



Beneficio del cacao Criollo venezolano: variaciones en composición proximal, metilxantinas y polifenoles

Beneficiation of Venezuelan Criollo Cocoa: Variations in Proximal Composition, Methylxanthines and Polyphenols

Clímaco O. Álvarez, Elevina E. Pérez y Mary del Carmen Lares¹

Resumen

El efecto del proceso de fermentación, secado y tostado fue estudiado mediante los cambios de la composición química proximal, contenidos de metilxantinas y de polifenoles en granos de cacao Criollo venezolano. Las muestras de granos sin fermentar, fermentados y secados al sol, provenían de una plantación de cacao localizada en El Pedregal, del estado Mérida, Venezuela. El proceso de tostado se realizó convencionalmente a 120°, 25 min. Se utilizaron las metodologías sugeridas por la A.O.A.C.I. y COVENIN. Los valores de humedad, proteínas, cenizas y azúcares variaron significativamente ($p \leq 0,05$) entre los granos sin fermentar, los fermentados y secados al sol y los tostados. No se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el grano fermentado y secado al sol (54,71%) y el sometido a tostado (54,68%). Los contenidos de teobromina y cafeína variaron en todos los procesos aplicados. El valor de la relación teobromina/cafeína fue ≤ 2 , evidenciándose que la muestra es del tipo Criollo. Los altos contenidos de (-)-epicatequina, procianidina C1 y polifenoles fueron para los granos sin fermentar y secos, observándose un efecto significativo del tostado en la procianidina B5, (-)-epicatequina y polifenoles. Se concluye que el beneficio post-cosecha y el tostado afectan los componentes químicos en el grano de cacao.

Palabras clave: cacao Criollo, grasa, polifenoles totales, teobromina, cafeína.

Abstract

The effect of the fermentation, drying and roasting process was studied through changes in the proximal chemical composition, methylxanthine and polyphenol contents in Venezuelan *Criollo* cocoa beans. The samples of unfermented, fermented and sun-dried beans came from a cocoa plantation located in “El Pedregal”, Mérida State, Venezuela. The roasting process was carried out conventionally at 120°, 25 min. The methodologies suggested by A.O.A.C.I. and COVENIN were used. Moisture, protein, ash and sugar values varied significantly ($p \leq 0.05$) between unfermented, fermented and sun-dried and roasted beans. No significant differences ($p \leq 0.05$) were observed between fermented and sun-dried grain

¹ Clímaco O. Álvarez: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Maracay, Venezuela, ORCID 0000-0002-0563-9984, climacoa@hotmail.com; Elevina E. Pérez: Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, ORCID 0000-0001-9788-4946, perezee@hotmail.com; Mary del Carmen Lares: Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, ORCID 0000-0002-2945-6541, marylares@hotmail.com

(54.71%) and that subjected to roasting (54.68%). The theobromine and caffeine contents, varied in all the processes applied. The value of the theobromine/caffeine ratio was ≤ 2 , evidencing that the sample is of the Criollo type. The high contents of (-)-epicatechin, procyanidin C1 and polyphenols were for unfermented and dry beans, with a significant effect of roasting on procyanidin B5, (-)-epicatechin and polyphenols. It was concluded that post-harvest processing and roasting affect the chemical components in the cocoa bean.

Keywords: Criollo cocoa, fat, total polyphenols, fermentation, theobromine, caffeine.

RECIBIDO: 18/11/2021 · ACEPTADO: 24/04/2022 · PUBLICADO: 01/09/2022

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) como materia prima para la elaboración de los diferentes productos de chocolatería y confitería, debe cumplir con ciertos parámetros de calidad física, química y sensorial (sabor y aroma), determinantes en la aceptación final de los productos (Álvarez *et al.*, 2019; Perea *et al.*, 2013). La mayoría de las características relacionadas con la calidad del grano dependen del proceso post-cosecha, ya que los cambios o las diferencias observadas en la composición química entre las variedades de cacao son una combinación de los efectos entre el genotipo y del beneficio post-cosecha (Cros *et al.*, 1999). Durante la fermentación ocurren variaciones en la composición de los compuestos no-volátiles (azúcares, aminoácidos, purinas y polifenoles) y contribuye a la formación de los precursores responsables del sabor y aroma que influyen en las características sensoriales del producto final (Álvarez *et al.*, 2012a).

Álvarez *et al.* (2018) y Pérez *et al.* (2017) consideran que la fermentación y el secado son dos procesos importantes del beneficio, que determinan la calidad comercial y aromática del grano de cacao, categorizándolo internacionalmente como cacao fino de aroma y cacao corriente. Posteriormente, en la transformación, la operación de tostado promueve un conjunto de reacciones químicas que potencian los atributos de sabor y aroma desarrollados durante la fermentación y el secado. Los autores sostienen que el cacao tipo Criollo venezolano se caracteriza por desarrollar esos sabores únicos y específicos debido al proceso de beneficio que se encuentra asociado a cada región productora.

Las características físicas de calidad en el grano de cacao permiten tipificarlo para un determinado mercado, en función de la uniformidad en el tamaño de la almendra, porcentaje de cascarilla, índice de fermentación y cantidad de defectos visuales en el grano (Álvarez *et al.*, 2019). Con relación a la composición química del grano, la grasa o manteca es el mayor constituyente no volátil y el parámetro más empleado para definir la calidad del chocolate y precio. Es la responsable de la dureza, la rápida y completa fusión en la boca, el brillo, textura y la vida útil del producto. Existen otros componentes mayoritarios en el cacao, que varían sus concentraciones durante el beneficio. Entre ellos, la degradación de las proteínas de los cotiledones en péptidos, que produce a los precursores específicos del aroma y sabor del cacao (Álvarez *et al.*, 2016). Durante los procesos de secado y tostado, estos precursores (péptidos y aminoácidos libres), junto a la reducción

de azúcares, también presentes en los granos fermentados de cacao, son sometidos a la reacción de *Maillard*, responsable del típico aroma a cacao.

Otros compuestos químicos no-volátiles (bioactivos) del grano de cacao son los llamados polifenoles con actividad antioxidante, los cuales son una subclase de un grupo de polifenoles conocidos como flavonoides. Los más abundantes en el cacao son los flavanoles monoméricos [(-)-epicatequinas, (-) catequinas] y los oligómeros de procianidinas (Pérez y Lares, 2017). Las concentraciones de estos compuestos son afectadas por los procesos de fermentación (70-80%), tostado y alcalinización, siendo sus contenidos variables entre los tipos existentes de cacao. La teobromina y cafeína, llamadas dimetilmetilxantinas —también presentes en el grano— son compuestos funcionales que, por difusión, varían sus contenidos durante el beneficio post-cosecha. Al igual que los polifenoles, juegan un importante rol en la calidad sensorial del licor de cacao, pues están relacionados directamente con el sabor amargo y la astringencia, como en la coloración del chocolate, pero de manera indirecta como precursores de moléculas que participan en el olor (Vásquez-Obando *et al.*, 2016; Perea *et al.*, 2013).

Estudios han revelado que el contenido de cafeína y las proporciones de teobromina y cafeína, son usados como parámetros para la clasificación o tipificación de los cacaos de acuerdo a la localidad geográfica en donde son cultivados (Lares y Pérez, 2015; Álvarez *et al.*, 2012a). La fibra y algunos minerales esenciales como potasio, magnesio y fósforo, tienen importancia en la calidad nutricional y varían según el genotipo, condiciones del suelo y la región de origen del cacao (Perea *et al.*, 2013).

La finalidad del siguiente trabajo fue determinar los cambios de la composición química proximal, contenidos de metilxantinas, procianidinas y de polifenoles totales en granos de cacao, debido al efecto del tratamiento post-cosecha y de tostado. Esta caracterización permitirá definir la tipificación del cacao tipo Criollo de Venezuela, en función de parámetros químicos.

Materiales y métodos

Material vegetal

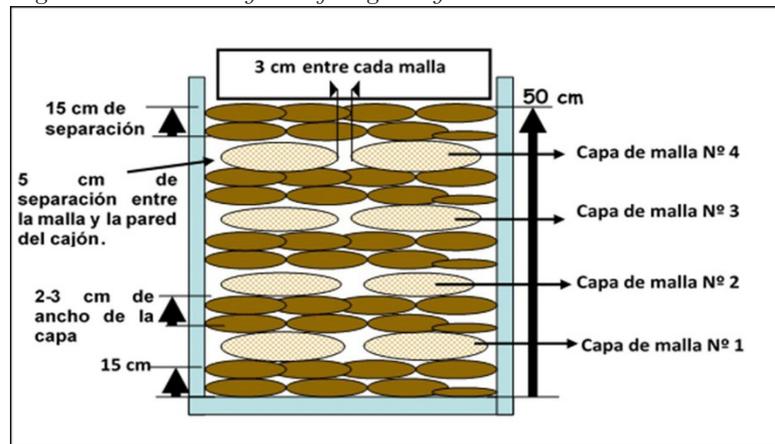
Las muestras de granos secos fueron proporcionadas por el Laboratorio de Cultivos Perennes del CIRAD, Montpellier, Francia. De una población representativa de cacao tipo Criollo venezolano, fueron seleccionados aleatoriamente catorce (14) árboles. La plantación natural de cacao se localiza en “El Pedregal” al Sur del Lago de Maracaibo, sector Río Frío, estado Mérida en Venezuela. Las condiciones agroecológicas de la región son muy favorables para el cultivo, con una altitud comprendida entre 120 a 200 m, pH del suelo de 4 a 5, con una precipitación anual de 1500-2000 mm y una temperatura media anual de 28°C (Portillo, 2006).

Descripción del tratamiento post-cosecha aplicado: Cosecha, fermentación y secado natural al sol (F/S)

Las mazorcas de cacao de cada árbol fueron recolectadas en campo con la selección de frutos maduros y sanos, sin daños mecánicos. El picado o la fractura fue realizada utilizando un mazo de madera. El desgranado consistió en la separación de las semillas frescas de la placenta y cáscara manualmente. Se obtuvieron dos lotes (L1 y L2) de una masa fresca equivalentes entre 12,0-12,5 kg de semillas frescas de cacao por árbol seleccionado. El lote 1 fue usado para el protocolo de la micro-fermentación de semillas frescas sugerido por Álvarez *et al.* (2016). A continuación, se muestra la figura del protocolo (Figura 1) usado para la micro-fermentación, con introducción de mallas flexibles, con 2,0-2,1 kg de semillas en baba de cada árbol estudiado. Las mallas fueron introducidas en el interior de una masa fermentante en cajones cuadrados de madera con capacidad de 60x60x60 cm. Los fermentadores fueron cubiertos con hojas de plátano y sacos de yute para asegurar las condiciones del proceso.

Figura 1. Protocolo empleado para el relleno con cacao fresco dentro de los cajones de madera

Figure 1. Protocol used for the filling with fresh cocoa inside the wooden boxes



Fuente: elaboración personal. Source: own elaboration.

La fermentación duró tres días con una remoción a las 24 horas después de iniciado el proceso. La prueba de corte para el lote 1, fue realizada sobre las muestras de cacao F/S hasta obtener un índice o porcentaje superior al 80% de fermentación correspondiente a un cacao comercial Fino de Aroma (F1) según los requisitos señalados por COVENIN (1995b). Todas las muestras se codificaron con un número de referencia para ser evaluadas en sus respectivos análisis.

Descripción del protocolo aplicado para las muestras de granos sin fermentar y secados naturalmente al sol (SF/S)

A las semillas frescas codificado como el lote 2, se le removió la pulpa con aserrín y fueron secados directamente al sol (sin fermentar).

Ambos lotes fueron secados naturalmente al sol en patios de gavetas de madera durante 4-5 días, según los protocolos del sector, con 3 remociones diarias. El producto final

de cada lote fue de un cacao fermentado y secado al sol (F/S) y de otro sin fermentar y secado (SF/S) respectivamente. Se obtuvieron entre 5,3-5,5 Kg de cacao seco por cada lote seleccionado. La muestra de cacao fermentada y seca obtenida fueron usados para los análisis posteriores.

Proceso de tostado convencional

El tostado del cacao por muestra de cacao F/S y SF/S, se efectuó a 120° C durante 25 minutos en una estufa ventilada con temperatura controlada según el protocolo de Álvarez *et al.* (2016, 2012b). Después del tostado, los granos fueron enfriados en una cava tipo congelador (Freezer) de 200 L por 5 minutos, para luego ser descascarados manualmente y triturados suavemente con la ayuda de un mortero y mazo hasta obtener nibs entre 4 a 6 mm. Los nibs obtenidos se utilizaron para los análisis de composición proximal, metilxantinas y procianidinas.

Preparación de las muestras de cacao (SF/S y F/S)

Las muestras de cacao SF/S y F/S fueron descascaradas manualmente y molidas con nitrógeno líquido en un pequeño molino de cuchillas A 11 basic (Janke Kunkel). Las muestras molidas obtenidas se tamizaron hasta una granulometría menor de 0,5mm y se trasvasaron a un envase plástico con cierre hermético para almacenarse a -18° C. Los análisis de la composición química proximal y compuestos funcionales se efectuaron en todas las muestras.

Métodos

Análisis de composición química proximal

Se procedió a realizar el análisis químico proximal en las muestras de granos F/S, SF/S y FS/T, con el fin de determinar los cambios en el transcurso del proceso post-cosecha. La determinación de los contenidos de humedad (N° 970.20), proteína cruda ($N_{2\text{ total}} \times 6,25$, N° 970.22) y cenizas totales (N° 972.15) se realizaron según la metodología señalada por la Association of Official Analytical Chemists International (2000). El contenido de grasa cruda, azúcares totales y reductores según la Norma COVENIN N° 1340 (1995a) y N° 1697 (Convención Venezolana de Normas Industriales, 1981), respectivamente.

Análisis de las sustancias de metilxantinas, procianidinas y polifenoles totales

La cuantificación de metilxantinas (teobromina y caféina) y de monómeros de (-) epicatequina, así como los dímeros de procianidina B2, procianidina B5 y procianidinas C1, fueron determinados de acuerdo a la metodología señalada por Álvarez *et al.* (2012a) y Davrieux *et al.* (2007). La determinación estuvo basada en el método NIRS (Near Infra-red Spectrometric) sigla en inglés que significa Espectrometría de Infrarrojo Cercano en castellano. Los contenidos fueron determinados a partir de curvas de calibración previamente calculadas con datos obtenidos por métodos químicos convencionales (HPLC)

relacionándolos con los datos espectrales de absorción en cada compuesto. El rango del espectro de la absorbancia fue de 770 hasta 2500 nm en un equipo Foss-Perstorp 6500. El contenido de polifenoles (PFT) totales se midió según metodología descrita por Price y Butler (1977). La densidad óptica fue leída a 720 nm y la concentración de los polifenoles totales se determinó mediante una curva de calibración realizada previamente, reportado los valores como porcentaje de ácido tánico/100 gramos de muestra.

Análisis estadístico

Los análisis físico-químicos fueron realizados por triplicado en cada árbol y a los resultados se les aplicó un análisis de varianza (ANAVAR) de una vía y una prueba de comparación de medias Duncan con el programa estadístico Infostat-Profesional, versión 1.1 (2002) con un nivel de confianza del 95%. Los niveles de significación estadística se representaron mediante letras, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Resultados y discusión

Composición química proximal: Contenido de humedad

Los valores del contenido de humedad para los 3 procesos efectuados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). El contenido de humedad de las muestras de granos de cacao fermentados y secados al sol (F/S) destinados para la comercialización no debe exceder del 8% según la norma venezolana, COVENIN N° 50 (1995b). En este caso, los valores se ajustan a lo establecido por la norma con un valor mínimo de 6% (Tabla 1). El secado natural al sol detiene el proceso fermentativo en el grano reduciendo los contenidos de humedad desde 45-50% hasta descender a valores entre 7-8% por efecto de secado (Álvarez *et al.*, 2018; Lares *et al.*, 2013). Durante esta etapa el crecimiento microbiano se detiene hasta lograr la estabilidad durante el transporte y almacenamiento con una humedad óptima.

En el caso del grano SF/S se observó un promedio inferior a 6%, porcentaje para lo cual es importante controlar la técnica de secado para evitar el alto porcentaje de granos frágiles o quebradizos y susceptibles al ataque de insectos-plaga durante el almacenamiento. Tanto para el grano de cacao fermentado, como sin fermentar, ambos secados en forma natural al sol, se exigen límites de humedad que no excedan del 7,5%. La etapa de tostado conduce a una reducción de la humedad desde 6-7% a 2,5% con una eliminación parcial de los ácidos volátiles (ácido acético) y al desarrollo de los compuestos aromáticos de origen térmico. Durante el tostado se transforman los precursores del *flavor* que se originan durante la fermentación y secado en compuestos que le confieren el aroma, sabor y color al producto final (Álvarez *et al.*, 2016).

Tabla 1. Variabilidad (en promedio) de la composición química proximal (% base seca) del grano de cacao tipo Criollo venezolano en diferentes etapas del tratamiento post-cosecha
Table 1. Variability (on average) of the proximal chemical composition (% dry basis) of Venezuelan Criollo cocoa beans at different stages of post-harvest treatment

Composición química proximal (%)	Cacao sin fermentar y secado natural al sol (SF/S)	Cacao fermentado y secado naturalmente al sol (F/S)	Cacao fermentado, seco y tostado (F/S/T)
% Humedad	5,29 ± 0,04 ^b	6,00 ± 0,01 ^a	2,52 ± 0,28 ^c
% Proteína cruda (Nx6,25)	16,12 ± 0,73 ^a	15,29 ± 1,03 ^b	14,12 ± 1,39 ^c
% Cenizas	3,92 ± 0,43 ^a	3,35 ± 0,38 ^{ab}	3,72 ± 0,37 ^a
% Grasa cruda	53,64 ± 0,08 ^b	54,71 ± 0,01 ^a	54,68 ± 0,00 ^a
% Azúcares totales	7,47 ± 1,16 ^a	5,83 ± 0,47 ^b	3,85 ± 0,50 ^c
% Azúcares Reductores	2,94 ± 1,20 ^b	5,05 ± 0,41 ^a	2,72 ± 0,20 ^c
% Azúcares no reductores	4,53 ± 0,37 ^a	0,78 ± 0,18 ^c	1,13 ± 0,46 ^b

Fuente: elaboración propia. Source: own elaboration.

Los resultados están expresados como el promedio de tres réplicas (n=3) ± desviación estándar y evaluados estadísticamente con ANAVAR por comparación de rango múltiple con un nivel de significancia de 5%. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$); SF/S: sin fermentar y secado al sol; F/S: fermentado y secado, y F/S/T: fermentado, seco y tostado.

Contenido de proteína cruda

Se observaron cambios significativos ($p \leq 0,05$) en el contenido de proteína cruda por efecto de la fermentación, secado y tostado. Las disminuciones observadas del grano SF/S al F/S son el producto de las reacciones bioquímicas y microbiológicas que ocurren durante la fermentación, afectando la composición interna del grano, siendo una de ellas, la degradación de las proteínas de reserva. La degradación de las proteínas de los cotiledones en péptidos y aminoácidos libres, conduce a la formación de los precursores específicos del aroma y sabor (Álvarez *et al.*, 2016).

Los valores de proteína reportados en el presente estudio son coincidentes con los descritos por Lares *et al.* (2013), donde el rango presente en el grano F/S, provenientes de diferentes cacaos y orígenes, está entre 10 al 15%. De Fariñas *et al.* (2003) reportaron para el cacao tipo Criollo de Cumboto (Aragua, Venezuela) valores entre 13,59% y 13,97%, los cuales no son concordantes a los encontrados en este estudio. Se puede inferir que el lapso de cosecha, el genotipo y el proceso de fermentación, contribuyen significativamente a los cambios en el contenido de proteína.

La disminución observada del grano F/S al tostado se debe a que las proteínas son fuentes de aminoácidos (a. a. hidrofóbicos), quienes posteriormente interactúan en el tostado con los azúcares reductores en la reacción de Maillard, dando lugar a la formación de una serie de compuestos químicos volátiles, precursores del sabor y aroma del chocolate (Álvarez *et al.*, 2016; Portillo, 2006).

Cenizas

La disminución observada en el contenido de cenizas entre el grano SF/S ($3,92 \pm 0,43\%$) y el F/S ($3,35 \pm 0,38\%$) se atribuye a que durante primeros días de la fermentación ocurre una emisión de líquidos debido a la exudación que se produce en la masa en fermentación por la actividad microbiana. Durante el proceso, se tiende a eliminar o perder minerales solubles, conduciendo a un desequilibrio en la concentración de estas sustancias entre la pulpa y los cotiledones. Se puede deducir que, mientras menos fermentación se produzca en las semillas frescas, menor será la pérdida de sustratos aumentando los niveles de cenizas. Mientras que el tostado ocasiona una concentración de los minerales y de otros compuestos no volátiles por pérdida del contenido de agua. Pérez y Lares (2017) atribuyen este fenómeno a factores como el tiempo de cosecha, beneficio y condiciones de tostado.

Grasa cruda (manteca de cacao)

Los contenidos de la grasa en las diferentes condiciones y procesos estuvieron por encima del 50% con un rango de variación de $53,64 \pm 0,08\%$ a $54,71 \pm 0,01\%$, sin diferencias estadísticamente significativas entre el grano F/S y F/S/T. Estos rangos coinciden con los descrito por Álvarez *et al.* (2019) y Lares *et al.* (2013), donde el rango de los lípidos totales presentes en los granos de cacao secos está entre el 50% a 60%. Perea *et al.* (2013) encontraron en materiales superiores de cacao colombiano valores entre el 56,7 a 60,9 %; que no se corresponden a los del cacao tipo Criollo de Venezuela y a los reportados por Jiménez *et al.* (2011) en clones de cacao ecuatoriano (37,64-47,42%). Los factores genéticos, la madurez fisiológica y las condiciones agroclimáticas afectan la calidad y cantidad de la grasa en diferentes tipos de cacao de varios orígenes geográficos (Hernández *et al.* 1991, citados en Arango, 2017).

No existen reportes que aseguren que existe un efecto de la fermentación en el aumento significativo del contenido de grasa o en su perfil de ácidos grasos (Arango, 2017); sin embargo, deben realizarse estudios a nivel de ultraestructura según lo planteado por Lares *et al.* (2013).

Contenido de azúcares reductores y no reductores

La fermentación conduce a un aumento de los contenidos de los precursores simples de la reacción de Maillard (azúcares reductores) y de una disminución de la sacarosa. El contenido de azúcares reductores (glucosa, fructosa, ramosa y xilosa), totales y no reductores (sacarosa) evidenció diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en cada uno de los procesos (Tabla 1). Los mayores contenidos de azúcares no reductores (sacarosa) se registraron en los granos SF/S ($4,53 \pm 0,37\%$) con bajos contenidos en azúcares reductores

($2,94 \pm 1,20\%$). Se observa un incremento significativo de los azúcares reductores después de la fermentación y el secado, de $2,94\%$ (en el grano SF/S) hasta $5,05 \pm 0,41\%$, para continuar su descenso en el grano F/S por el efecto del tostado ($2,72 \pm 0,20\%$) con bajos contenidos de sacarosa ($1,13 \pm 0,46\%$). Estos resultados corresponden a los reportados por Portillo (2006).

La disminución observada del contenido de azúcares no reductores durante el tostado, es atribuida a las reacciones de Maillard que se producen en conjunto con los aminoácidos hidrofóbicos libres (leucina, valina, alanina, fenilalanina y tirosina), por efecto de la temperatura y de las reacciones hidrolíticas en el interior del grano y en la pulpa, que contribuyen a la formación de los compuestos volátiles de origen térmico o del aroma final del chocolate. Portillo (2006), ha señalado que existe una relación inversa entre los contenidos de azúcares reductores y la sacarosa para el cacao SF/S del cacao Criollo, los cuales son más elevados que en los cacaos Forasteros y Trinitarios, dependiendo del método analítico para la cuantificación.

Las metilxantinas: teobromina y cafeína

Las metilxantinas (sustancias alcaloides), específicamente la teobromina y la cafeína, son los principales responsables del sabor amargo de las almendras y de la palatabilidad de los productos elaborados a partir de las almendras. La Tabla 2 muestra que las variaciones de los contenidos de teobromina y cafeína fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en los tres procesos estudiados. Los altos contenidos de las metilxantinas en los granos SF/S disminuyeron por efecto significativo de la fermentación y el secado. Portillo (2006) reportó para el grano de cacao Criollo SF/S valores de teobromina y cafeína en un rango de $5,90-10,20 \text{ mg. g}^{-1}$ y de $4,00-8,10 \text{ mg. g}^{-1}$ respectivamente, siendo concordantes al comportamiento mostrado en estas muestras. Perea *et al.* (2013) mostraron en granos SF/S de materiales regionales del cacao colombiano, valores más altos de teobromina y bajos en cafeína que variaron de $8,10$ a $11,5 \text{ mg. g}^{-1}$ y de $1,20$ a $4,10 \text{ mg. g}^{-1}$.

Zapata *et al.* (2013) evidenciaron que el tipo de material genético y el proceso post-cosecha tienen una marcada influencia sobre las variaciones de estos compuestos. En clones de cacao Trinitario de Colombia, reportaron una reducción de la teobromina en el grano SF/S que varió en un rango de $2,75-4,38 \text{ mg. g}^{-1}$ hasta $1,24-3,32 \text{ mg. g}^{-1}$. Los valores de la cafeína se redujeron en un rango de $0,43-3,54 \text{ mg. g}^{-1}$ a $0,32-1,49 \text{ mg. g}^{-1}$ en promedio respectivamente. Este comportamiento de la variabilidad observada en los niveles de las metilxantinas, se explica a que, durante los primeros días de fermentación existe una fuerte reducción del contenido de teobromina y cafeína debido a la difusión de estos alcaloides con los líquidos celulares y a la permeabilidad celular según el genotipo.

Tabla 2. Composición de metilxantinas (teobromina y cafeína), (-)-epicatequinas, procianidinas y de polifenoles totales (mg. g⁻¹ en base seca) en el grano de cacao tipo Criollo venezolano en diferentes etapas del tratamiento post-cosecha

Table 2. Composition of methylxanthines (theobromine and caffeine), (-)-epicatechins, procyanidins and total polyphenols (mg. g⁻¹ dry basis) in Venezuelan Criollo cocoa beans, at different stages of post-harvest treatment

*Compuestos funcionales	Cacao sin fermentar y secado al sol (SF/S)	Cacao fermentado y secado al sol (F/S)	Cacao fermentado, seco y tostado (F/S/T)
Teobromina (mg.g ⁻¹)	9,10±0,14 a	7,60±0,14 b	6,50±0,15 c
Cafeína (mg.g ⁻¹)	6,10±0,08 a	4,60±0,04 b	3,30±0,01 c
Relación teobromina/cafeína	1,49±0,36 b	1,65±0,43 a	1,97±0,02 b
(-) Epicatequina (mg.g ⁻¹)	10,30±0,37 a	0,50±0,11 b	0,35±0,01 c
Procianidina B2 (mg.g ⁻¹)	4,20±0,12 a	1,00±0,06 b	0,08±0,01 c
Procianidina B5 (mg.g ⁻¹)	1,10±0,04 a	0,08±0,01 b	0,05±0,01 c
Procianidina C1 (mg.g ⁻¹)	7,30±0,25 a	1,40±0,14 b	0,98±0,01 c
**Polifenoles totales (mg.g ⁻¹) (PFT)	14,40±0,45 a	3,60±0,10 b	2,00±0,04 c

Fuente: elaboración propia. Source: own elaboration.

Los resultados están expresados como el promedio de tres réplicas (n=3) ± desviación estándar y evaluados estadísticamente con ANAVAR por comparación de rango múltiple con un nivel de significancia de 5%. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (p ≤ 0,05), con (*) Resultados expresados en base seca (b.s) y PFT: Polifenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico (mg. g⁻¹)

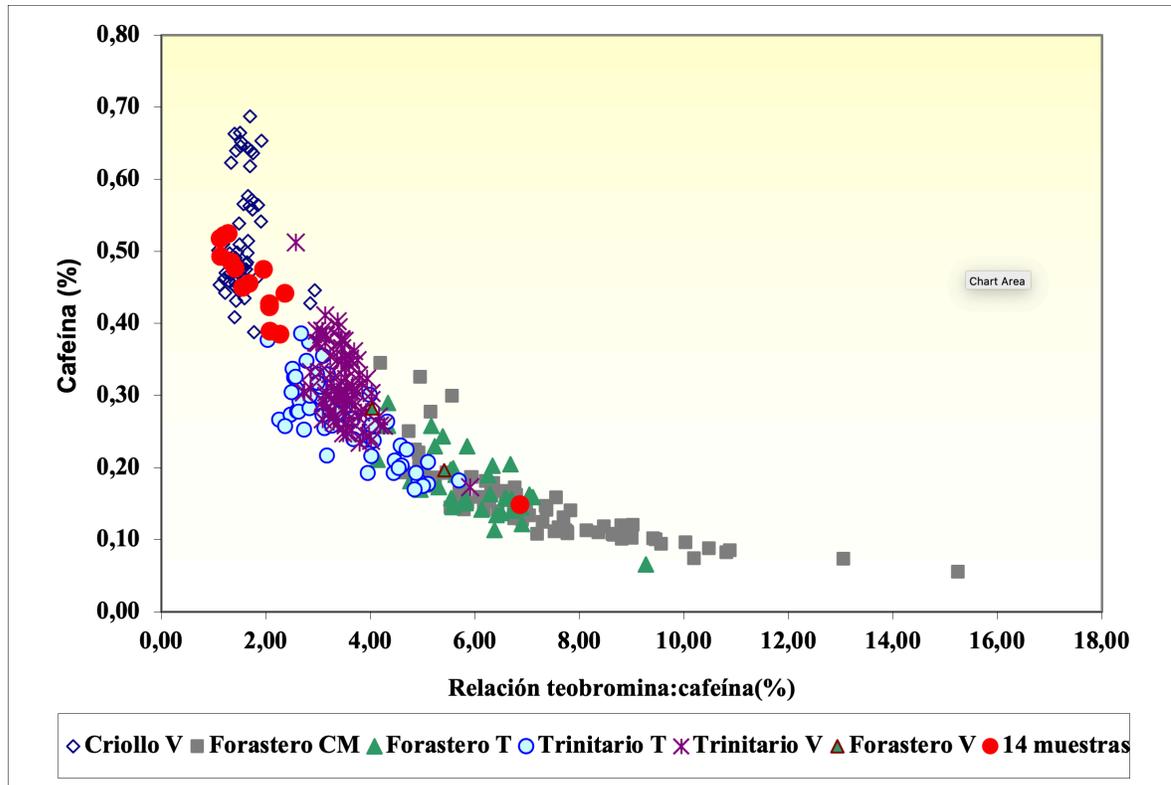
A medida que aumenta el tiempo de fermentación, la disminución de estos compuestos es gradual y lenta. El secado al sol permitiría una difusión a través de la testa contribuyendo a una reducción relativa en el interior de los cotiledones hasta mantenerse invariable al final del proceso. El tostado afecta fuertemente los contenidos de estos compuestos por reacciones químicas influenciadas por la temperatura que disminuirían su disponibilidad libre dentro del grano.

Valor de la relación teobromina y cafeína un parámetro que clasifica el tipo de cacao

El contenido de cafeína y las proporciones relativas de la teobromina y cafeína (Figura 2), son usados para definir un parámetro que clasifica el tipo de cacao (variedad) según el origen geográfico de donde proceden (Lares y Pérez, 2017; Álvarez *et al.*, 2012a; Davrieux *et al.*, 2007).

Para el cacao tipo Criollo, el parámetro de la relación teobromina/cafeína, disminuye al variar los contenidos de la cafeína, razón por la cual la mayoría de los valores de esta relación son inferiores al número 2, tal como se muestra en la Tabla 2 y Figura 2. Se observa en el gráfico 2, que una muestra está por encima del valor 2, indicativo de un material Trinitario cuyo valor de la relación es de 6,85.

Figura 2. Gráfico de la relación teobromina/cafeína para los tipos de cacao de orígenes diferentes y las muestras de cacao Criollo de Venezuela (14 muestras)
Figure 2. Graph of the theobromine/caffeine ratio for cocoa types of different origins and Criollo cocoa samples from Venezuela (14 samples)



En forma general, se deduce que los contenidos de las purinas en las primeras etapas del beneficio post-cosecha tienden a disminuir sus concentraciones, dando a los productos tostados un balance adecuado de amargor deseable y aceptable en los cacaos Criollos y aquellos catalogados como finos de sabor y aroma. Se estima que un mayor contenido de cafeína en el cacao tipo Criollo lo hace menos amargo en comparación a la concentración de teobromina. Álvarez *et al.* (2012a), Portillo (2006) y Davrieux *et al.* (2007) reportaron para el cacao Criollo venezolano valores de la relación teobromina/cafeína ≤ 2 , los cuales son comparables a los presentados en este estudio. En clones de cacao regionales y superiores de Colombia y Ecuador, los valores de esta relación estuvieron por encima del valor 2,00 hasta 7,40 para tipificarlos como una población de cacao de tipo Trinitario u híbrido (Perea *et al.*, 2013; Jiménez *et al.*, 2011). El genotipo según el origen guarda una relación con el valor de este parámetro químico (Álvarez *et al.*, 2012a).

Fracción fenólica: (-)-epicatequinas y procianidinas B2, B5 y C1

Los polifenoles están implicados tanto en la astringencia y el amargor de las almendras de cacao. Las variaciones de los contenidos de procianidinas y de la (-)-epicatequina son comparables a las observadas en los polifenoles totales (PFT). Los altos contenidos

de cada compuesto se presentaron en el grano SF/S, los cuales fueron disminuyendo fuertemente con los procesos de fermentación y secado (F/S), continuando la reducción durante el tostado. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los procesos estudiados (Tabla 2). El monómero de (-)-epicatequina representó ser cuantitativamente las más relevante en el grano de cacao SF/S (10,30 mg. g⁻¹) seguida de la procianidina C1 (7,30 mg. g⁻¹) y la prociniadina B2 (4,20 mg. g⁻¹).

Los contenidos de (-)-epicatequina y de las procianidinas B2 y B5 disminuyeron en el grano F/S/T posiblemente, por el efecto del tostado, ya que son susceptibles a las altas temperaturas y presentan degradaciones que podrían reducir la disponibilidad de estos con posibles pérdidas. Por su parte, el trímero de la procianidina C1 presentó una fuerte disminución en el grano F/S, mostrando un contenido estable en el grano F/S/T. Posiblemente, esta clase de polifenoles hayan presentado algunas reacciones de oxidación, conduciendo a la formación de ciertos taninos condensados insolubles con alto peso molecular inducidos por la temperatura de tostado.

La fuerte disminución del contenido de (-)-epicatequina durante la fermentación se debe, principalmente, a que estos polifenoles son oxidados a quinonas. Las quinonas pueden acomplejarse con aminoácidos, péptidos y proteínas, y polimerizarse con otros flavonoides para formar taninos complejos por condensación. La reducción también podría ser causada por la difusión de los compuestos fenólicos en los exudados liberados durante este proceso (Kim y Keeney 1984 y Forsyth y Quesnel 1957, todos citados en Zapata *et al.*, 2013). Hacia el final de la fermentación, las disminuciones de la (-)-epicatequina y procianidinas descienden en forma regular hasta mantenerse en forma constante o casi invariables (Portillo, 2006).

Zapata *et al.* (2013) encontraron que los niveles de (-)-epicatequinas en clones de tipo Trinitario procedentes de Colombia, variaron entre rangos de 3,14 a 10,20 mg. g⁻¹ en granos SF/S, con fuertes disminuciones en el grano F/S que varió de 0,26 a 3,90 mg. g⁻¹. El efecto de la fermentación sobre el contenido de la (-)-epicatequina es comparable a las variaciones sucedidas en los procesos reflejados para el cacao tipo Criollo venezolano.

Polifenoles totales (PFT)

El proceso de fermentación del cacao da lugar a importantes cambios químicos y estructurales en el grano, conduciendo a una disminución significativa del contenido de PFT. Las temperaturas de tostado producen pérdidas de estos compuestos tanto en los granos SF/S como en F/S, ya que estas temperaturas producen oxidación y degradación de los mismos. Los niveles de PFT fueron afectados con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los tres procesos estudiados. Perea *et al.* (2013) encontraron altos contenidos de PFT en granos SF/S de materiales regionales de Colombia, que variaron entre 47,63 a 74,47 mg. g⁻¹; mientras que el cacao tipo Criollo de Venezuela evidenció un valor muy inferior de 14,40 mg. g⁻¹ (Tabla 2).

Pallares-Pallares *et al.* (2016) reportaron altos contenidos de PFT en el grano SF/S del clon CCN-51 ecuatoriano con 73,48±4,93 mg. g⁻¹ cuyo contenido disminuyó al final del proceso de fermentación y secado a 36,68±2,08 mg. g⁻¹, evidenciándose el efecto del tratamiento post-cosecha. Álvarez *et al.*, por su parte, reportaron variaciones entre el 0,70

a 11,8 mg. g⁻¹ en granos secos y comerciales (híbridos) de cacao con diferentes índices de fermentación en varias zonas de Venezuela. Se ha reportado que los cacaos con bajo nivel de fermentación se caracterizan por tener una fuerte astringencia, de naturaleza desagradable en el perfil del sabor del chocolate.

Al fermentarse, los PFT son oxidados y polimerizados formando taninos condensados, insolubles de alto peso molecular provocando la disminución de la concentración, así como su actividad antioxidante. El proceso de secado contribuye igualmente con dichas reacciones favoreciendo la disminución de los niveles de amargor en los granos (Kongor *et al.*, 2016, citados por Arango, 2017). Cienfuegos-Jovellanos (2016) evidenció una fuerte disminución en el contenido de PFT por efectos de la fermentación y secado al sol, así como por el tostado. Concluyeron que los tiempos prolongados de tostado con altas temperaturas hacen que estos polifenoles sufran oxidación y polimerización con otras moléculas, afectando las características sensoriales del chocolate acorde con Wollgast y Anklam, (2000) citados por Cienfuegos-Jovellanos (2016).

Pancardo (2016) concluyó que la temperatura de tostado tiene un efecto sobre las concentraciones de los PFT y modifica las propiedades antioxidantes en el grano de cacao mexicano sin fermentar y secado al sol y para el grano con un nivel de fermentación del 75%. Propusieron establecer los parámetros adecuados para minimizar las pérdidas de contenido de PFT y degradación de la capacidad antioxidante. Se puede inferir que las metodologías de extracción y cuantificación, el genotipo, y las condiciones en el tratamiento post-cosecha, afectan los contenidos de estos compuestos y corresponden en forma similar a los cacaos de tipo Criollo, siendo los contenidos de estos últimos más bajos que los reportados en los tipos Forasteros y Trinitarios según los resultados obtenidos por Cienfuegos-Jovellanos (2016).

Conclusiones

1. Se observó una variabilidad en los contenidos de humedad, proteínas, azúcares y cenizas al comparar la composición química proximal de los granos SF/S, F/S y F/S/T, provenientes de una sub-población de árboles de cacao tipo Criollo del Sur del Lago de Venezuela. Los mayores contenidos de grasa cruda (manteca de cacao) se presentaron en los granos F/S y F/S/T sin diferencias estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre ellos.
2. Los PFT, metilxantinas, (-) epicatequinas y procianidinas en general, mostraron un mayor contenido en los granos SF/S, los cuales fueron disminuyendo en los procesos de fermentación, secado, y con el tostado aplicado controladamente.
3. El promedio del parámetro de la relación teobromina/cafeína en función de la concentración de cafeína, permitió clasificar a la sub-población de árboles (14) como un cacao de tipo Criollo o mejor denominado como los actuales “Criollos Modernos”. Es importante continuar con los estudios de las metilxantinas para diferenciar los tipos de cacao existentes en el país en función del tratamiento post-cosecha y por región productora.

4. Los contenidos de las procianidinas B2, B5, C1 y de la (-)-epicatequina, disminuyeron cuando las semillas fueron sometidas a fermentación y secado natural al sol, siendo mayor el efecto sobre la composición de la (-)-epicatequina y la procianidina B5 después del tostado.
5. El tostado tiene un efecto significativo en la reducción en el contenido de PFT demostrando que la temperatura es un factor importante en el mantenimiento de los polifenoles de cacao, especialmente de los oligómeros mayores de procianidinas.
6. Estos resultados permitirán la generación de un perfil químico para tipificar el cacao tipo Criollo y Fino de Aroma cultivado en el Sur del Lago de Maracaibo, en función del contenido de compuestos físico-químicos y no volátiles (funcionales y bioactivos), con miras hacia la obtención de la Indicación Geográfica Protegida (IGP) de estos cacaos, que son reconocidos a nivel mundial.

Agradecimientos

Al FONACIT por aportar los recursos necesarios para que se cumplieran los objetivos del proyecto de Cooperación entre Francia y Venezuela. A todo el personal del Laboratorio de Calidad de los Productos y de los Cultivos Perennes de la Mansión de la Tecnología del CIRAD (Centro de Investigación Internacional para el Desarrollo Agrícola), Montpellier, Francia.

Bibliografía

- Álvarez, C.; Liconte, N.; Pereira, Y.; de Farias, A.; Buscema, I. y Lares, M. (2018). “Perfil de calidad comercial de los cacaos venezolanos”. *Revista Novum Scientiarum* 3(7): 21-32.
- Álvarez, C.; Pérez, E.; Láres, M.; Boulanger, R.; Davricux, F.; Assemat, S. y Cros, E. (2016). “Identification of the Volatile Compounds in the Roasting Venezuela Criollo Cocoa Beans by Gas Chromatography-Spectrometry Mass”. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering* 5(4):1-8. DOI <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2016.05.00178>
- Álvarez, C.; Pérez, E.; Cros, E.; Lares, M.; Davricux, F. y Assemat, S. (2012a). “The Use of Near Infrared Spectroscopy to Determine the Fat, Caffeine, Theobromine and (-)-Epicatechin Contents in Unfermented and Sun-Dried Beans of Criollo Cocoa”. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 20(2): 307-315. DOI <https://doi.org/10.1255/jnirs.990>
- Álvarez, C.; Pérez, E.; Boulanger, R.; Lares, M.; Assemat, S.; Davricux, F. y Cros, E. (2012b). “Identificación de los compuestos aromáticos en el cacao criollo de Venezuela usando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases”. *Vitae Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 19(1): S370-S372. DOI <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.003>
- Arango, A.J. (2017). *Evaluación del efecto de técnicas de fermentación en el sabor y aroma de cacao CCN-51 (Theobroma cacao L.) en la zona de Tumaco-Nariño*. Tesis de maestría. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia.

- Association of Official Analytical Chemists International (2000). *Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.I.* Washington, Helrich.
- Cienfuegos-Jovellanos, F.E. (2016). *Estudio del Contenido de Compuestos Bioactivos del Cacao y su Aplicación en la Obtención de un Ingrediente Rico en Polifenoles para el Diseño de un Chocolate Enriquecido*. Tesis de doctorado. Murcia, Universidad de Murcia.
- Cros, E.; Chanliau, S. y Jeanjean, N. (1999). “Post-Harvest: A key step in cocoa quality”. En *Confectionery Science II. Proceedings of an International Symposium*. Pensilvania, Penn State University, del 14 al 16 de noviembre de 1999: 80-96.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1981). *Cacao y derivados: Determinación de azúcares totales, N° 1697*. Caracas, Ministerio de Fomento: 1-10. En <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1697-81.pdf> (consultado 22/07/2022).
- _____. (1995a). *Cacao y derivados: Determinación de grasa cruda, N° 1340*. Caracas, Ministerio de Fomento: 1-2. En <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1340-1995.pdf> (consultado 22/07/2022).
- “”
- _____. (1995b). *Granos de cacao N° 50*. 2da. revisión. Caracas, Fondonorma: 1-4. En <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/50-95.pdf> (consultado 22/07/2022).
- Davrieux, F.; Assemat, S.; Sukha, D.; Portillo, E.; Boulanger, R.; Bastinelli, D. y Cros, E. (2007). “Genotype Characterization of Cocoa into Genetic Groups through Caffeine and Theobromine Content Predicted by NIRS”. *Applications*: 382-386.
- De Fariñas, L.G.; De Bertorelli, L.O. y Parra, P. (2003). “Características químicas de la semilla de diferentes tipos de cacao de la localidad de Cumboto, Aragua”. *Agronomía Tropical* 53(2): 133-144.
- Jiménez, J.; Amores, F.; Niklin, C.; Rodríguez, D.; Zambrano, F.; Bolaños, M.; Reynel, V.; Dueñas, A. y Cedeño, P. (2011). “Micro fermentación y análisis sensorial para la selección de árboles superiores de cacao”. *Boletín Técnico* 140. Quevedo, INIAP, Estación Experimental Pichilingue: 1-64.
- Lares, M. y Pérez, E. (2015). “Types of Chocolate and their Nutritional Value—Chocolate as a Functional Food”. En Pérez, E. *Chocolate: Cocoa Byproducts Technology, Rheology, Styling, and Nutrition*. Nueva York, Nova Science Publishers: 118-142.
- Lares, M.; Pérez, E.; Álvarez, C.; Perozo, J. y El Khorri, S. (2013). “Cambios de las propiedades físico-químicas y perfil de ácidos grasos en cacao de Chuao, durante el beneficio”. *Agronomía Tropical* 63(1-2): 37-48.
- Pallares-Pallares, A.; Estupiñán, M.R.; Perea V., J.A. y López G., L. J. (2016). “Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51”. *Revista Ion* 29(2): 7-21.

- Pancardo, L.A. (2016). *Efecto del procesamiento del cacao (Theobroma cacao L.) en la capacidad antioxidante durante la obtención de licor y cocoa*. Tesis de licenciatura. Veracruz, Universidad Veracruzana.
- Perea, V.A.; Martínez, G.N.; Aranzazu, H.F. y Cadena, C.T. (2013). *Características de calidad del cacao de Colombia. Catálogo de 26 cultivares*. Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander y Federación Nacional de Cacaoteros.
- Pérez, E.; Gutiérrez, T. y Palomino, C. (2017). “Factores que definen la calidad del chocolate”. En Pérez, E.; Cañas, I y Gutiérrez, T. (eds.). *Del cacao al chocolate*. Madrid, Bellisco: 61-135.
- Pérez, E. y Lares, M. (2017). “Tipos de chocolate y su valor nutricional”. En Pérez, E.; Cañas, I y Gutiérrez, T. (eds.). *Del cacao al chocolate*. Madrid, Bellisco: 211-235.
- Portillo, P.E. (2006). *Caracterisation de l'arôme du cacao de type Criollo: Influence des conditions de traitement post-recolte*. Tesis de doctorado. Montpellier, Université de Montpellier II.
- Price, L. y Buttler, L. (1977). “Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain”. *J. of the Agric. and Food Chem.* 25(6): 1268-1272. DOI <https://doi.org/10.1021/jf60214a034>
- Vázquez-Ovando, A.; Ovando-Medina, I.; Adriano-Anaya, L.; Betancur-Ancona, D. y Salvador-Figueroa, M. (2016). “Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma”. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 66(3): 239-254.
- Zapata, B.S., Tamayo; T.A. y Benjamín, A.R. (2013). “Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 18(3): 391-404.