

## Evolución del contenido de procianidinas en granos de cacao criollo (*Theobroma cacao* L.)

Evolution of procianidinas's content in beans of criollo cocoa (*Theobroma cocoa* L.)

Elvis A. Portillo Páez<sup>1\*</sup>, Andreina B. Portillo Lopez<sup>4</sup>, Belkis B. Rodríguez<sup>2</sup>, Drisneila Fuenmayor F.<sup>2</sup>, Rosa I. Villasmil Villasmil<sup>3</sup> y Mary L. Alvarado Pacheco<sup>5</sup>

Universidad del Zulia (LUZ), <sup>1</sup>Departamento de Agronomía, <sup>2</sup>Laboratorio de Tecnología de Alimentos. <sup>3</sup>Laboratorio de Biotecnología. <sup>4</sup>Fundación para el Desarrollo del Cacao (FUNDACACAO). <sup>5</sup>Programa Ciencias del Agro y el Mar, Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora.

### Resumen

Con el objetivo de estudiar la evolución de los flavonoides en cacao Criollo Porcelana, procedente del Sur del Lago de Maracaibo. Se condujeron ensayos bajo un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial de  $2^2 \times 3 \times 5$ , se estudiaron cuatro factores: época de cosecha (2), diferimiento del desgrane de la mazorca (0 y 5 días), remociones de la masa (cada 24 h, 48 h y 24/72 h) y el tiempo de fermentación (0, 1, 2, 3 y 4 días). Las procianidinas extraídas (B2, C1, Epicatequina y B5) fueron cuantificadas por HPLC. Los flavonoides disminuyeron durante la fermentación, las concentraciones fueron superiores en los cacaos diferidos por cinco (5) días, para todas las épocas. Para remoción y diferimiento del desgrane no hubo diferencias significativas.

**Palabras clave:** astringencia, flavonoles y calidad.

### Abstract

In order to study the evolution of flavonoids in Criollo Porcelana cocoa, from the South of Lake Maracaibo. Trials were conducted under a randomized block design with a factorial arrangement of  $2^2 \times 3 \times 5$ , four factors were studied: the harvesting date (2), pod opening delays (0 and 5 days), turning regimes (every

Recibido el 06-02-2017 • Aceptado el 02-04-2020

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: eportillo@fa.luz.edu.ve

24h, 48h and 24/72h) and the time of fermentation (0, 1, 2, 3 and 4 days). The extracted procyanidins (B2, C1, Epicatechin and B5) were quantified by HPLC. The procianidinas diminished during the fermentation, the concentrations were always superiors in the cocoas that were submitted to opening of 5 days for all the harvesting date. There were no significant differences for removal and pod opening delays.

**Keywords:** Astringency, flavonoles and quality.

## Introducción

En los mercados internacionales, el cacao se comercializa según su calidad, de acuerdo a la industrialización del mismo. Para ello, se han definido criterios de calidad con base en características botánicas y de manejo poscosecha. Se distinguen cacaos del tipo “fino o de aroma”, provenientes de tipos criollos, y “tipos ordinarios o corrientes”, procedentes de cacaos forasteros.

Según cifras del MPPAT (2013), en el país existe una superficie de siembra de cacao alrededor de 60.194 ha, con rendimientos anuales de 364 Kg.ha<sup>-1</sup> y una producción anual 18.000 t. Aproximadamente un tercio de la producción total de cacao en grano es procesado y consumido internamente, y el resto es destinado a los mercados internacionales. El consumo nacional de cacao en grano tiene dos destinos: la industria procesadora y la chocolatera.

La fermentación es el proceso fundamental en el beneficio del cacao, debido a que durante este proceso se generan los precursores del sabor y el aroma del chocolate. (Portillo *et al.* 2014). Este proceso implica la ocurrencia de reacciones químicas mediante las cuales se generan

cambios internos en las almendras (Pinzón *et al.* 2008), finalmente, la calidad de las almendras de cacao, en cuanto al sabor, aroma, dependen de la experiencia y el buen cuidado que tenga el técnico encargado de su producción y manejo poscosecha (Brunetto *et al.* 2009). En este sentido, Portillo, *et al.*, (2014), evaluaron varios factores de estudio, entre ellos la remoción de la masa, el aguante de la mazorca y el tiempo de fermentación. Determinaron que, de estos, el tiempo de fermentación fue el factor más importante en los diferentes valores obtenidos. Así mismo, no encontraron diferencias en la frecuencia de remoción de la masa y aguante de la mazorca.

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (Hernández y Prieto, 1999). Los polifenoles de mayor concentración encontrados en el cacao son las epicatequinas y leucocianidinas. Los flavonoides juegan un rol fundamental en la sensación de astringencia del cacao y por ende del chocolate (Álvarez y *et al.* 2018), por ello, el estudio de la

evolución de estos compuestos en el cacao, son determinantes en la calidad.

Portillo *y et al.*, (2008), observaron que el tiempo de fermentación, en las almendras de cacao criollo Porcelana, tiene participación en el contenido de los polifenoles que actúan en la formación del sabor astringente y los azúcares reductores como precursores del aroma térmico del cacao. Por otro lado, Zambrano *et al.*, (2010), encontraron contenidos de polifenoles totales de 47,71 mg ácido gálico.g<sup>-1</sup> en el cacao criollo Mérida y 66,37 mg ácido gálico.g<sup>-1</sup> en el cacao Forastero de Ghana. Durante el proceso de fermentación los polifenoles totales presentes en las almendras de cacao disminuyen de manera considerable alrededor de un 70 a 80%.

Desde el punto de vista sensorial, algunos investigadores han determinado que el desarrollo del sabor del cacao aumenta a medida que transcurre el tiempo de fermentación, existiendo una correlación negativa con la astringencia, es decir, en la medida que transcurre el tiempo de fermentación, disminuye la astringencia de los granos (Luna *et al.* 2002; Portillo *et al.* 2006). Por otro lado, resaltan los investigadores que los contenidos de procianidinas o flavonoles en cacao son responsables de la astringencia de los granos y por ende tienen un efecto directo en la calidad del producto final.

El objetivo de esta investigación fue estudiar la evolución del contenido de flavonoles en cacao criollo Porcelana de Venezuela, considerando la época de cosecha, remoción de la masa, aguante o diferimiento de

desgrane de la mazorca y el tiempo de fermentación.

## Materiales y métodos

### Material Vegetal

Para este estudio se seleccionó el cacao de tipo “Criollo” proveniente de una plantación de cacao situada en la zona Sur del Lago de Maracaibo, entre los estados Mérida y Zulia (Venezuela). Las condiciones agroecológicas de la región son favorables para la producción de cacao: la altitud está comprendida entre 120 y 200 m, el pH del suelo entre 4 y 5, las precipitaciones anuales entre 1500 y 2000 mm y la temperatura media de 28 °C.

Después de la cosecha (aproximadamente 1500 mazorcas/cajón), las almendras frescas fueron fermentadas cuatro (4) días en cajones de madera cuadrados de 60 cm<sup>3</sup>. Las condiciones de fermentación comprendieron los siguientes factores de estudio: dos (2) aguante o diferimiento del desgrane de las mazorcas (D0 y D5 días), dos (2) épocas de cosecha (año 2011 y 2012), tres (3) tiempos o frecuencias de remoción de la masa (cada 24 h, 48 h y 24/72 h) y cinco (5) tiempos de fermentación (0, 24, 48, 72 y 96 horas), para un total de 60 tratamientos, agrupados de la siguiente manera:

D0BR24: Diferimiento del desgrane de la mazorca de cero (0) días y remoción de la masa cada 24 horas

D0BR48: Diferimientos del desgrane de cero (0) días y remoción de la masa a las 48 horas

D0BR24/72: Diferimientos del desgrane de cero (0) días y remoción

de la masa a las 24 y 72 horas

D5BR24: Diferimiento del desgrane de la mazorca de cinco (5) días y remoción de la masa cada 24 horas

D5BR48: Diferimientos del desgrane de cinco (5) días y remoción de la masa a las 48 horas

D5BR24/72: Diferimientos del desgrane de cinco (5) días y remoción de la masa a las 24 y 72 horas

Estos ensayos se condujeron bajo un diseño experimental de bloques al azar con un arreglo de factorial  $2^2 \times 3 \times 5$ . La masa de fermentación fue cubierta con hojas de plátano y sacos yute. Así mismo, el proceso se condujo en una sala cerrada, con paredes bloque y techos de zinc. Las tomas de muestras se realizaron diariamente (2,4 kg aproximadamente) y efectuadas en nueve puntos del cajón situados entre 30 y 35 cm de la superficie, se tomó una muestra de cada tratamiento y se realizaron tres repeticiones para sus respectivos análisis. Posteriormente, estas muestras fueron llevadas al patio de secado, el cual se efectuó en patios de madera al sol, en capas delgadas, durante cinco días hasta que el contenido de humedad estuviese alrededor de 8%. Una vez fermentadas y secadas, las almendras fueron guardadas en bolsas de tela y trasladadas al Laboratorio de Tecnología de Alimentos, de la Facultad de Agronomía, de la Universidad del Zulia, donde fueron congeladas a  $-82^\circ\text{C}$ , hasta sus análisis. Posteriormente, las almendras fueron descascarilladas y congeladas con nitrógeno líquido, para luego molerlas y pasarlas por un tamiz de  $0,5 \mu\text{m}$  y de esta manera obtener las muestras de

cacao (polvo) para ser analizadas.

### Extracción

Un (1) g de cacao en polvo desgrasado se extrajo con 100 mL de acetona/agua (75/25 % $v/v$ ) empleando agitación magnética, durante 1h. La mezcla fue filtrada con lana de vidrio y saturada con NaCl. De allí se separaron dos fases: la fase inferior acuosa que contenía en la mayoría de los derivados hidroxycinámicos (DHC) y la fase cetónica en la que estaban disueltos los analitos flavan-3-ols: (-) epicatequinas y procianidinas B2, B5 y C1. Luego dos (2) mg de ácido gálico se agregaron en una solución alcohólica (estándar interno), la fase cetónica fue evaporada totalmente. El residuo, fue recogido en 20 mL de agua y se lavó cuatro (4) veces con cloroformo para eliminar las xantinas, posteriormente, se extrajo cuatro (4) veces con acetato de etilo. La fase de acetato de etilo que contenía las procianidinas fue evaporada y luego se utilizó sulfato de sodio anhídrido como agente desecante y se filtró, utilizando filtros Millipore ( $0,45 \mu\text{m}$ ) antes de su análisis. El residuo se recogió en 5 mL de metanol.

### Separación cromatográfica

La separación cromatográfica de las procianidinas se realizó por HPLC, empleando el método de estándar interno. Para ello, se utilizó un Cromatógrafo HP (serie 1100), equipado con una Columna RP C18  $5 \mu\text{m}$  ( $25\text{cm} \times 4,6 \text{mm}$ ), un detector UV, operado a 280nm, la fase móvil estuvo constituida por la siguiente mezcla de solventes: A: ácido fosfórico 2 mM, B: metanol 5% a 100% de B en 48 minutos, a una velocidad del flujo de  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  y 20  $\mu\text{L}$  como volumen

de muestra.

### Análisis Estadísticos

El análisis de varianza (ANOVA) fue aplicado sobre los datos obtenidos. Los factores estudiados fueron: La época de cosecha, aguante de la mazorca, remoción de la masa y el tiempo de fermentación. Se utilizó la prueba de Duncan para clasificar las diferencias existentes entre los tratamientos. Todos los análisis fueron realizados con el software estadístico X-LSTAT 2013.

## Resultados y discusión

La fracción cuantificada está constituida esencialmente por la epicatequina y las procianidinas B2, B5 y C1. La concentración de los flavonoles disminuye durante la fermentación cualquiera sea el factor estudiado. Esta disminución es globalmente superior al 60%, de acuerdo con la concentración de cada uno de estos compuestos al inicio y al final del proceso de fermentación.

Los resultados mostraron que las concentraciones de las procianidinas B2, C1, epicatequina y B5, fueron

siempre superiores en los cacaos que fueron sometidos a un diferimiento del desgrane o aguante de mazorca de cinco (5) días (D5), indiferentemente de la época de cosecha. Por otro lado, es importante señalar que las mayores concentraciones de estos compuestos se obtuvieron para el mes de junio (cuadro 1). Las pruebas de medias muestran que hubo diferencias significativas en la concentración de los flavonoles en función del año de cosecha. Solo la procianidina B5 no mostró diferencias significativas para los dos (2) años de cosecha y aguante de cero (0) días. Así mismo la epicatequina tuvo el mismo comportamiento para el aguante de cinco (5) días. Es decir, no presentó diferencias significativas en las dos (2) épocas de cosecha estudiadas.

La disminución de las procianidinas durante la fermentación conduce a una reducción fuerte de la astringencia y disminuye la inhibición de las reacciones de desarrollo del aroma de origen térmico, en las cuales los polifenoles son responsables durante la torrefacción, las figuras 1, 2, 3 y 4 permiten ilustrar el comportamiento de estos compuestos

**Cuadro 1. Efecto de la época de cosecha y aguante de la mazorca sobre los flavonoides para el cacao fermentado y secado al sol.**

Epoca (años)	Aguante D0				Época (años)	Aguante D5			
	B2	C1	Epi	B5		B2	C1	Epi	B5
Febrero (2011)	0,55 b	0,88 b	1,52 b	0,14 a	Febrero (2011)	0,84 b	1,30 b	2,64 a	0,23 b
Mayo (2011)	0,48 b	1,09 b	1,11 b	0,13 a	Mayo (2011)	0,93 b	1,44 b	2,40 a	0,23 b
Junio (2012)	0,94 a	1,77 a	2,15 a	0,22 a	Junio (2012)	1,27 a	2,49 a	3,27 a	0,30 a

Medias con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas a un nivel del 5%.

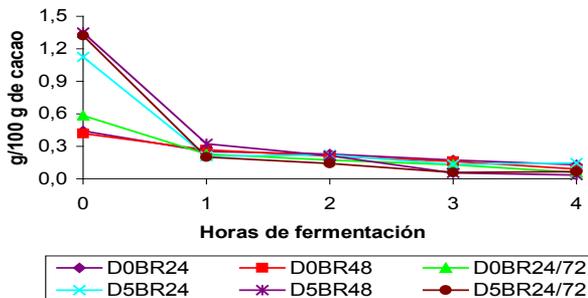


Figura 1. Evolución de la procianidina B2 en función de la fermentación.

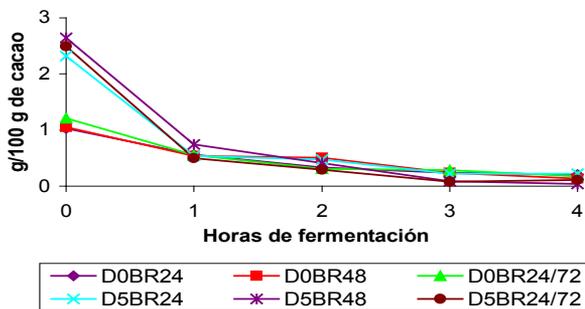


Figura 2. Evolución de la procianidina C1 en función de la fermentación.

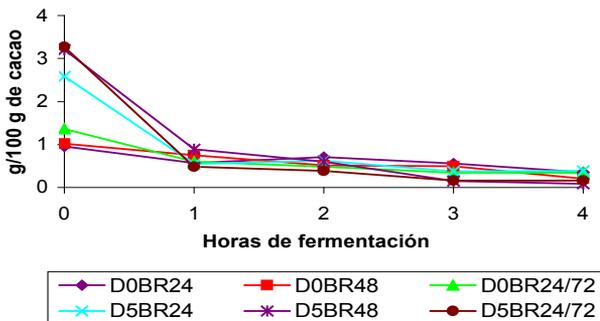


Figura 3. Evolución de la epicatequina en función de la fermentación.

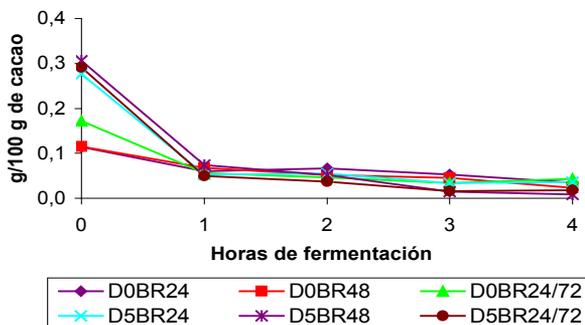


Figura 4. Evolución de la procianidina B5 en función de la fermentación.

durante la fermentación para cada uno de los factores evaluados. Por otro lado, las figuras antes mencionadas reflejan la evolución del contenido de las procianidinas cuantificadas, observándose que al inicio del proceso de fermentación las concentraciones son superiores para las cuatro procianidinas evaluadas y en la medida que transcurre el tiempo disminuyen drásticamente, hasta las 72 horas, para luego estabilizarse al final de la fermentación. Este comportamiento fue el mismo para cada una de las procianidinas estudiadas.

Considerando los resultados presentados en las figuras anteriores es posible observar un comportamiento similar para cada una de las procianidinas evaluadas, es decir, independientemente del aguante de las mazorcas y la remoción de la masa existe una tendencia similar; donde los frutos que fueron sometidos a aguante cero (D0BR24, D0BR48 y D0BR24/72), cuya concentración fue

inferior para cada una de ellas y con sus máximos valores para los granos no fermentados. Posterior a las 24 horas de iniciada la fermentación se observa una disminución que varía entre el 60 y el 80%, siendo este porcentaje superior para los cacaos cuyas mazorcas se dejaron cinco días (D5BR24, D5BR48 y D5BR24/72) para su apertura, extracción y fermentación de los granos. Todo esto permite aseverar que el factor de estudio determinante es el tiempo de fermentación y en segundo orden, la época de cosecha.

Al respecto, Forsyth y Rombouts (1951) citados por Rohan (1964), estudiaron cuantitativamente los cambios que se producen en los polifenoles solubles durante la fermentación y observaron que los pigmentos antocianínicos se destruían rápidamente, no así los otros compuestos polifenólicos que desaparecerían en menor grado por exudaciones a través de la

testa. Aunque esté presente una oxidasa cuyo sustrato es la fracción polifenólica, tal oxidasa parece no adquirir actividad hasta la fase de desecación, cuando el aire tiene acceso a los cotiledones

Estos resultados son comparables a otras investigaciones, que reportan una fuerte disminución del contenido de fenoles totales entre el 70 y 80%, durante la fermentación. Esta disminución se debe a fenómenos de difusión, de curtido y de polimerización oxidativa, los que ocasionan una reducción de la astringencia (Villeneuve *y col.* 1989). Los polifenoles de la semilla del cacao están almacenados en células distribuidas en grupos a través de los cotiledones. Son compuestos que participan activamente en las modificaciones bioquímicas en el interior de las almendras durante la fermentación, una de ellas, la oxidación enzimática, que causa la disminución del contenido de polifenoles (Calderón, 2002)

Elwers *y col.*, (2009) señalan que los cacaos criollos no tienen o casi no tienen antocianinas. Es importante destacar que el cacao se encuentra dentro del grupo de alimentos rico en antioxidantes polifenólicos en los cuales prevalece flavanol, procianidinas, monómeros y oligómeros de epicatequinas (Ferrari y Torres, 2003).

En relación a las diferencias encontradas en el comportamiento del contenido de polifenoles totales en las almendras de cacao de las dos épocas de cosechas, se puede atribuir a las condiciones edafoclimáticas en

cada una de ellas, ya que la deficiencia de agua y nutrientes en el suelo, trae como consecuencia una reducción en el tamaño de las mazorcas y de las almendras, originando variaciones significativas en la composición bioquímica de los cotiledones (Quiroz, 2012).

## Conclusiones

El tiempo de fermentación y la época de cosecha fueron los factores más importantes en la evolución y concentración de los flavonoles en el cacao.

Para este tipo de cacao después de las 48 horas de fermentación el contenido de flavonoides permanece estable, esto permite recomendar que el tiempo para realizar este proceso pueda ser de 72 horas o tres días.

## Literatura citada

- Álvarez, R. E. Portillo, A. Portillo y R. Villasmil. 2018. Evaluación de las propiedades sensoriales del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) obtenido en forma artesanal e industrial. Revista Agrollanía / Vol. 15 / Enero-diciembre, 2018: 1-6
- Brunetto, M.; Y. Cayama, L. Gutiérrez, S. Clavijo, Y. Méndez, M. Gallignani, A. Zambrano, A. Gómez and G. Ramos. 2009. Headspace gas chromatography mass spectrometry determination of alkylpyrazines in cocoa liquor samples. Food Chemistry 112: 253-257
- Calderón, L. 2002. Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobromacacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad. Tesis de Lic. En Química, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. 114 p

- Elwersl, S.; A. Zambrano; C. Rohsius y R. Lieberei. 2009. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). Eur Food Res Technol. 229:937-948.
- Ferrari, K. y A. Torres. 2003. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. Biomedicine & Pharmacotherapy 57:251-260.
- Hernández, M., y E. Prieto. 1999. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. Centro de Investigaciones Biomédicas. Rev cubana Invest Biomed 1999;18(1):12-4
- Ministerio del Poder Popular de Agricultura y Tierras (MPPAT). 2013. Estadísticas de Producción del rubro Cacao. <http://www.mat.gob.ve>. Consultado: 24-04-13
- Portillo, E. L. Graziani, y E. Betancourt. E. Cros. 2006. Efecto de algunos factores poscosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 23:51-59
- Portillo, E. 2008. Influencia del Tratamiento Poscosecha sobre el desarrollo del aroma del cacao criollo venezolano (*Theobroma cacao* L). Trabajo de Ascenso. LUZ. Facultad de Agronomía. Maracaibo.
- Portillo, E. A. Portillo, L. Grazziani, E. Cros, S. Assemat, F. Davrieux y R. Boulanger 2014. Efecto del tratamiento poscosecha sobre el contenido de teobromina y cafeína en Cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2014, Supl. 1: 801-811.
- Luna, F., D. Crouzillat, L. Cirou, and P. Bucheli. 2002. Chemical Composition and Flavor of Ecuadorian Cocoa Liquor. J. Agric. Food Chem. 50, 3527-3532
- Pinzón, J., J. Ardila y F. Rojas. 2008. Guía Técnica para el cultivo del cacao tercera edición. 152-164
- Quiroz, J. 2012. Influencia de la agronomía y cosecha sobre la calidad del cacao. Estación experimental Litoral del Sur. Programa nacional del cacao. Ecuador. Boletín técnico N° 147.
- Rohan, T. 1964. El beneficio del cacao bruto destinado al mercado. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 223 p.
- Villeneuve F.; E. Cros y J. Macheix. 1989. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. III. Evolution des flavan-3-ols de la fève. Café, Cacao, Thé, 33, 165-170.
- Zambrano, A.; C. Romero; Á. Gómez; G. Ramos; C. Lacruz; M. Brunetto; G. Máximo; L. Gutiérrez e Y. Delgado. 2010. Evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao criollo merideño durante la fermentación en dos condiciones edafoclimáticas. Agronomía Trop. 60(2): 211-219.