

Efecto de la fermentación sobre el contenido de purinas en cacao Criollo e Híbrido (*Theobroma cacao* L.) del Sur del Lago de Maracaibo

Effect of the fermentation on the content of purines in Creole and hybrid cocoa (*Theobroma cocoa* L.) in the south of Maracaibo's lake

E. Portillo¹, D. Fuenmayor², B. Rodríguez² y R. Díaz²

¹Departamento de Agronomía. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. ²Fundacite Zulia. Asistente de laboratorio.

Resumen

Con la finalidad de evaluar el efecto de la fermentación sobre el contenido de purinas en cacao Criollo e Híbrido del Sur del Lago de Maracaibo, se realizó un ensayo, en el cual las almendras fueron fermentadas por cuatro días, luego secadas al sol, descascarilladas, congeladas y molidas. Las purinas se determinaron por cromatografía líquida en una columna C18 en fase reversa y una solución al 20% v/v metanol: agua como fase móvil. El contenido de teobromina y cafeína disminuyó durante la fermentación para los dos tipos de cacao. El contenido de teobromina fue menor en el cacao criollo. Así mismo la relación teobromina: cafeína fue inferior para los cacaos tipos Criollo, indicando que estos son menos amargos que los híbridos.

Palabras clave: Cacao, *Theobroma cacao* L., fermentación, purinas.

Abstract

With the purpose of evaluating the effect of the fermentation on the purines content in Creole and hybrid cocoa from the South of the Maracaibo's Lake, an essay was performed, where the almonds were fermented for four days, then sun dried, chipped, frozen and ground. The purines content was determined by using liquid chromatography in a column C18 reverse phase and a 20 % v/v methanol: water solution as the mobile phase. The content of theobromine in cocoa caffeine decreased during the fermentation for both types of cocoa. The content of theobromine in Creole cocoa was low than in the hybrids type. Likewise, the relation theobromine: caffeine was low for the Creole types, means that is it less bitter than the hybrids types.

Key words: Cocoa, *Theobroma cacao* L., fermentation, purines.

Recibido el 30-6-2010 • Aceptado el 5-9-2011

Autor de correspondencia e-mail: elvisportillo@hotmail.com; belkis1002@hotmail.com

Introducción

El Zulia y en especial el Sur del Lago de Maracaibo, ha sido señalada por algunos autores (Leal y Valderrama, 1997) como la primera región donde se inició la producción de cacao en Venezuela. Esta región se ha caracterizado por producir cacao del tipo criollo (Porcelana, Mérida, Guasare, San Juan, entre otros), de alta calidad que se distingue por su aroma, e híbridos, los cuales han sido de gran importancia y se han destacado por su demanda en los mercados nacionales e internacionales. (Portillo *et al.*, 2009).

La calidad de las almendras de cacao depende de algunos factores, tales como el genotipo, el manejo agronómico, las características de suelo, las condiciones climáticas y lo más importante la tecnología poscosecha. En este sentido, la calidad de las almendras de cacao, en cuanto al sabor, aroma, dependerán de la experiencia y el buen cuidado que tenga el técnico encargado de su producción y manejo. (Brunetto *et al.*, 2009).

El manejo poscosecha del cacao, denominado beneficio, constituye un aspecto de máxima importancia que permite presentar al mercado un producto de calidad, garantizando que el grano sea, apetecido por la industria y asegure su comercialización, justificando un mejor precio (Pinzón *et al.*, 2008).

La fermentación es el paso fundamental en el beneficio del cacao. En este proceso se desarrolla el sabor y el aroma del producto y contribuye a formar un grano hinchado, de color marrón y de buena apariencia.

Introduction

Zulia, especially in the south of Maracaibo's Lake, has been recognized by some authors (Leal and Valderrama, 1997) as the first region where the production of cacao in Venezuela started. This region is characterized by producing cacao of the Creole type (Porcelana, Mérida, Guasare, San Juan, among others), of high quality that distinguish by its aroma, and hybrids, which have been of great importance and have been highlighted by their demand on the national and international markets (Portillo *et al.*, 2009).

The quantity of cacao almonds depends on some factors, such as, the genotype, the agronomic handle, the characteristics of the soil, the climatic conditions and the most important aspect, the post-harvest technology. On this matter, the quality of the cacao almonds, regarding taste, aroma, will depend on the experience and good care that the technician in charge have in the production and handle of it (Brunetto *et al.*, 2009).

The post-harvest handle of cacao, known as benefit, constitutes an aspect of great importance that allow presenting to the market a product with quality, guaranteeing that the grain be tempting for the industry and assures its commercialization, justifying a better price (Pinzón *et al.*, 2008).

Fermentation is the main step in the benefit of the cacao. In this process develops the taste and aroma of the product, and contributes to form a swollen grain, with a brown color and good appearance.

Una adecuada fermentación da origen a un cacao que al ser convertido en chocolate, es agradable al paladar y al olfato; por el contrario un manejo inadecuado de este proceso, puede desmeritar el producto de manera notable (Pinzón *et al.*, 2008).

La fermentación, también llamada cura del cacao o avinagrada, es un proceso complejo que consiste en una serie de cambios de carácter bioquímicos y físico en todas las estructuras del grano, tanto en la testa o cascarilla, en el mucílago que lo cubre, el interior del cotiledón y en el embrión que debe morir y reabsorberse. El proceso implica la ocurrencia de reacciones químicas mediante las cuales las metilxantinas (teobromina, cafeína) se van transformando (Pinzón *et al.*, 2008).

Con el objetivo de aportar conocimientos sobre las propiedades del cacao venezolano, se ha iniciado un estudio relacionado con la evaluación del contenido de metilxantinas (teobromina, cafeína) en las almendras de cacao producidas en el Sur del Lago de Maracaibo, en función del genotipo y su efecto sobre el sabor. El objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto de la fermentación sobre el contenido de las purinas en cacao criollo e híbrido del Sur del Lago utilizando cromatografía líquida de alta resolución.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se seleccionaron dos tipos de cacao (criollos e híbridos), de la región Sur del Lago de Maracaibo-estado Zulia; específicamente en el Centro

An adequate fermentation originates a cacao that once processed to chocolate, taste good and smells nicely; on the other hand, an inadequate handle of this process might demerit the product considerably (Pinzón *et al.* 2008)

Fermentation, also called cure of vinegared of the cacao, is a complex process that consist on a couple of biochemical and physical changes in all the structures of the grain, in both the head or rind, and the mucilage that covers it, the interior of the cotyledon and the embryo that must die and reabsorb. The process implies the occurrence of chemical reactions through methynxanthines (theobromine and caffeine) that transform (Pinzón *et al.* 2008).

With the aim providing information about Venezuelan cacao, a study has initiated related to the evaluation of the methylxanthines content (theobromine and caffeine) in the almonds of cacao produced in the south of Maracaibo's Lake, in function of the genotype and its effect on taste. The objective of this research was to study the effect of fermentation on the purines content in Creole and hybrid cacao in the south of Maracaibo's Lake, using liquid chromatography of high resolution.

Materials and methods

Vegetal matter

Two types of cacao were selected (creole and hybrids) from the south region of the Maracaibo's lake, Zulia state, specifically from the Socialist Center of Investigation and development of Cacao (CESID – Cacao),

Socialista de Investigación y Desarrollo del Cacao (CESID-Cacao) perteneciente a CORPOZULIA, situada en la Parroquia EL Moralito, municipio Colón del Estado Zulia. La misma presenta un clima de bosque húmedo tropical, está ubicada 8° 43' 27" al norte y 71° 44' 33" por el oeste, altitud de 50 msnm, las precipitaciones anuales promedio 1738 mm, humedad 83% y la temperatura media es de 26,8°C.

Una vez realizada la selección se cosecharon las mazorcas, se desgranaron y se procedió al proceso de fermentación. Las muestras de cacao criollo fueron fermentadas por un tiempo de 0 a 96 h (4 días) mientras que para el cacao híbrido, el tiempo de fermentación varió de 0 a 120 h (5 días), durante el proceso de fermentación la remoción de la masa se realizó cada 24 horas. 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°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 µm y de esta manera obtener las muestras de cacao (polvo) para ser analizadas.

Extracción de las metilxantinas:

Una mezcla conformada por 0,3 g de muestras de cacao en polvo y 80 mL de agua se sometió a un proceso de extracción a reflujo durante 30 min con el fin de extraer las metilxantinas a ser analizadas. Después de dejarla

that belongs to CORPOZULIA, located at El Moralito parish, Colón, Zulia state. The area has a wet tropical forest, located at 8° 43' 27" at the north and 71° 44' 33" in the west, with an altitude of 50 masl, the annual average precipitations are 1738 mm, humidity 83% and mean temperature of 26.8°C.

Once done the selection, cobs were cropped, shelled and fermented. Samples of creole cacao were fermented for 0 to 96 h (4 days) while in the hybrid cacao, the fermentation time varied from 0 to 120 h (5 days) during the fermentation process, the mass removal was done every 24 hours. Once fermented and dried the almonds, were stored in fabric bags and taken to the laboratory of Food Technology of the Agronomy Faculty, Universidad del Zulia, where were frozen at -82°C until the analysis. Subsequently, almonds were derailed and frozen with liquid nitrogen, then were ground and sift in 0.5 µm, to obtain cacao samples (powder) to be analyzed.

Extraction of Methylxanthines:

A mix formed by 0.3 g of cacao samples and 80 mL of water were submitted to a process of extraction for 30 min with the aim of extracting methylxanthines to be analyzed. After letting them cool, the mix was filtered at vacuum with glass wool and celite. Later, the filtered mix was taken to a balloon of 50m mL, assessed with distilled water. Then, was filtered with Millipore® filters of 0.45 µm (hydrophilic), bottling them in vials to be injected in the HPLC equipment.

Instrumentation and chromatographic conditions

A liquid chromatography

enfriar, la mezcla se filtró al vacío con lana de vidrio y celite. Posteriormente el filtrado se transfirió a un balón de 250 mL se aforó con agua con agua destilada. Luego se filtró con filtros Millipore® de 0,45 µm (hidrofilicos), envasándolo en viales para ser inyectados en el equipo HPLC.

Instrumentación y condiciones cromatográficas

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) modular (DIONEX, modelo Ultimate 3000, Estados Unidos), equipado con un inyector automático de volumen ajustable, una bomba cuaternaria para impulsar la fase móvil y un detector de arreglo de diodos UV (PDA).

La separación de los analitos se realizó empleando un sistema isocrático con una columna C18 (DIONEX, Aclaim® 120) mantenida en un horno a una temperatura de 40°C, utilizando un volumen de inyección de 20 µL, y una fase móvil compuesta por una solución al 20% (v/v) de metanol:agua, filtrada a través de membranas Millipore® y desgasificada empleando un baño ultrasónico, a una velocidad de flujo de 0,250 mL.min⁻¹ y la detección se realizó a una longitud de onda de 274 nm. El tiempo de corrida fue de 10 min. Los datos fueron obtenidos, almacenados y analizados usando un computador PC Pentium IV empleando un Software Chromeleon.

Procesamiento de los datos

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 1999), mediante un análisis de varianza; al detectar diferencias significativas (P<0.05), se rea-

equipment of high modular resolution (HPLC) was used (DIONEX, Ultimate 3000 model, United States), equipped with an automatic injector of adjustable volume, with a quarter bomb to impulse the movable phase and a diode detector UV (PDA).

The separation of analites was done employing an isocratic system with a C18 column (DIONEX, Aclaim® 120) kept in an oven at a temperature of 40°C, using an injection volume of 20 µL and a movable phase composed by a solution at 20% (v/v) of methanol:water, filtered with Millipore® membranes and deaerated, employing an ultrasonic bain, at a flow velocity of 0.250 mL.min⁻¹, the detection was done at a flow longitude of 274 nm for 10 min. The information was obtained, stored and analyzed using a Pentium PC IV computer, employing the Chromeleon software.

Processing of information

The information was analysed with the statistic software SAS (Statistical Analysis System, 1999), using the variance analysis, when detecting significant differences (P<0.05), a mean separation was done using the Tukey test.

Results and discussion

The purine content for all types of cacao reduces during the fermentation process (Bonvehi 2000; Naik 2001).

Figures 1 and 2 show a chromatographic profile of purines (theobromine and caffeine) of the analyzed samples, where can be seen the elution order or analites.

lizó una separación de medias mediante el test de Tukey.

Resultados y discusión

El contenido de purinas para todos los tipos de cacao disminuye durante el proceso de fermentación (Bonvehi 2000; Naik 2001).

Las figuras 1 y 2 muestran un perfil cromatográfico de las purinas (teobromina y cafeína), de las muestras analizadas, de las muestras analizadas, en donde se observa el orden de elución de los analitos. La teobromina (TR: 3,48 min) eluyó en primer lugar y la cafeína posteriormente (TR: 8,44 min). Los coeficientes de correlación lineal resultaron superiores a 0,99 para las purinas estudiadas.

El análisis de varianza determinó que el contenido de purinas fue afectado por el tipo de cacao como por el tiempo de fermentación ($P < 0,05$). Las pruebas de media en función del tipo de cacao mostraron que el contenido de teobromina fue menor en las muestras de cacao Criollo, mientras que los resultados opuestos se observaron para el contenido de cafeína (cuadro 1). Estos valores coinciden con los resultados reportados por Portillo *et al.* (2009) y se encuentra entre los valores establecidos por Davrieux *et al.* (2005).

También se observó que a medida que transcurrió el tiempo de fermentación, los contenidos de teobromina y cafeína disminuyeron, independientemente del tipo de cacao. Este comportamiento también ha sido observado por otros investigadores (Naik, 2001; Bonvehi, 2000). Los re-

Theobromine (TR: 3.48 min) eluded firstly and the caffeine later (TR: 8.44 min). The coefficients of lineal correlation resulted superiors at 0.99 for the studied purines.

The variance analysis determined that the purine content was affected by the type of cacao as well as for the fermentation time ($P < 0.05$). Mean test in function of the types of cacao showed that the content of theobromine was lower in samples of Creole cacao, while, opposite results were observed for the caffeine content (table 1). These values agree to the results reported by Portillo *et al.* (2009) and are found within the established values by Davrieux *et al.* (2005).

It was also observed that at the time that happen the fermentation, the contents of theobromine and caffeine reduced, independently of the types of cacao. This behavior has also been observed by other researchers (Naik 2001; Bonvehi 2000). The results are shown on table 2, where can be seen that the highest values of both purines were obtained at 0 hours, that is, at the beginning of the fermentation process, corroborating the reported in the literature (Davrieux *et al.*, 2005).

It is noteworthy that there is a slight variation of purines during the fermentation process for samples of creole cacao and hybrids, this corroborates that the high permeability of the head of the cacao grain during the first day of fermentation may not have a significant influence in the reduction of xanthenes levels, because during this period, the structure of the grain

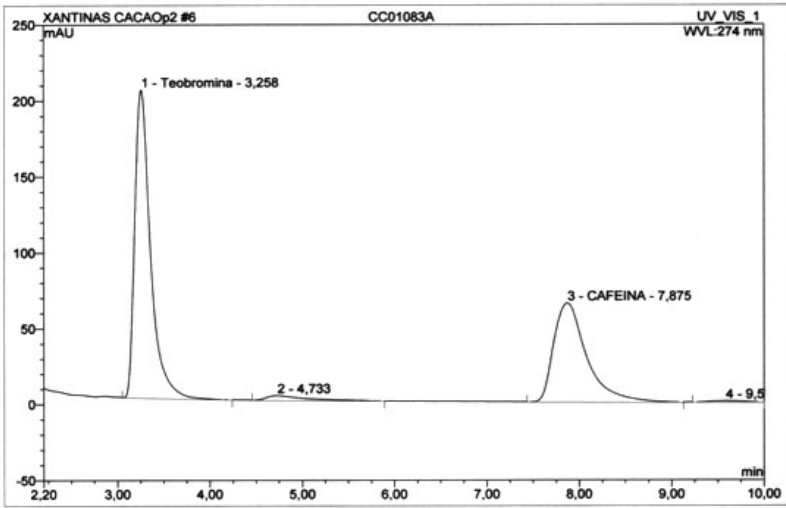


Figura 1. Perfil cromatográfico de las purinas presentes en el cacao Criollo.

Figure 1. Chromatographic profile of the purines present in Creole cacao.

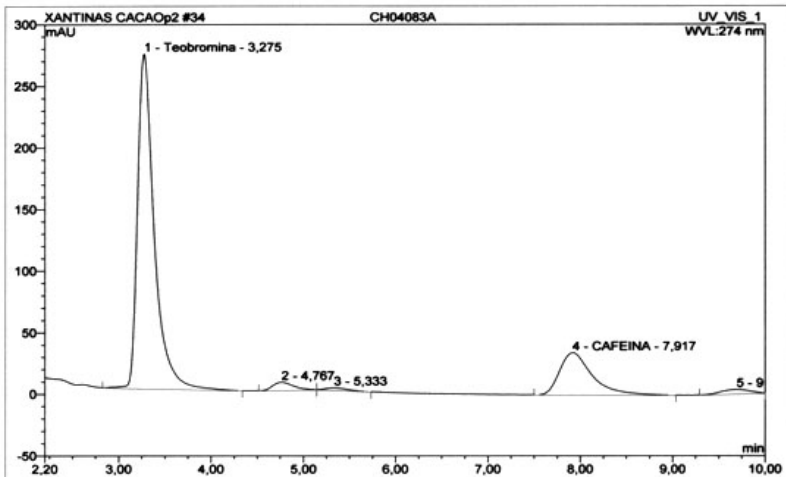


Figura 2. Perfil cromatográfico de las purinas presentes en el cacao Híbrido.

Figure 2. Chromatographic profile of purines present in Hybrid cacao.

Cuadro 1. Contenido de purinas en función del tipo de cacao.**Table 1. Content of purines in function of the types of cacao.**

Tipo de cacao	Teobromina ¹ %	Cafeína ¹ %
Criollo	0,59 ^b	0,48 ^a
Hibrido	0,91 ^a	0,35 ^b

¹Valores expresados en Porcentaje

Medias de valores con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

^aUn nivel del 5%.

sultados se muestran en el cuadro 2. En el mismo se puede observar que los valores más altos de ambas purinas se obtuvieron a las 0 horas, es decir, al inicio del proceso de fermentación corroborando lo que se ha reportado en la literatura (Davrieux *et al.*, 2005).

Es importante destacar que hay una ligera variación de la purinas durante el proceso de fermentación

is not broken yet and alkaloids cannot penetrate the head (Lambert and Aitken, 2000). However, this behavior may be explained since the first days of fermentation, the pulp of the cacao seeds has not been eliminated yet.

Conclusions

The HPLC technique resulted versatile and useful for determining

Cuadro 2. Efecto del tiempo de fermentación sobre el contenido de purinas en cacao.

Table 2. Effect of the fermentation time on the content of cacao purines.

Tiempo de fermentación(h)	Teobromina ¹ %	Cafeína ¹ %
0	0,81 ^{ab}	0,53 ^a
24	0,79 ^{abc}	0,47 ^{ab}
48	0,65 ^{bc}	0,41 ^{abc}
72	0,65 ^{bc}	0,42 ^{abc}
96	0,60 ^c	0,38 ^{bc}
120	0,85 ^a	0,32 ^c

¹Valores expresados en Porcentaje

Medias de valores con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas

^aUn nivel del 5%.

para las muestras de cacao criollos e híbridos, esto corrobora que la alta permeabilidad de la testa del grano de cacao durante los primeros días de fermentación puede no tener influencia significativa en la reducción de los niveles de xantinas, porque durante este período la estructura del grano no está aún rota y los alcaloides no pueden penetrar la testa aún (Lambert y Aitken, 2000). Sin embargo, este comportamiento puede ser explicado dado que durante los primeros días de fermentación, la pulpa de las semillas de cacao no ha sido eliminada.

Conclusiones

La técnica HPLC resulto versátil y útil para la determinación del contenido de metilxantinas, debido a que permitió analizar una gran número de muestras por día.

El tiempo de fermentación es uno de los factores más importantes en la evolución y concentración de purinas en cacao, independientemente del tipo de cacao evaluado.

La relación teobromina: cafeína, es determinante al momento de conocer el tipo de cacao, ya que mientras más baja sea esta, el cacao será de tipo criollo. En el caso contrario será híbrido o forastero.

Literatura citada

Bonvehi, J.S. y F. Ventura. 2000. Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder. *Eur. Food Res. Technol.* 210: 189-195.

the content of methylxanthines, because allowed analyzing a great number of samples per day.

The fermentation time is one of the most important factors in the evolution and concentration of purines in cacao, independently of the type of cacao evaluated.

The relation theobromine:caffeine, is determining at the moment of knowing the type of cacao, since the lower it is, the cacao will be Creole. On the opposite case, it will be hybrid or foreigner.

End of english version

Brunetto, M., L. Gutiérrez, Y. Delgado, M. Gallignani., A. Zambrano, A. Gómez, G. Ramos y C. Romero. 2009. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Rev. Food Chemistry.* 100:459-467.

Davrieux, F., S. Assemat, D. Sukha, E. Portillo, R. Boulanger, D. Bastianelli y E. Cross. 2005. Genotype characterization of cocoa into genetic groups through caffeine and theobromine content predicted by NIRS. 12th Inter. Conf on NIRS, 14-19 abril, Auckland (New Zealand), sous presse.

Lambert, S y W. Aitken. 2000. Possible influence of cocoa vein testa characteristics on the flavor quality of fermented cocoa beans. 13th International Cocoa Research Conference, October 9-14.

Leal, F y E. Valderrama. 1997. "Origen del cacao en Venezuela". *Memorias del 1^{er} congreso Venezolano del Cacao y su industria.* Maracay. Noviembre. 87-88.

- Naik, J.P. 2001. Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products *J. Agric. Food Chem.* 49: 3579-3583.
- Pinzón, J., J. Ardila y F. Rojas. 2008. Guía Técnica para el Cultivo del Cacao. Tercera Edición. 152-164.
- Portillo, E., L. Graziani, E. Cros, F. Davrieux, S. Assemat, R. Boulanger, M. Labarca y M. Marcano. 2009. Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista UDO Agrícola* 9 (2): 458-468.
- SAS, Institute, Inc. 1999. SAS User's guide: Statistics. Version 8, Cary, NC, USA. SAS Institute Inc.