

## NOTA TÉCNICA

### EVALUACIÓN QUÍMICA DE PRECURSORES DE AROMA Y SABOR DEL CACAO CRIOLLO MERIDEÑO DURANTE LA FERMENTACIÓN EN DOS CONDICIONES EDAFOCLIMÁTICAS

### CHEMICAL EVALUATION OF AROMA AND FLAVOR OF PRECURSORS OF THE CRIOLLO MERIDEÑO COCOA DURING FERMENTATION IN TWO EDAFOCLIMATIC CONDITIONS

Alexis Zambrano\*, Carlos Romero\*, Álvaro Gómez\*\*, Gladys Ramos\*\*, Carlos Lacruz\*\*\*, María del Rosario Brunetto\*, Gallignani Máximo\*, Lubin Gutiérrez\* y Yelitza Delgado\*

\*Profesores. Universidad de Los Andes (ULA). Facultad de Ciencias. Estado Mérida. Venezuela.

\*\*Investigadores y \*\*\*Técnico Asociado a la Investigación. INIA Mérida. Venezuela.

E-mail: alexiszve@yahoo.com.

#### RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó algunos parámetros asociados con los compuestos de aroma y sabor del cacao, *Theobroma cacao* L., Criollo Merideño (CM) cultivado bajo dos condiciones edafoclimáticas. Un primer lote establecido en el Campo Experimental San Juan de Lagunillas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Mérida), Venezuela, a una altura de 1 050 m.s.n.m con temperatura media anual de 26 °C y otro lote ubicado en la población Zea del mismo estado, a 850 m.s.n.m y 22 °C, respectivamente. Los análisis se efectuaron en muestras de cotiledones frescos durante el proceso de fermentación. En ambos casos se evaluó el porcentaje de: cascarilla, humedad, grasa y punto de fusión, contenido de ácidos volátiles, azúcares totales, polifenoles, purinas totales, teobromina, cafeína y pirazinas. Los resultados muestran que el cacao CM en San Juan de Lagunillas (SJL), presentó menor acidez titulable al inicio del secado y volátil al final de la fermentación, en comparación con el CM en Zea. Así mismo, se observó ligeras diferencias en el contenido de grasas, azúcares totales, pirazinas, cafeína y teobromina, lo que indica que las condiciones edafoclimáticas generaron cambios en el comportamiento químico de los precursores de aroma y sabor. Todos los parámetros químicos fueron corregidos en función de la humedad de la muestra durante el proceso de fermentación y relacionados con una muestra de cacao fermentado Forastero de Ghana.

**Palabras Clave:** azúcares; Criollo Merideño; fermentación; precursores de aroma; *Theobroma cacao* L.

#### SUMMARY

The present study evaluated some parameters associated with the aroma and flavor compounds in cocoa, *Theobroma cacao* L., Merideño Creole (MC) grown under soil and climatic conditions. A lot set in the Experimental Station of the San Juan de Lagunillas (INIA-Mérida), Venezuela at an altitude of 1,050 m.a.s.l. and average annual temperature of 26 °C and another in the town of Zea, Zea municipality of Mérida and 850 m.a.s.l. 22 °C average temperature. Tests were conducted on samples of fresh cotyledons during the fermentation process. Both cases evaluated the percentage of fiber, moisture, fat and its melting point, content of volatile acidity, total sugars, polyphenols, total purines, theobromine, caffeine and pyrazine. The results show that the MC cacao in San Juan of Lagunillas, a low acidity at the start of drying compared to MC in Zea as well as a less volatile acidity at the end of fermentation. It was also noted slight differences in fat content, total sugars, pyrazine and content of caffeine and theobromine, indicating that soil and climatic conditions have led to changes in the chemical behavior of the precursors of aroma and flavor. All chemical parameters were corrected according to the moisture of the sample during the fermentation process and were associated with a sample of fermented cocoa of Ghana.

**Key Words:** aroma precursors; fermentation; Merideño Creole; sugars; *Theobroma cacao* L.

RECIBIDO: febrero 02, 2010

ACEPTADO: septiembre 19, 2010

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años el mercado del cacao, *Theobroma cacao* L., resulta cada vez más exigente en cuanto a la uniformidad y las características aromáticas de la almendra. De este modo, se abren nuevas oportunidades para los productores e investigadores en este rubro.

A los productores se les permitirá ofrecer un producto de calidad definida, capaz de satisfacer las necesidades del cliente y a los investigadores les brindaría un campo que aunque no es nuevo, aún requiere estudios detallados para definir criterios de calidad confiables y reproducibles (Cros y Jeanjean, 1995).

En este sentido, el beneficio de la postcosecha representa una de las etapas de mayor relevancia en la formación de compuestos de aroma y sabor, siendo la fermentación fundamental para los precursores de aroma. Esta etapa incluye dos fenómenos distintos pero no independientes.

El primero es una fermentación microbiana de la pulpa que contribuye a degradar el mucilago presente alrededor de las almendras de cacao; y el segundo es un conjunto de reacciones bioquímicas internas en las mismas que conducen a una modificación de la composición fenólica, a la formación de los precursores de aroma que se consumirán en el tostado y a la formación de una fracción volátil.

Algunos autores indican que los aminoácidos y azúcares reductores resultaron ser los precursores del sabor y aroma del cacao, formando estos compuestos las pirazinas luego de un tratamiento térmico por la reacción de Maillard (Cros y Jeanjean, 1995).

En ese sentido, el contenido de azúcares reductores puede significar un criterio para evaluar el proceso de fermentación del cacao. Además, los azúcares reductores como la fructosa y glucosa representan no más del 25% del contenido inicial de sacarosa después de la fermentación. De este modo, la fructosa (0,2-0,4%) fue superior a la glucosa (0,07-0,1%).

Por otra parte, los contenidos de fructosa y glucosa son bajos pero equivalentes para granos, poco o no fermentados, mientras que el tostado del cacao bien fermentado produce un consumo prácticamente total de los azúcares reductores y de aminoácidos (Rohan y Stewart, 1967; Biehl *et al.*, 1989).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización de los ensayos

Fue realizado en un Campo Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del Estado Mérida (INIA Mérida), en una parcela de establecimiento del cacao CM en SJL, ubicada geográficamente en Los Andes venezolanos, formando parte de la cuenca media inferior del río Chama, municipio Sucre. El área de estudio se sitúa entre las coordenadas 8°28'30" y 8°32'00" LN, entre los 71°19'00" y 71°22'30" LO a una altitud de 1 150 m.s.n.m.

La topografía en general se encuentra influenciada por el control estructural proveniente de la falla de Boconó, presentándose una fosa tectónica entre el Páramo El Tambor y las estribaciones de la Sierra Nevada. En la localidad San Juan de Lagunillas, se distinguen dos grandes unidades de relieve: la unidad de vertiente, ubicada principalmente al Norte del área con pendientes mayores al 30% y la unidad de fondo de valle, la cual es producto de las acumulaciones provenientes tanto del río Chama como de las diversas quebradas afluentes del mismo.

Estas acumulaciones poseen pendientes promedio de 30% en las terrazas viejas y del 8% en las terrazas recientes (Concha e Izquierdo, 1982). El campo experimental se encuentra dentro de los rangos de pendiente de 5 a 12%, caracterizado por ser inclinado, de forma plana, localizado en los conos terraza y con una superficie desigual.

De acuerdo a las condiciones geomorfológicas el Campo Experimental San Juan de Lagunillas del INIA Mérida, descansa sobre sustratos de origen coluvial, como son los torrentes de detritus o lava torrencial, cuya característica principal es una matriz compacta de sedimentos arcillosos con inclusiones de bloques subangulares. Este material parental le confiere a los suelos una textura gravosa de media a fina, franco arcillosa y arcillosa, debido a las condiciones hidroclimáticas del municipio Sucre. Estas texturas permiten retener las pocas precipitaciones, las cuales no exceden los 600 mm anuales, mostrando un déficit durante todo el año (Concha e Izquierdo, 1982).

Con respecto a la temperatura, existe una moderada variabilidad de este parámetro, debido a que las condiciones topográficas proporcionan una marcada diferencia en la zona, creando el efecto de corrientes de aire (bolsón semiárido de San Juan de Lagunillas), que arrastran la humedad presente en el ambiente, la cual precipita en

los alrededores de Tabay y La Mucuy. Como consecuencia, las temperaturas oscilan entre los 18 y 30 °C, determinando una amplitud térmica entre 12 y 14 °C, condición que favorece la adaptación de cultivos de almacenamiento como la caña panelera.

Por otra parte, el período más seco se ubica entre diciembre y marzo, durante el cual ocurren las menores precipitaciones y corresponde con un descenso de las temperaturas, siendo este período más fresco que el comprendido entre junio y agosto donde se registran las mayores precipitaciones. Se observa que la evapotranspiración supera durante todo el año la precipitación, traduciéndose en un déficit anual de agua de 116 mm, cuando el suelo no llega en ningún momento a cubrir por completo la evapotranspiración potencial.

Por consiguiente, se hace necesario la aplicación de riego oportuno, uniforme y eficiente que permita almacenar una lámina de agua en el volumen de suelo ocupado por las raíces (Gurovich, 2001) de acuerdo a su estado fenológico. Cabe destacar que el Campo Experimental San Juan de Lagunillas posee un sistema de riego que le permite controlar los problemas de déficit de agua.

**Cacao Criollo Merideño en Zea:** ubicado en la calle 4, N° 895, Quinta Eluí en la población de Zea, municipio Zea del estado Mérida a una altura de 850 m.s.n.m. y temperatura media de 21,9 °C. Geográficamente el área de estudio se sitúa entre 08°22'83" LN y 71°46'95" LO. Su geomorfología corresponde a abanicos aluviales coalescentes y la unidad geomorfológica en la cordillera de Los Andes. El tipo de relieve es de valle. La forma del terreno es plana con pendiente < 2%.

Igualmente, los suelos son ácidos con pH cercanos a 5,1; además, exhiben bajos contenidos de materia orgánica (3,05%) y capacidad de intercambio catiónico (18,6 C-moles kg<sup>-1</sup>). Presentan una textura franco arcillo arenosa con drenajes internos y externos rápidos. En cuanto al clima, presenta una precipitación media anual entre 1 102 y 1 335 mm y una temperatura media de 21,9 °C. El tipo de paisaje es montañoso, donde la vegetación de la zona está compuesta principalmente por cacao CM e híbridos, parchita, café, cambur, aguacate, naranja y yuca, así como, sombra permanente de cambur, aguacate, naranja y bucare.

Entre las limitaciones agronómicas más importantes se destaca la escasa profundidad y pedregosidad variable donde en ciertos sectores existe una capa de grava y piedras a una profundidad de 20 cm.

## Muestra vegetal

**Cacaos criollos:** CM en SJL procedente del Campo Experimental San Juan de Lagunillas, municipio Sucre y CM en Zea derivado del terreno de la familia Benavides, municipio Zea, ambos del estado Mérida.

**Forastero:** cacao de Ghana (muestra referencial) suministrado por Guittard Chocolate Company.

**Preparación de la muestra:** una vez cosechado el cacao las semillas se sometieron a un proceso de fermentación durante 3 d. Este último proceso se realizó por triplicado en cajones de madera de 60 cm<sup>3</sup> durante un año, bajo condiciones de laboratorio. El volteo de la masa fermentante se realizó cada 24 h. Posteriormente, se efectuó el proceso de secado durante 6 d. Una vez que se secaron las muestras, se tomaron tres réplicas a las que se le aplicaron los diferentes análisis físico-químicos.

La muestra Forastero de Ghana se trató como los demás cacaos una vez concluido el proceso postcosecha. Seguidamente, se molieron, tamizaron ( $\leq 42$  mesh) y se desgrasaron de acuerdo al método de extracción con Soxhlet (IOCCC, 1996), almacenando las muestras a -20 °C para su conservación y análisis.

Para la determinación de polifenoles totales se empleó el método de Azul Prusiano (Budini *et al.*, 1980), los azúcares totales se determinaron por los métodos de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Las purinas totales (teobromina, cafeína y teofilina) se determinaron por el método de extracción con agua caliente (IOCCC, 1988). Para el análisis cromatográfico de purinas se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución con detector UV-arreglo de diodos y con limpieza de la muestra en línea, aplicando un sistema de columnas acopladas en la modalidad de transferencia indirecta.

La extracción de los analitos se realizó en una precolumna fabricada en el laboratorio de 50 x 4,6 mm empacada con una fase sílice C<sub>18</sub> (Alltech), de diámetro de partícula de 35 a 750  $\mu$ m. Finalmente, 0,01 g del polvo desgrasado se sometió a un proceso de extracción con 10 ml de H<sub>2</sub>O hirviendo durante 20 min. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente, se centrifugó a 3 000 g y el sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro Millipore de 45  $\mu$ m de diámetro de poro. Seguidamente, 10  $\mu$ l de esta solución se inyectó en el sistema cromatográfico.

**Preparación de licores de cacao:** la preparación del licor de cacao incluyó el tostado en estufa de circulación

forzada de aire. Las muestras de cacao CM se tostaron a 110 °C durante 20, 25 y 30 min y la muestra referencial de Ghana fue tostada a 145 °C por 30 min, de acuerdo a la metodología propuesta por Sukha *et al.*, 2007.

Por consiguiente, las semillas de cacao se fragmentaron y descascarillaron usando un molino de café de uso doméstico. Posteriormente, las almendras tostadas se rompieron hasta obtener trozos (nibs) de tamaño 0,5-0,25 cm, separándolos de la cáscara en un descascarillador de cacao marca John Gordon International. Simultáneamente, los nibs se molieron en un mortero (modelo 0, Pascall Co., UK) que se calienta inicialmente a 40 °C con una pistola de aire caliente (Black and Decker). La fabricación tuvo una duración de 90 min permitiendo que se formara un buen licor, luego fueron almacenados a -20 °C en envases plásticos estériles de 120 ml de capacidad.

Para la determinación de pirazinas se realizó sobre muestras de licor de cacao, en este caso el tostado de las almendras se realizó a un tiempo y temperatura definidas de acuerdo a las características de tamaño de las semillas, se estableció 110 °C por 25 min de acuerdo a las recomendaciones sugeridas por Guittard Chocolate Company, mientras que el cacao de Ghana se tostó a 145 °C por 30 min, mediante el acoplamiento instrumental utilizando un automuestreador automático de espacio de cabeza (EC, Perkin Elmer HS - 40) conectado a través de una transferencia capilar termostatzada al inyector de un cromatógrafo de gases (CG) VARIAN 3800.

La columna capilar seleccionada fue de sílice fundida de polietilenglicol AV – WAX (VARIAN) de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno y con un espesor de película de 0,25 mm y el detector un espectrómetro de masas VARIAN Saturno 2000, utilizando He como gas portador a un flujo de 1,0 ml.min<sup>-1</sup>.

Para ello, se realizó la extracción sólido-gas de los analitos en un vial de 22 ml de capacidad del EC. Se pesó 0,30 g de polvo de cacao previamente homogeneizado y se añadió 0,60 ml de metanol, el vial se cerró herméticamente, se agitó en un vortex por 1 min para asegurar proceso de la muestra y se termostató a 105 °C durante 15 min. Finalizado el tiempo de este último, el vial se presurizó 3 min con N<sub>2</sub> para facilitar la inyección del espacio de cabeza en la columna durante un tiempo de 0,08 min.

La separación de las pirazinas en la columna cromatográfica se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones de trabajo: programa de temperatura del horno 50 °C (2 min) a 70 °C (1 min) con una velocidad de

calentamiento de 10 °C.min<sup>-1</sup>, luego a 120 °C (1 min) a 4 °C.min<sup>-1</sup> y por último a 200 °C (10 min) a 20 °C.min<sup>-1</sup>. La temperatura del inyector se fijó a 220 °C. El modo de inyección empleado fue splitless con un tiempo de apertura de la válvula de 0,40 min y el detector de masas se operó bajo la modalidad de impacto electrónico utilizando 220, 50 y 220 °C como temperatura para la trampa, el manifold y la línea de transferencia, respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el caso del cacao CM en SJL durante la fermentación, la temperatura máxima alcanzada en los dos tipos de cacao estudiados osciló entre 45 y 50 °C. El porcentaje de cascarilla no superó el 13,5% en peso de la almendra. Se consiguió que el pH en la testa al final del proceso fue 4,66 y en cotiledones 4,71 (Cuadro 1). Este cacao presentó menor acidez titulable al inicio del secado en comparación con el CMZ, así como, una menor acidez volátil (alrededor de 18 mg CH<sub>3</sub>COOH) al final de la fermentación (Cuadro 2).

El CM en Zea presentó mayor contenido de grasa (cercano al 53%), mientras que el CM en SJL no superó el 50%, aunque los puntos de fusión resultaron ser iguales, indicando que la dureza de la manteca de cacao en ambos casos fue similar. Sin embargo, los niveles de grasa se vieron afectados por las condiciones edafoclimáticas. Resultados similares indicó Wintgens (1991) al evaluar la influencia de los factores genéticos y las condiciones agroclimáticas sobre la calidad de diferentes tipos de cacao en varios países.

Mediante la determinación de los compuestos precursores de aroma en el cacao CM en SJL, se obtuvo el 30,92 mg glucosa.gm<sup>-1</sup> como azúcares totales, mientras que en las purinas totales (cafeína, teobromina y teofilina) un 2,38% de teobromina. Finalmente, se evaluó los niveles totales de compuestos fenólicos y sus principales clases: cianidinas, procianidinas y flavanoles. Se alcanzó el 47,71 mg ácido gálico.g<sup>-1</sup> como polifenoles, al mismo tiempo que las cianidinas no superaron el 0,53 mg cianidina.g<sup>-1</sup> y las procianidinas el 47,47 mg cianidina.g<sup>-1</sup>, para los dos cacaos CM estudiados. En el cacao Forastero de Ghana, estos valores fueron superiores (Cuadro 3).

Cabe destacar, que los polifenoles están directamente relacionados con la astringencia del cacao (Sukha *et al.*, 2006). Estos resultados corresponden con los obtenidos por Elwers *et al.*, 2009 cuando señalan que los cacaos criollos no tienen o casi no tienen antocianinas.



**CUADRO 1.** Análisis físico-químicos del cacao Criollo Merideño en San Juan de Lagunillas, fermentado y seco.

Variable	Unidad de medida	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	CV
<b>Cascarilla</b>	Contenido (%)	11,30	12,12	9,52	0,12
<b>Acidez</b>	pH testa	4,26	4,58	4,30	0,04
	pH cotiledón	6,23	4,70	5,37	0,14
	Acidez titulable (meq NaOH.gm <sup>-1</sup> )	1,00	2,90	1,91	0,49
	Acidez volátil (mg CH <sub>3</sub> COOH.gm <sup>-1</sup> )	8,24	4,83	4,17	0,38
<b>Polifenoles</b>	Polifenoles totales (mg ácido gálico.g <sup>-1</sup> )	44,56	33,97	24,09	0,3
	Flavonoles totales (mg catequiza.g <sup>-1</sup> )	33,14	26,17	28,49	0,12
	Cianidinas totales (mg cianidina.g <sup>-1</sup> )	0,56	0,50	0,54	0,06
	Procianidinas totales (mg cianidina.g <sup>-1</sup> )	57,05	45,99	39,36	0,19
<b>Purinas</b>	Purinas totales (% teobromina)	2,82	1,95	2,40	0,18
	Teobromina (%)	1,79	1,38	1,60	0,13
	Cafeína (%)	0,99	0,63	0,81	0,22
	Relación teobromina/cafeína	1,81	2,19	1,98	0,1
<b>Azúcares</b>	Azúcares totales (mg glucosa.gm <sup>-1</sup> )	25,04	28,44	35,32	0,16
<b>Grasa</b>	Contenido (%)	48,22	47,96	51,59	0,04
	Punto de fusión (°C)	32,50	32,40	32,70	0,05

CV: Coeficiente de variación

gm: Gramo de muestra

En cuanto al contenido de purinas totales, el cacao CM en SJL fermentado y seco mostró 2,38 mg teobromina.gm<sup>-1</sup>, mientras que el cacao CM en Zea presentó una concentración media de 2,52 mg teobromina.gm<sup>-1</sup>. Respecto a la relación teobromina/cafeína en función de la concentración de cafeína se encontró que el cacao CM en Zea arrojó menor relación teobromina/cafeína que el cacao CM en SJL. Dicha relación no permitió diferenciar entre los dos tipos de cacaos, pero sí entre éstos y el cacao Forastero de Ghana (Cuadro 3), indicando que dichos cacaos son genéticamente iguales. Sin embargo, las diferencias edafoclimáticas afectaron la concentración de compuestos precursores de aroma, como el caso de los azúcares polifenoles, también los ácidos volátiles y no volátiles.

En la Figura, la curva indica que los CM están agrupados en la parte inferior derecha con relaciones teobromina/cafeína menores a dos, mientras que el cacao Forastero de Ghana presenta valores superiores a ocho, siendo la zona entre dos y seis la ubicación del cacao Trinitario. Así mismo, se encontró que no existen diferencias entre los resultados de purinas totales por colorimetría y la sumatoria de metilxantinas obtenidas por cromatografía

líquida de alta resolución en el método desarrollado. En estudios similares Davrieux *et al.* (2004) muestran que existe relación entre el contenido de metilxantinas y el genotipo del cacao.

Con relación a los licores se evaluaron los niveles de los compuestos volátiles (2-metil pirazina; 2,5-dimetil pirazina; 2,6-dimetil pirazina; etil pirazina; 2,3-dimetil pirazina; 2,3,5-trimetil pirazina y 2,3,5,6-tetrametil pirazina), tal como demuestra el Cuadro 4. Por otra parte, se observó que en ninguno de los cacaos CM se halló la etil pirazina, mientras que en el cacao Forastero de Ghana, aún cuando se encontró en concentraciones bajas, estuvo presente en todas las evaluaciones.

En este sentido, se podría inferir que la etil pirazina podría ser utilizada como criterio para distinguir entre el cacao Criollo y el Forastero. No obstante, la diferencia de área de pico (concentración) de los distintos compuestos volátiles, no sólo están asociadas al tipo de cacao, sino también a la temperatura y tiempo de tostado, las cuales a su vez dependen del material genético en estudio (Sukha *et al.*, 2006).

**CUADRO 2.** Análisis físico-químicos del cacao Criollo Merideño en Zea, fermentado y seco.

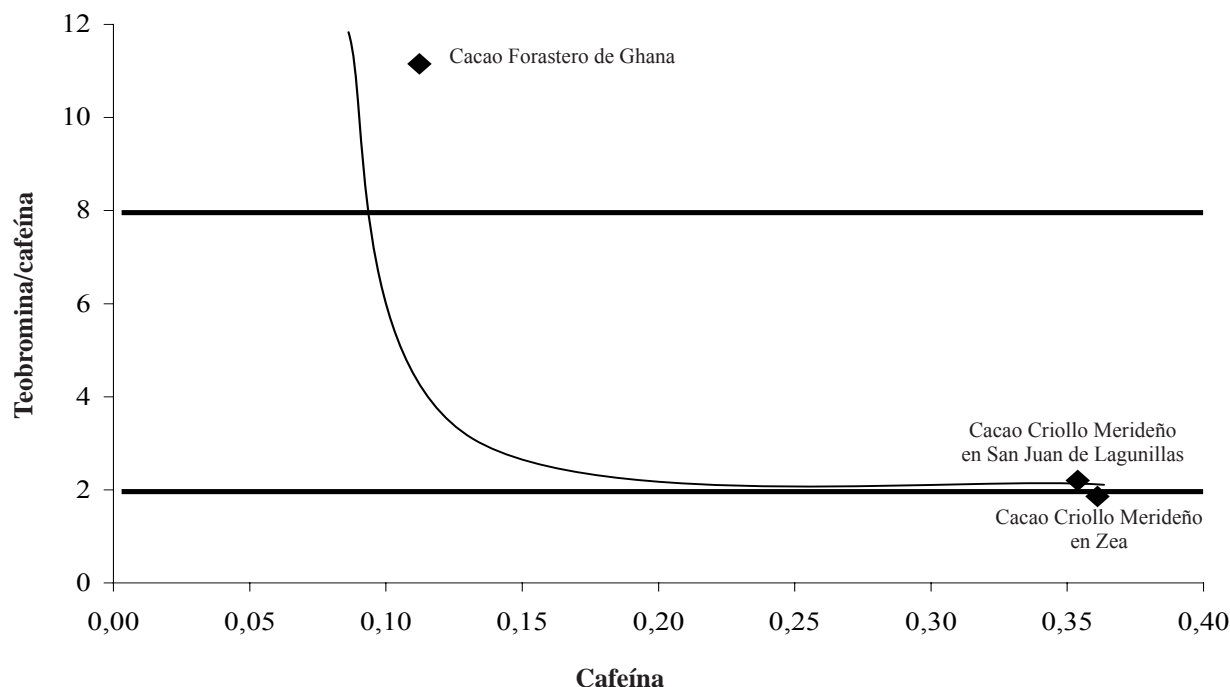
Variable	Unidad de medida	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	CV
<b>Cascarilla</b>	Contenido (%)	13,35	12,99	13,48	0,02
<b>Acidez</b>	pH testa	4,65	4,79	4,55	0,03
	pH cotiledón	4,73	4,90	4,51	0,04
	Acidez titulable (meq NaOH.gm <sup>-1</sup> )	2,94	2,38	3,35	0,17
	Acidez volátil (mg CH <sub>3</sub> COOH.gm <sup>-1</sup> )	16,80	18,47	7,43	0,42
<b>Polifenoles</b>	Polifenoles totales (mg ácido gálico.g <sup>-1</sup> )	44,56	53,23	43,30	0,11
	Flavanoles totales (mg catequiza.g <sup>-1</sup> )	37,08	24,97	33,2	0,2
	Cianidinas totales (mg cianidina.g <sup>-1</sup> )	0,53	0,47	0,5	0,06
	Procianidinas totales (mg cianidina.g <sup>-1</sup> )	50,86	42,70	46,8	0,09
<b>Purinas</b>	Purinas totales (% teobromina)	2,69	2,61	1,84	0,2
	Teobromina (%)	1,37	1,36	1,24	0,06
	Cafeína (%)	0,72	0,77	0,75	0,03
	Relación teobromina/cafeína	1,90	1,77	1,65	0,07
<b>Azúcares</b>	Azúcares totales (mg glucosa.gm <sup>-1</sup> )	31,20	31,32	30,25	0,02
<b>Grasa</b>	Contenido (%)	43,92	56,32	44,35	0,15
	Punto de fusión (°C)	31,80	32,80	32,40	0,02

CV: Coeficiente de variación  
gm: Gramo de muestra

**CUADRO 3.** Análisis físico-químicos del cacao Forastero de Ghana, fermentado y seco.

Variable	Unidad de medida	Muestra 1	Muestra 2	CV
<b>Cascarilla</b>	Contenido (%)	11,87	11,12	0,04
<b>Acidez</b>	pH testa	5,05	5,11	0,01
	pH cotiledón	5,55	5,52	0,004
	Acidez titulable (meq NaOH.gm <sup>-1</sup> )	1,75	2,08	0,12
	Acidez volátil (mg CH <sub>3</sub> COOH.gm <sup>-1</sup> )	7,30	3,62	0,48
<b>Polifenoles</b>	Polifenoles totales (mg ácido gálico.g <sup>-1</sup> )	53,64	66,37	0,15
	Flavanoles totales (mg catequiza.g <sup>-1</sup> )	38,42	11,72	0,75
	Cianidinas totales (mg cianidina.g <sup>-1</sup> )	2,49	2,30	0,06
	Procianidinas totales (mg cianidina.g <sup>-1</sup> )	76,48	78,83	0,02
<b>Purinas</b>	Purinas totales (% teobromina)	2,56	2,47	0,03
	Teobromina (%)	2,15	2,29	0,05
	Cafeína (%)	0,19	0,20	0,04
	Relación teobromina/cafeína	11,32	12,05	0,04
<b>Azúcares</b>	Azúcares totales (mg glucosa.gm <sup>-1</sup> )	15,47	25,24	0,34
<b>Grasa</b>	Contenido (%)	50,10	50,34	0,003
	Punto de fusión (°C)	30,7	33,4	0,06

CV: Coeficiente de variación  
gm: Gramo de muestra



**FIGURA.** Clasificación de los diferentes tipos de cacao en función del genotipo.

Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran un incremento de la concentración de las pirazinas a medida que transcurre el tiempo y la temperatura de torrefacción. En términos generales se evidenció que el cacao CM en Zea, presentó menores contenidos de pirazinas en el cacao CM en SJL. Lo anterior indica que probablemente su concentración se ve influenciada por factores tales como el tiempo, temperatura de tostado, la concentración y tipo de aminoácidos, los cuales son variables importantes a ser consideradas en futuras investigaciones.

**Análisis estadístico:** en la determinación de teobromina y cafeína, la linealidad del ensayo se realizó con ocho puntos de la curva de calibración preparada por dilución de los analitos en agua y con cacao en polvo enriquecida con teobromina y cafeína para concentraciones desde 2,0 a 20,0 y 1,0 a 10,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectivamente. En las curvas de calibración no se consiguió diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) dado que no hay interferencias de matriz. La concentración más baja que se pudo cuantificar con exactitud y precisión, fue de 0,50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para la teobromina y la cafeína. Por otra parte, el límite de detección fue de 0,10  $\mu\text{g}$  para la teobromina y cafeína por cada mililitro, usando 20  $\mu\text{l}$  de extracto en la inyección.

Por otra parte, la aplicación de la prueba de Duncan a los parámetros físicoquímicos señala que existen diferencias significativas mayores al 5% entre los distintos tipos de cacao, especialmente en lo referente al contenido de pirazinas.

## CONCLUSIONES

- El método propuesto permite determinar el contenido de metilxantinas en muestras de cacao fermentadas y no fermentadas.
- La determinación de la relación teobromina/cafeína permitió clasificar los cacaos de acuerdo a su genotipo en la forma clásica de forasteros y criollos.
- Los cacaos estudiados pueden ser genéticamente iguales, pero las diferentes condiciones edafoclimáticas condicionan ciertos parámetros, tales como: polifenoles, contenido de purinas totales, grasa, azúcares y pirazinas.
- La presencia de etil pirazina podría ser utilizada como criterio para diferenciar entre cacao fino (Criollo) y cacao común (Forastero).

**CUADRO 4.** Áreas de pico de licores de cacao Forastero Ghana, Criollo Merideño (CM) procedentes de San Juan de Lagunillas (SJL) y Zea, bajo diferentes condiciones de torrefacción de acuerdo al tipo de cacao.

Tipo de cacao	Condiciones torrefacción	2 Metil pirazina	2,5 Dimetil pirazina	2,6 Dimetil pirazina	Etil pirazina	2,3 Dimetil pirazina	2,3,5 Trimetil pirazina	2,3,5,6 Tetrametil pirazina
Ghana	145 °C x 30 min	737453	1328733	401910	180197	306797	1577173	14696233
CM en SJL	110 °C x 25 min	92103	136250	43793	0	120273	535867	6281463
	110 °C x 30 min	97287	138590	45577	0	165520	888793	6706070
CM en Zea	110 °C x 25 min	931757	62637	75427	0	75467	531100	3783510
	110 °C x 30 min	302503	270873	72233	0	241950	993913	5948523

### AGRADECIMIENTO

Al Proyecto ICCO-CFC-INIAP-INIA, para establecer parámetros físico-químicos y organolépticos para diferenciar entre cacao fino y ordinario.

### BIBLIOGRAFÍA

- Biehl, B., B. Meyer, G. Crone and L. Pollenn. 1989. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post harvest storage of cocoa pods. *J. Sci. Food Agric.* 48:189-208.
- Budini, R., D. Tonelli and S. Cirotti. 1980. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. *J. Agric. Food Chem.* 28:1 236-1 238.
- Concha, M. y S. Izquierdo. 1982. Clasificación de tierras con fines agrícolas (Aplicación del índice de Storie) sector San Juan de Lagunillas. ULA. Mérida-Venezuela. 91 p.
- Cros, E. and N. Jeanjean. 1995. Cocoa quality: effect of fermentation and drying. *Plantations, recherche, développement.* 24:25-27.
- Davrieux, F., S. Assemat, R. Boulanger and E. Cros. 2004. Determination of cocoa purine content by near infrared spectroscopy. XIV international conference of investigation of the cocoa, Ghana, Poster Presentation.
- Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Robers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-355.
- Elwersl, S., A. Zambrano, C. Rohsius and R. Lieberei. 2009. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *Eur Food Res Technol.* 229:937-948.
- Gurovich, R. L. A. 2001. Riego. **In:** Agenda del Salitre. Sociedad Química y Minera de Chile S.A. 11ed. edición. Capítulo V. 139-172 pp.
- International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionary (IOCCC). 1988. Determination of purines in cocoa and cocoa products. *Analytical Method N° 28.*
- International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionary (IOCCC). 1996. Determination of the Fat Content of Cocoa Powder by Soxhlet Extraction. *IOCCC. Analytical Method N° 37.*
- Rohan, T. and T. Stewart. 1967. The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. *J. Food. Sci.* 32:399-401.
- Sukha, D. A., D. R. Butler, F. Amores, J. C. Jimenez, G. Ramos, A. Gomez, A. Zambrano, N. Hollywood and J. Ravushiro. 2006. The CFC/ICCO/INIAP cocoa project "To establish the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate between fine and bulk cocoa" – some highlights from the organoleptic component. Presented at the 15th ICRC, San José, Costa Rica.
- Sukha, D. A., D. R. Butler, P. Umaharan and E. Boulton. 2007. The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour



attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *Eur Food Res Technol.* 226:405-413.

Wintgens, J. N. 1991. Influence of genetic factors and agroclimatic conditions on the quality cocoa. II International congress on cocoa and chocolate. Munich, Alemania, 55 p.