, 1979. 15p.
75. URIETA, A.B.; TOMA, M. & PARK, Y.K. Estudo comparativo da produção de celulase fúngica por fermentação submersa e por cultura semi-sólida. Revista Brasileira de Tecnologia, São Paulo, 6(2):181-8, jun. 1975.
76. URQUHART, D.H. The cocoa plantation (4). Preparation of the crop for market. In: _____. Cocoa. London, Longmans, 1955. cap.8, p.85-96.
77. VAN SOEST, P.J. Symposium on nutrition and forage and pastures: new chemical procedures for evaluating forages. Journal of Animal Science, Illinois, 23(3):838-45, Aug. 1964.

78. VILLENEUVE, F. Les composes phenoliques de la feve de cacao: Theobroma cacao L. Evolution au cours de la fermentation. Languedoc, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 1982. 109p. (Tese Doutorado).
79. WEISSBERGER, W.; KAVANAGH, T.E. & KEENEY, P.G. Identification and quantification of several nonvolatile organic acids of cocoa beans. Journal of Food Science, Chicago, 36(6): 877-9, Sept./Oct. 1971.
80. ZAK, D.L. & KEENEY, P.G. Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 24(3):483-6, Mar. 1976.

10. APENDICE

FICHA 1A - Ficha utilizada na avaliação sensorial das amostras de chocolate em barras, preparadas com sementes de cacau tratadas e não tratadas com celulases antes da secagem

TESTE TRIANGULAR

NOME _____ DATA: ___/___/___

Em cada prova, duas amostras são iguais e uma é diferente. Faça um círculo em volta da amostra diferente.

PROVA

Nº DA AMOSTRA

1a.

2a.

3a.

COMENTÁRIOS: _____

TABELA 1A - Temperaturas registradas na massa de sementes de cacau durante a fermentação.

Tempo de Ferment. (dias)	Hora da Leitura	Temperaturas (°C)			Médias	C. V. (%)
		Parte de Cima	Meio	Fundo		
0	8:00	25,7	25,2	23,5	24,8	3,39
	16:00	25,0	25,4	24,1		
1	8:00	25,9	23,9	23,0	25,0	8,68
	16:00	29,0	24,6	23,8		
2	8:00	33,1	24,6	23,8	30,5	18,26
	16:00	30,2	33,3	38,3		
3	8:00	43,3	42,9	39,8	44,1	6,13
	16:00	47,4	45,8	45,6		
4	8:00	49,0	48,6	48,7	48,6	2,64
	16:00	49,5	49,6	46,1		
5	8:00	49,2	47,8	47,0	50,1	4,89
	16:00	53,1	52,0	51,4		
6	8:00	51,6	50,7	50,6	51,0	1,08
	16:00	-	-	-		

TABELA 2A - Acidez e valores do pH da polpa e dos cotiledones das sementes de cacau durante a fermentação

Tempo de Ferment. (dias)	Acidez das Amostras ^{1/}								Valor do pH	
	<u>Ac.Vol.Livres</u>		<u>Ac.Vol. Fixos</u>		<u>Ac.Vol.Totais</u>		<u>Ac.Liv.Totais</u>		polpa	cotil.
	polpa	cotil.	polpa	cotil.	polpa	cotil.	polpa	cotil.		
0	0,013	0,023	0,008	0,011	0,021	0,034	0,514	0,178	3,6	6,3
1	0,021	0,030	0,007	0,030	0,028	0,060	0,590	0,137	3,5	6,4
2	0,056	0,037	0,018	0,032	0,074	0,069	0,547	0,131	3,5	6,5
3	0,196	0,055	0,087	0,228	0,283	0,283	0,410	0,256	4,1	6,1
4	0,350	0,510	0,197	0,630	0,547	1,140	0,710	1,298	4,3	4,9
5	0,333	0,520	0,320	0,634	0,653	1,154	0,692	1,397	4,6	4,8
6	0,591	1,020	0,373	0,721	0,964	1,741	1,142	2,216	4,5	4,6

^{1/} polpa: em % com relação à matéria úmida (polpa + semente)

cotiledones: em % com relação à matéria seca (semente).

TABELA 3A - Resumo da análise de variância das regressões polinomiais entre as variáveis :
tempo de fermentação versus temperatura da massa e acidez e valores do pH da
polpa e cotiledones das sementes de cacau

Variáveis	Causa da Variação			
	Regressão		Erro	
	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.
Tempo ferm. x temperatura massa	4	211,084838*	2	4,288896
" x Ac.vol.livres polpa	3	0,087993*	3	0,004490
" x Ac.vol.fixos polpa	4	0,035677**	2	0,000004
" x Ac.livres tot.polpa	2	0,139568*	4	0,014605
" x pH polpa	3	0,444286**	3	0,011905
" x Ac.vol.livres cotil.	3	0,279813*	3	0,016331
" x Ac.vol.fixos cotil.	3	0,200182*	3	0,008546
" x Ac.livres tot.cotil.	3	1,327935*	3	0,065197
" x pH cotiledones	3	1,358492*	3	0,073889

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 4A - Acidez e valor do pH dos cotiledones das sementes de cacau tratadas e não tratadas com celulases antes da secagem.

Tempo de Secagem (horas)	Acidez das Amostras ^{1/}							
	Ac.vol.Livres		Ac.vol. Fixos		Ac.Liv.Totais		Valor do pH	
	c.cel	s.cel	c.cel	s.cel	c.cel	s.cel	s.cel	c.cel
0	1,020	1,020	0,721	0,721	2,216	2,216	4,6	4,6
8	0,947	1,053	0,706	0,762	2,097	2,257	4,6	4,4
20	0,968	1,059	0,677	0,727	1,914	2,098	4,6	4,5
32	0,860	0,879	0,648	0,677	1,917	1,855	4,5	4,5
44	0,775	0,868	0,664	0,664	1,730	1,893	4,5	4,5
68	0,760	0,852	0,628	0,682	1,687	1,867	4,5	4,5
116	0,774	0,790	0,629	0,649	1,722	1,818	4,5	4,5

^{1/} % na matéria seca (semente).

TABELA 5A - Teores de celulose, hemicelulose e lignina da casca das sementes de cacau tratadas e não tratadas com celulases antes da secagem.

Tempo de Secagem (horas)	Biopolímeros das Amostras ^{1/}					
	Celulose		Hemicelulose		Lignina	
	Com Cel.	Sem Cel.	Com Cel.	Sem Cel.	Com Cel.	Sem Cel.
0	18,38	18,38	9,12	9,12	12,30	12,30
8	16,38	19,71	7,82	8,03	17,00	10,27
20	16,38	16,75	7,72	6,99	14,30	12,95
32	15,27	17,12	7,45	6,89	16,50	13,35
44	13,79	16,75	7,55	7,93	16,55	12,60
68	15,27	16,75	7,20	8,03	15,40	12,10
116	13,79	15,64	6,99	8,14	14,40	12,17

^{1/} % na matéria seca.

TABELA 6A - Resultados da avaliação sensorial - Teste Triangular, das amostras de chocolate em barras preparadas com sementes de cacau tratadas e não tratadas com células antes da secagem.

Provedor	Nº de Julgamentos Corretos por Grupo de Amostras						Totais por Provedor
	ABA	AAB	ABB	BBA	BAB	BAA	
1	0	0	0	1	1	0	2
2	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	0	0	1	0	3
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	1	0	0	1	3
7	0	0	1	1	1	0	3
8	0	0	0	0	0	0	0
9	1	1	1	0	1	0	4
Totais por Grupo Amostras	2	3	3	2	4	1	15