

Contenido de compuestos bioactivos en *Theobroma cacao* L. (seco y fermentado) de la región del Soconusco, Chiapas

S. Tello-Alonso¹, C.H. Avendaño-Arrazate², M.S. Vásquez-Murrieta¹ y M. del S. López-Cortéz¹.
Responsable-Laboratorio¹.

¹ Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Departamento de Biofísica, Prol. Carpio y Plan de Ayala, s/n. Col. Santo Tomás, Apartado Postal 42-186, México, D.F. C.P. 11340, México. ² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Avenida Progreso No. 5 Col. Barrio de Santa Catarina Delegación Coyoacán, México, DF. C.P. 04010. socolc@prodigy.net.mx

RESUMEN: Actualmente se busca consumir alimentos que además de nutrir tengan un impacto favorable en la salud y esto ha derivado el estudio de diversos alimentos como el vino, té verde y el cacao (*Theobroma cacao* L.). A este último, se le atribuye la disminución de infartos, hipertensión, estrés oxidativo, etc., y esto es por su alto contenido de antioxidantes (polifenoles, flavonoides, catequinas, epicatequinas). Para que un grano de cacao mejore sus propiedades organolépticas y pueda ser dirigido a la industria chocolatera, se deben cuidar etapas críticas como la fermentación y el secado, ya que se forman los precursores del sabor, color y aroma, potencializando su valor económico, calidad y actividad antioxidante. El objetivo de este estudio fue determinar el contenido de compuestos bioactivos en granos de cacao fresco, seco y fermentado de clones de 2 variedades de *Theobroma cacao* L.: variedad trinitaria (CAERÍ-1 y CAERÍ-2) y variedad criolla (LAGARTO, ROJO SAMUEL y CARMELO). Los resultados indicaron que existe una disminución de fenoles totales y capacidad antioxidante en granos fermentados pero un incremento de estas variables en granos secos con respecto a los granos frescos.

Palabras clave: Fenoles totales, capacidad antioxidante, fermentación.

ABSTRACT: Currently, it is sought to consume foods that, in addition to nourishing, have a favorable impact on health, and this has led to the study of various foods such as wine, green tea and cocoa (*Theobroma cacao* L.). The latter is attributed to the decrease in heart attacks, hypertension, oxidative stress, etc., and this is due to its high content of antioxidants (polyphenols, flavonoids, catechins, epicatechins). For a cocoa bean to improve its organoleptic properties and be directed to the chocolate industry, critical stages such as fermentation and drying must be taken care of, since the precursors of flavor, color and aroma are formed, enhancing their economic value, quality and antioxidant activity. The objective of this study was to determine the content of bioactive compounds in fresh, dry and fermented cocoa beans of clones of 2 varieties of *Theobroma cacao* L.: trinitarian variety (CAERÍ-1 and CAERÍ-2) and creole variety (LAGARTO, RED SAMUEL and CARMELO). The results indicated that there is a decrease of total phenols and antioxidant capacity in fermented grains but an increase of these variables in dry grains with respect to fresh grains.

Keywords: Total phenols, antioxidant capacity, fermentation.

Área: Alimentos funcionales

INTRODUCCIÓN

Dentro de los productos vegetales que poseen elevado contenido de antioxidantes se encuentran las semillas de cacao, motivo del presente estudio. A este respecto, un estudio de la universidad Harvard, reporta que poblaciones alrededor del mundo como los indios Kuna de Panamá, presentan un nivel bajo de incidencias de enfermedades cardiovasculares, coronarias, cáncer y diabetes; y esto se le atribuye al consumo regular de cacao y sus productos (licor de cacao, chocolate amargo, polvo de cacao o cocoa) ya que presentan altos contenidos de antioxidantes como catequinas (epicatequina, epigalocatequina, galocatequina y catequina), además de otros flavonoides como las procianidinas, antocianinas, flavononas y flavonol glicosídicos 1-6 (Villamil *et al.*, 2009).

Por otro lado, existen reportes de que las propiedades antioxidantes de frutos y vegetales dependen de su lugar de origen, clima y características del suelo de cultivo (Acuña, *et al.*, 2016). De acuerdo con Caballero-Pérez *et al.* (2014), en México las principales variedades cultivadas en el estado de Tabasco,

Chiapas, Guerrero y Oaxaca son los cacaos criollos y forasteros. El cacao Criollo es el de mayor calidad por su fino sabor, aroma y escaso contenido en taninos, el cual es reservado para la fabricación de los chocolates más finos. Por otro lado, el Forastero se distingue por heredar la robustez y el delicado sabor del cacao criollo mezcla con otras variedades.

Después de cosechado y desgranadas las mazorcas de cacao, sus almendras son sometidas a procesos de fermentación que consiste en la acumulación de los granos en cajas o sacos con el fin de que, al ser expuestos al ambiente, los microorganismos descompongan el mucílago (pulpa blanca y azucarada que envuelve los granos), incrementando la temperatura y provocar la muerte del embrión y así inicien los cambios bioquímicos y reacciones enzimáticas en el interior de las almendras (Reyes y Frezia, 2014). De acuerdo a la NMX-FF-103-SCFI-2003, el objetivo de desarrollar este proceso es disminuir del sabor amargo del grano y permite el desarrollo de precursores de los compuestos responsables del aroma, sabor y color del cacao, además de facilitar el proceso de secado de los granos. Para que se lleve a cabo se requiere un grano entero y sano extraído de mazorcas maduras y este proceso tarda de 5-7 días. Al finalizar la fermentación los granos se retiran de la caja para el proceso de secado, que toma alrededor de una semana para alcanzar hasta el 7 o 8% de humedad y así evitar el crecimiento de moho durante el almacenamiento (Beckett *et al.*, 2009). El método de secado tradicional por medio de la luz solar, comienza al extender los granos fermentados sobre bandejas de madera en el suelo, este proceso es ecológico, de bajo costo y produce granos de buena calidad ya que es más fácil retirar granos defectuosos, materiales extraños y hay menos riesgo de contaminación (Pava, 2016). Dado que no existen estudios relacionados a la determinación del contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante por DPPH y ABTS en cacao de origen mexicano, en la presente investigación se realizó empleando 2 variedades de granos de cacao mexicano (criollo y trinitario) frescos, secos y fermentados.

Considerando que los granos de cacao de manera general van dirigidos a la industria chocolatera, se busca que presenten una alta capacidad antioxidante y bajo sabor astringente; con estas características, se recomienda emplear el clon CAR-T, seguido del clon LAG-I, RS-C y RS-T a los 5 días de fermentación o cualquier clon seco.

MATERIALES Y MÉTODOS

La materia prima estudiada fue clones de cacao cosechado de diferentes municipios pertenecientes al estado de Chiapas, México (**Tabla I**). Para la preparación del extracto metanólico se homogenizaron 10 g de muestra desgrasada (Reyes y Frezia, 2014) en 100 mL de MetOH, la mezcla se maceró a oscuridad en un agitador orbital a 200 rpm durante 48 horas a 25 °C.

Finalmente, se filtró con papel filtro (Zapata *et al.*, 2013). El extracto obtenido se utilizó para la determinación fenoles totales y capacidad antioxidante.

Tabla I. Clones y variedades de granos de cacao empleadas		
Variedad	Clon	Municipio
CRIOLLA	CARMELO	<ul style="list-style-type: none"> • Izapa • Tuzantán • Cacahoatán
	ROJO SAMUEL	<ul style="list-style-type: none"> • Tuzantán • Cacahoatán
	LAGARTO	<ul style="list-style-type: none"> • Izapa
TRINITARIA	CAERÍ-1	<ul style="list-style-type: none"> • Izapa

La determinación de Fenoles Totales se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Singleton *et al.*, (1999) modificada de Folin-Ciocalteu, se realizó la lectura a una longitud de onda de 760 nm y los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por 100g de cacao en base húmeda (mg EAG/100g b.h.) y en base seca (mg EAG/100g b.s.). Se determinó la capacidad antioxidante por el método de DPPH como lo propone Bondet *et al.*, (1997) con algunas modificaciones.

La absorbancia se cuantificó a una longitud de onda de 517 nm en el espectrofotómetro y los cálculos se expresaron en μmol de trolox/g de cacao en base seca). La actividad antioxidante por el método de ABTS se realizó siguiendo la metodología de Rufino *et al.*, (2007) modificada. Para la reacción se empleó el radical catiónico ABTS \cdot^+ (7 mM) con persulfato de potasio (140 mM) a una longitud de onda de 734 nm. Los resultados se expresaron como valores de μmol de trolox / g de cacao en base seca).

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis estadístico en el programa MINITAB 17, aplicándose una prueba de Tukey. Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se analizaron con un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla II** se muestra que el mayor contenido de fenoles totales en granos frescos se presentó en el clon RS-C con 3512.720 mg EAG/100 g b.s. similar a lo mencionado por Orfa *et al.* (2013) donde reportan valores de 4949 ± 0.030 mg EAG/100 g b.s. para un cacao criollo (ICS-1) originario de Colombia. Por otro lado, los clones CAE1-I y CAE2-I presentaron un contenido de fenoles en un intervalo de 373.320 a 2695.570 mg EAG/100 g b.s., similar a lo mencionado por Orfa *et al.* (2013) donde reportan valores de 3868 ± 0.020 mg EAG/100 g b.s. para un cacao trinitario (POUND-12) procedente de Perú. El contenido de polifenoles presentes en el grano se debe probablemente a la presencia de flavonoides hidrosolubles en el grano fresco (Pineda *et al.*, 2012). Sin embargo, el clon Carmelo (CAR) el cual fue cosechado en 3 zonas con diferente altura a nivel del mar, como Tuzantán (60 m), Cacahoatán (685 m) e Izapa (314 m) y el clon Rojo Samuel (RS) que fue cosechado en 2 zonas con diferente altura a nivel del mar, como Tuzantán (60 m) y Cacahoatán; ambos a pesar de ser el mismo clon el contenido de fenoles totales fue diferente en cada zona de cultivo siendo mayor en Izapa (CAR-I), seguido de Cacahoatán (CAR-C y RS-C) y finalmente Tuzantán (CAR-T y RS-T), Carrillo *et al.* (2013) menciona que existe una relación proporcional entre el contenido de polifenoles con los cambios en la altitud de los cultivos de plantas, en este caso a mayor altura sobre el nivel del mar mayor contenido de fenoles totales en la planta de cacao.

De forma general el contenido de fenoles totales en granos secos y fermentados-disminuyó en comparación con los granos frescos (**Tabla II**), esto puede deberse a las reacciones de Maillard desarrolladas en el proceso de secado (Pineda *et al.*, 2012) y en los clones RS-C y CAE1-I incrementaron durante el proceso fermentativo y esto puede reflejar la formación de proantocianidinas poliméricas (taninos) (Wollgast y Anklam, 2000).

Tabla II. Contenido de fenoles totales en grano fresco y grano lavado de los 8 clones analizados			
CLON	FRESCO	SECO	FERMENTADO
	mg EAG/100 b.s.		
CAR-C	2484.388 ± 0.002^D	1923.819 ± 0.002^D	75.242 ± 0.052^G
CAR-T	1129.392 ± 0.008^F	101.223 ± 0.002^H	227.561 ± 0.002^E
CAR-I	1960.485 ± 0.001^E	838.655 ± 0.004^G	791.771 ± 0.013^A
RS-C	3512.726 ± 0.005^A	1959.292 ± 0.003^C	399.289 ± 0.005^C
RS-T	856.302 ± 0.007^H	1737.963 ± 0.005^E	278.541 ± 0.001^D
LAG-I	238.047 ± 0.003^G	1310.292 ± 0.001^F	80.579 ± 0.003^F
CAE1-I	3138.195 ± 0.003^C	2531.852 ± 0.003^B	780.609 ± 0.012^B
CAE2-I	373.316 ± 0.001^B	3111.905 ± 0.002^A	75.242 ± 0.052^G

Tabla III. Capacidad Antioxidante mediante el método DPPH en grano fresco y lavado de los 8 clones analizados

CLONES	FRESCO	SECO	FERMENTADO
	μmol ET/100 g b.s.		
CAR-C	3.071 ± 0.025 ^F	11.664 ± 0.049 ^A	215.452 ± 0.372 ^C
CAR-T	3.059 ± 0.034 ^F	11.610 ± 0.061 ^{A,B}	271.649 ± 0.081 ^B
CAR-I	12.871 ± 0.021 ^C	11.523 ± 0.028 ^{B,C}	156.782 ± 0.243 ^F
RS-C	5.749 ± 0.015 ^E	11.540 ± 0.028 ^{A,B}	196.535 ± 0.451 ^D
RS-T	2.150 ± 0.021 ^G	11.496 ± 0.034 ^{B,C}	138.055 ± 0.281 ^G
LAG-I	6.466 ± 0.051 ^D	11.410 ± 0.058 ^C	187.219 ± 0.140 ^E
CAE1-I	17.228 ± 0.065 ^A	11.205 ± 0.034 ^{B,C}	292.620 ± 0.215 ^A
CAE2-I	16.174 ± 0.087 ^B	11.016 ± 0.052 ^{A,B}	215.452 ± 0.372 ^C

La capacidad antioxidante determinada mediante la técnica de DPPH para granos frescos, secos y fermentados (**Tabla III**); los valores más altos de capacidad antioxidante en grano fresco se presentaron en el clon CAE1-I con 17.228 μmol ET/100 g b.s. y CAE2-I con 16.174 μmol ET/100 g b.s, se observa que también el contenido de fenoles totales es alto en ambos clones y esto puede deberse a que la capacidad antioxidante se la confiere la cantidad de fenoles presente en el grano de cacao (Negaresh y Marí, 2013). Mientras que, para los granos secos y fermentados la capacidad antioxidante mayor respecto a los granos frescos y esto puede ser debido a la formación de proantocianidinas poliméricas “taninos” en el proceso de secado (Rivera-Ordoñez, 2013).

Se presentan los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante referidos al radical ABTS^{o+} en los granos frescos, secos y fermentados (**Tabla IV**), donde la mayor eficiencia frente al radical ABTS^{o+} para granos frescos se presentó en los clones CAE1-I y LAG-I con 29.747 y 25.941 μmol ET/100 g b.s. respectivamente; además CAR-C y CAR-T no presentaron diferencia estadísticamente significativa, los cuales fueron cultivados en diferentes zonas de cultivo (Tuzantán y Cacahoatán), al respecto Orfa *et al.* (2013) menciona que la diferencia en la cantidad de polifenoles totales registrados en los clones se debe en parte por la variedad, pero en mayor razón por la intensidad de la luz, humedad, temperatura, y otros factores como el estrés producido en el suelo de cultivo. De forma general existió un incremento en la capacidad antioxidante en los granos lavados de los clones CAR-C, CAR-T, CAR-I, RS-C y RS-T, esto puede ser porque otros factores también influyen en la actividad antioxidante como: la concentración de antioxidantes, el medio de extracción, la temperatura, el pH del medio (Gazzani *et al.*, 1998), las estructuras químicas y la posición en la molécula (Prior *et al.*, 2005).

Tabla IV. Capacidad Antioxidante mediante el método ABTS en grano fresco y lavado de los 8 clones analizados

CLONES	FRESCO	SECO	FERMENTADO
	μmol ET/100 g b.s.		
CAR-C	7.521 ± 0.084 ^E	19.384 ± 0.047 ^A	0.857 ± 0.003 ^B
CAR-T	7.506 ± 0.064 ^E	19.462 ± 0.027 ^A	0.781 ± 0.004 ^C
CAR-I	21.767 ± 0.002 ^D	19.460 ± 0.028 ^A	0.355 ± 0.243 ^E
RS-C	6.867 ± 0.214 ^G	19.462 ± 0.027 ^A	1.009 ± 0.002 ^A
RS-T	6.284 ± 0.012 ^F	18.916 ± 0.082 ^B	0.138 ± 0.003 ^G
LAG-I	25.941 ± 0.165 ^B	19.352 ± 0.072 ^A	0.145 ± 0.005 ^F
CAE1-I	29.747 ± 0.071 ^A	19.384 ± 0.811 ^A	0.690 ± 0.002 ^D

CAE2-I	23.907 ± 0.252 ^C	19.368 ± 0.071 ^A	0.857 ± 0.003 ^B
--------	-----------------------------	-----------------------------	----------------------------

Para los clones LAG-I, CAE1-I y CAE2-I la capacidad antioxidante disminuyó respecto al estado fresco y esto se puede relacionar con la pérdida de catequinas durante el secado (Moraga *et al.*, 2012). La capacidad antioxidante disminuyó en granos fermentados secos en comparación con los granos frescos y secos, estas pérdidas pueden deberse a que en el proceso de fermentación y secado se lleva a cabo la difusión de los compuestos fenólicos a través del agua exudada durante estos procesos (Rivera y Ordoñez, 2013; Pineda *et al.*, 2012), esto quiere decir que, en los granos fermentados-frescos, los compuestos antioxidantes hidrosolubles como la: (-)-epicatequina, (+) - catequina y quercetina (Sanbogi *et al.*, 1997) le confieren dicha capacidad antioxidante, además de la acción de las enzimas polifenoloxidasas que convierten a los flavanoles (compuestos de (-)-epicatequina) a quinonas y con la disminución de los flavonoles, catequinas y epicatequinas durante los procesos de fermentación y secado (Beckett *et al.*, 2009; Rivera y Ordoñez, 2013).

En conclusión, se encontró que existe una relación proporcional entre el contenido de polifenoles con los cambios en la altitud de los cultivos de plantas, a mayor altura sobre el nivel del mar mayor contenido de fenoles totales en granos de cacao, además estos incrementaron en los granos secos y fermentados. La capacidad antioxidante por DPPH de granos frescos de cacao es menor respecto a los granos secos y fermentados-secos y la capacidad antioxidante por ABTS es mayor en granos secos que en granos frescos y fermentados. Considerando que los granos de cacao de manera general van dirigidos a la industria chocolatera, se busca que presenten una alta capacidad antioxidante y bajo sabor astringente; con estas características, se recomienda emplear el clon CAR-T, seguido del clon LAG-I, RS-C y RS-T a los 5 días de fermentación o cualquier clon seco.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Ávila P.E., Vásquez-Murrieta M.S., Franco-Hernández M.O., López-Cortéz M.S. 2016. Relationship between the elemental composition of grapeyards and bioactive compounds in the Cabernet Sauvignon grapes *Vitis vinifera* harvested in Mexico. Food Chemistry. Vol. 79. México.
- Beckett, Stephen T., B.Sc., D.Phil, 2009. Industrial Chocolate Manufacture and Use. 4^o Edition Blackwell Publishing Ltd,
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. 1997. Kinetic and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Food Science Technology- Lebensmittel-Wissenschaft Technologie.
- Caballero-Pérez J.F., Avendaño-Arrazate C.H. 2014. Manual para el beneficiador del Cacao. Instituto Nacional de investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Sur. Campo Experimental Rosario Izapa, Tapachula Chiapas, México
- Carrillo C.L., Londoño J., Londoño A.G. 2013. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa growing areas in Colombia. Food Research International. Volume 60.
- Gazzani G., Papetti A., Massolini G. y Daglia M., 1998. Antioxidant and Pro-oxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect thermal treatment. J. Agric Food Chem 46:4118-4122.
- Moraga.G., Igual.M., García-Martínez.E., Mosquera.L.H, y Martínez-Navarrete.N. 2012. Effect of relative humidity and storage time on the bioactive compounds and functional properties of grapefruit powder. Journal of Food Engineering 112: 191-199.
- Negaresh S., Marín I. 2013. El cacao y la salud humana: propiedades antioxidantes del cacao nicaragüense y productos alimenticios comercializados. Agroforestería en las Américas. Laboratorio de BIOciencia, UNAN-Managua.
- NMX-FF-103-SCFI-2003. Productos Agrícolas No Industrializados- Cacao En Grano (*Theobroma Cacao* L.). Especificaciones y Métodos De Prueba. México: Secofi: Secretaría De Comercio Y Fomento Industrial.
- Orfa Nazario; Elizabeth Ordoñez, Yeni Mandujano, Juan Arévalo. 2013. Polifenoles Totales, Antocianinas, Capacidad Antioxidante De Granos Secos y Análisis Sensorial Del Licor De Cacao (*Theobroma Cacao* L.) Criollo Y Siete Clones. Investigación y Amazonía 2013; 3 (1): 51-56
- Pava Sancho D. A. 2016. Eficacia de los métodos de fermentación y secado para optimizar la calidad

- de las almendras de cacao *Theobroma cacao* L. (Examen complejo). UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador
- Pineda R.P., Chica M.J., Echeverri L.F., Ortiz A., Olarte H.H., Riaño N.M. 2012. Influencia de la fermentación y el secado al sol sobre las características del grano de cacao TSH 565 e ICS 60. *Vitae*, vol. 19, núm. 1, Universidad de Antioquia-Medellín, Colombia.
- Prior R.L., Wu X. y Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant Capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.* 53(10): 4290-302.
- Reyes P., Frezia N. 2014. Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante y evaluación sensorial en granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y CCN51 con y sin beneficio. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Perú.
- Rivera C.R., Ordoñez G.E. 2013. Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao. *Revista EI Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva*, Apartado 156. Perú.
- Rufino, MS., Alves, RE., Brito, ES., Morais, SM., Sampaio, CG., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, FD. 2007. Metodología científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. *Comunicado Técnico* 128. Embrapa, Fortaleza, 44(4): 399-408.
- Sanbogi C., Suzuki N., y Sakane T., 1997. Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cellular Immunology*, 177:129-136.
- Singlenton, V., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Oxidants and antioxidants part A. *Methods in Enzymology*. (Vol. 299). USA: Elsevier.
- Villamil P.J., Cala C.T., Ardila H.J. 2009. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. Artículo científico. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Santander.
- Wollgast J., Anklam E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33 (2000) 423-447.
- Zapata Bustamante, Sandra; Tamayo Tenorio, Angélica; Rojano, Benjamín Alberto. 2013. Efecto del Tostado Sobre los Metabolitos Secundarios y la Actividad Antioxidante de Clones de Cacao Colombiano. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, vol. 68, núm. 1, 2015, pp. 7497-7507. Universidad Nacional de Colombia Medellín, Colombia