

## ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE CACAO CRIOLLO (*Theobroma cacao* L.) DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN Y SECADO POR COMPONENTES PRINCIPALES.

Janet Castañeda-Sedano<sup>a</sup>, Jacobo Rodríguez-Campos<sup>b</sup>, Eugenia del Carmen Lugo-Cervantes<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Tecnología Alimentaria, <sup>b</sup> Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos, CIATEJ, Av. Normalistas 800 Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, 44270, MEXICO. \*elugo@ciatej.mx

### Resumen

El cacao es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, los principales países productores son Costa de Marfil, Ghana, Indonesia y Ecuador, en donde México contribuye con menos del 1% de la producción a pesar de que éste fue domesticado en Mesoamérica. En México se cultiva la variedad criollo que presenta una calidad aromática superior al cacao forastero. En el presente trabajo se evaluó la dinámica de los compuestos volátiles del cacao criollo procedente de Tabasco durante el proceso de fermentación tradicional y el secado al sol. Se identificaron 63 compuestos volátiles pertenecientes a las familias de aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos y pirazinas principalmente. La extracción de los compuestos volátiles se realizó utilizando la técnica de microextracción en fase sólida con modo de espacio de cabeza (SPME-HS) y su identificación fue por GC-MS. Las áreas de los compuestos identificados se sometieron a un análisis de componentes principales (ACP) para establecer cuáles de estos son los más importantes durante la fermentación y el secado del cacao criollo y determinar las diferencias con la variedad forastero.

### Introducción

El cacao es una planta que pertenece a la familia de las esterculiáceas, sus granos se han utilizado en México desde tiempos prehispánicos como moneda de cambio y en la preparación de bebidas. Es cultivado principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas con una producción de 26,969 toneladas [1]. Se cultivan principalmente 3 variedades: Forastero, Trinitario y Criollo. El cacao Criollo presenta baja productividad debido a su alta susceptibilidad a enfermedades e insectos, por lo tanto, es el menos cultivado, sin embargo su calidad sensorial es más alta debido a que es menos amargo y más aromático [2].

Cosechados, los granos de cacao se someten a un proceso de beneficio en el cual, las operaciones de fermentación y secado son las más importantes porque es donde se desarrollan las características físicas, químicas y sensoriales deseadas en el chocolate. La fermentación se lleva a cabo de manera espontánea y consiste en dejar reposar los granos ya sea en cajas, canastos, bandejas o montones para que los microorganismos actúen sobre ellos. Se inicia con una fermentación alcohólica, donde las levaduras como *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *C. castelli*. hidrolizan y remueven el mucilago que rodea los granos y fermentan los azúcares produciendo etanol y compuestos aromáticos como acetato de isopropilo, acetato de etilo, 1-propanol, alcohol isoamílico, 2,3-butanodiol, succinato de dietilo y 2-feniletanol. Terminada la fermentación alcohólica la aireación de los granos favorece el desarrollo de bacterias acéticas como *A. aceti* y *A. pasterianus* las cuales oxidan el etanol en ácido acético, lo cual eleva la temperatura de los granos ocasionando la muerte del embrión. Las bacterias acéticas producen otros volátiles como acetato de etilo, butanol, isopropanol y ácidos orgánicos como el málico y cítrico [3,4]. Posteriormente, aparecen las bacterias lácticas como *L. fermentum*, *Lb. plantarum* y *L. mesenteroides* las cuales producen ácido láctico a partir de la glucosa. Al final de la fermentación bacterias como *Bacillus*



spp producen compuestos como ácido acético y láctico, 2,3-butanodiol y tetrametilpirazina. Estas bacterias también producen ácidos grasos libres de cadena corta que se consideran responsables de olores desagradables en el chocolate [3]. Durante la fermentación la sacarosa y los compuestos proteicos son parcialmente hidrolizados generándose los precursores de los compuestos volátiles. Además, se reduce el sabor astringente debido a la pérdida por difusión de alcaloides y polifenoles, y el color del grano se torna café o marrón debido a la oxidación de los polifenoles [4].

Después de la fermentación, se realiza el secado con el fin de reducir el contenido de humedad hasta un 8%, disminuir el contenido de acidez volátil y detener la oxidación de los polifenoles que pueden producir una gran cantidad de amoniaco resultando en sabores indeseables [5]. Durante el secado se lleva a cabo la reacción de Maillard entre los precursores generados previamente en el proceso de fermentación en la cual se producen compuestos como pirazinas y aldehídos [4].

## Metodología

Los granos de cacao criollo se obtuvieron de Cunduacán, Tabasco, México. La fermentación se llevó a cabo de forma espontánea en cajas de madera con capacidad de 500Kg y tuvo una duración de 5 días. Posteriormente el cacao fue secado durante dos días en un invernadero. Las muestras obtenidas se congelaron para poder ser transportadas al laboratorio y se analizaron posteriormente sin que cambiara su composición.

Para la extracción de los compuestos volátiles se empleó la técnica de microextracción en fase sólida en modo de espacio de cabeza (SPME-HS). Se utilizaron las siguientes condiciones: fibra bi-polar de 50/30  $\mu\text{m}$  divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, fibra gris); temperatura de 60°C y tiempo de exposición de la fibra de 30 minutos con un pre-equilibrio de 15 minutos [6]. Se colocaron 2 g de muestra de cacao molido en un vial de vidrio de 10 mL, se selló herméticamente a presión con una tapa metálica y septa de silicón blanco de 20 mm diámetro. El vial se sometió a una temperatura de 60 °C durante 15 min para establecer el pre-equilibrio. Posteriormente la septa se perforó con la aguja del sistema manual de SPME que contiene la fibra y se expuso durante 30 minutos al espacio de cabeza de la muestra empujando el émbolo hacia abajo. Transcurrido el tiempo de extracción se retrajo la fibra y se insertó inmediatamente en el puerto de inyección del GC-MS donde se mantuvo durante 5 min. Entre cada extracción la fibra se sometió a un proceso de limpieza térmica en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases durante 30 min a 200 °C.

Para la separación e identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se utilizó una columna Innowax® de 60 m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de película. Se programó una rampa de temperatura del horno del GC de la siguiente forma: 40°C durante 5 min, seguida de incrementos de 10°C min/min hasta alcanzar 200 °C manteniéndose así durante 30 min. Se utilizó helio de alta pureza como gas de arrastre con un flujo de 0.7 mL/ min. El inyector se operó en modo splitless a 240°C. Para la identificación de los compuestos volátiles se compararon los espectros de masa con la librería electrónica NIST5.0/EPA/NIH (versión 2.0 d) que se encuentra instalada en el equipo.

Finalmente se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de las áreas de los compuestos volátiles identificados para establecer cuáles de estos son los más importantes durante la fermentación y el secado del cacao criollo.



## Resultados

Durante la fermentación y el secado se identificaron 63 compuestos volátiles. En el cacao fresco se identificaron 22 compuestos, el primer día de fermentación se presentó un incremento en la cantidad de compuestos hasta llegar a un total de 35, los cuales incrementaron hasta 37 en el día 2, manteniéndose de esta forma hasta el final del día 5 a excepción del día 4 en el que se observó una disminución identificándose solo 34 compuestos. Durante el secado los compuestos aumentaron a 47 y 48 durante el día uno y dos respectivamente. La evolución de los compuestos durante la fermentación se muestran en la Figura 1a donde se observa que durante la fermentación los alcoholes tienen mayor número de compuestos en el día 2 y posteriormente decrecen para volver a incrementar en el último día. La cantidad de compuestos pertenecientes a la familia de aldehídos y cetonas permanecen prácticamente constantes durante la fermentación. El número de compuestos ácidos incrementa durante todo el proceso de fermentación. Los ésteres incrementan alcanzando su máximo a la mitad de la fermentación para volver a disminuir al final de ésta. Las pirazinas solo se encontraron en el último día de fermentación. Se observó un comportamiento distinto al cacao forastero estudiado por Rodríguez-Campos y colaboradores (2011) en donde se encontró un máximo de compuestos en el día 5 que descendió al final de la fermentación, en este estudio no se encontraron pirazinas durante la fermentación. Durante el secado se observó un comportamiento constante en el número de compuestos de cada familia (Figura 1b).

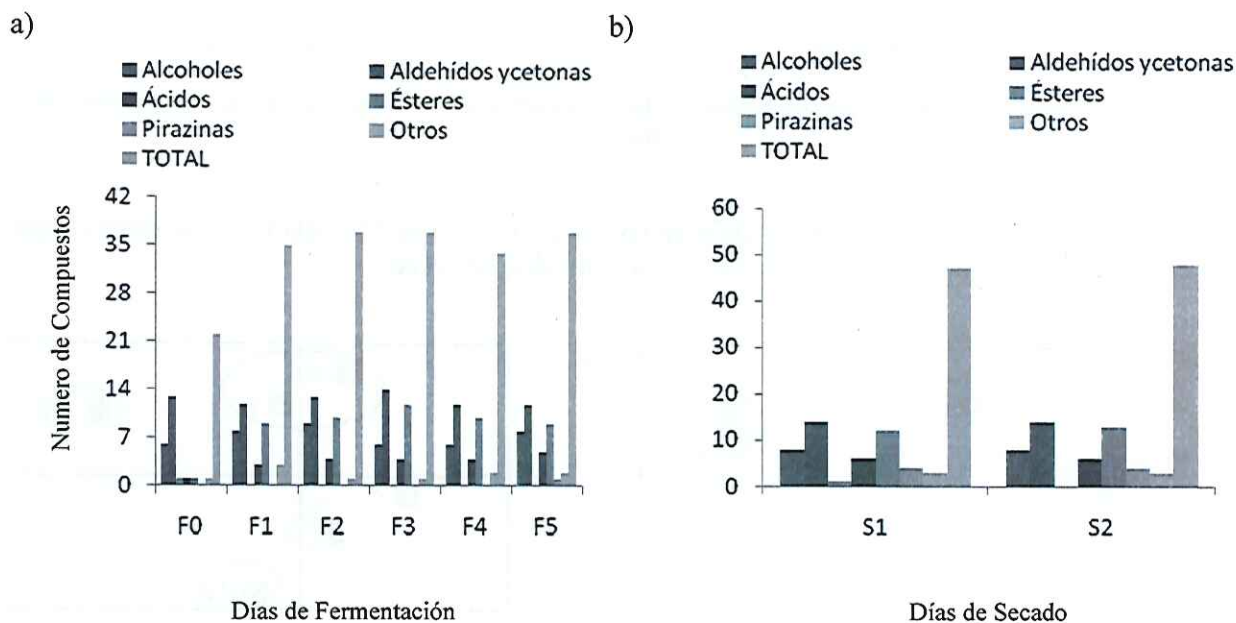


Figura 1. Evolución del número de compuestos por grupo funcional durante: a) fermentación y b) secado.

Durante la fermentación se observó que el máximo contenido de compuestos volátiles (áreas) se encontró en el día 2 de fermentación lo cual coincide con el estudio de cacao forastero [6]. Al inicio de la fermentación fueron los alcoholes los que participaron con mayor porcentaje en el contenido total de todos los compuestos, durante el día dos de la fermentación los ésteres y al final los aldehídos y cetonas (Figura 2a) a diferencia del cacao forastero en el que los ésteres predominaron durante los primeros días de la fermentación y los ácidos fueron los grupos funcionales con mayor porcentaje al final de la

fermentación. En cuanto al secado, el mayor contenido de volátiles se encontró al inicio siendo los aldehídos y cetonas los compuestos mayoritarios durante todo el secado, seguidos por los ácidos (Figura 2b) a diferencia del forastero que reportó un máximo de volátiles al final del secado en donde fueron los ácidos los compuestos predominantes [6].

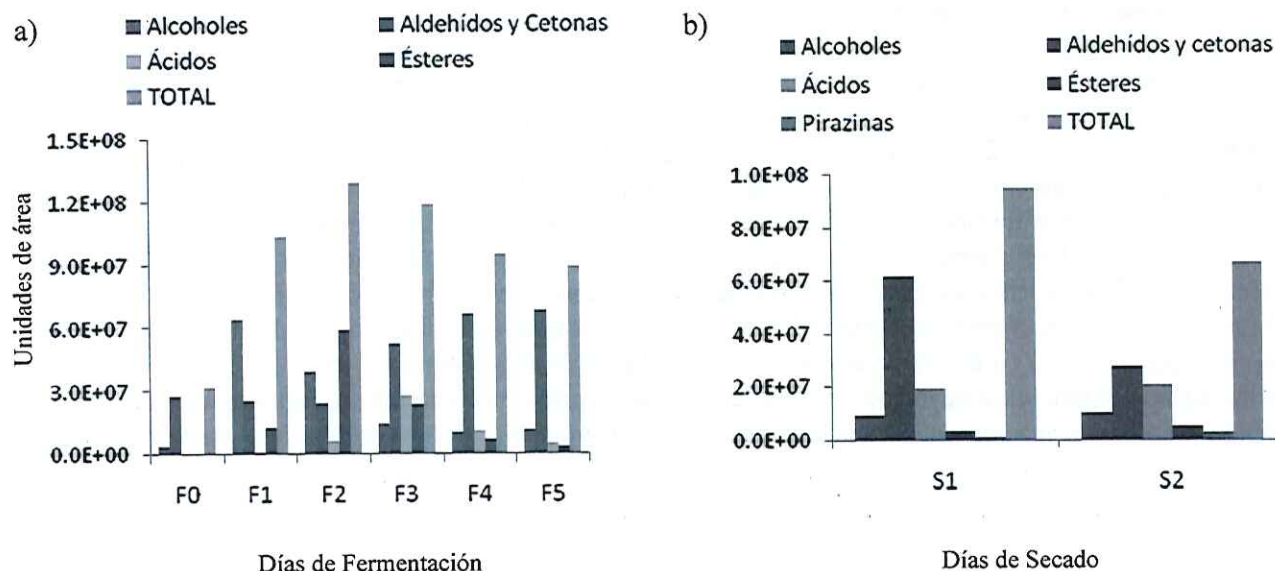


Figura 2.- Evolución del área generada por los compuestos separados por grupo funcional durante: a) fermentación y b) secado.

En el ACP se evaluaron las semejanzas y diferencias entre los compuestos volátiles y se observó que hay una clara separación en las etapas de fermentación y los días de secado.

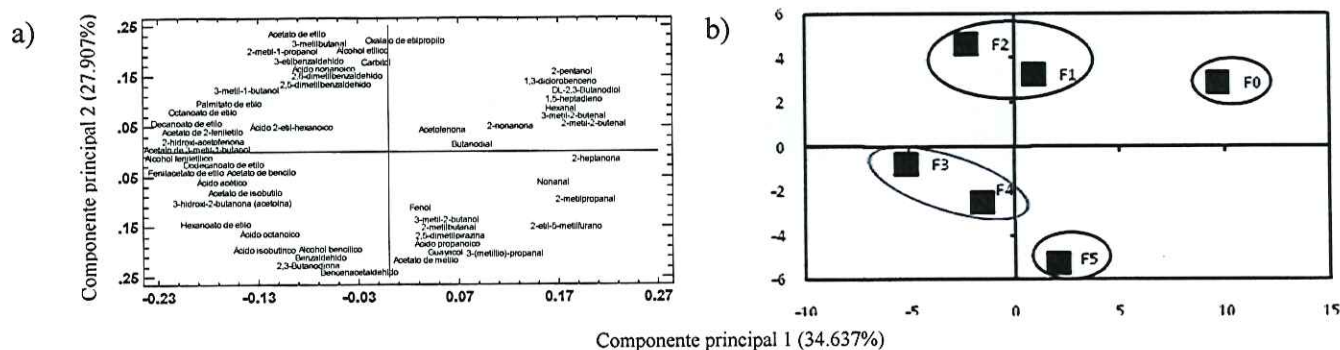


Figura 3.- Análisis de componentes principales con el CP1 y CP2: a) gráfica de pesos de la evolución de los compuestos volátiles durante la fermentación, b) gráfica de CP-valores obtenidos durante la fermentación.

En la Figura 3a se observa que en el eje positivo del CP1 (componente principal 1) se encontraron compuestos que presentaron alta concentración en el cacao fresco tales como 2-pentanol, hexanal y 2-



metil-2-butenal y del lado negativo compuestos que presentan su máxima concentración en el día tres de fermentado como octanoato de etilo, alcohol feniletílico, ácido acético y acetato de isobutilo, los cuales pueden ser producidos por bacterias acéticas. En el eje positivo del CP2 (componente principal 2) se encontraron compuestos que presentan su máximo contenido durante los primeros días de fermentado como el acetato de etilo, alcohol etílico, 2-etil-1-propanol y 3-etilbenzaldehido, compuestos que son producidos por las levaduras; en el eje negativo del CP2 se agruparon compuestos que alcanzan su máxima concentración en el día 5 como el fenol, 3-metil-2-butanol, 2,5-dimetilpirazina y acetato de metilo. En la figura 3b se observa la formación de cuatro grupos: el primero constituido por el cacao fresco (F0), el segundo por el cacao con uno y dos días de fermentado (F1 y F2), el tres por el tercero y cuarto día de fermentación (F3 y F4) y el cuarto por el último día de fermentado (F5).

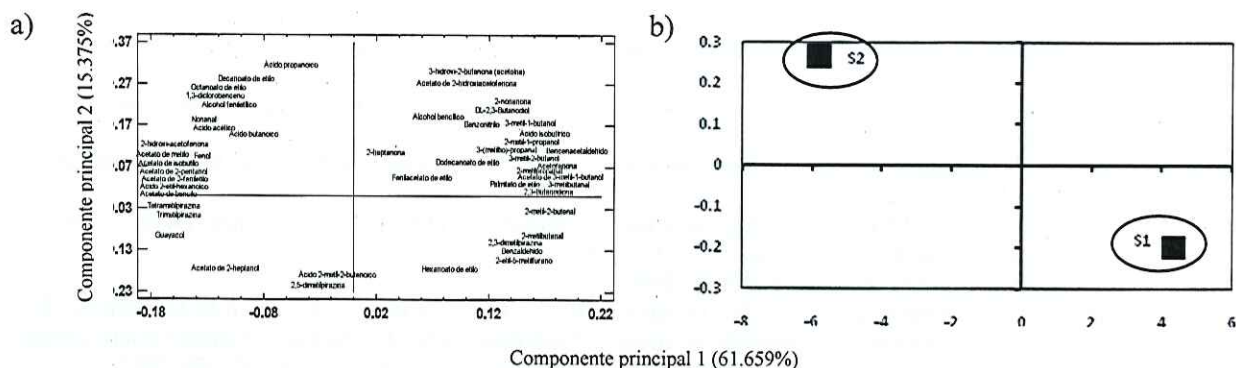


Figura 4.- Análisis de componentes principales con el CP1 y CP2: a) gráfica de pesos de la evolución de los compuestos volátiles durante el secado, b) gráfica de CP-valores obtenidos durante el secado.

En la Figura 4 se presentan las gráficas de pesos (a) y de valores-PC (b) para el secado del cacao. En este caso, los componentes 1 y 2 explicaron el 61.659% y 15.375% de la variabilidad de los datos. En la Figura 4a se observa que en el lado positivo del eje del componente 1 se encuentran compuestos como el palmitato de etilo, 2,3-butanodiona, 3-metilbutanal, acetofenona, 2-metil-2-butenal y 2,3-dimetilpirazina los cuales presentaron una disminución en su contenido durante el secado. En el lado negativo del eje se ubicaron compuestos como el acetato de metilo, acetato de isobutilo, acetato de 2-pentanol, acetato de 2-feniletilo, tetrametilpirazina y trimetilpirazina que presentaron un incremento en su contenido durante el secado. La producción de pirazinas se debe a la reacción de Maillard entre los precursores formados durante la fermentación tales como azúcares reductores y péptidos o aminoácidos que se generan al someter los granos a elevadas temperaturas. En la Figura 4b se observa la formación de dos grupos que corresponden a cada uno de los días de secado.

## Conclusiones

Se identificaron 63 compuestos volátiles a diferencia de los 39 reportados en estudios anteriores en cacao forastero. Los compuestos fueron de las familias de aldehídos y cetonas (20), ésteres (16), alcoholes (11), ácidos (8), pirazinas (4) y otros (4). De acuerdo al ACP, los compuestos se clasificaron en 4 grupos durante el proceso de fermentación y en 2 durante el secado.

Al final de la fermentación y el secado los aldehídos y cetonas participaron con el mayor porcentaje en el contenido total de compuestos (75% en la fermentación y 65% en el secado) a diferencia de lo

reportado para el cacao forastero en donde fueron los ácidos los compuestos mayoritarios (65% y 75%). Los aldehídos y cetonas confieren a los granos notas agradables a almendras, mantequilla o florales mientras que los ácidos presentan notas de queso, rancio o astringente.

Las pirazinas están entre los compuestos de sabor más importantes del cacao ya que confieren notas de chocolate, café y horneado. Al final del secado se identificaron cuatro pirazinas: 2,5-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina y tetrametilpirazina que representan el 3.8% de los compuestos totales a diferencia del cacao forastero en el que solo se encontró una pirazina equivalente al 0.6% del total de volátiles.

## Referencias

1. SIAP/SAGARPA. Sistema de Información Agrícola y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. ([www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx)), 2014.
2. Rusconi, M., and A. Conti. "Theobroma cacao L., the food of the gods: A scientific approach beyond myths and claims: Review". *Pharmacological Research*, Vol. 61, p. 5–13, 2010.
3. Rodríguez de Sindoni, N. *Beneficio del cacao (Theobroma cacao L.)* Caracas Venezuela. Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, 2006.
4. Schwan, R.F., and A.E. Wheals. "The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* Vol. 44, p. 205–221, 2004.
5. Afoakwa, *Chocolate Science and Technology*, p. 03-82, 2010.
6. Rodríguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, E., "Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao L.*) during fermentation and drying processes using principal components analysis". *Food Research International*, Vol. 44, No. 1, p. 250–258, 2011.