

Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma

Alfredo Vázquez-Ovando, Isidro Ovando-Medina, Lourdes Adriano-Anaya,
David Betancur-Ancona, Miguel Salvador-Figueroa

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.
Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN: El sabor y aroma de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) fueron las principales razones que promovieron su domesticación y uso alimentario por los pueblos precolombinos de Mesoamérica. Incluso hoy día, la calidad sensorial determina la clasificación entre cacaos finos y a granel. Muchos compuestos químicos de las almendras son responsables de la calidad sensorial, pero sobresalen los polifenoles y los alcaloides, compuestos que de manera directa inciden en el sabor y palatabilidad de las almendras y de manera indirecta sobre los precursores de aroma. Los alcaloides están asociados con el amargor. Su concentración está relacionada con la variedad y se modifica con el procesamiento. Los polifenoles son responsables, junto con otras moléculas de la astringencia (poco deseable en chocolates), pero también de propiedades antioxidantes deseables por los consumidores. En esta revisión se abordan aspectos de la biosíntesis de estas importantes moléculas en las almendras de cacao, de las implicaciones en el sabor y aroma, así como los cambios que ocurren durante el procesamiento de las mismas.

Palabras clave: *Theobroma cacao*; alcaloides; metilxantinas; antioxidantes; fermentación.

SUMMARY: Cacao alkaloids and polyphenols: Mechanisms that regulate their biosynthesis and its implications on the taste and aroma The flavor and aroma of cacao (*Theobroma cacao*) beans were the main reasons that promoted its domestication and food-use by pre-Columbian peoples of Mesoamerica. Polyphenols and alkaloids are compounds that directly affect the flavor of the cocoa beans and indirectly on the flavor precursors. The alkaloids are associated with bitterness; its concentration is related to the cultivar and its modifying through the processing. Polyphenols molecules are responsible together with other molecules of the astringency (not desirable in chocolate), but also are responsible for antioxidant properties, very desirable by consumers. This review focuses on aspects of the biosynthesis of these important molecules in cocoa beans as well as implications in taste and flavor. The changes of these molecules that occur during processing are also approached.

Key words: *Theobroma cacao*; alkaloids; methylxanthines; antioxidants; fermentation.

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta de reproducción preferentemente alógama, con número cromosómico $2n = 20$ (1), de la familia Malvaceae, cultivada en las regiones tropicales del mundo y de cuyos frutos se obtienen almendras que son empleadas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. En el año 2012, a nivel mundial se produjeron poco más de 5 000 000 de toneladas de granos secos, lo que representó un ingreso superior a los 4 000 millones de dólares (2). La industrialización de los granos, y

la producción de derivados del cacao, ha reportado históricamente dividendos por más de 73 000 millones de dólares (3).

En el neotrópico, la importancia y demanda de los granos de cacao, data de tiempos precolombinos. Aunque se ha documentado ampliamente que el cacao es originario de la Cuenca Amazónica y a partir de ahí se dispersó por Centro y Sudamérica, existen vestigios de su domesticación y uso con fines comestibles, hacia los años 1600 – 1200 a.C. por los Mokaya, pobladores asentados en el sitio conocido como Paso de Amada en

Soconusco, Chiapas; México (4) y los Olmecas de la región de San Lorenzo, Veracruz; México (5). A la llegada de los españoles a América, se documentó ampliamente el uso del cacao como moneda entre los nativos, mostrando la importancia social y económica que ostentaba este cultivo. Paralelo al empleo como moneda, los Aztecas, habitantes de la región central de lo que hoy es México, destinaban su consumo sólo a las clases sociales de mayor estatus y en eventos religiosos, pues era sinónimo de poder y de divinidad. A la fecha se sabe que el cacao se consumía como restaurador del estado de ánimo, como energético, como estimulante de la libido y de la digestión. Con fines medicinales o curativos se documentaron hasta 150 usos diferentes (6), además de era empleado en eventos ceremoniales fúnebres de dignatarios (7).

Posterior a la época de colonización de América, el cacao se extendió hacia las regiones tropicales de África y Asia, donde actualmente se produce más del 80% del cacao mundial y del que los corporativos mundiales obtienen igual porcentaje de materia prima para producir la gran cantidad de productos derivados como la cocoa en polvo, chocolates, confites, cosméticos y medicamentos. La continuada popularidad del cacao se debe tanto a los factores intrínsecos de las almendras como a los productos que posteriormente se obtuvieron a partir de ellas: chocolate, cocoa y “manteca” de cacao. La manteca de cacao llega a comprender hasta el 56% del peso seco de la almendra y su composición, evaluada como la relación ácidos grasos saturados: insaturados (promedio de 1 : 0.60) permite obtener una grasa sólida a 25 °C, con punto de fusión entre 33 - 37 °C (8) lo que confiere a los productos la capacidad de derretirse al estar en contacto con el cuerpo humano, característica altamente apreciada en los chocolates y en productos farmacéuticos.

Se puede inferir que los pueblos mesoamericanos que domesticaron el cacao, hace casi 4000 años, basaron sus criterios de selección en aspectos relacionados con el sabor y el aroma tanto del

fruto como de las almendras, criterios empíricos que en la actualidad se siguen empleando para calificar la “calidad” de las almendras comercializables y para obtener nuevos individuos (plantas) productores de cacaos finos.

Las almendras de cacao son ricas en polifenoles (aproximadamente 15% de peso seco) y alcaloides (hasta 4%) y éstos contribuyen con el sabor y aroma del cacao. Los polifenoles confieren sensación de amargor y astringencia y contribuyen a los olores a verde y afrutado de las almendras, mientras que los alcaloides confieren amargor y están involucrados en la palatabilidad de los alimentos que los contienen (9). La cantidad y proporción de estos grupos de moléculas pueden variar en las almendras por aspectos genéticos y ambientales, por lo que el conocimiento en su biosíntesis puede impactar en el diseño a nivel biotecnológico (regulación de la expresión de genes) o modificando las condiciones que afectan esas rutas de biosíntesis y con ello producir cacaos con características más deseables por el consumidor o la industria.

Por lo anterior, en esta revisión se aborda el papel de los alcaloides, particularmente metilxantinas y de los compuestos fenólicos en el sabor y aroma del cacao, la principal ruta biosintética de dichas moléculas, así como los cambios que dichas moléculas tienen durante el procesamiento de las almendras.

Factores que la afectan la calidad del cacao

Un ejemplo típico de la composición proximal de almendras de cacao de diferente origen y variedad puede verse en la Tabla 1. Con estos datos puede verse que la composición es resultado de la interacción de factores genéticos, ambientales y de manejo es, sin lugar a dudas, una característica que ha contribuido a la popularidad del cacao ya que influyen tanto en las características sensoriales del producto, junto a moléculas igualmente importantes como los alcaloides y los compuestos fenólicos. Estos últimos, actualmente tienen gran importancia, pues contribuyen a la capacidad antioxidante total del cacao y sus derivados (Figura 1).

TABLE 1. Composición proximal de almendras de cacao de diferentes variedades y regiones geográficas (g/100 g).

Parámetro	Variedad de cacao		
	cv. Criollo*	cv. Criollo OC63**	cv. MAR 4***
Humedad	52,5	4,62	6,37
Proteína	7,88	19,15	14,0
Grasa	23,92	56,37	56,0
Fibra cruda	3,13	4,23	0,37
Cenizas	2,07	5,24	3,32
Carbohidratos	10,5	10,39	19,94

*Resultados expresados en base húmeda, realizados con almendras frescas de cacao proveniente del sureste de México (12). **Resultados expresados en base seca, realizados con almendras provenientes de Venezuela (8). ***Resultados en base seca, realizados con almendras provenientes de la región de Cuyagua, Venezuela (89).

Otro factor determinante en la calidad del cacao, es el procesamiento al que son sometidos, primero los frutos (principalmente tiempo de almacenamiento) y posteriormente las almendras, ya que se ha demostrado el efecto que puede ejercer el procesamiento poscosecha (10, 11), principalmente la fermentación, el secado y tostado de las almendras que promoverán la transformación, disminución o síntesis de moléculas que han de contribuir con las características sensoriales y que determinan la calidad o defectos en los cacaos.

Alcaloides del cacao

La teobromina (3,7-dihidro-3,7-dimetil-1H-purina-2,6-diona), el principal alcaloide-purina

que se encuentra en los productos de los árboles de cacao, sus semillas y cáscaras, pertenece a una clase de moléculas alcaloides conocidas como metil-xantinas, las cuales se producen de forma natural hasta en 60 diferentes especies de plantas y también incluyen a la cafeína (la principal metil-xantina del café) y teofilina (la principal metil-xantina del té). Los cotiledones de almendras maduras contienen entre 2,2 y 2,7% del peso en base seca de teobromina para la variedad Forastero y hasta 1,5 % en la variedad Criollo. La segunda

metil xantina importante por su contenido es la cafeína, cuyos valores se reportan desde 0,1 hasta 0,8%, siendo más elevado su contenido en almendras de la variedad Criollo respecto a las variedades Forastero y Trinitario (12). Otros alcaloides reportados para cacao o específicamente para el género *Theobroma* pero en concentraciones más bajas son la teofilina con 0,3 % (12) y menos de 0,5% de teacrina (13) (Figura 2).

Sobre la función que desempeñan los alcaloides en los tejidos vegetales (hojas, frutos, almendras), existen diferentes teorías. La más sólida, argumenta que su acumulación implica un rol biológico como químicos de defensa, ya que fungen como antiherbívoros y como compuestos

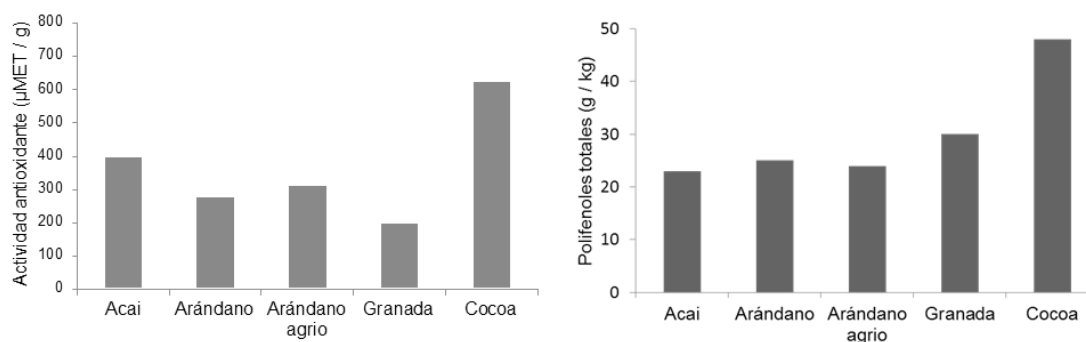


FIGURA 1. Actividad antioxidante evaluada por el método ORAC (IZQ) y contenido de polifenoles totales (DER), en polvo de cacao (cocoa) comparado con polvo de otras frutas (41).

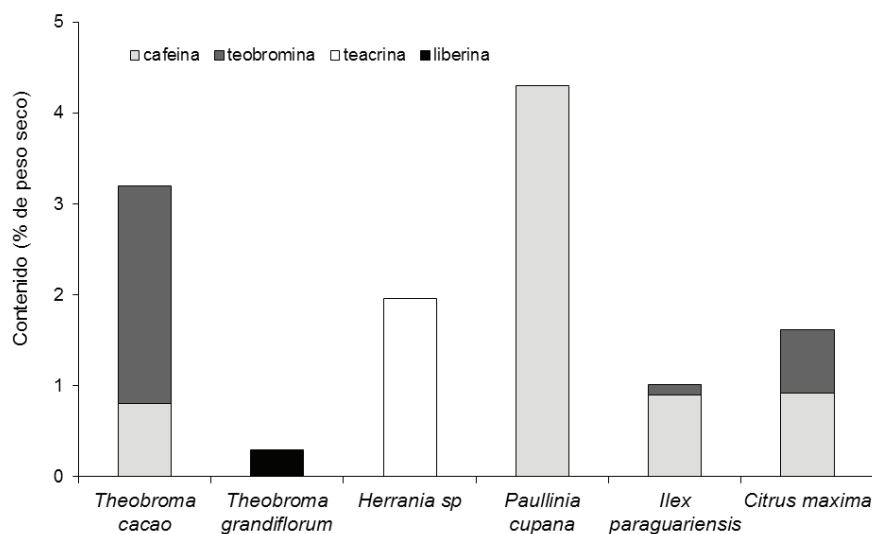


FIGURA 2. Contenido de alcaloides – purina en almendras de cacao (promedio para nueve muestras de las tres variedades provenientes de Brasil) comparado con otras fuentes (13, 90).

alelopáticos (14,15); esto, al igual que lo ocurre con los polifenoles, es de suma importancia pues la planta de cacao está continuamente expuesta al ataque de diversos hongos que producen mancha negra, moniliasis, escoba de bruja entre otros problemas fitosanitarios. También se ha propuesto que su presencia en los tejidos, responde a productos de desecho o almacenamiento del nitrógeno sobrante, como una equivalencia a la del ácido úrico o de la urea en los animales o bien como reguladores del crecimiento, ya que se ha reportado su contenido incrementado en almendras en estado de germinación, sobre todo con deficiencia de nutrimentos (16).

Desde la perspectiva del consumo, las almendras de cacao deben su sabor amargo en mayor medida a los alcaloides presentes, que no exclusivamente, ya que se ha comprobado (17), que otras moléculas de naturaleza diferente a alcaloides (dicetopiperazinas, L-aminoácidos libres o péptidos) contribuyen a la percepción de amargor, o que pueden generar confusión en la percepción entre amargo-astringente (taninos de bajo peso molecular como epicatequina, catequina, procianidinas). Es indudable que algunas característi-

cas de los alcaloides como estimulantes del sistema nervioso, y otros efectos farmacológicos que se les atribuyen, fueron seguramente responsables de muchas de los usos que se dio al cacao (o derivados de éste), antes incluso de conocer su composición (18).

El contenido de estos alcaloides durante las fases del procesamiento primario se ve disminuido dando a los productos tostados el balance adecuado de amargor deseable en cacaos fi-

nos. Con los datos antes presentados, puede notarse como los cacaos Criollos resultan ser menos amargos como resultado del mayor contenido de cafeína, pero sustancialmente menor contenido de teobromina que resulta a la precepción de un consumidor hasta once veces más amargo que la misma cafeína (17).

Algunas versiones sugieren que la relación teobromina / cafeína en almendras de cacao, puede resultar un indicio de la “fineza” del cacao, toda vez que los cacaos Forasteros o “a granel” presentan valores de esta relación por arriba de 4, pudiendo superar el valor 10, mientras que los cacaos Criollos debieran reportar valores inferiores a 4; tal como se reporta (12), con valores en esta relación de 11,2 y 1,6, para cacaos fermentados Forastero y Criollo, respectivamente.

Biosíntesis de las metil xantinas

Aunque la cafeína, que es la principal metil xantina estudiada, fue conocida desde los años 1800’s no fue sino hasta el año 2000, cuando se elucidó completamente la ruta de su biosíntesis (19). Basado en esto, se estableció que las metilxantinas, derivan de nucleótidos de purina los

cuales son compuestos importantes para el metabolismo energético y como elementos esenciales para la biosíntesis de ácidos nucleicos (20,21). Se sintetizan en las plantas tanto por la vía de novo como por la vía de salvamento de purinas. La vía de novo que produce nucleótidos de purina a partir de moléculas precursoras más pequeñas, tales como los aminoácidos y CO₂, es conservada, pero la vía de salvamento difiere entre especies (22).

La biosíntesis de teobromina a partir de las purinas se ha estudiado mucho menos comparada con la biosíntesis de cafeína en café y otros cultivos. La teobromina, al igual que en cacao resulta ser el alcaloide predominante en plantas como *Camellia ptilophylla* (23) y *Camellia irrawadiensis* (24) aunque se ha reportado no se produce en todas las especies del genero *Theobroma* y relacionados de la misma familia como se puede comprobar en la Figura 2.

La síntesis de cafeína (Figura 3), con teobromina como intermediario, está catalizada predominantemente por la enzima cafeína sintasa bifuncional y fue purificada originalmente a partir de hojas de té (25). Esta enzima es monomérica, con una masa molecular aparente de 41 kDa, y muestra un pH óptimo de pH 8,5. La longitud total del ADNc aislado, denominado TCS1 (AB031280), es 1 438 pb y codifica una proteína de 369 aminoácidos (26).

En café, la cafeína sintasa bifuncional ha sido parcialmente purificada a partir de frutas y hojas (27). Esta preparación enzimática poseía actividad N-metil-transferasa asociado con los últimos pasos de biosíntesis de cafeína, y ya se han reportado los genes que codifican para los tipos de N-metil-transferasa implicadas en los mismos dos últimos pasos (28-30). Estos son CTS1 (AB034700), CaMXMT1 (AB048796), CCS1 (AB086414) y CaDXMT1 (AB084125).

A diferencia de lo ocurre en café, en cacao y otras especies de *Camellia*, la teobromina es el alcaloide principal, lo que puede ser explicado porque la enzima cafeína sintasa posee actividad de metilación en 3-N pero no en 1-N. Ensayos realizados en este sentido, muestra que extractos de *C. ptilophylla* se ha demostrado que pueden metilar 7-metilxantina, pero no las dimetilxantinas, teobromina, teofilina paraxantina (23). Un gen homólogo (BTS1) para la cafeína sintasa fue clonado a partir de *Theobroma cacao* por RT-PCR. Plásmidos de expresión para BTS1 se construyeron en el vector pET23d y BTS1 recombinantes fueron producidos en *E. coli* BL21 (BL21). Cuando un lisado bacteriano se incubó con una variedad de derivados de xantina en la

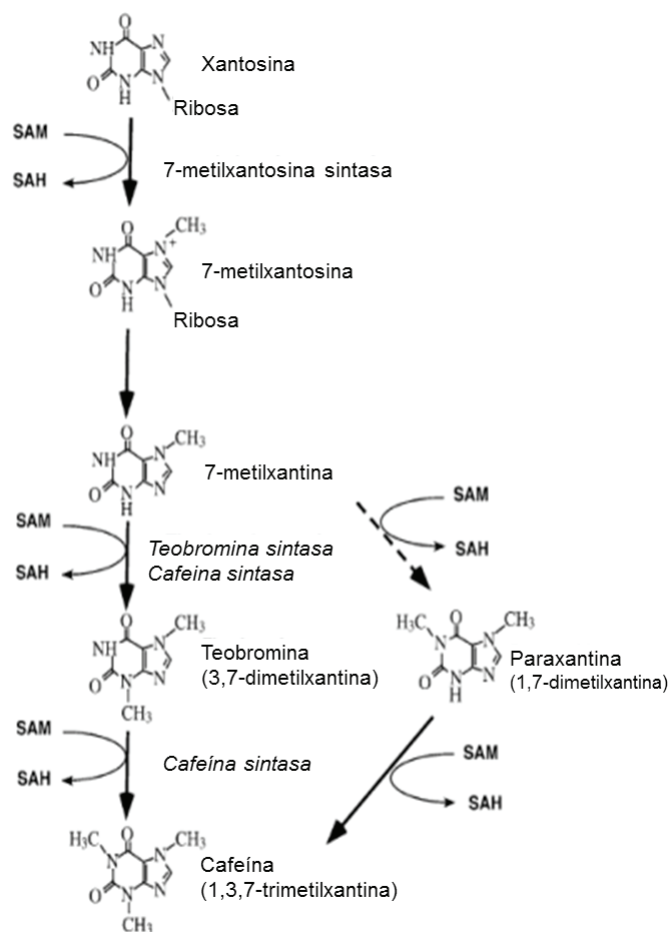


FIGURA 3. Vía de síntesis de alcaloides en plantas (91).

presencia de [metil-14C] SAM, BTS1 catalizó la 3-N-metilación de 7-metilxantina, lo que sugiere que BTS1 era teobromina sintasa. La acumulación de alcaloides de purina es por lo tanto, dependiente de especificidad por el sustrato de la N-metil-transferasa (30).

Polifenoles del cacao

Los principales compuestos fenólicos presentes en las almendras de cacao se localizan en tres grupos, las catequinas o flavan 3-ol que representan el 37% del total; las antocianinas con cerca del 4% y las proantocianidinas con el 58% (31). Del primer grupo, la epicatequina es casi la única molécula que compone el grupo (cerca del 98% del total de catequinas), aunque las proantocianinidinas sean el principal componente fenólico en almendras de cacao (32). Los compuestos fenólicos o polifenoles pertenecen a un amplio grupo de sustancias químicas, considerados no esenciales para la supervivencia de las plantas (metabolitos secundarios), pero que poseen gran cantidad de actividades, tanto como estructuras químicas (33), ya que comprende más de 8 000 compuestos distintos identificados. Constituyen uno de los grupos de productos más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Por citar solo algunos ejemplos, los polifenoles incluyen flavonoides, elagitaninos, cumarinas, furanocumarinas, estilbenos, ligninas y lignanos. Un grupo muy importante y sobre el que se ha estudiado ampliamente son los flavonoides, los cuales tienen diversas funciones en la bioquímica, fisiología y ecología de las plantas (34). Constituyen los pigmentos en flores frutos, contribuyen a la tolerancia al estrés biótico y abiótico, defensa contra radiación UV dañina y tienen papel en la fertilidad del polen (35,36).

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o más grupos hidróxidos incluyendo derivados funcionales como los ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (33). La naturaleza de los polifenoles varía desde mo-

léculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como la lignina o los taninos. Se pueden encontrar en los tejidos vegetales en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos al grupo hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un C aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glucósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos (37). Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (38).

En las últimas tres décadas, se han multiplicado exponencialmente los reportes que atribuyen a los compuestos fenólicos incorporados en la dieta, efectos benéficos para la salud humana y animal, bien como antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios y antiaterosclerosis (39). La estructura polifenólica de flavonoides por ejemplo, resulta ideal para la actividad secuestrante de radicales libres, además han demostrado ser varias veces más eficaces como antioxidantes que por ejemplo las vitaminas E y C (40), empleados convencionalmente como los más potentes antioxidantes naturales.

Por otra parte, los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal. Su contribución a la pigmentación de los alimentos vegetales está claramente reconocida, por ejemplo, las antocianidinas, son responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de muchos frutos clasificados incluso como “superfrutos” por su notable actividad antioxidante (41) y que, en cacao se ha demostrado el contenido de polifenoles y potencial antioxidante es superior (Figura 1). Así

también, los compuestos fenólicos, particularmente los taninos condensados o proantocianidinas se asocian con la astringencia que presentan muchos frutos, como lo es el cacao al momento de ser cosechado.

Las células llamadas de almacenamiento de polifenoles o células de pigmentos de los cotiledones, en cacao van de color blanco a violeta oscuro, dependiendo de la cantidad de antocianinas presentes. La degradación de las antocianinas, que ocurre principalmente durante la fermentación, explica el blanqueo del color púrpura de los cotiledones. Los polifenoles que se conservan en los cotiledones, son transformados mediante oxidación hacia quinonas, mediado por las Polifenol-Oxidasa (PPO), que como antes se dijo reduce el contenido de polifenoles (astringencia) y permite el desarrollo de color marrón.

Biosíntesis de los compuestos fenólicos

Los polifenoles son productos de la ruta de los fenilpropanoides, sintetizados por la vía de shikimato, al igual que los compuestos fenólicos más simples, tales como ácido gálico y ácido cinámico. La biosíntesis de polifenoles complejos como los flavonoides está relacionada con el metabolismo primario a través de productos intermediarios derivados de plástidos y mitocondria, siendo exportados en forma individual al citoplasma donde se incorporan en forma separada. Los flavonoides tienen un esqueleto carbonado base C6-C3-C6, donde los dos C6 (llamados anillos A y B, respectivamente) son de naturaleza fenólica y el C3 llamado anillo cromano. El anillo aromático B y el anillo cromano se originan a partir del aminoácido fenilalanina (Figura 4), siendo

por sí mismos producto de la vía de shikimato, mientras que el anillo A, a partir de tres unidades de malonil-CoA (42,43). Estas tres unidades de malonil-CoA se añaden a través de sucesivas reacciones de descarboxilación de condensación, que inicia la biosíntesis de flavonoides. La feni-

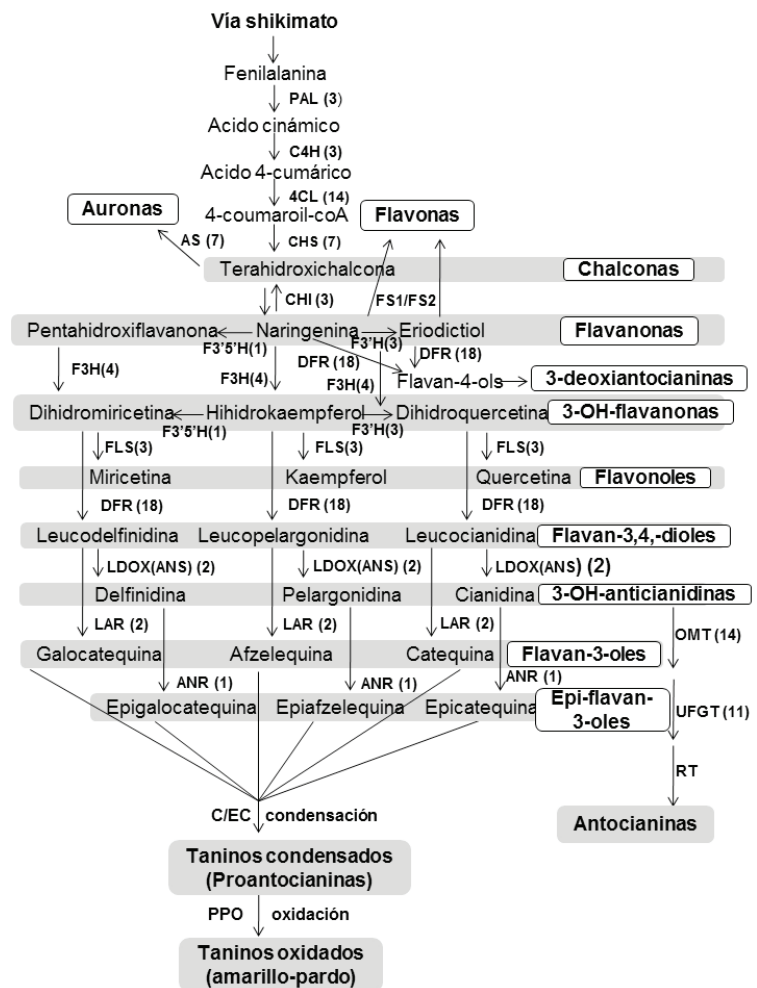


Figura 4. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides (49). El número de copias de genes ortólogos a cada enzima localizados en el genoma de *Theobroma cacao* se indican entre paréntesis. PAL: fenilalanina amonioliasa, C4H: cinamato 4-hidroxilasa, 4CL: 4-cumarato-CoA ligasa, CHS: chalcona sintasa, AS: auresidina sintasa, CHI: chalcona isomerasa, FS1/FS2: flavona sintasa (número de copias no determinado en cacao), F3H: flavanona 3 hidroxilasa, F3'H: flavonoide 3'-hidroxilasa, F3'5'H: flavonoide 3'5'-hidroxilasa, FLS: flavonol sintasa, DFR: dihidroflavonol 4-reductasa, LDOX (ANS): leucoantocianidina dioxigenasa, LAR: leucoantocianidina reductasa, ANR: antocianidina reductasa, OMT: O-metiltransferasa, UFGT: UDP-glucosa:flavonoid 3-O-glucosiltransferasa, RT: ramosil transferasa (número de copias no determinado en cacao), PPO: polifenol oxidasa. C: catequina, EC: epicatequina.

alanina amonio liasa (PAL, por su nombre en inglés phenylalanine ammonia lyase) es una enzima clave de la vía fenilpropanoide que cataliza la conversión de la fenilalanina en ácido cinámico (C6-C3). Posteriormente, el intermediario final 4-cumaril-CoA y tres moléculas de malonil-CoA se condensan para dar la primera estructura flavonoide, chalcona naringenina por acción de la enzima chalcona sintasa (CHS). La chalcona es isomerizada por la chalcona flavona isomerasa (CHI) a una flavanona. La flavanona es un intermediario fundamental, porque es básicamente de donde todas las clases de flavonoides (subgrupos incluidos), se ramifican (43).

Se han reportado, los mecanismos que controlan la biosíntesis de flavonoides en diferentes tejidos. En almendras en germinación de Arabidopsis, se ha reportado que los niveles de ARNm que codifican a las enzimas PAL1, CHS, CHI y dihidroflavanol reductasa (DFR) se mantienen en estado estacionario en plántulas crecidas en luz blanca. En plantas cultivadas en oscuridad, solamente la enzima PAL mantiene niveles altos de ARNm. Al inducir la expresión de las enzimas se puede ver que, siguen el mismo orden que las etapas de biosíntesis de los flavonoides. Además se ha comprobado que los genes de biosíntesis de flavonoides son inducidos por la luz UV-B y por la luz azul, sugiriendo la presencia de un receptor específico para ésta última (44).

Es así que los isoflavonoides principalmente, tienen efecto protector contra la radiación UV, en cuyos niveles elevados se induce la acumulación (45). También se ha sugerido que los isoflavonoides pueden actuar como quimio-atrayentes de organismos fijadores de nitrógeno, ya que se ha comprobado que los niveles bajos de nitrógeno incrementan la concentración de éstas moléculas (46).

Muchos factores pueden inducir la acumulación de compuestos de naturaleza fenólica. Los flavonoles por ejemplo se acumulan en respuesta al ataque de patógenos, en el sitio de la infección

suelen encontrarse en concentraciones que resultan tóxicas al patógeno (47); del mismo modo el kaempferol, se acumula en lesiones causadas por herbívoros, siendo tóxico para éstos (48) y también se acumula durante el desarrollo del polen sugiriendo efecto aseptizante (47). Las flavonas y antocianinas se acumulan en respuesta a exposición intensa a la luz, actuando como fotoprotectores, reduciendo la cantidad de luz que llega a los sistemas fotosintéticos (45).

Mediante análisis comparativo, se han identificado 96 genes ortólogos a Arabidopsis thaliana que están implicados en la ruta biosintética de los flavonoides, los cuales pueden revisarse a detalle en (49). Son 60 genes más que en Arabidopsis, y de los cuales se ha evaluado en tabaco son genes funcionales. Algo importante de notar es el elevado número de genes ortólogos a dihidroflavon-4-reductasa (DFR), mientras que para Arabidopsis solo se encuentra uno, en cacao se encontraron 18. Los DFR catalizan la reacción que produce los flavan-3, 4-dioles, quienes son los precursores inmediatos de los flavonoides catequina y epicatequina; lo que explicaría la acumulación de estos compuestos fenólicos de entre 8-12% de peso seco de las almendras desgrasadas y que coloca como ya antes se apuntó al cacao como una de las fuentes más ricas conocidas de este fitonutriente (49,50).

Aroma y sabor del cacao, efecto del procesamiento poscosecha

Además de las características reológicas de la pasta de cacao (obtenida de la molienda de las almendras secas y tostadas), o de las propiedades físicas de la manteca de cacao (extraída por prensado, disolventes u otro método), el aroma y sabor de las almendras y de los derivados de éstas (particularmente el chocolate), son las principales razones de la popularidad del cacao. A su vez, el aroma y sabor está en función de la presencia y/o ausencia de diversos compuestos (51). Algunos autores (11,52) han realizado esfuerzos para relacionar la presencia de algunos compuestos tanto

con la calidad sensorial como con la ausencia de aroma y/o sabor característico de las almendras. En este sentido, se ha indicado que los ácidos isobutírico, isovalérico y propiónico pueden fungir tanto como indicadores de calidad deficiente o aromas no deseables en un cacao (rancio, astringente, acidez extrema, aroma a queso o a jamón) que puede a su vez ser el resultado de tiempos prolongados en los procesos de fermentación (11). Así mismo, algunos alcoholes producidos durante la fermentación (comentadas más adelante) también son empleados como indicadores de calidad (53), o los ácidos orgánicos (principalmente acético) son indicadores de la acidificación de las almendras y consecuentemente de su calidad. En este sentido se pueden revisar reportes más completos para ver la contribución de compuestos volátiles y no volátiles y su implicación en la calidad sensorial.

Sin embargo, existen moléculas no volátiles como los polifenoles y los alcaloides que de manera directa participan en el sabor de las almendras y de manera indirecta como precursores de moléculas que participan en el olor. Los polifenoles están implicados tanto en la astringencia de las almendras como en la intensidad de aromas a cacao, verde, afrutado. Por su parte, los alcaloides, específicamente la teobromina, la cafeína y la teofilina, son los principales responsables del sabor amargo de las almendras y de la palatabilidad de los productos elaborados a partir de las almendras. La concentración de estos compuestos, está influenciada por el procesamiento de las almendras (52,54).

De lo anterior, es importante hacer notar que, el sabor y aroma de las almendras producidas por el árbol del cacaotero, o correctamente expresado, sus precursores son el resultado de varios factores. El más determinante es el origen genético, pues se ha documentado que de las variedades diferenciadas en hasta diez grupos genéticos usando marcadores moleculares microsatélites, se pueden obtener cacaos con variabilidad en la calidad sensorial (55); sobre todo entre cacaos del grupo genético

Criollo (independientemente de su origen geográfico) y los otros grupos genéticos (56). Otro factor determinante es el ambiente donde se desarrollan los árboles, dado por las condiciones edafo-climáticas y la vegetación asociada a los árboles, que se ha comprobado influyen en los aromas y sabores que habrán de desarrollar las almendras. Por ejemplo, se ha demostrado que la cantidad y composición de compuestos polifenólicos (también de metil xantinas) varía con la altitud a la que se encuentran las plantaciones debido posiblemente al diferencial de radiación UV-B que como antes se discutió influye de manera directa en la biosíntesis de polifenoles (57). Los demás factores, atribuibles al manejo pre y poscosecha son las prácticas culturales de manejo de la plantación, que en las plantaciones de América reviste de importancia por las plagas y enfermedades que aquejan a este cultivo (moniliasis, mancha negra, hormigas, ardillas), fertilización (sintética u orgánica), momento de cosecha, tiempo transcurrido entre la cosecha y el procesamiento de la mazorca, así como las atribuibles (igualmente importantes) al procesamiento de las mismas (58). La fermentación, secado y tostado de las almendras, se han reportado como los principales procesos poscosecha implicados en las características finales de sabor y aroma que habrán de poseer las almendras y consecuentemente los productos de ellas obtenidos como cocoa, chocolate, manteca de cacao (52,54).

Por la relevancia que tiene el procesamiento primario de los frutos y las almendras, y dado que existe un consenso en la comunidad científica acerca de que los principales cambios que ocurren a las almendras durante la fermentación, secado y tostado conlleva implicaciones que habrán de reflejarse en el sabor y aroma de las almendras, toda vez que se dice que un cacao que no es procesado de este modo, no puede desarrollar las características sensoriales deseables de un buen cacao, tendiendo a permanecer astringente y con características heterogéneas (59), resulta de interés ver de manera particular como cada proceso

poscosecha influye en la producción y/o transformación de biomoléculas.

Fermentación

Las frutos de cacao (mazorcas) son bayas con un espeso y duro exocarpio (cáscara) de entre 7 y 20 mm de grosor, la cual sirve de protección a las almendras dispuestas a lo largo de un eje embrionario, y envueltas por un fluido mucilaginoso, el cual dada su composición química actúa como medio de cultivo para que de manera espontánea se desarrollen una sucesión de microorganismos, que dan origen a la fermentación del mucílago y transformación de las todavía almendras por éste envuelto. Los principales componentes del mucílago o pulpa son agua (82-87 %) azúcares (10-15%), pentosanas (2-3 %), ácido cítrico (1-3 %), cuyo contenido determina el pH del mucílago (~3,6) y pectina (1-1,5 %) (60). Ésta última, responsable del aspecto mucilaginoso, aunque contribuyendo de manera importante se han reportado citratos, hemicelulosa y lignina (61). También se han reportado como componentes de la pulpa proteínas, aminoácidos, vitaminas, (principalmente vitamina C) y minerales, los cuales complementan los principales requerimientos de levaduras, bacterias ácido lácticas, ácido acéticas y otras que se han reportado participan de la fermentación (54).

La fermentación es un proceso que se lleva a cabo de manera espontánea, en un período generalmente de cuatro a seis días, en cajas, cestas, o en plataformas (62,63). Pese a que hay algunos informes del desarrollo e inoculación de cultivos iniciadores (66-66), el proceso se sigue dando de manera espontánea, al menos entre los pequeños productores. La primera etapa de la fermentación conlleva un aumento moderado de la temperatura a valores de entre 35 y 45 °C (56) que provoca la transformación de la pulpa mucilaginosa alrededor de los granos, la muerte del embrión y la aparición de metabolitos sensorialmente deseables (67).

Las profundas transformaciones que sufren tanto el mucílago como los granos, son el resul-

tado de la intensa proliferación y actividad microbiana que provocan cambios bioquímicos en el interior de las almendras y que, contribuyen a la reducción de amargor y astringencia; así mismo a la aparición de diferentes compuestos volátiles considerados como indicativos de la calidad del grano (11). A diferencia de otras materias primas fermentables, las enzimas endógenas de las almendras de cacao, al ser activadas juegan un papel fundamental en el desarrollo de moléculas asociadas con el sabor o precursoras del aroma. Estas enzimas, aunadas a la de los microorganismos endófitos de los frutos (aunque se reportan que son estériles) y a las de los que “contaminan” la pulpa, tienen actividad degradadora importante (68).

Durante la primera fase de la fermentación, el metabolismo de levaduras es favorecido por la acidez del medio (dado por el contenido de ácido cítrico), la riqueza en carbohidratos fermentables y el bajo contenido de oxígeno de la masa; estos microorganismos provocan la despectinización (depolymerización de la pectina) del medio, dando lugar a la aparición de alcoholes simples (principalmente etanol) que junto con el ácido cítrico, al permear a las almendras provocan la muerte del embrión (69).

Los metabolitos antes producidos, aunados a azúcares simples (sacarosa, glucosa y fructosa) optimizan el medio para la aparición de bacterias (tolerantes al etanol) ácido lácticas (BAL ó LAB) microaerofílicas y ácido acéticas (BAA) aerófilas, que promueven la degradación de azúcares y la oxidación (exotérmica) de etanol hasta ácidos láctico y acético, respectivamente, además de manitol (66), lo que conlleva a un ligero aumento en la acidez de la pulpa, y al permear a través de la testa de los cotiledones disminuye el pH interno (de 6,5 a 4,8), lo que como antes se citó, activa enzimas endógenas implicadas en la degradación de pigmentos tales como invertasas, glucosidasas, proteasas y polifenol oxidasas (68, 70).

Aunque existen algunos reportes recientes que sugieren que los cambios que ocurren en la fermentación de las almendras de cacao y que de-

terminan la aceptabilidad del producto final está dada casi exclusivamente por las levaduras (71, 72), es todavía innegable el importante papel que desempeñan las bacterias tanto ácido lácticas como ácido acéticas en la producción de metabolitos que imparten aromas muy particulares al cacao (73). En este sentido las investigaciones posteriores serán muy importantes.

Un aspecto adicional importante en el proceso de fermentación y consecuentemente en el desarrollo de sabor y aroma, son los manejos técnicos o tecnológicos que habrán de tenerse para lograr la correcta sucesión de microorganismos. El tamaño del fermento (pila, caja, etc.) se ha propuesto como un factor importante, ya que puede regular en gran medida la temperatura de la masa y junto con el mezclado y volteado constante (diariamente o hasta dos veces al día) durante los días que dura el proceso resultan medulares para evitar el desarrollo de hongos no deseados (74), o la desaparición abrupta de mesófilos deseables en la aparición de moléculas de interés por la falta de aireación o el aumento de la temperatura (75). Una revisión más detallada del proceso de fermentación puede ser consultada en Schnaw y Wheals (54).

En suma, los principales cambios que se asocian con la fermentación pueden ser agrupados en función de la ruta metabólica que habrá de seguir, para estar presentes en las almendras fermentadas:

1. Degradación o transformación: proteínas de almacenamiento (mayoritariamente globulinas) por acción de endo – aspartato-proteasas y carboxipeptidasas, sacarosa (por acción de endo-invertasas), glucósidos (antocianinas), epicatequina y antocianidinas (que son oxidadas por acción de las polifenol oxidasas y transformados en quinonas), quinonas que forman complejos con otros polifenoles, proteínas o péptidos.
2. Formación, básicamente a expensas de otros metabolitos degradados o acompleja-

dos: glucosa y fructosa (a partir de sacarosa), aminoácidos libres (tanto hidrofílicos como hidrófobos), oligopéptidos, alcoholes (etanol), taninos condensados (a partir de polifenoles), antocianidinas (degradación de antocianinas), galactosa, arabinosa, quinonas, ácidos orgánicos (principalmente acético y láctico).

3. Disminución: principalmente por difusión de las células de almacenamiento promovida durante el tiempo de fermentación y que se ha reportado reduce hasta el 30% del total de alcaloides y hasta 20% de polifenoles totales (taninos como las proantocianidinas y flavonoides como la flavan 3-ol).

Estos cambios, generan un amplio número de moléculas agrupadas en familias, de las que sobresalen los ésteres, alcoholes y ácidos (76) que habrán de modificarse o aumentar su contenido con los tratamientos posteriores (Tabla 2) pero que desde esta etapa disminuyen la astringencia (disminución de polifenoles totales) y la tonalidad purpura de las almendras (transformación y degradación de antocianinas), amargor (disminución de alcaloides) de las almendras, desarrollo de coloración marrón (presencia de quinonas). Incluso, algunos parámetros que se emplean a nivel industrial para evaluar el grado de fermentación son los contenidos de antocianinas y el color marrón.

Secado

Una vez completada la fermentación, la humedad de los granos que está por el 60% (77), debe reducirse hasta un nivel que garantice, por un lado que las almendras conservarán su testa, es decir no tan secos que se vuelva quebradiza, pero tampoco con humedad suficiente para permitir la proliferación de hongos que se desarrollan durante el almacenamiento y que pueden generar sabores desagradables o más riesgadamente, producir toxinas. Valores de humedad entre 6 y

TABLA 2. Distribución de las familias de moléculas y número de compuestos volátiles identificados en una muestra típica de cacao (76)

Familias	Cacao fresco	Cacao seco	Cacao tostado
Aldehídos	8	12	11
Alcoholes	15	13	13
Ácidos	14	14	12
Cetonas	9	13	13
Esteres	22	27	26
Hidrocarburos	3	7	3
Pirazinas	3	7	15
Misceláneos	3	5	3
Pirroles	1	4	4
Furanos	6	7	7
Azufres	1	1	2
Terpenos	3	4	3
Fenoles	4	6	6
Oxazoles	0	1	1
Total	92	121	119

8% son altamente deseables (78). Este proceso se lleva a cabo casi exclusivamente, y cuando las condiciones lo permiten, con secado solar. Cuando las condiciones ambientales son adversas, es decir lluvias por períodos prolongados, se recurre a secadores mecánicos, los más empleados son del tipo Samoa o estufas de aire forzado (79). El uso de uno u otro método se ha reportado, puede ejercer efecto sobre las características sensoriales del producto final, en este sentido se ha reportado (11, 80), que los contenidos de alcoholes, ésteres y pirazinas se ven aumentados durante el proceso de secado al sol, mientras que los de ácidos, aldehídos y cetonas disminuidos, lo cual coloca el secado al sol como el mejor método para obtener el máximo sabor (81). Además de los contenidos, las familias de compuestos también se ven modificadas tal como se aprecia en la Tabla 2. Es notorio que los grupos que se sugiere disminuyen en concentración durante el secado, no muestran aumento sustancial en el número de familias (ácidos). Estos cambios, pueden ser explicados debido a la continuidad de la fase oxidativa

que se inició en la fermentación, por lo que el secado juega un papel importante en la disminución de la astringencia, amargor y acidez del grano, así como en el desarrollo del color marrón a partir de los compuestos fenólicos mediado como antes se dijo por polifenol oxidadas (52,81).

Tostado

La última etapa del procesamiento primario de las almendras de cacao es el tostado, que cumple varias funciones físico - químico - sensoriales. Esta etapa ayuda a reblandecer y retirar la testa de las almendras, las vuelve más frágiles, como preparación a la molienda o prensado, pero sobretodo, desarrolla a partir de los precursores generados en la fermentación y secado, aún más el sabor del cacao o característico a chocolate.

Este proceso continúa promoviendo la disminución de la acidez, al reducir las concentraciones de ácidos volátiles como el ácido acético (82); aunque no la de otros ácidos no volátiles como el oxálico, cítrico, tartárico, succínico y láctico (83). Sin embargo, los principales cambios derivan de las reacciones de Maillard y Strecker, donde participan los aminoácidos libres, péptidos y azúcares reductores (84). La reacción de Maillard es una reacción de oscurecimiento no enzimática que requiere un aminoácido y un azúcar reductor, tal como glucosa o fructosa. Las condiciones ideales para la reacción de Maillard que se produzca son, temperatura elevada y bajo contenido de humedad, condiciones que se dan durante el tostado (85). La degradación de Strecker se produce cuando un carbonilo derivado de la reacción de Maillard, reacciona con otros aminoácidos libres del producto. Esto provoca la degradación de los aminoácidos a aldehídos, amoníaco y dióxido de carbono. Los aldehídos que se producen contribuyen al aroma. La degradación de Strecker de cada aminoácido específico, produce un aldehído único con un aroma único (85).

Se ha reportado que aminoácidos hidrofóbicos como la leucina, alanina, fenilalanina y tirosina, liberados durante la fermentación contribuyen de manera importante al unirse a fructosa y glucosa (reductores) que se producen por la hidrólisis de sacarosa (86-88).

CONCLUSIÓN

Los alcaloides y los compuestos polifenólicos presentes en las almendras de cacao participan en el aroma y sabor de las mismas y de los productos que de ellas se obtiene; son responsables de los gustos a amargo, astringente y en menor medida ácido así como los olores ácido, verde y afrutado, entre los principales. La biosíntesis de los polifenoles está regulada por la expresión de enzimas implicadas en la vía del shikimato, además su contenido en la planta y almendras de cacao parece responder a inductores ambientales, como la radiación UV-B, lesiones y ataque de patógenos. Los alcaloides por otra parte disminuyen su concentración en las almendras con la maduración del fruto y con el procesamiento poscosecha, y su biosíntesis es conservada por la síntesis de novo. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de plantas que contienen alcaloides y, debido a que la enzima cafeína sintasa implicada en la formación de teobromina no posee actividad metiladora en el N1, la teobromina resulta ser el principal alcaloide de las almendras de cacao, por lo que la regulación en la expresión de esta enzima parece ser el mecanismo más apropiado para manejar los contenidos de teobromina:cafeína en las almendras de cacao.

REFERENCIAS

- Dantas L, Guerra M. Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. *Genet Mol Biol*. 2010; 33: 94-98.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAOSTAT 2014. Estadísticas de Producción 2012.
- Ploetz R. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology*. 2007; 97: 1634-1639.
- Powis T, Hurst W, Rodríguez M, Ortiz P, Blake M, Cheetham D, et al. The origins of cacao use in Mesoamerica. *Mexicon*. 2008; 30: 35-38.
- Powis T, Cyphers A, Gaikwad N, Grivetti L, Cheong K. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 8595-8600.
- Dillinger T, Barriga P, Escárcega S, Jiménez M, Lowe D, Grivetti L. Food of the Gods: Cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J Nutr*. 2000; 130: 2057S-2072S.
- Ramiro E, Franch A, Castellote C, Andres-Lacueva C. Effect of *Theobroma cacao* flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *Br J Nutr*. 2005; 93: 859-866.
- Liendo R, Padilla F, Quintana A. Characterization of cocoa butter extracted from Criollo cultivars of *Theobroma cacao* L. *Food Res Int*. 1997; 30: 727-731.
- Aprotosoiaie A, Luca S, Miron A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Compr Rev Food Sci F*. 2016; 15: 73-91.
- Afoakwa E, Quao J, Takrama J, Budu A, Saalia F. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *J Food Sci Technol*. 2013; 50: 1097-1105.
- Rodríguez-Campos J, Escalona-Buendía H, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E, Jaramillo-Flores M. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res Int*. 2011; 44: 250-258.
- Sotelo A, Álvarez G. Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cacao bean. *J Agric Food Chem*. 1991; 39: 1940-1943.
- Hammerstone JF, Romanczyk LJ, Aitken WM. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. *Phytochemistry* 1994; 35: 1237-1240.
- Bernays A, Oppenheim S, Chapman R, Kwon H, Gould F. Taste sensitivity of insect herbivores to deterrents is greater in specialists than in generalists: a behavioral test of the hypothesis with two closely related caterpillars. *J Chem Ecol*. 2000; 26: 547-563.
- Smyth D. Effect of methylxanthine treatment on rice seedling growth. *J Plant Growth Regul*. 1992; 11: 125-128.

16. Evans W. Trease and Evans - Pharmacognosy. 15th ed. Edinburgh: Saunders. 2000.
17. Lewis W. Plants used medically by indigenous people. In: Phytochemical resources for medicine and agriculture. pp. 33-74. Nigg H, Seigler D (eds). Plenus Press, New York, USA, 1992.
18. Stark T, Bareuther S, Hofmann T. Molecular definition of the taste of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) by means of quantitative studies and sensory experiments. J Agric Food Chem. 2006; 54: 5530-5539.
19. Ashihara H, Sano H, Crozier A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. Phytochemistry 2008; 69: 841-856.
20. Stasolla C, Katahira R, Thorpe T, Ashihara H. (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. J Plant Physiol. 2003; 160: 1271-1295.
21. Koyama Y, Tomoda Y, Kato M, Ashihara H. Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. Plant Physiol Biochem. 2003; 41: 977-984.
22. Sugiura M, Takeda Y. Nucleic acids. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. pp. 260-310. Buchanan BB, Gruissen W, Jones RL (eds). Rockville, Am Soc Plant Physiol, 2000.
23. Ashihara H, Kato M, Ye C. Biosynthesis and metabolism of purine alkaloids in leaves of cocoa tea (*Camellia ptilophylla*). J Plant Res. 1998; 111: 599-604.
24. Ashihara H, Kubota H. Biosynthesis of purine alkaloids in *Camellia* plants. Plant Cell Physiol. 1987; 28: 535-539.
25. Kato M, Mizuno K, Fujimura T, Iwama M, Irie M, Crozier A, Ashihara H. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. Plant Physiol. 1999; 120: 579-586.
26. Kato M, Mizuno K, Crozier A, Fujimura T, Ashihara H. Caffeine synthase gene from tea leaves. Nature 2000; 406: 956-957.
27. Mazzafera P, Wingsle G, Olsson O, Sandberg G. S-adenosyl-L-methionine: theobromine 1-Nmethyltransferase, an enzyme catalyzing the synthesis of caffeine in coffee. Phytochemistry 1994; 37: 1577-1584.
28. Mizuno K, Okuda A, Kato M, Yoneyama N, Tanaka H, Ashihara H, et al. Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.) FEBS Lett. 2003; 534: 75-81.
29. Mizuno K, Tanaka H, Kato M, Ashihara H, Fujimura T. cDNA cloning of caffeine (theobromine) synthase from coffee (*Coffea arabica* L.). In: Proceedings of the International Scientific Colloquium on Coffee. ASIC, Paris, 2001; 19: 815-818.
30. Uefuji H, Ogita S, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferase involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. Plant Physiol. 2003; 132: 372-380.
31. Rusconi M, Conti A. *Theobroma cacao* L., the food of the gods: A scientific approach beyond myths and claims. Pharmacol Res. 2010; 61: 5-13.
32. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Res Int. 2000; 33: 423-447.
33. Martínez-Valverde I, Periago M, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch Latinoam Nutr. 2000; 50: 5-18.
34. Grotewold E. The science of flavonoids. Ohio, USA: Springer. 2006.
35. Martens S, Mithöfer A. Flavones and flavone synthases. Phytochemistry 2005; 66: 2399-2407.
36. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physiol. 2001; 126: 485-493.
37. Herrmann K, Weaver L. (1999). The shikimate pathway. Annual Review of Plant Physiology. Plant Mol Biol. 1999; 50: 473-503.
38. Bravo L. Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr Rev. 1998; 56: 317-333.
39. Parr A, Bolwell G. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. J Sci Food Agric. 2000; 80: 985-1012.
40. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 1997; 2: 2152-2159.
41. Crozier S, Preston A, Hurst J, Payne M, Mann J, Hainly L, et al. Cacao seeds are a "Super Fruit": A comparative analysis of various fruit powders and products. Chem Cent J. 2011; 5:5.
42. Fatland B, Ke J, Anderson M, Mentzen W, Cui L, Allred C, et al. Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-Coenzyme A in Arabidopsis. Plant

- Physiol. 2004; 130: 740-756.
43. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010; 2: 1231-1246.
 44. Kubasek W, Shirley B, McKillop A, Goodman H, Briggs W, Ausubel F. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 1992; 4: 1229-1236.
 45. Beggs C, Kuhn K, Böcker R, Wellman E. Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 1987; 172: 121-126.
 46. Graham T. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol.* 1991; 95: 594-603.
 47. Dixon R, Pavia N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 1995; 7: 1085-1097.
 48. Hahlbrock K, Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Biol.* 1989; 40: 347-369.
 49. Argout X, Salse J, Aury J, Guiltinan M, Droc G, Gouzy J, et al. The genome of *Theobroma cacao*. *Nat Genet.* 2011; 43: 101-109.
 50. Tomas-Barberán F, Cienfuegos-Jovellanos E, Marín A, Muguerza B, Gil-Izquierdo A, Cerdá B, et al. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 3926-3935.
 51. Frauendorfer F, Schieberle P. Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting. *J Agric Food Chem.* 2008; 56: 10244-20251.
 52. Luna F, Crouzillat D, Cirou L, Bucheli P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 3527-3532.
 53. Oberparleiter S, Ziegler G. Amylcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality. *Z Lebensm Unters Forsch A.* 1997; 204: 156-160.
 54. Schwan R, Wheals A. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004; 44: 205-221.
 55. Bozan E, Motamayor J, Amores F, Cedeño-Amador S, Tondo C, Livingstone D, Schnell R, Gutiérrez O. Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: Its Impact and significance on global cacao improvement and production. *J Am Soc Hort Sci.* 2014; 139: 219-229.
 56. Camú N, De Winter T, Addo S, Takrama J, Bernaert H, De Vuyst L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *J Sci Food Agr.* 2008; 88: 2288-2297.
 57. Carrillo L, Londoño-Londoño J, Gil A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Res Intern.* 2014; 60: 273-280.
 58. Aikpokpodion, P. Variation in agromorphological characteristics of cacao, *Theobroma cacao* L., in farmers' fields in Nigeria. *New Zeal J Crop Hort.* 2010; 38: 157-170.
 59. Hansen C, del Olmo M, Burri C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J Sci Food Agr.* 1998; 77: 273-281.
 60. Roelofsen PA. Fermentation, drying, and storage of cocoa beans. *Adv Food Res.* 1958; 8: 225-296.
 61. Pettipher G. Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium. *J Sci Food Agr.* 1986; 37: 297-309.
 62. Baker D, Tomlins K, Gray C. Survey of Ghanaian cocoa farmer fermentation practices and their influence on cocoa flavour. *Food Chem.* 1994; 51: 425-431.
 63. Tomlins K, Baker D, Daplyn P, Adomako D. Effect of fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. *Food Chem.* 1993; 46: 257-263.
 64. Schwan R. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 1477-1483.
 65. Dzogbefia V, Buamah R, Oldham J. The controlled fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) using yeasts: enzymatic process and associated physico-chemical changes in cocoa sweatings. *Food Biotechnol.* 1999; 13: 1-12.
 66. Lefeber T, Janssens M, Camú N, De Vuyst L. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 7708-7716.
 67. Gotsch N. Cocoa biotechnology: status, constraints and future prospects. *Biotechnol Adv.* 1997; 15: 333-352.
 68. De Brito E, Pezoa-García N, Gallão M, Cortelazzo A, Fevereiro P, Braga M. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *J Sci Food Agr.* 2000; 81: 281-288.
 69. Quesnel V. Agents inducing the death of the cacao seeds during fermentation. *J Sci Food Agr.* 1965;

- 16: 441-447.
70. Misnawi S, Jamilah B, Nazamid S. Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. *Int J Food Sci Tech.* 2003; 38: 285-295.
 71. Ho VT, Zhao J, Fleet G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *Int J Food Microbiol.* 2014; 174: 72-87.
 72. Ho VT, Zhao J, Fleet G. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *Int J Food Microbiol.* 2015; 205: 54-67.
 73. De Vuyst L, Weckx S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *J Appl Microbiol.* 2016; doi: 10.1111/jam.13045.
 74. Papalexandratou Z, Vrancken G, De Bruyne K, Vandamme P, De Vuyst L. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiol.* 2011; 28: 1326-1338.
 75. Rohan T. The precursors of chocolate aroma: application of gas chromatography in following formation during fermentation of cocoa beans. *J Food Sci.* 1963; 32: 402-404.
 76. Portillo E, Labarca M, Grazziani L, Cros E, Assemat S, Davrieux F, et al. Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao L.*) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Rev UDO Agric.* 2009; 9: 458-468.
 77. Rohan T. The precursors of chocolate aroma: comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. *J Food Sci.* 1964; 29: 456-459.
 78. Harrington W. The effects of roasting time and temperature on the antioxidant capacity of cocoa beans from Dominican Republic, Ecuador, Haiti, Indonesia, and Ivory Coast. Tesis de Maestría, Universidad de Tennessee. EUA. 2011.
 79. Amoye S. Cocoa sourcing, world economics and supply. *Manuf Confect.* 2006; 86: 81e-85e.
 80. Rodríguez-Campos J, Escalona-Buendía HB, Contreras-Ramos SM, Orozco-Avila I, Jaramillo-Flores E, Lugo-Cervantes E. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chem.* 2011; 132: 277-288.
 81. Jinap S, Siti M, Norsiaty M. Formation of methyl pyrazine during cocoa bean fermentation. *Pertanika J Trop Agric Sci.* 1994; 17: 27-32.
 82. Ramli N, Hassan O, Said M, Samsudin W, Idris N. Influence of roasting condition on volatile flavour of roasted Malaysian cocoa beans. *J Food Process Preserv.* 2006; 30: 280-298.
 83. Jinap S, Wan Rosli W, Russly A, Nordin L. Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *J Sci Food Agr.* 1998; 77: 441-448.
 84. Ziegleder G. Composition of flavor extracts of raw and roasted beans. *Z Lebensm Unters For.* 1991; 192: 521-525.
 85. Lindsay R. Food Additives. In: *Food Chemistry.* pp. 768-823. 3rd edition. Fennema O (ed). Marcel Dekker, New York, USA, 1996.
 86. Voigt J, Biehl B, Heinrich H, Kamaruddin S, Gaim-Marsoner G, Hugi A. In vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma related peptides generated from cocoa seed protein by cooperation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem.* 1994; 49: 173-180.
 87. Voigt J, Biehl B, Kamaruddin S. The major seed proteins of *Theobroma cacao L.* *Food Chem.* 1993; 47: 145-151.
 88. Granvogl M, Bugan S, Schieberle P. Formation of amines and aldehydes from parent amino acids during thermal processing of cocoa and model systems: new insights into pathways of the Strecker reaction. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 1730-1739.
 89. Álvarez C, Pérez E, Lares M. Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, estado Aragua. *Agron Trop.* 2007; 57: 249-256.
 90. Ashihara H, Kato M, Crozier A. Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. In: *Methylxanthines, Handbook of Experimental Pharmacology.* pp. 11-31. Fredholm BB (ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2011.
 91. Ishida M, Kitao N, Mizuno K, Tanikawa N, Kato M. Occurrence of theobromine synthase in purine alkaloid-free species of *Camellia* plants. *Planta* 2009; 229: 559-568.

Recibido: 29-01-2016
Aceptado: 27-05-2016