

Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao L*) del clon CCN-51.

Influence of fermentation and drying processes in the aroma precursor compounds of cocoa beans (*Theobroma cacao L*) CCN-51.

Impacto das condições de beneficiamento sobre os compostos precursores de aroma em grãos de cacau (*Theobroma cacao L*) do clone CCN-51.

Andrea Pallares-Pallares¹, Janeth Aidé Perea-Villamil², Luis Javier López-Giraldo³

Forma de citar: A. Pallares-Pallares, J.A. Perea-Villamil, L.J. López-Giraldo, "Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao L*) del clon CCN-51", *Resuestas*, vol. 21, no. 1, pp. 120-133, 2016.

Recibido:

Junio 22 de 2015

Aceptado:

Octubre 29 de 2015

Resumen

Se evaluó el efecto de los días de fermentación y secado sobre la evolución de los compuestos de aroma (volátiles) en la variedad de cacao CCN-51. El método empleado fue la Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas, en combinación con Micro Extracción en Fase Sólida de Espacio de Cabeza (HS-SPME-GC-MS). Para los análisis se construyó un diseño experimental factorial multinivel, con un total de 15 experimentos/muestreo. Durante el beneficio se aplicó el método de microfermentación en cajón y el secado se hizo por exposición directa al sol. El Análisis de Componentes Principales (PCA) permitió explicar un 68% de la varianza total asociada con las características de aroma (compuestos volátiles). El proceso de beneficio fue dividido en etapas de acuerdo con el grado de fermentación. Se identificaron, a lo largo del beneficio compuestos precursores de aroma deseables e indeseables. Entre los compuestos deseables se identificaron, entre otros, el 3-metil-1-butanol, 2-fenil etanol, benzaldehído, fenil acetaldehído, etilhexanoato, etil benzoato, etilfenil acetato y 2-fenil etil acetato, los cuales aportan notas odoríficas muy agradables (chocolate, caramelo, dulce, nuez, miel, frutal, floral). Finalmente, se propuso un método alternativo de beneficio, que incorpora un pretratamiento del clon CCN-51 y que arroja evidencia preliminar de mejoría en lo que respecta a los componentes precursores del aroma.

Palabras clave: Análisis de componentes principales, beneficio, cacao, CCN-51, compuestos volátiles, cromatografía de gases-masas.

Abstract

The influence of the days of fermentation and drying in the aroma compounds (volatile fraction) of cocoa beans CCN-51 was evaluated. The method used was Gas Chromatography-Mass Spectrometry, coupled to Head Space Solid Phase Micro Extraction (HS-SPME-GC-GS). A multifactorial experimental design was created, containing 15 experiments per repetition. The fermentation technique was microfermentation in boxes, while drying was achieved by exposing the samples to the sun. A Principal Component Analysis (PCA) allowed to explain 68% of the total variability associated with aroma characteristics (volatile compounds). Both, desirable and undesirable compounds were identified throughout the processes of fermentation and drying. The benefit process (fermentation and drying) was divided in stages depending on the degree of fermentation. The desirable compounds identified were: 3-methyl-1-butanol, 2-phenyl-ethanol, benzaldehyde, phenyl acetaldehyde, ethylhexanoate, ethyl benzoate, ethylphenyl acetate and 2-phenyl ethyl acetate, which are associated with odoriferous notes very nice (chocolate, candy, sweet,

¹Magister in Food Technology
andrepallares@gmail.com
Orcid: 0000-0002-9052-9738
Universidad Industrial de
Santander
Bucaramanga, Colombia

²Doctora en Química
aperea@uis.edu.co
Orcid: 0000-0002-9804-0793
Escuela de Química, Grupo
de Investigación - CICTA,
Universidad Industrial de
Santander
Bucaramanga, Colombia

³Doctor en Química Bioquímica
y Ciencia de Alimentos
ljlopez@uis.edu.co
Orcid: 0000-0001-9267-7016
Escuela de Ingeniería Química,
Grupo de Investigación - CICTA,
Universidad Industrial de
Santander
Bucaramanga, Colombia

nuty, honey, fruity, floral). Finally, a pre-treatment of cocoa beans CCN-51 prior to fermentation was proposed to be incorporated during the benefit of the beans as it seems to enhance the formation of desirable aroma compounds.

Keywords: Principal component analysis, fermentation, drying, cocoa, CCN-51, volatile compounds, gas chromatography-gas spectrometry.

Resumo

Avaliou-se o efeito dos dias de fermentação de secado sobre a evolução dos compostos de aroma (voláteis) na variedade de cacau CCN-51. O método empregado foi a Cromatografia de Gases-Espectrometria de Massas, em combinação com Micro-Extração em Fase Sólida tipo Headspace (HS-SPME-GC-MS). Para análise se construiu um delineamento experimental fatorial multinível, com um total de 15 experimentos/amostragem. Durante o beneficiamento se aplicou o método de micro-fermentação em caixa e o secado se fez por exposição direta ao sol. O Análise de Componentes Principais (PCA) permitiu explicar um 68% da variância total associada com as características de aroma (compostos voláteis). O processo de beneficiamento foi dividido em etapas de acordo com o grau de fermentação. Identificaram-se, ao longo do beneficiamento compostos precursores de aroma desejáveis e indesejáveis. Entre os compostos desejáveis se identificaram, entre outros, o 3-metil-1-butanol, 2-fenil etanol, benzaldeído, fenilacetaldéido, etilhexanoato, benzoato de etilo, acetato de etilfenil e acetato de etilo 2-fenil, os quais aportam pontuações odoríferas muito agradáveis (chocolate, caramelo, doce, noz, mel, frutado e floral). Finalmente, se propôs um método alternativo de beneficiamento, que incorpora um pré-tratamento do clone CCN-51 e que mostra evidencias preliminares de melhoria no que diz respeito aos componentes precursores do aroma.

Palavras-chave: Análise de componentes principais, beneficiamento, cacau, CCN-51, compostos voláteis, cromatografia de gases-massas.

1. Introducción

El cacao (*Theobroma cacao L*) es reconocido a nivel mundial como el ingrediente principal para la producción de chocolate. Numerosas investigaciones han sido desarrolladas con el fin de determinar sus propiedades de sabor y aroma, así como las de sus productos derivados [1]-[5]. La gran cantidad de compuestos volátiles (>500) [2], [3] relacionados con el sabor y aroma del cacao y el chocolate (alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas, ésteres, pirroles, pirazinas, furanos, etc.) convierten a estos últimos en matrices volátiles de alta complejidad, con investigación constante al respecto.

Las propiedades de sabor y aroma del cacao (*Theobroma cacao L*), así como sus características funcionales, son afectadas por factores como el genotipo, las condiciones

agroclimáticas, el proceso de beneficio (fermentación y secado) y el proceso de industrialización [6]-[9]. De las etapas del beneficio, la fermentación es un requerimiento fundamental para el desarrollo de los precursores del sabor y aroma característicos de chocolate [10]. La fermentación reduce el nivel de amargura y astringencia de los granos de cacao, hecho atribuido a la pérdida de polifenoles durante el proceso de la poscosecha [11].

Un cacao sin fermentar tiene un alto contenido en polifenoles pero sus características organolépticas se disminuyen expresando sabores que no se ajustan a los requerimientos de los consumidores. El contenido de polifenoles tiene relación directa con la astringencia, acidez, amargura y nota verde en el aroma de la semilla de cacao, mientras que presenta una correlación negativa con el

aroma frutal de la misma [12]. En contraparte, un cacao fermentado, seco y tostado tiene buenas características organolépticas; en el caso del CCN-51 tiene un sabor a cacao y un perfil frutal. Sin embargo, con los procesos de fermentación, secado y tostado existe una pérdida importante de sustancias funcionales que disminuyen su potencial de aplicación desde el punto de vista nutracéutico.

En el secado ocurren reacciones de oxidación no enzimática que son aceleradas por el incremento de oxígeno al cual está expuesto el tejido de los granos. Durante esta etapa sigue el desarrollo de los precursores de sabor y aroma, con la aparición del color marrón característico [8]. Además, cuando las semillas de cacao son sometidas a este proceso enzimático su contenido de polifenoles continúa reduciéndose [7].

De los 22 clones de cacao recomendados por la Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia para ser sembrados en las 4 zonas agroecológicas del país, sobresale el CCN-51, por su alto grado de compatibilidad y rápida adaptabilidad ambientes secos. Además, es preferido por un gran número de cultivadores porque tiene un alto rendimiento y tolerancia a las enfermedades fúngicas tropicales. A pesar de sus buenas cualidades físicas, su calidad desde el punto de vista sensorial ha sido cuestionada en múltiples ocasiones. De hecho, no es considerado como una variedad de buen sabor en el mercado [13], [14]. No obstante, no se ha realizado aún ningún trabajo de investigación conducente a determinar de manera específica los compuestos volátiles que intervienen en el sabor y aroma de la variedad CCN-51.

En este contexto, el propósito de este trabajo fue evaluar de forma simultánea la influencia del tiempo de fermentación y de secado sobre las propiedades de aroma (compuestos volátiles) del cacao clonal CCN-51. Lo anterior, con el fin de seleccionar condiciones de proceso que permitan obtener un producto de calidad que permitan identificar los precursores

responsables del aroma y demostrar técnicas adecuadas durante la poscosecha, con mayor valor agregado a la industria chocolatera.

2. Materiales y métodos

2.1. Beneficio de los granos de cacao. La recolección y el beneficio (fermentación y secado) de las muestras fueron desarrollados en la granja experimental Villa Mónica (Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia, San Vicente de Chucurí, Santander, 693msnm, $T_{media} \approx 27^{\circ}C$). Se hicieron dos muestreos en la época de cosecha comprendida entre octubre de 2012 y enero de 2013.

El beneficio de los granos del clon CCN-51 siguió el método de microfermentación en cajones ajustado por el Departamento de Investigación de la Federación Nacional de Cacaoteros [15]. El tiempo de desgrane no superó las 24h y los granos de CCN-51 obtenidos (2.5 kg) fueron ubicados en mallas plásticas de 25x50cm.

Inicialmente, las muestras se dejaron escurrir por 16-18h. Luego, fueron presecadas al sol por 30h y finalmente se transfirieron a un cajón con una masa total fermentable superior a 200 kg. Allí tuvo lugar la primera remoción de las mallas y la masa total fermentable a las 48h. Siguió remociones cada 24h hasta finalizar el proceso (6 días en el cajón). El momento en que comenzó el escurrimiento se consideró el punto inicial de la fermentación (F0).

Con el fin de inactivar la enzima polifenol oxidasa y evitar el avance de la fermentación y la oxidación, las muestras del nivel F0 fueron ubicadas en agua a 10-15°C durante 15min. Posteriormente, se separó el mucílago de la pulpa y esta última fue introducida en agua a 95°C durante 5 min [16].

Después de los procesos de inactivación, escurrimiento y secado (48h en total), las muestras fueron pasadas al cajón; este punto es considerado como el nivel F2 del proceso de fermentación. Los demás niveles de fermentación se detallan en la tabla I.

El secado se realizó de manera natural en una casa Elba de techo móvil. Las horas de exposición al sol y el número de remociones fueron incrementándose hasta alcanzar 6 días.

Cada muestra recolectada fue codificada y se mantuvo en condiciones de refrigeración (4°C), ausencia de luz y oxígeno reducido hasta su uso.

2.2. Análisis de propiedades de aroma.

2.2.1. Extracción de compuestos volátiles.

Fue realizada según el procedimiento planteado por Rodríguez-Campos *et al.* [9]. Dos gramos (2g) de muestra (descascarillada y molida) fueron ubicados en un vial de 10ml (PTFE/Silicona septa), en donde fueron extraídas las sustancias volátiles utilizando la técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME). En el procedimiento se empleó una fibra DVB/CAR/PDMS (50/30µm, Supelco). Para el establecimiento del equilibrio, la muestra fue acondicionada a 60°C durante 15min. Luego, la fibra fue expuesta durante 30min a 60°C en el espacio de cabeza del vial, lugar donde fueron absorbidos los compuestos volátiles.

2.2.2. Separación e identificación de compuestos volátiles. La separación fue realizada en un cromatógrafo de gases 7890A adaptado a un espectrómetro de masas 5975C (Agilent Technologies, GC/MSD Agilent Series). Se utilizó una columna DB-Wax (30mx0,25mmx0,25µm; Agilent Technologies). En el horno, la temperatura fue fijada a 40°C durante 5min, luego se incrementó hasta 200°C a una velocidad de 10°C/min y finalmente fue mantenida a 200°C durante 30min. El flujo del gas de arrastre (helio de alta pureza) fue de 0,7ml/min. La desorción de sustancias volátiles tuvo lugar a 240°C durante 5min, en modo *splitless*. En el espectrómetro de masas, la temperatura de la fuente se fijó en 260°C y la energía electrónica de ionización fue de 70eV [9].

La identificación de los compuestos volátiles presentes fue hecha mediante comparación de

los espectros de masa obtenidos con aquellos disponibles en la librería W8 (*WileyRegistry of Mass Spectral Data, 8th Edition*). El análisis cromatográfico se realizó por duplicado para cada punto del diseño experimental.

2.3. Análisis del comportamiento de los compuestos volátiles a través del proceso de beneficio. Las áreas cromatográficas de los compuestos volátiles identificados en cada una de los niveles propuestos en la tabla I fueron estudiadas mediante Análisis de Componentes Principales (ACP). Para esto se usó el usando el software STATGRAPHICS Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc. Trial version).

Tabla I. Factores y niveles del diseño experimental.

| Factores | Símbolo | Unidades | Nivel | | | | |
|------------------------|---------|----------|-------|---|---|----|----|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Tiempo de Fermentación | F | Días | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 |
| Tiempo de Secado | S | | 1 | 3 | 5 | -- | -- |

Fuente: Autores

3. Resultados y análisis

3.1 Identificación de compuestos volátiles presentes. Se identificaron 34 compuestos durante los procesos de fermentación y secado del clon CCN-51. Un resultado similar al obtenido aquí fue reportado por Rodríguez-Campos *et al.* [9], que identificaron 39 compuestos volátiles en el beneficio de cacao mexicano de la variedad Forastero.

Las sustancias volátiles aisladas en el presente estudio se presentan en la Tabla II, organizadas por familias (alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos y ésteres). La Figura 1 muestra uno de los cromatogramas obtenidos, señalando algunos de los picos identificados.

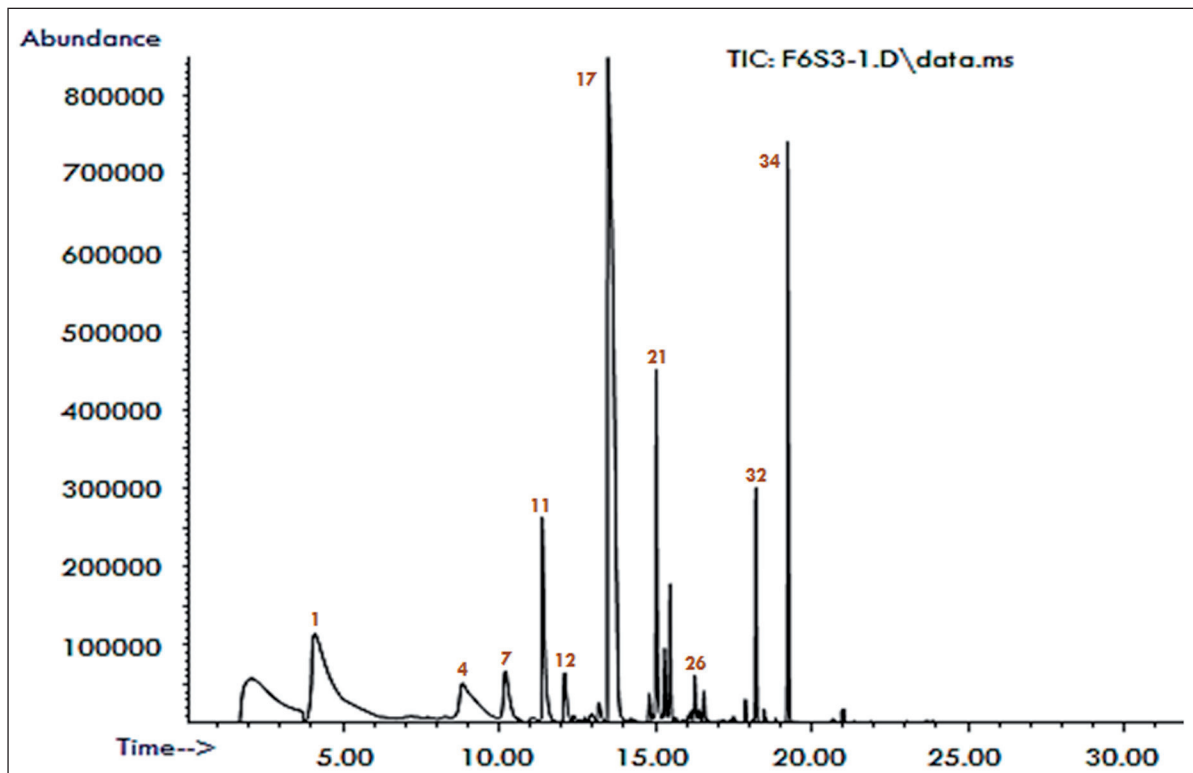


Figura 1. Cromatograma obtenido para la muestra con seis días de fermentación y tres días de secado. Para identificación de los picos señalados Ver Tabla 2. Fuente: Autores

Varios de los compuestos hallados en las muestras han sido reportados previamente como característicos del cacao y los productos elaborados a partir de él [3], [9], [17]-[19]. Más aún, se tiene conocimiento de las notas odoríficas que aportan algunas de estas sustancias a las matrices en las que se encuentran (Ver Tabla II).

Tabla II. Compuestos volátiles identificados durante el beneficio del clon CCN-51.

| Grupo Funcional | No. de pico | Compuesto | Descripción del olor* | Etapas del beneficio en que se identificó |
|---------------------|-------------------|--|---|---|
| Alcoholes | 1 | Etanol | -- | F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5) |
| | 3 | 2-metil-1-propanol | Vino | F4(S1-S5) |
| | 4 | 2-pentanol | Verde, verde suave | F0(S1-S5); F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5) |
| | 7 | 3-metil-1-butanol | Malta, amargo, chocolate | F2S1; F2S5; F4(S1-S5); F6(S1-S5) |
| | 12 | 2-heptanol | Cítrico | F0(S1-S5); F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) |
| | 13 | cis-hept-4-en-2-ol | -- | F0(S1-S5) |
| | 14 | 1-hexanol | Fruta, verde, herbáceo | F2(S1-S5) |
| | 18 | 2-nonanol | -- | F0(S1-S5); F2(S1-S5) |
| | 21 | 2,3-butanediol | -- | F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) |
| | 22 | Linalol | Flores, floral, fruta (bajo) | F0(S1-S5); F2S3 |
| 24 | 2,3-butanediol | -- | F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) | |
| 34 | 2-fenil etanol | Acaramelado, dulce, miel, especias, rosa, lila, floral, fragante | F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) | |
| Aldehídos y Cetonas | 2 | 2-pentanona | Fruta | F0(S1-S5); F2(S1-S5); F4(S1-S5) |
| | 6 | 2-heptanona | -- | F0(S1-S5); F2S3 |
| | 8 | 5-metil-2-hexanona | -- | F8S3; F8S5 |
| | 11 | 3-hidroxi-2-butanona | Mantequilla, crema | F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) |
| | 16 | 2-nonanona | -- | F0(S1-S5); F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) |
| | 19 | Benzaldehído | Nuez, amargo | F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) |
| | 26 | Fenil acetaldehído | Floral, dulce, miel, nuez, bayas | F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8S1; F8S3 |
| 27 | 1-fenil etanona | -- | F0(S1-S5); F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) | |
| Ácidos | 17 | Ácido acético | Astringente, vinagre, agrio, fuerte, picante | F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) |
| | 20 | Ácido propanoico | Picante, rancio, soya | F6S1; F6S3; F8(S1-S5) |
| | 28 | Ácido 3-metil butanoico (isovalérico) | Rancio, sudoroso, caseoso | F6S1; F6S3; F8(S1-S5) |
| Ésteres | 5 | 3-metil-1-butanol acetato | Banana | F8(S1-S5) |
| | 9 | Etilhexanoato | Fruta, manzana, banana, vino, brandy | F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8S3 |
| | 10 | 1-metilpropil acetato | -- | F0(S1-S5) |
| | 15 | 2,3-butanediol acetato | -- | F8(S1-S5) |
| | 23 | Etil acetato | Piña | F8(S1-S5) |
| | 29 | Etil benzoato | Floral, fruta | F4(S1-S5); F6(S1-S5) |
| | 31 | Etilfenil acetato | Fruta, dulce, miel | F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) |
| | 32 | 2-feniletil acetato | Rosa, miel, tabaco, floral, dulce | F0(S1-S5); F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) |
| 33 | Isobutil benzoato | -- | F0(S1-S5); F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) | |
| Otros | 25 | dihidro-2(3H)-furanona | -- | F2(S1-S5); F4(S1-S5); F6(S1-S5); F8(S1-S5) |
| | 30 | α -terpineol | -- | F0(S1-S5) |

* Reportado en la literatura.

Fuente: Autores

De acuerdo a los descriptores de olor atribuidos a algunos de los compuestos, éstos pueden clasificarse como deseables o indeseables, en función de la calidad sensorial según la variedad. Así por ejemplo, la presencia de 3-metil-1-butanol, 2-fenil etanol, etilfenil acetato, 2-feniletil acetato, benzaldehído y fenilacetaldehído resulta benéfica para las propiedades de aroma del cacao, al aportar notas de chocolate, caramelo, dulce, nuez, frutal y floral [4], [9], [2], [20]. Por el contrario, cuando se identifican los ácidos 3-metil butanoico y propanoico, así como cantidades muy elevadas de ácido acético, sus atributos de sabor y aroma son desmejorados, con notas de olor defectuosas (rancio, picante, agrio, astringente) [1], [17].

3.2 Evolución de los compuestos volátiles. Fueron identificados en total 12 alcoholes, 8 aldehídos y cetonas, 3 ácidos, 9 ésteres y 2 compuestos de otras familias. Su evolución a través del beneficio

Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51.

del clon CCN-51 se analizó haciendo especial énfasis en aquellas sustancias de importancia en la calidad sensorial del cacao. La determinación de aumento y/o disminución del contenido de los compuestos a lo largo del proceso tuvo como base los valores de área relativa obtenidos en el análisis GC-MS.

Muestras F0S1, F0S3 y F0S5. Se caracterizaron por la presencia de alcoholes (5), cetonas (4) y ésteres (3). Entre los primeros sobresalen 2-pentanol y 2-heptanol, los cuales están asociados con notas a verde y cítrico respectivamente (Figura 2). La presencia de 2-pentanol ha sido reportada previamente en granos de cacao fresco, con aporte de notas herbales [9].

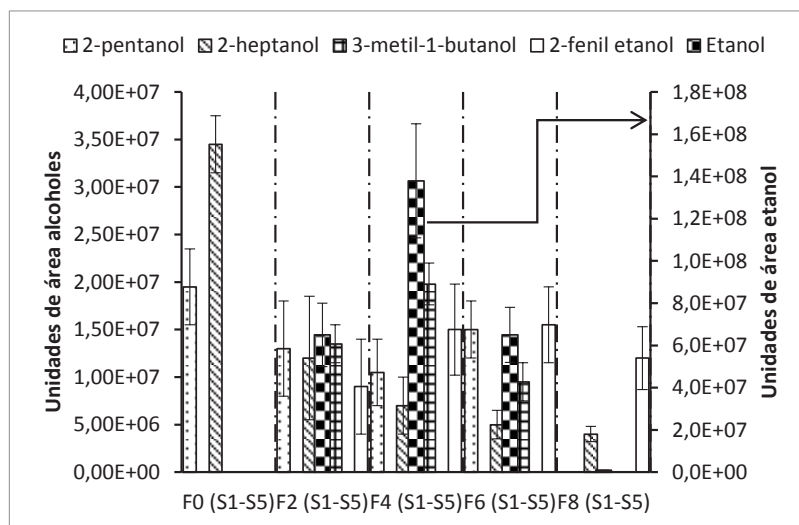


Figura 2. Evolución de alcoholes durante el beneficio del clon CCN-51.
Fuente: Autores

No hubo evidencia de formación de etanol ni ácido acético (Figuras 2 y 3), por lo que puede asegurarse que en este grupo de muestras no había iniciado aún el proceso fermentativo. La gran cantidad de azúcares fermentables que tiene el mucílago de los granos de cacao, aunada a la actividad microbiana, hacen que las primeras reacciones en la fermentación del cacao sean aquellas de producción de etanol y ácido acético, acompañadas de generación de calor (por lo general durante la fermentación la temperatura de la masa puede llegar hasta 50°C) [1], [21].

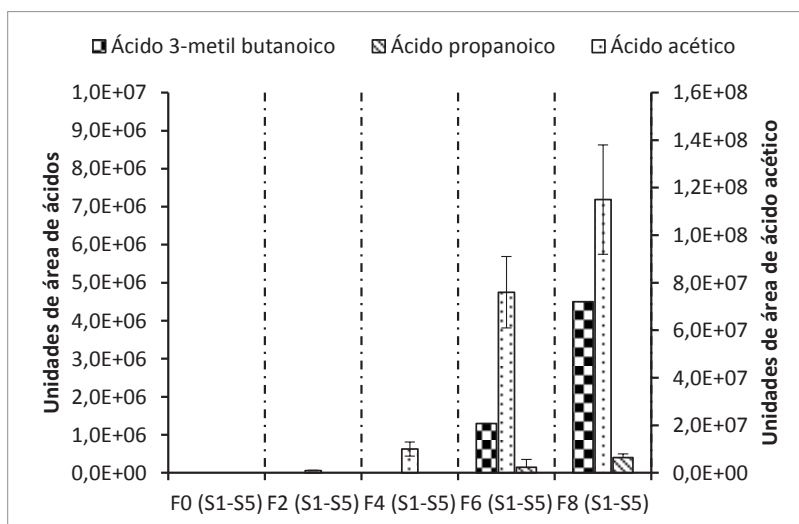


Figura 3. Evolución de ácidos durante el beneficio del clon CCN-51.
Fuente: Autores

Del lado de los ésteres debe resaltarse la presencia, aunque en poca proporción, de 2-feniletil acetato (Figura 4). Este compuesto ha sido reportado como marcador de buena calidad sensorial del cacao [2], [18].

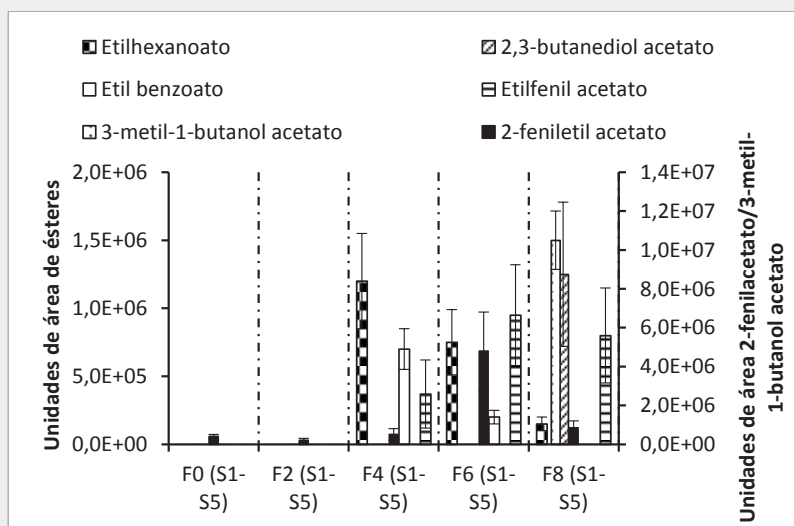


Figura 4. Evolución de ésteres durante el beneficio del clon CCN-51.
Fuente: Autores

En cuanto a las cetonas, 1-fenil etanona estuvo presente desde el inicio del proceso, manteniendo su valor prácticamente constante a lo largo de éste (Figura 5).

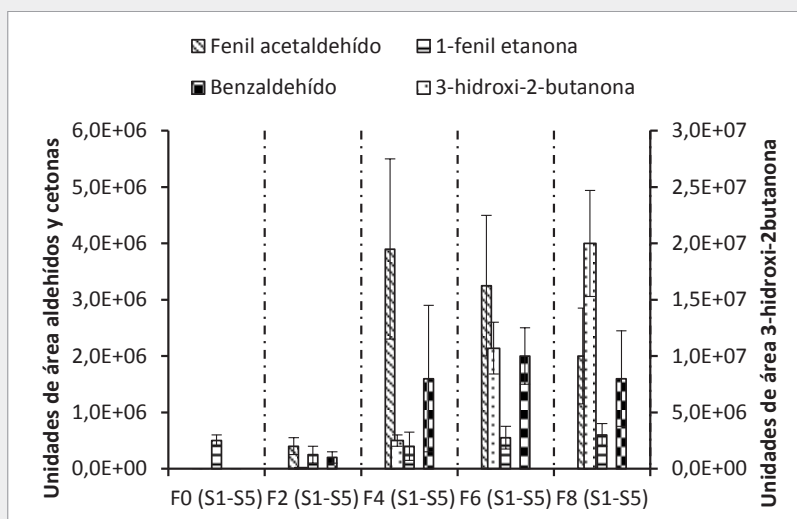


Figura 5. Evolución de aldehídos y cetonas durante el beneficio del clon CCN-51.
Fuente: Autores

Muestras F2S1, F2S3 y F2S5. En este grupo el número de alcoholes identificados ascendió a ocho. Hubo aparición de etanol (indicando inicio de la fermentación) y de los alcoholes isoamílicos 3-metil-1-butanol y 2-fenil etanol (Figura 2), estos últimos de fundamental importancia en las propiedades de aroma del cacao [4], [9]. Otros alcoholes característicos del cacao con presencia en este nivel del beneficio fueron 2,3-butanediol y 1-hexanol. Los contenidos de 2-heptanol y 2-pentanol disminuyeron en 66% y 35% aproximadamente (Figura 2).

Entre las otras sustancias presentes se incluyen un ácido (acético, confirmando el desarrollo del proceso fermentativo), cinco cetonas (entre ellas 3-hidroxi-2-butanona, que aporta notas a

mantequilla) y dos ésteres (Figuras 3, 4 y 5). No se presentó incremento en el área de 2-feniletil acetato (Figura 4).

En las muestras de este nivel de fermentación aparecieron dos aldehídos (benzaldehído y fenilacetaldehído, ver Figura 5), ambos de gran importancia en la calidad sensorial del cacao (notas a nuez, dulce, miel, floral) [9], [20].

Muestras F4S1, F4S3 y F4S5. Es el nivel en el que se presentaron las mayores áreas de etanol. Lo anterior demuestra la penetración de este compuesto a los cotiledones de los granos, una vez se incrementa lo suficiente su concentración en la pulpa (mucílago) [21]. Lo mismo ocurrió con 3-metil-1-butanol y 2-fenil etanol, que exhibieron en esta parte del beneficio su mayor contenido (Figura 2). También del grupo de los alcoholes, se registró presencia de 2-metil-1-propanol, que aporta notas de olor parecidas al vino y guarda coherencia con la percepción odorífica que se tuvo de este grupo de muestras. 2-heptanol y 2-pentanol disminuyeron su valor relativo de área en 42% y 23% respectivamente, con relación al nivel anterior (Figura 2). Por su parte, el ácido acético registró un contenido 5 veces mayor (Figura 3).

En este punto del beneficio se registró un incremento del número de ésteres presentes (Figura 4). Fueron identificados cinco, entre los que sobresalen etilfenil acetato por sus notas de miel y dulce [9],[17] y etil benzoato y etilhexanoato por sus aportes florales y frutales [17], [18], [19]. El valor relativo de 2-feniletil acetato aumentó ligeramente respecto al nivel anterior (Figura 4).

En el caso de los aldehídos y cetonas presentes, la tendencia seguida fue de aumento en la cantidad relativa (Figura 5). El contenido de 3-hidroxi-2-butanona fue 5 veces mayor al nivel anterior, aproximadamente. Así mismo, fenilacetaldehído y benzaldehído exhibieron un notorio incremento, registrando sus mayores valores relativos en este momento del beneficio (F4(S1-S5)).

Muestras F6S1, F6S3 y F6S5. Se registró presencia de dos ácidos nuevos, ambos de poca deseabilidad en los granos de cacao: ácido propanoico y ácido 3-metil butanoico [1], [9], [17]. También, el contenido de ácido acético se incrementó en forma considerable (Figura 3). En el grupo de los alcoholes, hubo un descenso en el contenido de etanol y el alcohol isoamílico 3-metil-1-butanol (aproximadamente 55% en ambos compuestos, ver Figura 2). Respecto a este último, su tendencia de reducción ha sido reportada previamente para tipos de cacao diferentes al CCN-51 [4], [9]. Incluso se ha relacionado la disminución pronunciada en su concentración, junto con la aparición de ácidos y amil acetatos, como indicador de defectos en el sabor del cacao [4], [22]. 2-fenil etanol mantuvo constante su valor relativo (Figura 2).

En los ésteres, etilhexanoato y etil benzoato redujeron su contenido (38% y 67% respectivamente, ver Figura 4). Por el contrario, 2-feniletil acetato y etilfenil acetato registraron valores de área por encima del nivel anterior 4 y 1,5 veces (Figura 4), respectivamente. En el caso de aldehídos y cetonas, el contenido relativo de fenilacetaldehído y benzaldehído fue prácticamente el mismo del nivel anterior, mientras que la cantidad relativa de 3-hidroxi-2-butanona fue 4 veces mayor a la del nivel anterior (Figura 5).

Muestras F8S1, F8S3 y F8S5. Caracterizadas por un contenido de etanol prácticamente nulo (Figura 2). Las cantidades relativas de los 3 ácidos presentes (acético, propanoico y 3-metil butanoico) experimentaron en este nivel un notorio incremento (Figura 3), que se traduce en el desmejoramiento de las propiedades sensoriales del clon bajo estudio [1], [17]. Otro indicador de reducción en la calidad de sabor y aroma fue la desaparición del alcohol isoamílico 3-metil-1-butanol, con lo que se pierden las notas a malta y chocolate (Figura 2). Así mismo, la disminución del contenido de los ésteres etilhexanoato, etil benzoato y etilfenil acetato, que aportan notas a dulce, miel, florales y frutales (Figura 4).

Fenil acetaldehído, benzaldehído y 2-fenil etanol también redujeron sus áreas relativas en este nivel (Figuras 2 y 5).

Se registró aparición de 3-metil-1-butanol acetato y 2,3-butanediol diacetato (Figura 4), lo cual indica esterificación de alcoholes a acetatos. Este hecho debe evitarse en la fermentación, pues su ocurrencia es sinónimo de defectos en el proceso [4], [22].

Se efectuó un *Análisis de Componentes Principales (ACP)* con el fin de establecer el conjunto de compuestos volátiles característicos de un determinado nivel de beneficio del clon CCN-51. En forma mutua, para determinar el efecto de este proceso sobre el comportamiento de sustancias del aroma deseables y/o indeseables en el clon mencionado. Las dos primeras componentes principales (CP) fueron capaces de explicar un 68% de la varianza total asociada al impacto que tiene el beneficio del clon CCN-51 sobre los componentes del aroma. En la Figura 6 se muestra la gráfica de pesos de los componentes evaluados (compuestos volátiles).

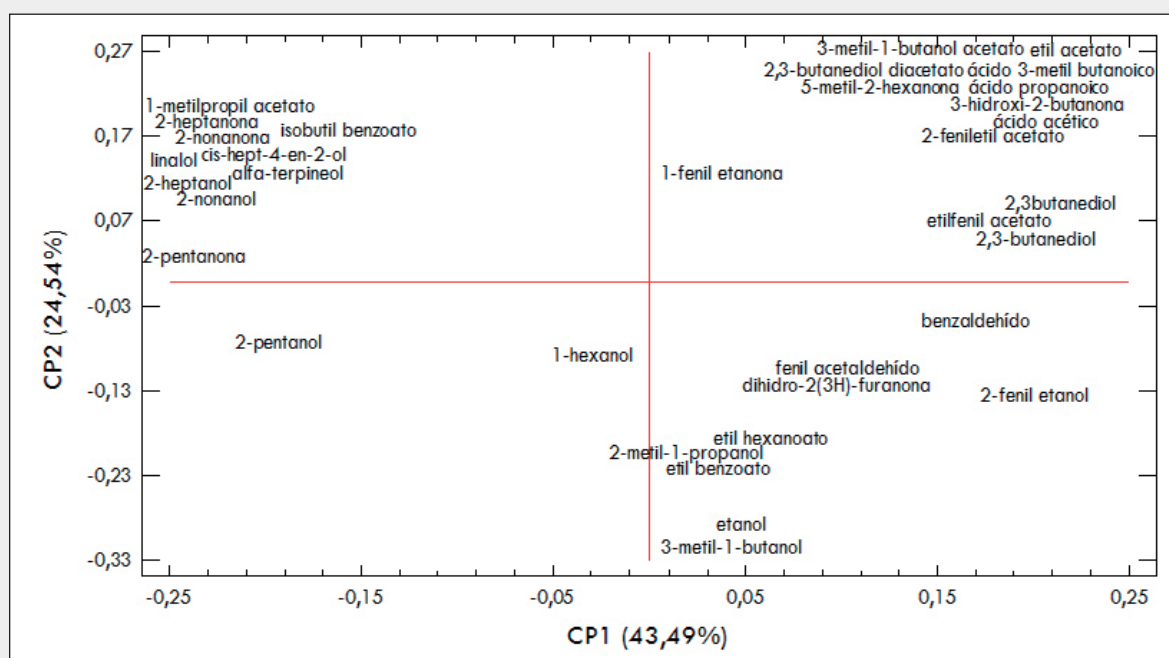


Figura 6. Evolución de compuestos volátiles durante el beneficio del clon CCN-51, según el Análisis de Componentes Principales. Gráfica de pesos de los componentes evaluados.

Fuente: Autores

El segundo cuadrante de la Figura 6 (lado negativo de CP1 y positivo de CP2) agrupó a los compuestos representativos de las muestras con el nivel más bajo de fermentación (F0) y todos los niveles de secado (S1-S5)). Algunas de estas sustancias estuvieron presentes sólo en las muestras sin fermentar, desapareciendo en los niveles posteriores (2-heptanona, 1-metil propil acetato, linalol, α -terpineol). Otras en cambio exhibieron su mayor contenido y disminuyeron a medida que avanzó el proceso de beneficio (2-heptanol, 2-heptanona, 2-pentanol, 2-nonanona).

En el lado negativo de CP2, sobre el eje correspondiente a CP1, hubo influencia de 2-metil-1-propanol, 1-hexanol, etil benzoato, 3-metil-1-butanol y etanol. Estos compuestos tuvieron su mayor cantidad relativa en la etapa intermedia de la fermentación (F2 – F4) sin importar los niveles de secado (S1-S5), y disminuyeron y/o desaparecieron en los niveles posteriores. Por su parte, en el cuadrante formado por el lado positivo de CP1 y el lado negativo de CP2 se ubicaron compuestos volátiles de gran deseabilidad en los granos de cacao: etilhexanoato, fenil acetaldehído, benzaldehído y 2-fenil etanol. Éstos exhibieron su mayor contenido en el nivel 6

Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51.

de fermentación (F6); así mismo, el análisis mostró que no existió efecto del tiempo de secado (S1-S5).

Al observar los compuestos con mayor influencia en el primer cuadrante de la Figura 6, se encontró que la mayoría fueron aquellos de poca deseabilidad para el cacao: ácido acético, ácido 3-metil butanoico, ácido propanoico, 3-metil-1-butanol acetato, 2,3-butanediol diacetato. Así mismo, se identificaron compuestos que sólo fueron encontrados en el último nivel de fermentación -F8(S1-S5)- (5-metil-2-hexanona, etil acetato).

La ubicación de compuestos volátiles en la gráfica de pesos (en la que se representa el 68% de la varianza total del sistema evaluado), dependió principalmente del nivel de fermentación de las muestras y no del nivel de secado. Por lo tanto puede decirse que, de las etapas del beneficio, la mayor influencia sobre las propiedades de aroma es ejercida por el desarrollo del proceso fermentativo. El efecto del secado, comparado con el de la fermentación, es mínimo.

Esta afirmación fue corroborada mediante una gráfica de valores CP, que permitió además definir las etapas de beneficio del clon CCN-51. En la Figura 7 se observa el resultado obtenido, que demuestra que el análisis de componentes principales agrupa las muestras según su grado de fermentación, sin que este hecho sea afectado en gran medida por el nivel de secado de las mismas. La dispersión (varianza) presentada por las sustancias volátiles es mucho menor en el secado que en la fermentación.

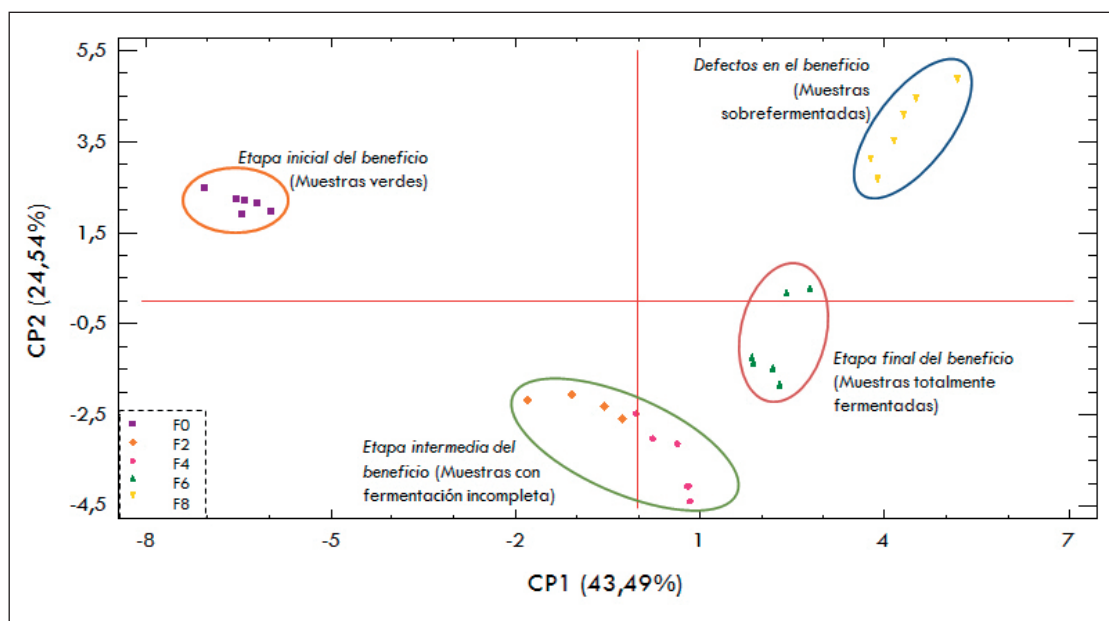


Figura 7. Etapas del beneficio del clon CCN-51, según el Análisis de Componentes Principales. Gráfica de valores CP. Fuente: Autores

Respecto a CP1 (Figura 7), en el lado negativo se ubicó la etapa inicial del beneficio agrupando las muestras F0(S1-S5). En el lado positivo del mismo eje se situaron las muestras F6(S1-S5), que fueron identificadas como etapa final del beneficio debido a los compuestos volátiles presentes en ellas. Con relación a CP2, el lado positivo permitió agrupar las muestras F8(S1-S5), que presentaron sustancias volátiles poco deseables en el cacao y que fueron relacionadas entonces con defectos en el beneficio (producto de la realización de este proceso por un tiempo mayor al adecuado). Finalmente, en el lado negativo de CP2 se situó la etapa intermedia del beneficio agrupando las muestras F2(S1-S5) y F4(S1-S5), con fermentación incompleta.

4. Conclusión

Fueron identificados compuestos volátiles asociados al proceso de beneficio del clon CCN-51. Algunos de ellos, como 3-metil-1-butanol, 2-fenil etanol, benzaldehído, fenil acetaldehído, etilhexanoato, etil benzoato, etilfenil acetato y 2-fenil etil acetato resultan deseables porque aportan notas odoríficas muy agradables (chocolate, caramelo, dulce, nuez, miel, frutal, floral), que incrementan la calidad sensorial del cacao. Por el contrario, sustancias volátiles como ácido propanoico, ácido 3-metil butanoico y 3-metil-1-butanol acetato, así como cantidades elevadas de ácido acético afectan negativamente su percepción de sabor y aroma (notas a rancio, picante, agrio, astringente).

El análisis de componentes principales permitió determinar que el 68% de la varianza total del sistema evaluado es explicada por el proceso de beneficio del clon CCN-51. A través de las gráficas de pesos y de valores CP se estableció que, de las etapas asociadas a dicho proceso, la fermentación ejerce la mayor influencia en la evolución de compuestos volátiles. El secado no presentó efecto de mayor significancia, al ser comparado con la etapa de fermentación.

En función de la evolución de compuestos volátiles, el proceso de beneficio del clon CCN-51 fue dividido en tres etapas: inicial (F0), intermedia (F2 y F4) y final (F6). Así mismo, fue posible identificar defectos en las características de aroma del clon, asociadas a la extensión del beneficio por mayor tiempo del necesario (F8).

Los compuestos volátiles presentes en las muestras con 8 días de fermentación (sin importar su nivel de secado), permiten asegurar que no es conveniente extender el proceso fermentativo por más de 4 días en cajón, si se ha efectuado el pretratamiento (escurrimiento + presecado) a los granos de cacao CCN-51.

Con base en los resultados obtenidos en el análisis de compuestos volátiles por cromatografía gaseosa acoplada a masas, se propone que el proceso de beneficio del clon CCN-51 sea desarrollado como sigue: acondicionamiento de los granos, iniciando con un escurrimiento durante 16-18h y presecado por 30h; fermentación habitual en cajón durante 4 días y secado natural (al sol) durante 5 días, o hasta que el porcentaje de humedad esté alrededor del 7%.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen al programa Jóvenes Investigadores del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (COLCIENCIAS) y a la Universidad Industrial de Santander, a través de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión y del Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) por el apoyo económico recibido en la realización del proyecto. Igualmente a la Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia por facilitar las muestras necesarias para su ejecución.

Así mismo, los autores agradecen a COLCIENCIAS por su apoyo financiero a través del proyecto RC 523 — 2011.

6. Referencias

- [1] E. Afoakwa et al. "Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 48, no. 9, pp. 840-857, 2008.
- [2] F. Frauendorfer et al. "Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 56, no. 21, pp. 10244-10251, 2008.
- [3] S. Ducki et al. "Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile

- compounds in cocoa products". *Talanta*, vol. 74, no. 5, pp. 1166-1174, 2008.
- [4] J. Rodriguez-Campos et al. "Effects of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa". *Food Chemistry*, vol. 132, no. 1, pp. 277-288, 2012.
- [5] Li, Y. et al. "The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder". *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 25, no. 1, pp. 17-23, 2012.
- [6] M. Paine et al. "Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 19, pp. 10518-10527, 2010.
- [7] J. Wollgast, E. Anklam. "Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification". *Food Research International*, vol. 33, no. 6, pp. 423-447, 2000.
- [8] E. Afoakwa. *Chocolate Science and Technology*. ISBN 978-1-4051-9906-3. Primera Edición. John Wiley & Sons, Ltd, 2010.
- [9] J. Rodriguez-Campos et al. "Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal component analysis". *Food Research International*, vol. 44, no. 1, pp. 250-258, 2011.
- [10] P. Aikopokpodion y L. Dongo. "Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans". *International Journal of Sustainable Crop Production*, vol. 5, no. 4, pp. 66-70, 2010.
- [11] H. Kim, P. Keeney. "(-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans". *Journal of Food Science*, vol. 49, no. 4, pp. 1090-1092, 1984.
- [12] F. Luna et al. "Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 12, pp. 3527-3532, 2002.
- [13] L. Garcia et al. Farmer participatory and on-station selection activities carried out at Universidad Nacional Agraria de la Selva, Peru. Final report of the CFC/ICCO/Bioversity international project on "cocoa productivity and quality improvement: a participatory approach", 59, pp. 102-107. A. B. Eskes, Ed, 2010.
- [14] F. Amores et al. On-farm and on-station selection of new cocoa varieties in Ecuador. Final report of the CFC/ICCO/Bioversity international project on "cocoa productivity and quality improvement: a participatory approach", 59, pp. 59-72. A. B. Eskes, Ed, 2010.
- [15] Federación Nacional de Cacaoteros – Departamento de Investigación. Protocolo para fermentación de muestras de cacao. Mayo de 2012.
- [16] Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. Proceso de obtención de extractos de cacao con elevado contenido de polifenoles. Patente WO 2007/138118 A1. 06.12.2007.
- [17] J. Serra Bonvehí. "Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder". *European Food Research and Technology*, vol. 221, no. 1, pp. 19-29, 2005.
- [18] E. Afoakwa et al. "Matrix effects on flavor volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry". *Food Chemistry*, vol. 113, no. 1, pp. 208-215, 2009.

- [19] C. Counet et al. "Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 8, pp. 2385-2391, 2002.
- [20] M. Torres Moreno. Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición fisico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro. Tesis Doctoral, Universitat Rovira I Virgili. Departamento de Bioquímica y Biotecnología, 2012.
- [21] R. Schwan et al. "The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 44, no. 4, pp. 205-221, 2004.
- [22] S. Oberparleiter et al. "Amyl alcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, vol. 204, pp. 156-160, 1997.