

Análisis de azúcares en pulpa de cacao por colorimetría y electroforesis capilar

Analysis of sugars in cocoa pulp by colorimetric and capillary electrophoresis

Carlos ROMERO¹ y Alexis ZAMBRANO² ✉

¹Laboratorio de Genética y Química Celular (GeQuimCel), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes (ULA), Mérida, 5101, estado Mérida, Venezuela y ²Laboratorio de Investigaciones y Análisis Químicos, Industriales y Agropecuarios (LIAQIA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, ULA. E-mail: alexisz@ula.ve ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 04/02/2010

Fin de arbitraje: 06/12/2011

Revisión recibida: 10/12/2012

Aceptado: 18/12/2012

RESUMEN

En este trabajo, se determinó el contenido de azúcares solubles en la pulpa fresca de semillas maduras de cacao, de nueve cultivos producidos en los estados Zulia, Mérida y Barinas, con el fin de comprobar variaciones entre los principales tipos: Criollos, híbridos y Forasteros. Los azúcares totales y reductores, se determinaron por los métodos de fenol-sulfúrico y ácido 3,5-dinitrosalicílico respectivamente, mientras que el contenido de fructosa, glucosa y sacarosa se evaluó por electroforesis capilar. Los resultados indicaron que el cacao Criollo tiene mayores azúcares totales (1,62-2,84%) que el Forastero (1,37-1,51%) e híbridos (1,45-2,70%). En conclusión, existen diferencias en el contenido de azúcares totales y reductores presentes en la pulpa fresca de los cacaos evaluados, lo cual posiblemente tenga un impacto en el tiempo de fermentación.

Palabras clave: Cacao, pulpa, azúcares, Criollos, electroforesis

ABSTRACT

The content of soluble sugars was determined in the fresh pulp of mature cocoa seeds that were cultivated in nine farms placed in the Zulia, Mérida and Barinas States. This comparison was done in order to demonstrate the variations among the principal cocoa types, such as: Criollos, hybrids and Forasteros. The total and reducing sugars were determined through the phenol-sulfuric and 3,5-dinitrosalicylic acid methods, respectively, while the fructose, glucose and sucrose content was evaluated through capillary electrophoresis. The results have showed that the Criollo Cocoa more total sugars (1.62-2.84%) than the Forastero (1.37-1.51%) and the híbridos (1.45-2.70%). Finally, it could say that there are differences between the content of total and reducing sugars in the fresh pulp of the analyzed cocoas. This condition could have a possible influence in the fermentation period time.

Key words: Cocoa, pulp, sugars, Criollos, electrophoresis

INTRODUCCIÓN

La pulpa del cacao (*Theobroma cacao* L.) es un tejido parenquimático de color blanco formado por células alargadas derivadas del endocarpio que se fusiona con el tegumento de la semilla tomando consistencia mucilaginoso cuando alcanza la madurez. Dicho tejido representa 40-52% del peso fresco de la semilla madura (Biehl *et al.*, 1989 y Saposhikova, 1952) y contiene mayoritariamente agua (78-80%), azúcares simples (10-15%), ácido cítrico (1-3%), proteínas ($\leq 1\%$), grasas ($\leq 0,5\%$), aminoácidos ($\leq 0,2\%$), entre otros, (Schawn *et al.*, 1995 y Lima *et al.*, 2011). Dentro del fruto sano la pulpa permanece estéril, pero es colonizada por una sucesión de microorganismos, particularmente levaduras, bacterias lácticas y acéticas después de

abrir la baya (Rohan, 1964). En tal sentido, la pulpa constituye el sustrato para el crecimiento microbiano durante la fermentación de la semilla, con el fin de generar las sustancias precursoras del sabor y aroma característicos a chocolate (Cros, 1995). Los microorganismos llevan a cabo la fermentación en la pulpa, que contiene carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa) y un valor de acidez (pH) entre 3,3 y 4,0 debido a la presencia de ácido cítrico. La pulpa es viscosa porque contiene pectina y otros polisacáridos, que además dificultan la difusión del aire (Wacher, R.M. 2011). La pulpa es rica en carbohidratos y tiene un pH bajo, favoreciendo de esta manera el desarrollo de microorganismos como las levaduras, las cuales forman parte fundamental en el proceso poscosecha del cacao contribuyendo de esta manera a larga relación con la sociedad humana debido a su

actividad en otros alimentos como el pan, cerveza y vino desde hace aproximadamente 5.000 años (Fleet, 2006).

La fermentación del cacao involucra la degradación microbiana de la pulpa y complejas reacciones enzimáticas dentro de los cotiledones, similares a la germinación. Primero, los azúcares simples son metabolizados por levaduras y bacterias lácticas bajo condiciones anaeróbicas, para producir etanol y ácido láctico respectivamente (Forsyth y Quesnel, 1963). Por otra parte, el consorcio de levaduras consume el oxígeno, creando un ambiente anaerobio que favorece el desarrollo de bacterias lácticas. Luego, el alcohol es transformando en ácido acético por bacterias aeróbicas, con abundante desprendimiento de calor, lo cual eleva la temperatura en la masa fermentante (Jinap, 1994), donde el embrión muere bajo la acción conjunta de la penetración de los ácidos orgánicos, reducción de la concentración de oxígeno y la alta temperatura (≤ 50 °C). Los ácidos, principalmente el acético, reducen el pH del cotiledón y provocan la ruptura de sus membranas celulares permitiendo el contacto entre sustancias almacenadas (proteínas, carbohidratos, polifenoles, triglicéridos etc.) y enzimas endógenas (Biehl *et al.*, 1985). De acuerdo con la cantidad de ácidos absorbidos, los triglicéridos asumen formas de agregación particulares (compacta ó dispersa) que restringen tanto la extensión de las reacciones enzimáticas como la exudación de los productos resultantes, muchos de los cuales son precursores aromáticos tales como: aminoácidos, péptidos, azúcares, etc., (Biehl *et al.*, 1993).

Nielsen *et al.*, (2007) señalan que entre las 36 y 38 horas dominan las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia membranaefaciens*, que se encuentra al final de la fermentación. Así mismo en trabajos más recientes, se ha evaluado la fermentación por pilas en Ghana (uno de los principales países productores de cacao), donde se ha conseguido *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae* como los microorganismos principales de la comunidad de levaduras, donde *Hanseniaspora opuntiae* se desarrolla al principio de la fermentación, debido a su tolerancia a valores bajos de pH y a sus características metabólicas (Daniel *et al.*, 2009).

De esta manera, la actividad microbiológica sobre los azúcares de la pulpa que conlleva a la producción de ácidos y calor, se condiciona indirectamente la calidad organoléptica del cacao

comercial (Selamat y Dimick, 1990). Según Pettipher (1986), existen pocas diferencias entre el contenido de azúcares totales para la pulpa fresca de cacaos Forasteros cultivados en Costa de Marfil, Nigeria y Malasia. Sin embargo, se observan variaciones notables en los niveles de azúcares las cuales son atribuidas a la edad de los frutos.

Actualmente, existe poca información sobre la composición química de la pulpa fresca de cacaos Criollos venezolanos. De aquí el interés por evaluar los azúcares simples en cacaos de la región. El objetivo de esta investigación consiste en determinar el contenido de azúcares en la pulpa de cacaos maduros antes de la fermentación, cultivados en el occidente venezolano, evaluando a su vez el efecto del contenido de azúcares y su consecuencia sobre el crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), como precursores fundamentales de la fermentación del cacao. Del mismo modo, determinar el contenido de azúcares en cacaos Criollos durante los dos periodos de máxima cosecha en un año, en occidente del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra vegetal

Los frutos maduros se cosecharon al azar de tres árboles sanos, pertenecientes a los siguientes tipos agronómicos de *Theobroma cacao* L:

Criollos:

- Porcelana (Estación Local Chama y Campo Experimental San Juan de Lagunillas, INIA-Mérida).
- Guasare (Campo Experimental San Juan de Lagunillas, INIA-Mérida).
- Criollo Merideño (Campo Experimental San Juan de Lagunillas, INIA-Mérida).

Híbridos:

- Ocumare (Sector Río Frío, Tucaní municipio Fray Juan Ramos de Lora-Mérida).
- IMC-67 x OC-61 (IMC-67 x Ocumare 61, Hacienda San Joaquín, Barinas).

- Pentágona (Campo Experimental San Juan de Lagunillas, INIA-Mérida).

Forasteros:

- Amelonado I (San Jacinto, municipio Libertador, Mérida).
- Amelonado II (km 41, municipio Colón, Santa Bárbara del Zulia).
- Pajarito (Cacao corriente conocido como “pajarito”, sector Río Frío, Tucaní municipio Fray Juan Ramos de Lora, Mérida).

En todos los casos, las muestras se tomaron durante la época de mayor producción, es decir, durante la estación lluviosa en cada sitio durante los años 2006 y 2007. Tanto en las estaciones experimentales como unidades de producción privadas, las muestras de cacao fueron escogidas de acuerdo a plantas élites previamente seleccionadas con fines de investigación y de alto rendimiento. En el caso de las unidades de producción de pequeños agricultores, las muestras han sido colectadas bajo las condiciones de manejo agronómico de cada productor. Mientras que las muestras provenientes de estaciones experimentales, las muestras han sido tomadas en parcelas donde no se estaban realizando ensayos de campo para el momento del muestreo.

Preparación de la muestra

De los frutos recién cosechados (< 12 h) se extrajeron las semillas manualmente, para removerles el tegumento con su pulpa adherida sobre un soporte de vidrio, empleando un equipo de disección. El líquido viscoso y dulce se separó del tejido por centrifugación a 8.000 g durante 20 min de cada fruto por separado al vacío a través de una membrana Millipore (0,45 µm) conservándose en tubos estériles a -20 °C. Previo al análisis, las muestras fueron descongeladas colocándolas en baño de María por 5 min. Después se agitaron en un vórtex durante 10 s y finalmente permanecieron a temperatura ambiente por 15 min. Dicho procedimiento se realizó por triplicado en frutos individuales para cada tipo de cacao y árbol.

Análisis fisicoquímicos

pH: Se determinó introduciendo el electrodo del potenciómetro directamente en la muestra de acuerdo al método utilizado por Stevenson et al., 1993, usando un pH-metro Orion 410A.

Humedad: El contenido de humedad en la pulpa de cacao, se siguió de acuerdo al método de la AOAC (1990).

Densidad: La densidad aparente se determinó por el método de desplazamiento de volumen con un picnómetro a 22 °C utilizando agua destilada como líquido de referencia y la densidad de los líquidos según el método AOAC 945,06 (AOAC, 1990).

Materia sólida y humedad: La deshidratación de la pulpa fresca se realizó con un liofilizador Freezone 77510, marca Labconco, con el fin de recuperar los sólidos disueltos y preservar la muestra para sus análisis posteriores (Biehl *et al.*, 1989), tomando una porción (100 mg) para evaluar el contenido de azúcares totales.

Azúcares totales: Se cuantificaron por el método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) en muestras diluidas previamente deshidratadas. La reacción se realizó mezclando 1 mL de la muestra diluida con 1 mL de fenol acuoso y 5 mL de H₂SO₄ concentrado, registrando la absorbancia a 490 nm.

Azúcares reductores: En este caso se usó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). La reacción se efectúa combinando 3 mL de la muestra diluida con 3 mL del reactivo en medio alcalino, calentando la muestra y después de enfriar la solución, para ello se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu mini UV-visible 1240 midiendo la absorbancia a 575 nm a temperatura ambiente.

Electroforesis capilar

Los azúcares reductores, también fueron separados y cuantificados, empleando la metodología desarrollada por Soga y Ross (1999). En esta experiencia se utilizó un equipo de electroforesis capilar Beckman P/Ace 5000 con detector de arreglo de diodos (190-600 nm), cartucho Beckman con capilar de sílice recubierto con poliamida (100 µm DI x 75 cm), siendo el buffer electroforético para azúcares ácido-2,6-dicarboxilpiridina 20 mM y bromuro de cetiltrimetilamonio 0,5 mM (pH = 12,1). Solución regeneradora (NaOH 0,1 M). En esta experiencia se usó 20 µL de pulpa, diluidos con buffer alcalino en el vial de inyección y se introdujo por aspiración desde el extremo catódico del tubo capilar, pre acondicionado con el mismo buffer durante 2 min. Después se aplicó un voltaje constante (-20 kV) que generó una corriente estable de 165 µA, la cual

permitió la migración de los azúcares ionizados negativamente hasta el detector fijado a 230 nm (Stefansson y Westerlund, 1993). La separación se realizó a 15 °C, regenerando el tubo capilar con NaOH 0,1 mM, agua desionizada y buffer alcalino por 2 min., entre las corridas. Para determinar la concentración de los diferentes azúcares estudiados, se construyeron curvas de calibración a partir de cinco concentraciones seriadas (10; 5; 2,5; 1,25 y 0,625 mg/mL) de cada azúcar, registrando la magnitud de la señal a 230 nm y a su vez determinar la precisión del método utilizado. Además de glucosa, fructosa y sacarosa se incorporaron a la muestra los ácidos cítrico y glutámico con el fin de identificar las señales correspondientes por efectos de matriz.

Por otra parte, se realizaron estudios de determinación de azúcares reductores y totales durante dos cosechas consecutivas (ciclo de cosecha completo durante un año) de los cultivares Guasare, Porcelana y Criollo Merideño. Con el fin de evaluar posibles efectos asociados a la época del año. En este ensayo se estableció preferencia sobre los cacaos Criollos, en vista de su importancia nacional como cacaos finos de aroma (Amores *et al.*, 2007), además de ser los materiales de mayor disponibilidad en el occidente venezolano. Todos los resultados de azúcares fueron corregidos en función del contenido de humedad, es decir, los resultados expresados corresponden a muestras de pulpa de cacao húmedas.

Crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

A objeto de estudiar el posible impacto de los azúcares sobre el proceso fermentativo se tomó como criterio el crecimiento anaeróbico de levaduras (*S. cerevisiae*) en pulpa y medio salino con sacarosa al 4% (control). Este se realizó en tubos cerrados bajo agitación constante por 48 h, previa inoculación del

líquido extraído de la pulpa con una suspensión de células, mantenidas en medio salino con sacarosa. Las levaduras fueron recolectadas por centrifugación a 6.000 g durante 5 min., desechándose el medio de cultivo. La masa celular se resuspendió con 25 mL de agua y se estimó el crecimiento a 540 nm (Ramírez, 1993).

Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados por triplicado y a los resultados se les aplicó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significación de 95%, usando el programa Minitab 15 (Minitab, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características químicas de la pulpa de la semilla de cacao

La pulpa del cacao presentó una densidad relativa casi constante (Cuadro 1), debido a la escasa variación del contenido de agua (80±2%) entre los tres tipos de cacao cosechados en diferentes épocas del año (Biehl *et al.*, 1989; Graziani de Fariñas *et al.*, 2003). El pH osciló entre 3 y 4, lo cual se corresponde con la acidez obtenida para frutos maduros (Saposhnikova, 1952). Los cultivares Criollos exhibieron el promedio más bajo (3,21) seguidos por los híbridos (3,61) y Forasteros (3,87). Según Pettipher (1986), existe una relación lineal inversa entre el pH de la pulpa y la concentración de ácido cítrico, por tratarse de la especie predominante (≥ 95%) sobre los demás ácidos presentes (aspártico, glutámico, oxálico, málico y tartárico). Por lo tanto, los cacaos Criollos posiblemente, contienen al menos dos veces mayor proporción de ácido cítrico, respecto a los híbridos y Forasteros.

Cuadro 1. Características de la pulpa para diferentes cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Tipo de cacao	Cultivares	Humedad (%)	pH	Densidad a 22 °C (g/mL)	Azúcares totales (%)
Criollos	Guasare	87	3,31	1,0460	2,56
	Porcelana	86	3,02	1,0352	1,62
	Merideño	85	3,40	1,0684	2,84
Híbridos	Ocumare	82	3,82	1,0389	1,45
	IMC-67 x OC-61	82	3,77	1,0548	2,70
	Pentágona	88	3,25	1,0311	1,90
Forasteros	Amelonado I	90	3,84	1,0531	1,37
	Amelonado II	90	3,56	1,0280	1,51
	Pajarito	91	4,20	1,0686	1,51

De acuerdo al análisis estadísticos, no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes tipos de cacao estudiados (Criollos, híbridos y Forasteros) para la concentración de azúcares totales.

La mayoría de las muestras exhibieron pH entre 3 y 4, el cual se corresponde con los valores señalados por Saposhnikova, (1952). Los pH más bajos ($\leq 3,2$) pertenecen a los Criollos y podrían asociarse a un mayor contenido del ácido cítrico, debido a su predominio ($\geq 98\%$) sobre los demás ácidos (glutámico, aspártico, etc.). La densidad de la pulpa permanece constante (1,05 g/mL) y el contenido de azúcares totales, donde no se observan diferencias significativas entre los cacaos evaluados para las variables pH, densidad y porcentaje de azúcares totales. Estos valores bajos de pH se deben a una alta acidez debido a la presencia de diversos ácidos orgánicos fundamentalmente el ácido cítrico (Lima *et al.*, 2011). Dicha acidez junto con el incremento de la temperatura durante la fermentación conducen a la muerte del embrión y a una lisis parcial de las paredes celulares, ocasionando las reacciones que originan los precursores del sabor a chocolate (Cros y Jeanjean, 1995). Esta acidificación de los granos tiene un efecto favorable sobre el sabor del cacao, debido a que la actividad proteolítica es óptima a pH 3,5-4,5, cuyo intervalo de pH coincide para la mayoría de los cacaos estudiados en esta investigación.

Entre principales azúcares constituyentes de la pulpa de cacao, se consiguieron: fructosa (0,35-1,19%), glucosa (0,11-0,84%) y sacarosa (0,11-1,32%) que representan entre 2 y 9 % de la materia seca, valores similares señalan (Schawn *et al.*, 1995). Del mismo modo, Afoakwa *et al.*, (2013) obtienen valores entre 2,8 y 3,1% de azúcares no reductores en

cacaos sin fermentar, lo que representa entre el 81 y 90% de los azúcares totales.

En el Cuadro 2, se presentan los contenidos de fructosa, glucosa y sacarosa, de los cacaos estudiados, donde se aprecia que no existe diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los cacaos Criollos respecto a los niveles de los azúcares estudiados, sin embargo, se observa que la concentración del sacarosa es hasta 4,5 veces mayor que el contenido de glucosa y hasta 3 veces mayor para la fructuosa. Un comportamiento similar se observa para los cacaos híbridos y Forasteros. No obstante para el cacao Ocumare y Amelonado II se han conseguido valores altos de fructosa, que aunque no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los azúcares y entre los cacaos, dicho valor puede estar asociado con el tipo de cacao o el tiempo de maduración de la fruta en el árbol. En la Figura 1, se presenta la separación de los azúcares reductores por electroforesis capilar, obtenido a partir de la muestra liofilizada.

Efecto de la época de cosecha sobre el nivel de azúcares

El cacao presenta dos ciclos de cosecha fundamentales, los cuales están marcados por las precipitaciones, específicamente, el inicio y culminación de las lluvias, lo que a su vez está relacionado con las condiciones edafoclimáticas. Dichas condiciones tienen un efecto (aunque poco estudiado), sobre los compuestos (tales como azúcares) que determinan la calidad del cacao (Cros, 1997 y Zambrano *et al.*, 2010). En este sentido, en el Cuadro 3, se presentan los contenidos de azúcares reductores y totales en algunos de los cultivares de cacao evaluados durante dos cosechas consecutivas (ciclo de cosecha completo durante un año), en el mismo se observa un ligero incremento del contenido

Cuadro 2. Contenido de azúcares (%) en la pulpa fresca para los tipos de cacao (*Teobroma cacao* L.) determinados por electroforesis capilar.

Tipo de cacao	Cultivares	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
Criollos	Guasare	0,65	0,19	0,77
	Porcelana	0,41	0,29	0,82
	Merideño	0,36	0,28	1,08
Híbridos	Ocumare	1,19	0,40	0,57
	IMC-67 x OC-61	0,77	0,84	1,32
	Pentágona	0,68	0,79	0,91
Forasteros	Amelonado I	0,38	0,11	0,89
	Amelonado II	1,04	0,45	0,69
	Pajarito	0,35	0,13	0,75

de azúcar durante la época de lluvia. No obstante, las diferencias no son significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los cacaos Criollos estudiados en los dos periodos de cosecha tanto en azúcares reductores como totales, mientras que para la sacarosa en los cacaos Criollo Merideño, Porcelana y Guasare, existen diferencias significativas ($p < 0,05$) durante los dos periodos de cosecha evaluados. Estos resultados posiblemente están asociados a una influencia del contenido de agua en el suelo y el aumento de sacarosa en el cacao maduro. Resultados similares señalan Graziani de Fariñas *et al.*, (2003) en semillas y en mucílago de cultivares cacaos híbridos del estado Aragua (Venezuela).

Este resultado, también se observa en otros alimentos, por ejemplo, el tiempo necesario para la pasificación de la uva, depende de la variedad, el grado de maduración y sobre todo de las condiciones climatológicas (Pangavhane y Sawhney, 2002).

Crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en la pulpa de cacao

Aunque se sabe que el nivel de azúcares en la pulpa es un rasgo genético, aun se desconoce con

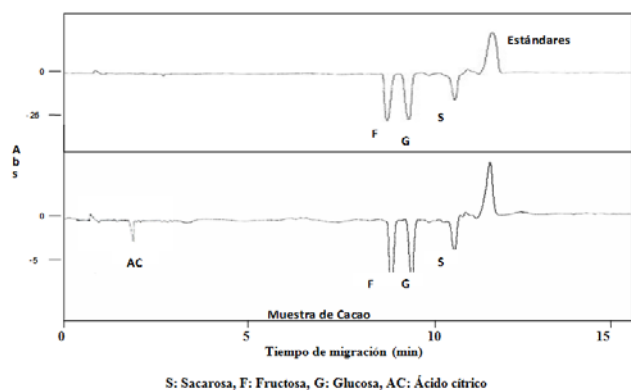


Figura 1. Separación de azúcares de la pulpa fresca de cacao (*Teobroma cacao* L.) por electroforesis capilar.

Cuadro 3. Concentración de azúcares reductores y totales en pulpa de cacao (*Teobroma cacao* L.) Criollos en dos cosechas consecutivas durante un año.

Tipo de cacao	Cosecha	Azúcares reductores		Sacarosa	Azúcares totales (%)
		Fructosa	Glucosa		
Guasare	Primera (enero)	0,65	0,19	0,94	2,56
	Segunda (julio)	1,10	0,78	0,43	2,97
Porcelana	Primera (marzo)	0,41	0,29	0,82	1,73
	Segunda (octubre)	0,71	0,56	0,20	1,62
Merideño	Primera (enero)	0,96	0,68	0,08	1,76
	Segunda (julio)	1,32	0,66	0,18	2,84

precisión cómo esa composición afecta el tiempo de fermentación requerido para cada tipo de cacao (Schawn *et al.*, 1995). De este modo, al estudiar el posible impacto de los azúcares en la fermentación junto al crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en la pulpa de cacao, manteniendo un pH entre 3 y 5, (Vinicius de Melo *et al.*, 2012) se consiguió una correspondencia directa entre crecimiento y niveles de azúcares. Se observó un mayor crecimiento de levaduras en la pulpa de semillas de cacaos Criollos, lo cual indica que dicho crecimiento está directamente relacionado con el contenido de azúcares totales (Figura 2). Así mismo, el contenido de azúcares en la pulpa favorece el desarrollo de levaduras durante la fermentación, las cuales promueven la fermentación alcohólica, con un consecuente aumento de la acidez, tal como lo señalan Nielsen *et al.*, (2007); el crecimiento de estos microorganismos está soportado por el contenido de azúcares y por otros componentes minoritarios de la pulpa de cacao.

En cuanto a los niveles de ácido cítrico (1%) y glutámico (0,4%), éstos representan una fuente adicional de carbono y energía para las levaduras, cuya abundancia justificaría el mayor crecimiento observado (Forsyth y Quesnel, 1963). Del mismo modo, también influye la fuente de nitrógeno disponible como aminoácidos (glutámico y aspártico)

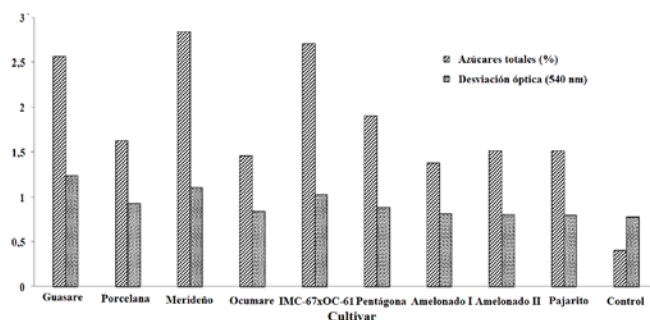


Figura 2. Crecimiento de levaduras en pulpa fresca de cacao (*Teobroma cacao* L.).

y proteínas (Pettipher, 1986). No obstante, se requiere continuar éste tipo de estudios, especialmente sobre la sucesión microbiana, la actividad enzimática dentro de los cotiledones y la exudación de compuestos durante la fermentación principalmente en cacaos Criollos, tanto por su importancia económica como cacaos fino de aroma como por su valor genético (Amores, *et al.*, 2007), lo que permitirá conocer con mayor soporte su comportamiento.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se tiene que el contenido de azúcares varía considerablemente (> 40 %) entre los tipos de cacao. Del mismo modo, estos azúcares también varían entre las cosechas en los cultivares criollos, desarrollándose bajo condiciones edafoclimáticas distintas. Las desviaciones encontradas para las cosechas y los clones, podrían asociarse con la madurez de los frutos, debido a que las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa aumentan con la edad del mismo y dicho estado de madures presenta una distribución heterogénea en la plantación.

El crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en cacaos Criollos es mayor debido a la presencia de concentraciones superiores de azúcares en la pulpa de cacao, lo que influye directamente en la fermentación posiblemente acelerando este proceso debido a la presencia de mayor contenido de sustratos (azúcares) y ácidos cítrico y glutámico.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se realizó gracias al suministro de las muestras de cacao fresco provenientes del Campo Experimental San Juan de Lagunillas, del INIA-Mérida, de la Estación Local Chama del INIA-Zulia y CORPOZULIA y la Hacienda San Joaquín, de Chocolates El Rey, en el estado Barinas.

LITERATURA CITADA

Afoakwa, E. O.; J. E. Kongor, J. Takrama and A. S. Budu. 2013. Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal* 20 (4): 1843-1853.

Amores, F.; D. Butler, G. Ramos, D. Sukha, S. Espín, A. Gómez, A. Zambrano, N. Hollywood, R. van

Loon and E. Seguíne. 2007. Project to determine the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate between fine and bulk cocoa. EX/134/10, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Quevedo, Ecuador. 16 p.

AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, United States of America. 1141 p.

Biehl, B.; E. Brunner, D. Passern and V. Quesnel. 1985. Acidification, proteolysis and flavor potential in fermenting cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 583-598.

Biehl, B.; B. Meyer, G. Crone and L. Pollmenn. 1989. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post harvest storage of cocoa pods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 48: 189-208.

Biehl, B.; H. Heinrichs, B. Ziegler, S. Srivastava, Q. Xiong, V. Passern, V. Senyuk and M. Hammor. 1993. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angew. Bot.* 67: 59-65.

Cros, E. 1995. Cocoa aroma formation. *In: Cocoa Meeting, The various aspects of quality*. Seminar Proceeding. CIRAD. Montpellier, Francia. p. 169-180.

Cros, E. 1997. Factores condicionantes de la calidad del cacao. *Memorias del primer congreso venezolano del cacao y su industria*. ISBN 980-620-56-1. Maracay, Venezuela. p. 1-17.

Daniel, H. M.; G. Vracken, J. F. Takrama, F. Camu, P. de Vos and L. de Vuyst. 2009. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research* 9 (5): 774-83.

Dubois, M. K.; A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355.

Fleet, G. H. 2006. The commercial and community significance of yeasts in food and beverages production. *In: Yeast in food and beverages*. The Yeast Handbook. A. Querol and G. H. Fleet (Eds.). Springer. Berlin. p. 1-13.

- Graziani de Fariñas, L.; L. Ortiz de B. y P. Parra. 2003. Características químicas de las semillas de diferentes tipos de cacao de la localidad de Cumboto, Aragua. *Agronomía Tropical* 53 (2): 133-144.
- Forsyth, W. and V. Quesnel. 1963. The mechanism of cacao curing. *Adv. Enzymol.* 25: 457-492.
- Jinap, S. 1994. Organic acids in cocoa beans. *Food Journal* 9: 3-12.
- Lima, J. L.; M. H. Almeida, N. M. J. Rob M. H. and Zwietering. 2011. *Theobroma cacao* L., The food of the gods: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51: 731-761.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3): 426-428.
- Minitab 15 StatGuide. Minitab Inc., 2007. Minitab Statistical Software, Release 15 for Windows, State College, Pennsylvania. United States of America.
- Nielsen, D. S.; O. D. Teniola, L. Ban Koffi, M. Owusu, T. S. Andersson and W. H. Holzappel. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 114: 168-186.
- Pangavhane, D. R. and R. L. Sawhney. 2002. Review of research and development work on solar dryers for grape drying. *Energy Conversion Management* 43: 45-61.
- Pettipher, G. 1986. Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardized artificial cocoa pulp medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37: 297-309.
- Ramírez, R. 1993. Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones. Alhambra Mexicana S. A. de C. V. 3^{ra} reimpresión. México. 452 p.
- Rohan, T. 1964. El beneficio del cacao bruto destinado al mercado. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (F.A.O). Roma, Italia. 221 p.
- Saposhnikova, K. 1952. Cambios de la acidez y de los hidratos de carbono durante el crecimiento y maduración de las frutas de cacao. *Agronomía Tropical* 2 (2): 83-90.
- Schawn, R.; A. Rose and R. Board. 1995. Microbial fermentation of cacao beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 79: 96-107.
- Selamat, J. and P. Dimick. 1990. Acidic characteristic of fermented and dried cocoa beans from different countries of origin. *Journal of Food Science* 55 (2): 547-550.
- Soga, T. and G. Ross. 1999. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* 837: 231-239.
- Stefansson, M. and D. Westerlund. 1993. Capillary electrophoresis of glycoconjugates in alkaline media. *Journal of Chromatography A.* 632: 195-200.
- Stevenson, C.; J. Corven and G. Villanueva. 1993. Manual para análisis de cacao en laboratorio. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Costa Rica. Series Publicaciones Misceláneas. 25 p.
- Vinícius de Melo, P. G.; P. M. da Cruz, R. C. Lacerda and S. R. Freitas. 2012. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (15): 5395-5405.
- Wacher, R. M. 2011. Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria* 12 (4): 1-9.
- Zambrano, A.; C. Romero, A. Gómez, G. Ramos, C. Lacruz, M. Brunetto, G. Máximo, L. Gutiérrez y Y. Delgado. 2010. Evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao criollo merideño durante la fermentación en dos condiciones edafoclimáticas. *Agronomía Tropical* 60 (2): 211-219.