

Vol. 16(2). 2007



Trabajos aceptados
para su presentación en:

CIBIA VI

VI Congreso Iberoamericano
de Ingeniería en Alimentos
(Mesas Redondas - Ciencia)

La revista ALIMENTOS, CIENCIA E INGENIERÍA es una publicación semestral de Artículos Técnicos y Trabajos de Investigación realizados en la FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS de la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO, así como Publicaciones Científicas de otras Universidades e Instituciones, con las cuales la Facultad mantiene convenios de cooperación mediante el intercambio científico y cultural.

Las contribuciones de la presente publicación son responsabilidad absoluta de los autores.



Universidad Técnica de Ambato
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Rector	Ing. M. Sc. Luis Amoroso Mora
Vicerrector Académico	Dr. M. Sc. Galo Naranjo Lopez
Vicerrector Administrativo	Dr. M. Sc. Remigio Medina Guerra
Decano	Ing. MBA. Danilo Morales Carrasco
Subdecana	Ing. Mg. Gladys Navas Miño
Calificación de trabajos	Ing. M. Sc. Ph. D. Milton Ramos Moya
Organización de Contenidos y Revisión	Ing. M.Sc. Juan de Dios Alvarado
ISSN	1390 - 2180

**LA RELACION TEOBROMINA /CAFEINA ASOCIADA A LA CALIDAD DEL
CACAO ECUATORIANO**

Espín, Susana; Samaniego, Iván; Wakao, Harue; Jiménez, Juan Carlos
INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD

Casilla 17-01-340. E. mail frivera@uio.satnet.net

Palabras claves : cacao, parámetros químicos, metilxantinas, fermentación, teobromina, cafeína

RESUMEN

La finalidad del presente estudio fue la de establecer el contenido y comportamiento de las Metilxantinas: Teobromina y Cafeína en genotipos de cacao ecuatoriano durante la fermentación. Estos componentes dependen del genotipo y están asociados con la formación de los precursores del sabor y aroma durante la fermentación del cacao.

La relación Teobromina vs Cafeína (T/C), evidenció su asociación con el origen genético y geográfico de los cacaos, siendo un importante parámetro de calidad para diferenciar cacao fino del ordinario, factible al comparar los valores obtenidos en materiales Criollos de Venezuela y Forastero procedente de Ghana, utilizados como materiales de referencia.

La identificación y cuantificación simultánea de los compuestos, se realizó utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), en muestras tomadas a diferentes tiempos de fermentación (1 a 6 días)

El proceso de fermentación se realizó bajo condiciones similares para todos los materiales estudiados.

INTRODUCCIÓN

El cacao desde hace más de un siglo, es uno de los productos de consumo más importantes negociado en los mercados internacionales, siendo los países industrializados de las regiones templadas los mayores consumidores. Actualmente existen mercados en desarrollo en otras regiones, particularmente en Asia, Europa Oriental y Latinoamérica.

Desde hace varias décadas, el mercado internacional del cacao ha establecido distinción entre dos amplias categorías de almendras de cacao: las de "Sabor Fino" y "Corriente u Ordinario". Las almendras de cacao de Sabor Fino provienen de los tipos del árbol de cacao Criollo o Trinitario, mientras las segundas se derivan del cacao Forastero. Aún así, hay excepciones a esta generalización. Esto ha hecho que en los últimos años y especialmente en Europa, la demanda industrial de cacao se haya desplazado parcialmente hacia lotes de calidad aromática superior. Sin embargo, obtener cacao de alta calidad exige que se cumpla con una serie de requisitos que se inician con la selección del lugar de siembra y los suelos que lo caracterizan, hasta la aplicación de una tecnología post cosecha adecuada y precisa. Esta calidad se manifiesta a través de las características físicas, organolépticas y químicas de las almendras, siendo estas últimas atributos propios del tipo de cacao o desarrolladas fundamentalmente durante el proceso de fermentación, secado y torrefacción. Dichas características químicas proporcionan información cuantitativa que permiten evaluar el beneficio post cosecha del cacao y caracterizar los diferentes tipos de cacao, pudiendo ser utilizadas como un criterio para evaluar su calidad y diferenciar entre cacaos. De este modo, cada vez se disponen de más criterios objetivos aceptados de calidad para la clasificación del cacao, con la perspectiva futura de seleccionar estándares, diseñar sistemas de control de la calidad del cacao, y transparentar el mercado internacional.

La teobromina y la cafeína constituyen más del 99% del contenido de purinas en la especie *Theobroma cacao*, casi todo el remanente son trazas de teofilina y salsolinol. Estos alcaloides no revelan transformaciones químicas durante la fermentación, pero pierden alrededor del 20 % de la teobromina presente en los cotiledones frescos en el curso de la fermentación por difusión en los tejidos y migración a los tegumentos de las almendras cuyo contenido aumenta considerablemente. Esta pérdida de teobromina es en gran parte responsable de la disminución del amargor de las almendras "bien fermentadas" y es por tanto, responsable del sabor relativamente menos amargo del cacao Criollo que presenta un contenido menor de esta base púrica. (Wakao, 2002). El genotipo y la madurez de la semilla afectan el contenido de alcaloides del cacao.

Biehl y Voight, (1996) aseveran que la astringencia en los granos de cacao es causada por polifenoles y que el sabor amargo es causado por la sinergia de las reacciones entre la teobromina, cafeína y las dicetopiperazinas. Además, la teobromina (3-7-dimetilxantina) y la cafeína (1-3-7-trimetilxantina) estarían más o menos ligadas a los taninos para formar en los cotiledones frescos compuestos complejos relacionados con los atributos de sabor del cacao (Wakao, 2002).

Chevalley en 1976, dio los primeros indicios de que la relación Teobromina / Cafeína (T/C), puede variar de una especie a otra y discriminar el cacao por su origen. Cacaos procedentes de África presentaron menores contenidos de cafeína en relación a los cacaos finos originarios de América con valores de la relación T/C de 39 y de aproximadamente 6 para cacaos producidos en Venezuela, Trinidad y Ecuador.

El presente estudio, a través de la determinación del contenido de teobromina y cafeína, así como mediante el establecimiento de la relación Teobromina/Cafeína (T/C), ha caracterizado varios genotipos de cacao producido en el Ecuador, y determinado un rango de 3,2 a 6,9 de la relación T/C. La relación de estos valores respecto a las muestras referenciales de cacao forastero procedente de Ghana que alcanzó valores de la relación T/C superiores a 10, y de los cacaos criollos producidos en Venezuela que presentaron valores iguales o inferiores a 2 ubican al cacao ecuatoriano dentro del grupo de los cacaos Trinitarios.

Se registran valores expresados en porcentaje de $2,16 \pm 0,24$ para teobromina y $0,38 \pm 0,04$ de cafeína en cacaos procedente de fincas comerciales, mientras que $2,25 \pm 0,22$ de teobromina y $0,44 \pm 0,06$ de cafeína corresponden a los clones locales de cacao fino. La muestra referencial de Ghana enviada por la Guittard Chocolate Company de USA, durante tres años consecutivos, registró un valor medio de 2,45% de teobromina, 0,25% de cafeína y 9,91 como valor de la relación teobromina /cafeína.

C2. PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MATERIALES Y METODOS

Los materiales en estudio se agruparon de la siguiente manera:

- Muestras de cacao Nacional, provenientes de fincas comerciales: Voluntad de Dios (Provincia del Guayas), Santa Lucía (Provincia de Bolívar), La Gloria y las Brisas (Provincia de Manabí)
- Genotipos de cacao fino de las colectas existentes en la Estación Experimental Tropical de Pichilingue del INIAP (Provincia de los Ríos): EET-62, EET103, EET95, CCAT 1119, CCAT 4675, CCAT 2664
- Otros clones de cacao: EET400, IMC 67, ICS-95 y el CCN51
- Muestras referenciales: Cacao Ordinario procedente de Ghana y proporcionada por la Guittard Chocolate Company de USA y de Cacao Guasare Criollo Venezolano

Todas las muestras fueron sometidas al proceso de fermentación, en la planta de beneficio de la Estación Experimental Tropical de Pichilingue. Se aplicó la técnica de microfermentaciones realizadas en cajas de laurel de 60x60x60 cm de alto, ancho y profundidad respectivamente, con una remoción a las 48 horas. Los días de fermentación establecidos fueron 5 días para el cacao fino y 6 días para los otros clones. Se tomaron muestras cada 24 horas durante el proceso de fermentación aplicable para todos los materiales en estudio. El secado se realizó de manera natural al sol, hasta obtener una humedad de aproximadamente 7 %.

Posteriormente estas muestras fueron remitidas a los laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Santa Catalina en Quito para la ejecución de los análisis químicos respectivos

Preparación de muestras.- Aproximadamente 500g de muestras de almendras de cacao fermentadas, no fermentadas y secas receptadas en el laboratorio, fueron codificadas, homogenizadas y aplicando la técnica del cuarteo se obtuvo una submuestra de 250 g a ser utilizada para los análisis químicos respectivos. El resto de la muestra se la almacenó en recipientes herméticos en un congelador a -18°C.

Posteriormente, las submuestras obtenidas, siguieron el siguiente proceso:

- Separación manual de la cascarrilla.
- Molienda de las almendras en un molino de café de doble hélice, utilizando nitrógeno líquido.
- Separación de partículas de 42 y 100 mesh, utilizando un tamiz.
- Desengrasado de muestras.
- Almacenamiento de muestras molidas y desengrasadas en recipientes plásticos y de vidrio respectivamente muy herméticos en un congelador a -18°C, cuando los análisis no fueron posibles ejecutarlos de manera inmediata.

El análisis de la cafeína y teobromina, se realizó extrayendo en medio acuoso los alcaloides de una muestra de cacao previamente molida y desengrasada, posteriormente estos alcaloides fueron separados, identificados y cuantificados a través de un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución Agilent 1100, provisto de una columna de fase reversa C₁₈ ODS II (150 x 4,6 mm I.D) precolumna del mismo material (10x 4,6 mm I.D) detector UV/VIS a 273 nm. Una solución del 25% de metanol en agua (v/v) con un flujo

de 1 ml / minuto fue utilizada como fase móvil bajo condiciones isocráticas de elusión.

El método utilizado fue previamente estandarizado y validado, con base en los procedimientos descritos en el Método Oficial 980.14 de la AOAC, su modificación realizada por Janick y Paiva, así como en el método definido por Caperos y Girard, del laboratorio Cantonal de Neuchatel –Suiza.

RESULTADOS

Las Figuras 1 y 2 muestran el comportamiento de la cafeína y teobromina durante la fermentación por grupos de cacao. Se observó que existe una disminución del contenido inicial independiente del tipo de cacao estudiado, determinando que los genotipos considerados dentro de la categoría de los clones de cacao fino y los otros clones pierden un 17 % de la concentración de teobromina, mientras que las muestras de cacao provenientes de las fincas comerciales disminuyen un 15%

Respecto a la cafeína se identificó una disminución del 12,69, 14 y 18 % para clones locales de cacao fino, procedentes de fincas comerciales y otros clones.

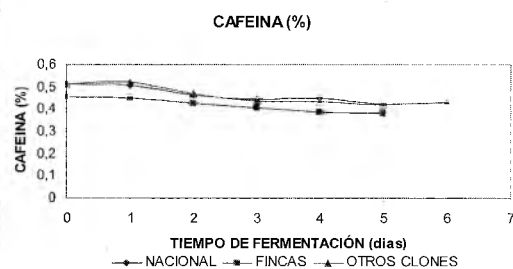


Figura 1. Comportamiento de la cafeína durante la fermentación en cacao ecuatoriano

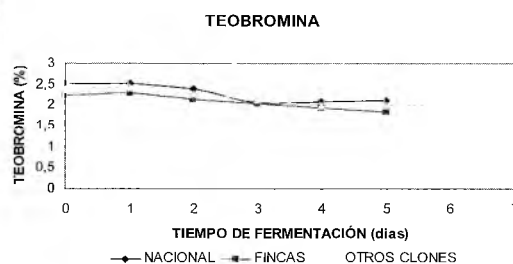


Figura 2. Curvas de evolución de la teobromina durante la fermentación en cacao ecuatoriano

No se visualiza un patrón de comportamiento que permita discriminar entre tipos de cacao a través de estas variables de manera independiente. El menor contenido de cafeína antes y después de la fermentación registra el clon CCN-51 (0,326%) lo cual es característico de los cacaos Forasteros, mientras que la mayor concentración muestra el clon ICS-95 (0,556%)

Relación Teobromina / Cafeína

Al establecer el análisis de variancia para la relación Teobromina / Cafeína, (T/C) se identificó que los genotipos se diferenciaron al nivel del 1%, no detectando diferencias estadísticas entre genotipos y tiempos de fermentación. El promedio general de la relación T/C fue de 5,06, con un coeficiente de variación de 14,58%.

Tabla 1. Valores de la relación Teobromina / Cafeína (T/C) en 14 genotipos de cacao ecuatoriano durante la fermentación

Genotipo	Días de fermentación						
	0	1	2	3	4	5	6
EET 95	5,1	5,2	5,2	5,3	5,2	5,2	
EET 103	5,4	5,3	6,1	5,2	5,0	6,0	
EET 62	4,6	4,9	4,9	4,5	4,4	4,4	
CCAT 1119	4,7	5,1	4,8	4,5	5,2	4,9	
CCAT 2664	3,9	4,0	4,0	3,8	3,6	3,6	
CAT 4675	5,7	6,0	6,0	6,1	5,9	5,7	
La Gloria	5,3	5,0	5,0	4,7	4,9	4,9	
Las Brisas	4,5	4,6	4,6	4,7	4,4	4,4	
Vol.de Dios	4,7	5,1	4,9	4,9	4,9	5,0	
Santa Lucía	5,4	5,6	5,8	5,7	5,6	5,6	
IMC 67	5,5	5,0	5,1	5,3	5,1	5,3	5,2
ICS 95	3,2	3,3	3,5	3,7	3,4	3,4	3,5
EET 400	4,5	4,4	4,7	4,7	4,5	4,7	4,6
CCN 51	6,7	7,0	7,2	6,8	6,7	6,7	6,9

Los valores registrados en el Cuadro 1, indican que la relación T/C de los materiales cultivados en el Ecuador, se distribuyen en el rango de 3,2 a 6,9 cuyos valores extremos corresponden a los cacaos ICS 95 y CCN51 respectivamente. Al relacionar los orígenes de estos materiales, se conoce que el primero dispone de una base genética que le acerca a los cacaos Criollos mientras que el segundo muestra sus orígenes de cacao Forastero; esta particularidad constituye la base de la importancia de los valores de la relación T/C como un instrumento para diferenciar cacaos por el origen y factible entre cacao fino del ordinario. De igual manera, los valores referenciales de la relación T/C obtenidos en el desarrollo del presente estudio en cacaos ordinarios procedentes de Ghana cercanos a 10 y de cacaos criollos procedentes de Venezuela iguales o menores a 2, indican que la mayor parte del cacao ecuatoriano se ubica dentro de un grupo intermedio, como resultado de la mezcla o hibridación del cacao Nacional con otros materiales genéticos.

Según Davrieux y Cros 2004, acorde al rango determinado de la T/C en cacaos ecuatorianos, estos se ubican en el grupo de los cacaos Trinitarios.

La Figura 3, incorpora datos correspondientes a cacao criollo venezolano y la muestra de referencia proveniente de Ghana, observando claramente la dispersión de los valores de la relación T/C de estos materiales, respecto al conjunto de materiales provenientes del Ecuador, también se advierte como la concentración de la cafeína es determinante en la definición del valor de la relación T/C,

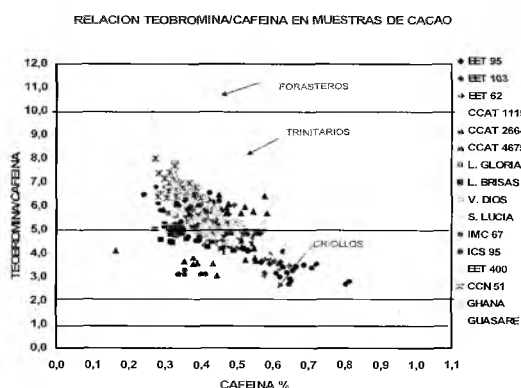


Figura 3. Distribución de los genotipos de cacao en relación al contenido de metil xantinas

CONCLUSIONES

En vista de que las concentraciones de las metilxantinas, teobromina y cafeína no permiten diferenciar entre tipos de cacaos, se determinó la relación Teobromina/Cafeína (T/C) cuyos valores se muestran constantes durante el proceso de fermentación, lo que permite hacer uso de la misma en cualquier etapa del proceso post cosecha del cacao. Además es útil para discriminar cacao por su origen, teniendo como base el contenido de cafeína que varía de acuerdo al genotipo, siendo alto en cacaos criollos, 1,58% determinado en cacao Guasare de Venezuela, y bajo para el caso del cacao ordinario proveniente de Ghana con 0,26% mientras que los cacaos ecuatorianos presentan un valor medio de 0,41% de cafeína; esto determina que los cacaos criollos presentan valores bajos de la relación T/C a diferencia de los cacaos ordinarios o forasteros que presentan valores iguales o superiores a 10.

El cacao ecuatoriano despliega valores de la relación T/C en un rango de 3 a 7 aproximadamente, dependiendo del grado de hibridación o mezcla que presente. El cacao CCN51 presentó el valor más alto (6,9) particular que le diferencia de los clones de cacao fino de aroma

AGRADECIMIENTOS.

Nuestros reconocimientos al Common Fund for Commodities de la Unión Europea, por el financiamiento de esta actividad parte del Proyecto CFC/ICCO/006. Al Dr. Edwards Segwine de la Guittard Chocolate Company de USA y al Ldo. Alexis Zambrano del INIA, Mérida, Venezuela, por el envío de muestras referenciales.

BIBLIOGRAFÍA

- Biehl, B., Voigt, J. 1996. Biochemistry of chocolate flavour precursors. International Cocoa Research Conference, 2thBahia november 17-23. 1996. (proceedings). Pp. 929-938.
- Bucheli, P, Rosseau, G., Alvarez, M., Laloi., Mccarthy, J. 2001. Development Variation of Sugars, Carboxylic Acids, Purine Alkaloids, fatty Acids, and Endoproteinase Activity during maturation of *Theobroma cacao* L. Seeds. Journal of Agriculture Food Chemical. Francia. 49 (10): 5046-5051.
- Caperos, J, et Girard, J. 2000. Manuel assurance qualité, "Dosage des sucres par HPLC", Laboratoire Cantonal Neuchatel, Suiza
- Cros, E.2000. Factores condicionantes de la calidad del cacao. Congreso Venezolano del Cacao y su industria, 1er. Maracaay,. (memoria). Pp. 301-310.
- Chevalley, J; 1991. Theobromine and caffeine content of cocoa beans from different botanical and geographical origins, Second International Congreso on cocoa and chocolat. Munich.Nestle LTD. Agricultural Services. p.31-32
- Davrieux, F; Assemat, S; Boulanger, R; Cros, E. 2004. Determinación de cocoa purine content by near infrared spectroscopy. XIV International conference of investigation of cocoa. Ghana, Poster presentation
- Espín, S. y Wakao, H. 2001. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in cocoa beans by HPLC UV detector. Procedures for chemical analysis homologation. Procedimiento Normalizado. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad. Quito, Ecuador
- Enriquez, G. 1982. La cura o beneficio del cacao. Boletín Divulgativo del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Ecuador Pp. 96.
- Jean Jean, N. "Influence du genotype, de la fermentation et de la torrefaction duo le developpement de l'arome cacao" These pour obtenir le diplome de Doctorat. Universite Mompellier II Sciences et Technicus du languedoc, , p. 144.
- Wakao, H. 2002. Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional durante el proceso de beneficio, Tesis: Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito.