Metodologías para el análisis bromatológico, físico y químico del cacao fermentado y seco, dentro del marco normativo internacional

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero de Alimentos

Carolina Bedoya Vergara

Asesor

Julián Londoño-Londoño.

Químico Farmacéutico, Doctor en Ciencias Químicas.

Facultad de Ingeniería

Ingeniería de Alimentos

Caldas – Antioquia

2016

DEDICATORIA

A mi madre que siempre ha hecho su mayor esfuerzo por ayudarme a cumplir mis sueños

A mi abuela que es el ángel que está en el cielo cuidando de mí y

A Óscar por darme tanto amor y acompañarme en este camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi guía, Andrea Gil Garzón sin su guía, concomiendo, entrega, dedicación, perseverancia y amabilidad no hubiera logrado realizar tan excelente trabajo. Gracias por tenerme la paciencia necesaria y tomar la actitud correcta en cada desafío que presentaba.

A Julián Londoño Londoño por siempre darme una oportunidad, creer en mí a pesar de las circunstancias, por ser mi mentor y mi guía en este camino, infinitas gracias por apoyarme y enseñarme tanto.

A Doña Blanca por hacer de mí una persona perseverante y darme una voz de aliento, siempre que el camino tuviera tropiezos.

A Ana María Muñoz que es la química de mi corazón, gracias por tomarse el tiempo de ayudarme con los métodos, pero más que eso por enseñarme con tanta dedicación y permitirme entrar al mundo de la cromatografía.

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación resaltando a Ana María Restrepo Duque y Luz María Álzate.

A mis compañeros y amigos Dubán Ovidio González Álvarez, Nataly Saavedra Hortúa, María Victoria Álvarez Henao, Sandra Milena Llano Gil, Jessica Flórez Arroyave.

Contenido

Planteamiento de problema 16

Justificación 19

Objetivos 23

Objetivo general 23

Objetivos específicos 23

Marco teórico 24

El cacao y su origen 24

Distribución del cacao 24

Cacao a nivel internacional 24

Cacao en Colombia 26

Tipos de cacao 28

Cacao Criollo 28

Cacao Forastero 29

Cacao Trinitario 30

Clasificación comercial del cacao 31

Cacao “fino y de aroma” 31

Cacao Común 32

Beneficio del cacao 33

Cosecha 33

Fermentación 33

Secado 34

Beneficios del cacao para la salud 35

Determinación de la calidad del cacao 37

Calidad física 37

Calidad bromatológica 37

Calidad química 39

Revisión de la norma técnica Colombia 1252 de 2003 bajo las exigencias de normas internacionales y reportes científicos 43

Materiales y métodos 43

Reactivos 43

Material vegetal 43

Resultados y análisis 48

Análisis de la normativa internacional 48

Estandarización del método de acidez y contenido de extracto etéreo 54

Conclusiones 64

Estandarización de métodos de análisis bromatológicos, físicos y químicos a partir del estudio de materiales vegetales de Antioquia 65

Materiales y métodos 65

Reactivos 65

Material vegetal 66
Tratamiento del material vegetal posterior a su cosecha 67
Identificación morfológica de las mazorcas 69
Parámetros de calidad de fermentación 69
Grado de fermentación 70
Índice de fermentación 70
Color 70
Acidez total (AT) y pH 71
Análisis bromatológico 72
Contenido de extracto etéreo, EE 72
Contenido de proteína cruda 72
Contenido de fibra cruda 73
Contenido de humedad 74
Contenido de cenizas 75
Caracterización analítica 75
Capacidad de absorción de radicales de oxígeno 76
Contenido de fenoles 78
Alcaloides y monómeros de procianidinas 79
Diseño de Experimentos 81
Resultados y análisis 82

Análisis físicos de las mazorcas 82
Parámetros de calidad de fermentación 84
Índice de fermentación 84
Antocianinas 85
Color 87
Acidez y pH 89
Análisis bromatológico 92
Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, contenido de fenoles, concentración de monómeros de procianidinas en cacao 97
Contenido de alcaloides, parámetro diferenciador en variedades de cacaos 103
Análisis estadístico 106
Propuesta de Norma Técnica Colombiana Actualizada 107
Conclusiones 108
Referencias 110
Apéndices 117

Lista de tablas

Tabla 1. Producción de cacao en grano por países 2010-2014 25

Tabla 2. Producción nacional de cacao en grano por departamento de 2002-2014 28

Tabla 3. Composición de acidez en los diferentes países productores de cacao . 40

Tabla 4. Contenido de teobromina en el cacao en sus diferentes etapas de beneficio 41

Tabla 5. Relación teobromina / cafeína 41

Tabla 6. Condiciones de operación del equipo Soxhlet con cada solvente de extracción 45

Tabla 7. Esquema de aleatorización de los tratamientos evaluados 48

Tabla 8. Requisitos de calidad exigidos para el cacao bien fermentado y seco según la norma NTC 1252 de 2003 49

Tabla 9. Resumen de las normas que se refieren a granos de cacao 50

Tabla 10. Funciones e indicadores, con sus respectivos pesos que componen la propuesta para la determinación del Índice de la calidad del cacao realizado por Araujo y Fernández en 2014 52

Tabla 11. Revisión de los métodos reportados entre 2010 y 2016 para la extracción del extracto etéreo del cacao y subproductos 56

Tabla 12. Resultados de la evaluación de rendimiento de extracción, porcentaje de extracto etéreo y valor del método 59

Tabla 13. Diferencias entre los valores medios del porcentaje de extracto etéreo de acuerdo a la prueba de Tukey 60

Tabla 14. Revisión de los métodos reportados entre 2010 y 2015 para la determinación de acidez en cacao y subproductos 62

Tabla 15. Condiciones óptimas de SRM para el análisis de alcaloides y monómeros de procianidinas 81

Tabla 16. Peso de 100 granos de cacao, y su clasificación según 3 normas técnicas (Colombia, Venezuela, Ecuador) 85

Tabla 17. Resultados de análisis bromatológicos de cacaos de Maceo, Antioquia 94

Tabla 18. Resultados bromatológicos de las dos clones de cacaos Forasteros ... 96

Tabla 19. Cuadro resumen de los análisis realizados a 4 clones de cacao, seco fermentado y sin fermentar 97

Tabla 20. Porcentaje de grasa extraído por el método de ultrasonido en cacaos fermentados y no fermentados 99

Tabla 22. Análisis estadístico de la diferenciación por variedad 106

Lista de figuras

Figura 1. Precio de venta del cacao en las bolsas de valores de New York y Londres 26

Figura 2. Cacaos Criollos de Maceo, Antioquia..... 29

Figura 3. Cacaos Forasteros de Maceo, Antioquia..... 30

Figura 4. Cacaos Trinitarios de Maceo, Antioquia 30

Figura 5. Distribución del cacao según sus ventas en Latinoamérica 32

Figura 6. Representación por bloques de las diferencias de medias entre los tratamientos según el ANAVA. 57

Figura 7. Apariencia y color del extracto etéreo (abajo) y cacao desengrasado (medio) comparado con la muestra inicial sin extracción (arriba) para cada uno de los tratamientos empleados..... 61

Figura 8. Ubicación del municipio de Maceo, Antioquia 66

Figura 9. Clasificación del material vegetal estudiado, de acuerdo a su forma, rigurosidad, profundidad de los surcos, ápice y base del fruto. 82

Figura 10. Diferencias entre las relación de absorbancias 530/460 para cacaos Criollos y Trinitarios..... 87

Figura 11. Resultados de índice de color IC (variable respuesta), en los cuatro clones evaluados después del secado con o sin fermentación 87

Figura 12. Relación de absorbancias a 530/460, para cacaos fermentados 88

Figura 13. Acidez de 4 clones de cacaos cultivados en Maceo, Antioquia en las diferentes etapas del beneficio. 1)Cacaos Criollos seco sin fermentar 2) cacaos

Criollos fermentados 3) cacaos Criollos crudos 4) cacaos Forasteros seco sin fermentar 5) cacaos Criollos fermentados 6) cacaos crudos sin fermentar. 90

Figura 14. Valores de pH de cuatro clones de cacaos cultivados en Maceo, Antioquia en las diferentes etapas del beneficio 91

Figura 15. Comparación de dos clones de las variedades “Criollos modernos “en términos de sus características bromatológicas..... 95

Figura 16. Contenido de polifenoles en granos de cacaos con 2 diferentes metodologías de extracción..... 100

Figura 17. Compuestos fenólicos en cacaos fermentados 101

Figura 18. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno en muestras de cacao fermentado 102

Lista de apéndices

Apéndice A. propuesta de actualización: norma técnica colombiana NTC 1252 117

Resumen

Uno de los productos más llamativos en la producción agrícola en los últimos años es el cacao, debido a su amplia demanda mundial que no alcanza a ser suplida por los países productores. Colombia produjo 47.000 toneladas reportadas en 2014, con un aporte de 1,12% ocupando la décima posición a nivel mundial, capacidad que no alcanza para cubrir la producción interna. Por esta razón, se creó el Plan Nacional de Desarrollo Cacaotero 2012-2021 el cual busca impulsar este sector con un crecimiento planificado con calidad y orientado al fortalecimiento del cacao común pero de forma paralela con el posicionamiento del cacao fino o de aroma.

La calidad del grano de cacao destinado a la industrialización para consumo humano está regida en el país por la Norma Técnica Colombiana 1252 de 2003. Esta guía de productores y de la industria presenta algunos requisitos para una evaluación en términos físicos, químicos y biológicos, pero que en su mayoría son ambiguos, poco explícitos y conllevan a decisiones subjetivas que afectan directamente el valor comercial.

Es importante que la normativa Colombia permita estar a la vanguardia del mercado internacional, para esto a nivel interno se debe contar con una guía que permita definir las pruebas estandarizadas y tener la certeza que los datos suministrados por dichas pruebas pueden ser garantías para la toma de decisiones entre las cuales están incluidas tener una impacto importante en el

mercado con un producto que cuente con las exigencias normativas a nivel mundial.

En el presente proyecto se realizó la estandarización de las metodologías el aseguramiento de una buena fermentación los cuales son: índice de color, peso de 100 granos, índice de fermentación (contenido de antocianinas, pH y acidez, entre los análisis bromatológicos se realizaron contenido de extracto etéreo , contenido de fibra cruda, contenido de cenizas , contenido de humedad , contenido de proteínas y las pruebas analíticas fueron el contenido de alcaloides (teobromina, cafeína) y monómeros de procianidinas (epicatequina, catequina). dentro del marco normativo internacional, como referencia para la actualización de la norma técnica colombiana enmarcado en el proyecto “Implementación de modelos para garantizar la calidad del grano de cacao en poscosecha: estrategias sostenibles enmarcadas en el comercio internacional” financiado por el Sistema General de Regalías.

Luego de realizar diferentes pruebas con distintos solvente el hexano presenta un rendimiento aceptable, además que sus costos y porcentaje de recuperación son cortos por lo que debe ser el solvente utilizado realizando la extracción en baches de 4 horas para completar 16 horas en total, para la medición de acidez el cambio de filtración por centrifugación fue una alternativa que redujo tiempo y los resultados fueron comparables con otros reportes.

Las pruebas de proteínas, índice de fermentación, contenido de polifenoles, fibra y relación teobromina / cafeína pueden ser una buena herramienta para diferenciar cacaos finos y de aroma, de cacaos comunes.

Planteamiento de problema

El sector agroindustrial en Colombia tiene una gran acogida a nivel internacional debido a la variedad y exclusividad de sus frutos, es importante estar a la vanguardia de las exigencias regulatorias de los mercados internacionales, para encaminar la demanda en exportaciones como una forma de incrementar la economía del país y aprovechar los diferentes acuerdos comerciales existentes, enmarcados dentro de los tratados de libre comercio.

El cacao es una de las materias primas agrícolas más importantes del comercio internacional y como tal, es una fuente indispensable de divisas para los países productores. La contribución del comercio de cacao en muchos países al intercambio con el exterior varía significativamente con las fluctuaciones del precio, pero ha llegado a ser incluso el 54% de las ganancias por exportación.(Centro de exportaciones e inversiones de Nicaragua, 2012)

El principal productor de cacao es África, resaltando su producción de cacao común. Se estima que América Latina produce el 15% de la producción mundial de cacao y Colombia por su parte aporta 47.000 toneladas reportadas en 2014, lo cual representa el 1,12% ocupando la décima posición a nivel mundial y el quinto en la región, según un estudio realizado por la casa productora, *United Cacao* miembro de la Fundación Mundial del Cacao (FMC).

El cacao colombiano es conocido por ser de gran calidad, exclusivo para el uso de chocolates finos por su punto de acidez y equilibrio. Colombia compite en esta variedad principalmente con Venezuela, Ecuador, Perú y República Dominicana. La variedad de los granos de cacao colombianos son muy reconocidos y

altamente demandados en Europa.(Proexport, 2014) En Colombia se producen cacaos comunes y de calidad Premium, ambos son finos de sabor y aroma, y pertenecen al tercer grupo de productos con mayor ventaja comparativa en el país, respecto de sus competidores internacionales, dadas las condiciones agroecológicas en términos de clima y humedad y su asociación con otros cultivos (Superintendencia de Industria y Comercio, 2014).

Es importante destacar que Colombia se encuentra entre los 17 países considerados por la Organización Internacional de cacao y Chocolate (ICCO) como países comercializadores de cacao fino y de aroma, lo cual le ha permitido ser galardonado por importantes premios internacionales en esta categoría.

Antioquia que cuenta con 40 municipios productores de cacao, producen un poco más del 7,0 por ciento del total nacional, es decir, 3.250 toneladas en 2010 (crecimiento del 17 por ciento sobre 2009), es uno de los departamentos impulsados por el Plan Decenal de Desarrollo Cacaotero para aumentar su producción de cacao, la producción nacional en una primera etapa de 42.000 toneladas en 2010, a 79.800 en 2014, mejorando los cultivos existente, incentivando la renovación y con un direccionamiento especial para la producción de cacaos élites o de aroma con perfiles para la producción de chocolatería fina. Los alcances mencionados van orientados a reducir la dependencia de las importaciones que demanda inversiones por 2.6 billones, transacciones realizadas principalmente por parte de las dos grandes empresas encargadas de la industrialización del cacao como la Compañía Nacional de Chocolates y Casa

Luker, las dos con sede matriz en este este Departamento y posicionarse en nuevos mercados internacionales (CECODES, 2014).

Actualmente en Colombia no existe una diferenciación establecida entre cacaos comunes vs cacaos finos y de aroma lo que conlleva a que no se estipulen estándares de calidad esto tiene un impacto directo en el precio de venta afectando directamente al agricultor , y en consecuencia este no intervenga efectivamente en el proceso de beneficio y no realice esfuerzos para mejorar la calidad de su producto , ya que independientemente de las características organolépticas destacables que es este tenga será comprado al mismo precio. Entre los estándares de calidad más importantes que deben ser medidos en el cacao según los diferentes sectores que este interviene se encuentran el contenido de extracto etéreo, la acidez al terminar la fermentación, dos de los cuales no se establecen en la norma técnica colombiana 1252 de 2003.

Justificación

La Norma Técnica Colombiana 1252 de 2003 es el derrotero oficial para definir la clasificación y los estándares de calidad que deben cumplir el cacao en grano, destinado a la industrialización para consumo humano. Dentro de los parámetros que estipula la Norma están: la clasificación del grano en las categorías de Premium, Común o Pasilla según su grado de fermentación en cacao y los criterios físicos (peso, color), químicos (humedad) y microbiológicos.

Las directrices que se especifican en la norma para la toma de muestras pueden llegar a ser mucho más específicas facilitando la interpretación para el analista, muchos de los datos analizados son cualitativos por los cual se debe establecer de forma más concreta los rangos que permitan identificar categorías de calidad, se debe implementar la utilización de equipos que no sean menos robustos e imprecisos , para correlacionar los datos del comprados – vendedor , además de lo antes descriptos los criterios tienen rangos muy amplios lo cual impide:

a) Realizar una clasificación rigurosa comparada con normas internacionales o exigencias internas de grandes compañías productoras de chocolates.

b) Los métodos para la verificación de cada prueba son ambiguos y subjetivos, lo que conlleva a falta de posicionamiento o diferenciación de un producto de calidad o corriente

c) La norma técnica colombiana y por consiguiente sector económico no contemplan la diferenciación de un cacao común con el cacao fino o de aroma,

favoreciendo al sector industrial que va tener un producto de mayor calidad y afectando al Agricultor a quien no se le verán reflejados los esfuerzos puestos en la etapa de poscosecha.

d) La caracterización, identificación y conocimiento de las propiedades biológicas, físicas, químicas y sensoriales de los alimentos son componentes requeridos para la toma de decisiones con respecto a la destinación de los mismos, ya sea para comercialización directa, industrialización o propósitos de investigación.

Razones expuestas que evidencian la importancia del manejo de estándares de calidad normalizados que sirvan como un referente el cual permita determinar con certeza la calidad del producto competitivo.

Se pueden consultar diversas normas y guías tantos internacionales como nacionales las cuales especifican los parámetros físicos, químicos, bromatológicos y microbiológicos con los que deben contar los granos de cacao para su clasificación o aceptación, dichas normas son la referencia para la toma de decisiones entre las cuales están el precio de compra de la materia prima, la aceptación o rechazo del cacao, productos de primera, segunda y tercera categoría, según sea el caso.

La cadena productiva de cacao debe mejorar la trazabilidad en sus procesos lo que reflejara un mayor valor comercial y posicionamiento en el mercado, la posibilidad de diferenciar su producto de un cacao común de cacao fino o de aroma, necesario para la competencia a nivel nacional e internacional.

Es importante que la normativa de Colombia permita estar a la vanguardia del mercado internacional, para esto a nivel nacional se debe contar con una guía que permita al agricultor, productor, comerciante y todos los demás actores involucrados en la cadena productiva de cacao, definir pruebas estandarizadas y tener la certeza que los datos suministrados por dichas pruebas pueden ser garantías para la toma de decisiones.

Dentro del Programa de la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de la Gobernación de Antioquia “Apoyo y fomento al cultivo de cacaos especiales en el departamento de Antioquia” financiado por el Sistema General de Regalías, está incluido el proyecto “Implementación de modelos para garantizar la calidad del grano de cacao en poscosecha: estrategias sostenibles enmarcadas en el comercio internacional”. Dentro del mencionado proyecto están contemplados diferentes análisis entre los cuales se encuentran la cuantificación de compuestos de interés, la identificación de la microbiota involucrada en la fermentación del cacao, mejoramiento del proceso de secado, identificación de compuestos responsables del aroma, entre otros, pero antes de llevar a cabo los procedimientos antes descritos es importante contar con la caracterización estandarizada en términos bromatológicos, fisicoquímicos, sensoriales y microbiológicos de la muestra con el objetivo que todas las muestras sean tratadas bajo las mismas condiciones y los datos arrojados de dichos análisis sean confiables y se permita correlacionar resultados entre los diferentes laboratorios y analistas involucrados en dicho proyecto.

Con lo antes descrito, se puede formular la siguiente pregunta de investigación ¿se puede realizar una guía con metodologías estandarizadas para el análisis bromatológico, fisicoquímico y microbiológico del cacao fermentado y seco, dentro del marco normativo internacional, como referencia para la actualización de la Norma Técnica Colombiana?

Objetivos

Objetivo general

Estandarizar las metodologías para el análisis bromatológico, físico y químico del cacao fermentado y seco, dentro del marco normativo internacional, como referencia para la actualización de la norma técnica colombiana.

Objetivos específicos

- Clasificar las metodologías reportadas por diferentes entidades para la determinación de la calidad del cacao fermentado y seco
- Estandarizar los protocolos para la ejecución de los análisis bromatológico, físicos y químicos del cacao fermentado y seco bajo los estándares internacionales
- Definir los procedimientos y parámetros para la actualización de la Norma Técnica Colombiana para el grano de cacao

Marco teórico

El cacao y su origen

El cacao (*Theobroma cacao L*.) es un árbol nativo de américa tropical, el nombre genérico deriva del griego (*Theos*, Dios y broma, alimento) “alimento de los dioses”. Se cree que una población de este se extiende naturalmente a la largo del amazonas, los españoles lo encontraron creciendo en forma silvestre en muchos lugares, especialmente en regiones húmedas. Se ubicó inicialmente en 1753, al género *Theobroma* en la familia *Tiliaceae,* pero después se consideró que debía ser incluido en la familia *Sterculiaceae.* En la actualidad se le ha clasificado en la familia *Malvaceae.* El T*heobroma cacao* L., es una de las 22 especies del género, es originaria de Sudamérica y parte de Centroamérica. (Landero, 2014)

Distribución del cacao

Cacao a nivel internacional

El cacao es una de las materias primas agrícolas más importantes del comercio internacional y como tal, es una fuente indispensable de divisas para los países productores. La contribución del comercio de cacao en muchos países al intercambio con el exterior varía significativamente con las fluctuaciones del precio, pero ha llegado a ser incluso el 54% de las ganancias por exportación en Ghana, el 40% en Costa de Marfil y el 30% en Camerún. La producción mundial de cacao ocupa en la actualidad más de siete millones de hectáreas y las principales zonas productoras se encuentran en áreas de bosque lluvioso tropical. Los ocho mayores países productores de cacao son Costa de Marfil, Indonesia,

Ghana, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador, y Togo, que juntas representan el 87% de la producción mundial. Catorce (14) millones de trabajadores están envueltos en su producción, 10 millones de los cuales se encuentran solamente en África como se puede observar en la Tabla 1, así mismo otro punto de vital importancia es que la gran mayoría de la producción de cacao es realizada por pequeñas comunidades productoras, lo cual hace que los medios de vida de millones de hogares campesinos en muchos países del mundo dependan directamente de los precios internacionales. Solamente en África del Oeste, el cacao es la fuente directa de ingresos de más de 11 millones de agricultores , en la figura 1 se presentan los precios de la venta del cacao en las principales bolsas de valores del mundo para junio del 2016 (Centro de exportaciones e inversiones de Nicaragua, 2012)

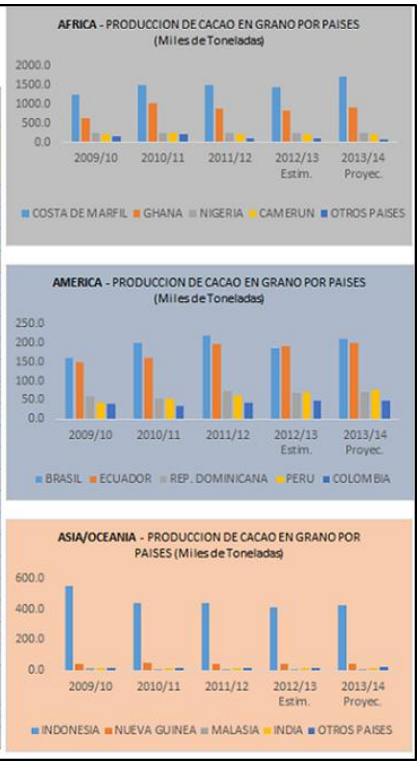
Tabla 1. Producción de cacao en grano por países 2010-2014

FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS

Producción de cacao +A20:F46en grano por países (Miles de Toneladas)

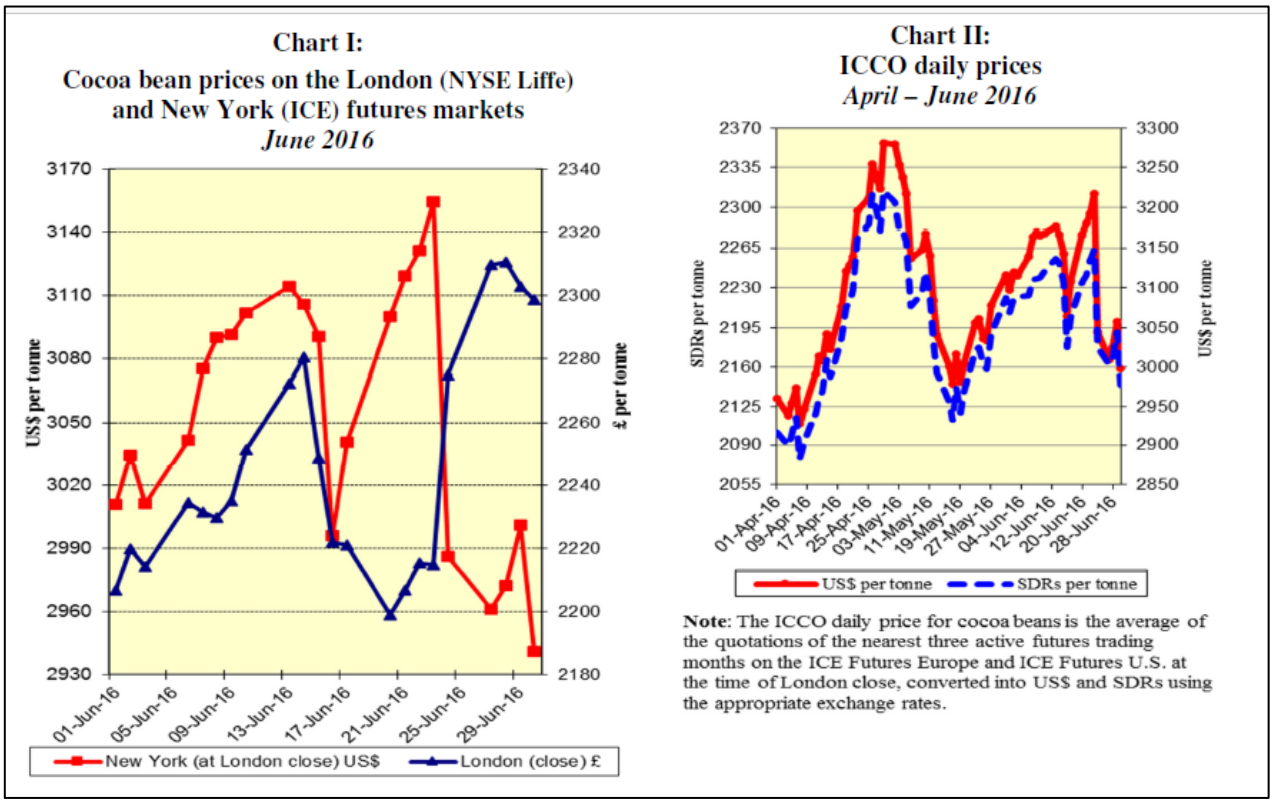
PAIS	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13 Estim.	2013/14 Proyec.
COSTA DE MARFIL	1242.3	1511.3	1485.9	1449.0	1730.0
GHANA	632.0	1024.6	879.3	835.5	920.0
NIGERIA	235.0	240.0	245.0	235.0	240.0
CAMERUN	208.5	228.5	206.5	225.0	200.0
OTROS PAISES	167.9	219.8	112.7	88.5	83.8
Total Africa	**2485.7**	**3224.2**	**2929.4**	**2833.0**	**3173.8**
BRASIL	161.2	199.8	220.0	185.3	210.0
ECUADOR	149.8	160.5	198.0	191.5	200.2
REP. DOMINICANA	58.3	54.3	72.2	68.0	70.0
PERU	42.9	54.4	60.6	69.4	75.0
COLOMBIA	40.0	35.2	42.6	48.4	47.0
MEXICO	27.0	21.4	27.6	27.9	30.0
VENEZUELA	18.0	17.1	18.0	17.0	18.0
OTROS PAISES	18.3	15.7	16.2	14.6	15.9
Total America	**515.5**	**558.4**	**655.2**	**622.1**	**666.1**
INDONESIA	550.0	440.0	440.0	410.0	425.0
NUEVA GUINEA	39.4	47.6	38.7	41.2	42.0
MALASIA	15.1	7.5	4.0	3.0	4.0
INDIA	13.0	14.5	13.0	15.0	14.0
OTROS PAISES	15.6	16.8	15.2	17.5	20.1
Total Asia y Oceania	**633.1**	**526.4**	**510.9**	**486.7**	**505.1**
Total Mundial	**3634.3**	**4309.0**	**4095.5**	**3941.8**	**4345.0**

Fuente. ICCO Volumen XL No. 3 (Datos a Julio 2014)



Fuente : (International Cocoa Organization (ICCO), 2014)

Figura 1. Precio de venta del cacao en las bolsas de valores de New York y Londres



Fuente: (International Cocoa Organization (ICCO), 2016)

Cacao en Colombia

Según el Observatorio Agrocadenas Colombia, la cadena de cacao se divide en tres eslabones de acuerdo a cada etapa del proceso productivo. Un eslabón primario que se refiere a los procesos de siembra, mantenimiento y recolección de cacao, al cual pertenecen todos los agricultores o dueños de las tierras y productores de insumos; un segundo eslabón que abarca la comercialización del grano, tanto a nivel interno como externo, desde el momento en que el grano es comprado por los agentes, hasta que es colocado en la puerta de las fábricas

procesadoras o en el país de destino de las exportaciones. Finalmente, el eslabón industrial comprende el procesamiento del grano para producir licor, pasta, manteca, polvo de cacao, chocolates y confites que contengan chocolate. (Mojica, Joaquín, & Vega, 2006). Se puede apreciar en la Tabla 2 que los principales departamentos productores de cacao en Colombia son Santander, Huila, Tolima, Arauca, Antioquia.

El año cacaotero 2014/2015 cerró con un aumento de la producción del 11% y de los precios promedio del 22% respecto al año cacaotero anterior. Según cifras de la Federación Nacional de Cacaoteros (Fedecacao), con base en el recaudo de la cuota de fomento, que es lo que reportan las compañías al comprar el grano, el año cacaotero 2014/2015 finalizó con 54.120 toneladas frente a 48.762 toneladas del año cacaotero inmediatamente anterior. Así mismo en materia de precios promedio también se observó una recuperación importante pues se pasó de $5.262 por kilo en el año cacaotero 2013/2014 a $6.443 en el año cacaotero que finalizó en septiembre de 2015, para una variación del 22,45% (Rosillo, 2015).

Tabla 2. Producción nacional de cacao en grano por departamento de 2002-2014

DEPTO/AÑO	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
SANTANDER	16.280	19.719	16.803	17.974	15.017	16.723	18.178	17.272	19.411	16.165	16.225	19.517	19.085
HUILA	2.817	3.558	4.170	3.998	3.265	3.535	3.323	3.009	4.237	2.172	3.708	3.166	3.301
N.SDER	3.100	4.024	2.389	1.638	1.831	1.756	1.454	1.339	1.609	1.002	2.153	1.779	1.428
TOLIMA	1.323	2.131	1.883	1.277	670	1.596	2.114	2.059	2.892	1.569	1.986	3.054	2.515
ARAUCA	2.552	3.249	3.357	3.489	2.350	1.889	4.179	3.967	3.988	6.495	4.501	4.532	5.448
ANTIOQUIA	1.700	2.101	2.296	2.100	1.824	2.133	2.052	2.030	3.254	2.537	3.377	3.478	3.553
NARIÑO	1.209	1.884	1.864	2.854	1.831	1.660	1.970	1.795	1.152	2.289	2.882	2.711	2.763
CALDAS	444	548	565	500	473	545	600	491	497	166	287	561	421
CUND/MARCA	1.195	795	546	499	1.025	1.066	849	551	957	630	944	1.477	1.573
VALLE	698	831	552	942	696	513	353	452	716	913	725	527	953
BOYACA	116	149	134	127	54	57	100	219	201	563	446	810	683
META	553	702	460	424	488	652	622	676	965	199	1.023	1.155	1.486
RISARALDA	383	344	175	139	161	270	37	238	405	256	508	308	394
CHOCO	85	50	97	32	22	31	20	61	19	24	212	322	385
CORDOBA	75	98	67	30	23	92	118	81	216	221	249	358	437
CESAR	1.125	1.094	513	750	350	559	944	882	735	729	914	1.178	1.243
CAQUETA	75	68	65	76	86	73	106	139	123	145	149	149	207
CAUCA	49	123	250	152	105	173	286	263	331	287	373	310	414
QUINDIO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	9
GUAINIA	20	48	25	7	1	4	2	12	5	0	0	77	-
MAGDALENA	199	148	120	76	66	140	194	192	238	181	230	186	162
BOLIVAR	4	20	12	11	13	10	212	314	213	197	307	420	349
SUCRE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
PUTUMAYO	0	0	0	0	1	0	0	10	126	437	330	503	590
VAUPES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
CASANARE	0	0	0	3	6	6	6	56	4	12	82	151	247
ATLANTICO	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-
AMAZONAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
GUAJIRA	0	19	10	0	0	0	0	8	0	0	1	5	2
GUAVIARE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	58	0	83
TOTAL NACIONAL	34.002	41.704	36.356	37.099	30.357	33.482	37.718	36.118	42.294	37.203	41.670	46.739	47.732

Fuente: Federación Nacional de Cacaoteros 2014

Tipos de cacao

Cacao Criollo

Estos tienen cotiledones violeta pálido, estaminoides de color rosa pálido, las mazorcas de forma alargada con punta muy acentuada en el extremo inferior, marcados con diez surcos muy profundos o a veces en grupos alternos cinco, el pericarpio es rugoso y delgado, el mesocarpio poco lignificado. Siendo estas de color rojo o verde en estado inmaduro, tornándose amarillas y anaranjado rojizos cuando están maduras.

Los granos del cacao Criollo son gruesos, casi redondos, con cotiledones muy ligeramente pigmentados. Estos requieren de dos a tres días para fermentar, es muy aromático y se designa comercialmente como “Cacao Fino”, presentando un chocolate apetecido por el sabor a nuez y frutas. (Borbor, F. y Vera, M. 2007)

Figura 2. Cacaos Criollos de Maceo, Antioquia

Fuente Propia

Cacao Forastero

Es característico del cacao Forastero o Amazónico la acidez del grano, el pequeño tamaño de la almendra, su sabor amargo y color bastante pigmentado de los cotiledones. Estos materiales son originarios de la cuenca alta de río Amazonas y un ejemplo característico de ellos es el material IMC 67 (*Iquitos Marañon Collection*) usado como patrón y polinizador. Se ha expandido principalmente al África Occidental y Brasil (Fedecacao, 2004).

Presentan estaminoides de color violeta, las mazorcas son amarillas cuando están maduras, presentan surcos y rugosidad poco notables; son lisas y de extremos redondeados. La cáscara es algo grueso y el mesocarpio lignificado, los

granos son más o menos aplanados con cotiledones de color púrpura (Borbor, F. y Vera, M. 2007)

Figura 3. Cacaos Forasteros de Maceo, Antioquia

Fuente propia

Cacao Trinitario

Desarrollados en la isla de Trinidad, proviene de cruces espontáneos y dirigidos de Criollos y Forasteros, por lo cual presentan características intermedias de estos dos tipos y una amplia variabilidad genética. Son algunos de los materiales más difundidos hoy día a nivel mundial. Presentan en general buenos rendimientos y alta tolerancia a problemas fitosanitarios un ejemplo son los clones ICS (*Imperial Collage Selection*), CCN (Colección Castro Narajal) y TSH (*Trinidad Selection Amazon*) (Fedecacao, 2005).

Figura 4. Cacaos Trinitarios de Maceo, Antioquia

Fuente propia

Clasificación comercial del cacao

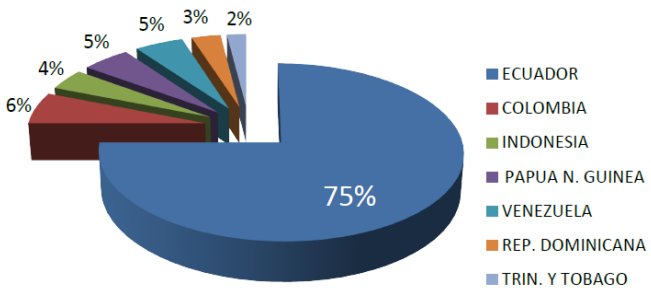
Cacao “fino y de aroma”

Aromas y sabores frutales, florales, de nueces y de malta. Este es el sabor característico del Cacao Fino o de Aroma que lo diferencia de los demás cacaos en el mundo. Fino de Aroma es una clasificación de la Organización Internacional del Cacao (ICCO) que describe un cacao de exquisito aroma y sabor. (Casa luker)

La producción de Cacao Fino ha crecido menos que la de otros tipos y está relacionado con los materiales genéticos. El primer grupo se relaciona con materiales Criollo, Trinitario y Nacional. El segundo, con la variedad Forastero Amazónico (Amelonado).

Su producción es importante para chocolatería fina y mezclas y se estima en 116.000 toneladas que proviene de 17 países localizados en Suramericana, América Central, Islas del Caribe y sudeste Asiático. Latinoamérica se considera un área de Cacao Fino o de Aroma, con excepción de Brasil, México, Panamá y Perú las exportaciones se pueden apreciar en la Figura 5. Los países clasificados por la ICCO como productores de Cacao Fino o de Aroma en un 100% son: Belice, Granada, Islas Sotavento, Jamaica, Samoa, Sri Lanka, Trinidad Tobago, Venezuela, República Dominicana y Santa Lucia. Estos países han transformado su producción utilizando materiales híbridos de alto rendimiento. (41% del área sembrada). El rendimiento promedio oscila entre 450 y 530 kg por hectárea para plantaciones con semillas tradicionales y entre 618 y 783 utilizando materiales híbridos (Escobar & Rojas, 2001).

Figura 5. Distribución del cacao según sus ventas en Latinoamérica



Fuente: ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol XXXXIX, No. 2, Cocoa Year 2012/2013
Publicado: 29-05-2013

En Colombia, las exportaciones de Cacao Fino o de Aroma son relativamente bajas y se incluyen dentro de la partida arancelaria 1801001900, los demás cacaos están clasificados como crudos en grano, entero o partido. En el 2012, Colombia exportó US$10.515.000 FOB, un 24% más que en el 2011(US$7.981.000), pero un 27,5% menos que en 2010 (US$14.510.000) (Banco de desarrollo de america latina, 2013).

Cacao Común

Más del 95 % de la producción anual en el mundo es considerada como cacao corriente u ordinario, los cuales proceden en su mayoría de África, Asia y Brasil que pertenece esencialmente al tipo cacao Forastero. Este cacao se destina en gran parte para la producción de manteca de cacao, polvo de cacao, como aromatizante en recetas domésticas, en la preparación de varios alimentos y bebidas instantáneas.

Beneficio del cacao

Cosecha

El estado ideal para cosechar las mazorcas es cuando están maduras, sin embargo, en el momento de la recolección, no todas se encuentran en ese estado, y se recolectan también las mazorcas que recién comienzan su maduración (pintonas).

En los períodos “picos” de cosecha, las rondas de recolección se deben realizar semanalmente. No obstante, en las temporadas de menor producción, las cosechas se pueden programar cada dos o tres semanas.

Es fundamental no dejar sobre madurar las mazorcas pues se pueden contaminar de algunas enfermedades con hongos (fungosas). Este estado propicia la germinación de los granos, que se considera un defecto calidad (Cubillos, Merizalde, & Correa, 2008).

Fermentación

Es el proceso que continua después del desgrane. Consiste en amontonar los granos durante varios días con el fin de que los microorganismos descompongan el mucílago (la pulpa blanca y azucarada que envuelve los granos), aumente la temperatura para producir la muerte del germen o embrión y se inicien los cambios bioquímicos y las reacciones enzimáticas en el interior de las almendras, que van a ser los responsables de la formación de los compuestos precursores del sabor a chocolate. Este proceso, facilita además el secado de los granos (Cubillos et al., 2008).

Esta etapa se reconoce por la formación de precursores de aroma como aminoácidos, péptidos, aldehídos, ácidos, entre otros y la disminución de su composición en alcaloides (Rodríguez, 2011).

Secado

Después de la fermentación el cacao se debe secar inmediatamente, no solo para disminuir la humedad del grano que debe quedar al 7%, sino también, para que continúen algunas reacciones bioquímicas que finalmente producirán los precursores del sabor. Es tan importante el secado como una buena fermentación. El contenido de humedad de los granos secos no debe ser mayor al 8% por la propensión de los granos a enmohecerse, tampoco debe estar por debajo del 6%, ya que los granos se vuelven frágiles y quebradizos (Cubillos et al., 2008).

Durante esta etapa se forman compuestos responsables del aroma y disminuye la acidez volátil, indicador de buena calidad

Secado natural

El secado se realiza normalmente al sol sobre plataformas de madera. Para que el proceso sea uniforme, el primer día los granos se deben revolver con poca frecuencia y en los días siguientes con mayor frecuencia hasta terminar el proceso.

La principal característica de la finalización de esta etapa de forma cualitativa es el resquebrajamiento o crujido que se siente al presionar un puñado de los granos en las primeras horas de la mañana. Al terminar el secado, en el interior de

los granos se desarrolla la estructura arriñonada y el color pardo típico del cacao bien beneficiado (Cubillos et al., 2008).

Secado artificial

En algunas regiones (Arauca, por ejemplo), la época de cosecha coincide con la temporada de invierno y bajo condiciones naturales es difícil secar el cacao debido la escasa luminosidad. En ese caso hay que emplear un sistema de secado artificial porque de lo contrario el secado al sol sería muy prolongado y los granos correrían el riesgo de contaminarse de hongos deteriorándose su calidad. Por tal motivo deben utilizarse diferentes metodologías como secadores rústicos, lechos fluidizados, hornos entre otros (Cubillos et al., 2008).

Beneficios del cacao para la salud

El cacao se considera una estimulante debido a las presencia de innumerables sustancias como purinas, alcaloides, teobromina, cafeína, además de esto tiene un alto poder nutricional debido a sus altos niveles de hidratos de carbono, lípidos, proteínas, se reportan 300 compuestos químicamente activos (Araujo, Fernandes, et al., 2014).

Los flavonoides pueden tener un marcado impacto en el estado de ánimo. En primer lugar, afectan los procesos neurofisiológicos asociados a menudo con trastornos del estado de ánimo. En segundo lugar, mejorar los comportamientos que dependen en la motivación y las emociones. En tercer lugar, estimulan el rendimiento cognitivo y el flujo sanguíneo cerebral. En cuarto lugar, tienen

propiedades antidepresivas en modelos de comportamiento de los animales (Smith, 2013).

El cacao es una fuente importante de flavonoides, principalmente flavonoides, epicatequina y catequina y de bajo peso molecular, procianidina tal como procianidina B1 y B2, metilxantinas, principalmente teobromina y cafeína), y magnesio; todas son sustancias biológicamente activas que pueden afectar positivamente la salud humana.

El cacao es también una fuente importante de fibra dietaría (DF), en contraste con el chocolate. Los efectos cardioprotectores de cacao están bien establecidos con varios exámenes exhaustivos publicados han demostrado que pueden mejorar potencialmente la salud, los fabricantes de cacao están produciendo nuevos productos de cacao funcionales enriquecidos con compuestos bioactivos, con bajos niveles de grasa y azúcar (Sarriá et al., 2015).

Diversas investigaciones han descrito que cuando el chocolate es industrializado su contenido de hidratos de carbono y lípidos puede considerarse como peligroso para la salud, por esto se recomienda consumir en bajas cantidades, sin embargo en los granos de cacao sin transformar se ha sugerido que mejoran la presión sanguínea, la agregación plaquetaria y la función endotelial (Kerimi & Williamson, 2015).

Determinación de la calidad del cacao

Calidad física

Color: El color es una percepción humana de la luz reflejada por un objeto. Se trata de una apreciación, que depende de cómo nuestros ojos detectan la luz reflejada y de cómo nuestro cerebro la procesa. Está afectado por el objeto, el observador, el iluminante, la geometría óptica, el área, fondo, superficie, brillo y temperatura. Se lo define entonces como una respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa visible produce en la retina. Se considera un concepto psicofísico, relacionado al mismo tiempo con la psicología del observador, la fisiología de la visión y la energía radiante espectral de una fuente luminosa. Cada color tiene su propia apariencia basada en tres elementos: matiz, valor y croma. Al describir un color usando estos tres atributos se identifica con precisión un color específico y se distingue de cualquier otro (X-rite, 2002).

Calidad bromatológica

Extracto etéreo

Se denomina extracto etéreo o grasa bruta al conjunto de sustancias de un alimento que se extraen con solventes orgánicos (ésteres de los ácidos grasos, fosfolípidos, lecitinas, esteroles, ceras, ácidos grasos libres). La extracción consiste en someter la muestra exenta de agua (deshidratada) a un proceso de extracción continua (Soxhlet) utilizando para la extracción solventes orgánicos como pueden ser hexano, éter de petróleo, etil éter. El contenido de grasa está cerca del 50 al 55 % en cacao fresco y luego de ser tostado presenta

aproximadamente entre 48 al 52 %; el cual está constituido principalmente de glicéridos como el ácido oleico, laúrico, palmítico, esteárico y aráquico (Belitz, citado por Wakao 2002).

Proteínas

Las proteínas son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Pueden considerarse polímeros de unas pequeñas moléculas que reciben el nombre de aminoácidos y serían, por tanto, los monómeros. Los aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos (V. Guillén Luque, n.d.).

Fibra cruda

Se debe entender la fibra cruda como la parte orgánica del alimento que es insoluble y no digestible y que está formada en la inmensa mayoría de las ocasiones por celulosas y lignocelulosas provenientes de los tejidos vegetales. No debe confundirse con la denominada fibra dietética o soluble que, aunque no se absorbe como nutriente en el intestino humano, pero que es fisiológicamente importante en los procesos intestinales (JMFS, 2005).

Cenizas

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento

original, debido a las perdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes. (Mexico, 2008)

Humedad

Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización al que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: “agua libre” Y “agua ligada”. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se halla combinada o absorbida. Se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales (Unam, 2008).

Calidad química

Acidez

El contenido de ácidos orgánicos, compuestos que aportan a la acidez del perfil sensorial del cacao, varía entre el 1.2% y 1.6% (Tabla 3). Algunos, entre ellos el acético, cítrico y oxálico, se forman durante la fermentación El ácido acético y el ácido cítrico destacan por su mayor presencia (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009).

Tabla 3. Composición de acidez en los diferentes países productores de cacao

País	Ácidos orgánicos, g /100g de muestra					
	Acético	Oxálico	Cítrico	Málico	Succínico	Láctico
Brasil	0,81	0,06	0,37	0,19	0,19	0,27
Ecuador	0,51	0,08	0,43	0,28	0,16	0,29
Venezuela	0,62	0,09	0,76	0,33	0,37	0,21
Rep. Dominicana	0,55	0,17	0,86	0,28	0,23	0,30
Ghana	0,51	0,10	0,58	0,14	0,36	0,22
Malasia	0,76	0,08	0,52	0,20	0,26	0,50

Capacidad antioxidante

Los polifenoles encontrados en el grano de cacao se almacenan en las células pigmentadoras de los cotiledones y dependiendo del contenido de antocianinas estas células pueden llegar a tener una tonalidad púrpura oscura. Los grupos de polifenoles más abundantes en cacao son metabolitos tipo flavonoide, especialmente 3 grupos básicos con un núcleo común tipo flavan-3-ol: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). La principal catequina es (-)-epicatequina que representa cerca del 30% del contenido de polifenoles del grano, otras catequinas minoritarias son (+)-catequina, (+)-gallocatequina y (-)-epigallocatequina. La fracción de antocianinas consiste principalmente de cianidina-3-arabinosa y cianidina-3-D-galactosa y entre las procianidinas, las más abundantes son aquellas unidades diméricas, triméricas y oligoméricas de epicatequina y flavan-3,4-diol. En estudios previos se ha mostrado que el contenido total de polifenoles solubles en los granos de cacao secos y desengrasados de la variedad Forastero, varía entre 10-15%, donde el contenido de (-)-epicatequina oscila entre 34.65 y 43 mg/g mientras que los cacaos Criollos contienen solo 2/3 partes de este contenido (Gil Quintero, 2012).

Teobromina / cafeína

La teobromina y la cafeína constituyen más del 99% del contenido de los alcaloides en cacao, y lo restante son trazas de teofilina y salsolinol. Generalmente el contenido de alcaloides está determinado por el genotipo y la maduración de la semilla los contenidos de teobromina y cafeína disminuyen a medida que avanza la fermentación aproximadamente en un 24% en el cacao de fincas comerciales y en un 15 % en el cacao "Fino" (Belitz, citado por Wakao 2002).

Tabla 4. Contenido de teobromina en el cacao en sus diferentes etapas de beneficio

Duración de la fermentación	Cáscara seca de Teobromina %	Cotiledón desgrasado secos Teobromina %
0	0,28	2,96
2	0,28	3,05
4	2,35	2,57
6	2,35	2,36
8	2,33	2,23
10	2,33	2,22

Fuente: Rohan, T. El beneficio del cacao bruto, destinado al mercado p. 95, citado por Wakao (2002).

Tabla 5. Relación teobromina / cafeína

Grupos	Valor de Teobromina / Cafeína
Cacaos Forasteros	**15-10**
Cacao Trinitario	**2-10**
Cacaos Criollos	**2-1**

Fuente: Hasing, H. 2004

Perfil de ácidos grasos

La grasa de cacao contiene predominantemente triglicéridos de ácidos grasos consistentes de ácidos oleico (37,3%), esteárico (34,4%), y palmítico (26,2%). Más de 73% de los glicéridos están presentes como formas monoinsaturadas. El ácido esteárico, un ácido graso saturado que, a diferencia de otros, no aumenta el nivel de colesterol en la sangre, no es aterógeno (Salinas & Bolivar, 2012).

Diferentes estudios confirman que los cambios en las proporciones de los ácidos grasos del cacao puede estar influenciados por el área de cultivo de los granos de cacao y las condiciones del clima en el año, especialmente la temperatura. Esta relación es de vital importancia en aquellos grupos que influyen en las características físicas de la manteca de cacao tales como el contenido de grasa sólida y el perfil de fusión (Żyżelewicz et al., 2014).

Revisión de la norma técnica Colombia 1252 de 2003 bajo las exigencias de normas internacionales y reportes científicos

Este capítulo responde al alcance del primer objetivo específico de clasificar las metodologías reportadas por diferentes entidades para la determinación de la calidad del cacao fermentado y seco, el cual se desarrolla mediante la presentación de los materiales y métodos empleados, el análisis de los resultados obtenidos y sus respectivas conclusiones.

Materiales y métodos

Reactivos

Los reactivos marca Merck® (Alemania) empleados para los análisis fueron: n-hexano (96 %), dietil éter (99 %), éter de petróleo (99 %), ciclohexano (99 %), metanol (99,9 %), cloroformo (99 %), ácido sulfúrico (96 %), ácido clorhídrico (0,1 N), hidróxido de sodio (99 %), ácido bórico (99,5 %), sulfato de potasio y sulfato de cobre, n-octanol, acetona anhídrida (99,6 %), ftalato ácido de potasio, FPA y fenolftaleína.

En algunos análisis fueron empleados papel filtro Whatman N° 4, de 0,45 µm y 125 mm Schleicher & Schuel y dedales de celulosa.

Material vegetal

Mazorcas de cacao obtenidas de una finca Cannes ubicada en la vereda de Betulia del municipio de Maceo, Antioquia de la subregión del Magdalena Medio, de la cosecha de mayo de 2016, fermentada en cajas de madera y secadas al sol durante seis días.

Comparación de la Norma Técnica Colombiana – NTC 1252 de 2013

Para la comparación de la norma NTC 1252 de 2003 se realizó la búsqueda de normas nacionales relacionadas con las exigencias de calidad del grano de cacao fermentado y seco de interés para los productores, compradores y la industria. Las normas fueron elegidas de países productores de cacao fino de aroma (Venezuela y Ecuador) y de cacao Común (México, así como de un país reconocido por ser principalmente importador de esta materia prima (Argentina). Otras referencias mundiales fueron el Codex Alimentario que rige a nivel mundial y los Métodos Oficiales de Análisis de sus siglas en inglés *American Official Method* AOAC International.

Otra fuente secundaria consultada fueron las publicaciones reportadas en el período establecido entre 1994 a 2016, para la realización de las pruebas de análisis mencionados en las normas consultadas.

Contenido de extracto etéreo, EE

A partir de la revisión realizada sobre los procedimientos establecidos para la realización del método de análisis del contenido de extracto etéreo en granos de

cacao fermentados y secos se evaluaron seis sistemas de solventes: Cloroformo-Metanol, diclorometano, ciclohexano, dietil éter y n-hexano para la extracción por un sistema Soxhlet.

La elección de las condiciones de operación para el método Soxhlet se basó en el método No 989.05 de la norma A.O.A.C con modificaciones basadas en los reportes de estudios científicos que fueron evaluadas en términos de los tiempos de extracción.

El método en general consistió en pesar 3 g (P1) de muestra triturada y seca, luego se llevó a un dedal de celulosa. Posteriormente se adicionaron 90 mL del solvente objeto de estudio en un crisol previamente pesado (P0). Se llevó al montaje de Soxhlet y la extracción se efectuó en baches de 4 h hasta que la diferencia entre una extracción y otra no superara 0,5% o 1 mg del peso de extracto etéreo. En la Tabla 6 se describe las temperaturas y material de los sellos requeridos para la extracción con cada solvente de acuerdo a su naturaleza, al punto de ebullición y de ignición para ser empleados en el equipo Soxhlet Velp Scientific Modelo SER 148.

Tabla 6. Condiciones de operación del equipo Soxhlet con cada solvente de extracción

Solvente	Material del empaque/sellos	Temperatura del plato de calentamiento (°C)	Punto de ebullición (°C)	Punto de ignición (°C)
Cloroformo - metanol	Vitón	210	64,7	470
Ciclohexano	Vitón	200	86,7	No combustible
Dietil éter	Butil	110	34,6	180-190
Éter de petróleo	Vitón	110	30-80	No especificado
Metanol	Butil/Vitón	210	64,7	470
n-hexano	Vitón	130	69	234

El extracto etéreo después de estar libre de solvente, se transfirió a un desecador y se pesó (P2). Para calcular el porcentaje de extracto etéreo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{P_2 - P_0}{P_1}\ x\ 100 \qquad \text{Ec. 1}$$

Acidez total (AT)

La acidez total (AT) de las semillas de cacao fermentado y seco se realizó según la norma internacional A.O.A.C 925.34 de 1990 con algunas modificaciones sugeridas por Nazzaduri (2006) y Guehi (2010). Para determinar la cantidad de muestra se realizó la verificación de la influencia de la relación granos de cacao molido y agua reportada en las publicaciones científicas revisadas que consistieron en 10:90 y 5:45 de granos y agua respectivamente y una relación propuesta en esta investigación debido a la limitante de cantidad de muestra, que fue 1:10.

El método consistió en la reducción del tamaño de partícula del cacao seco en un molino, el cual se tamizó posteriormente para recoger mínimo 1 o 10 g de polvo de cada una de las muestras entre 594 y 420 µm, las mismas que se vertieron en 10 o 100 mL de agua destilada, respectivamente y fueron sometidas a 90 °C con agitación durante 1 hora. La mezcla obtenida se centrifugó durante 25 min a 15 °C y 5000 rpm y 5 o 25 mL del sobrenadante fue titulada con una solución de NaOH al 0.01 N hasta alcanzar un pH con rango de 8.27 – 8.33. Los valores de la acidez total (AT) se reportaron como mmoles de hidróxido de sodio por 100 g semilla

seca y como meq de NaOH por 10 g de cacao seco (meq de NaOH. 10 g^{-1}) (AOAC, 1990; Nazaruddin, et al, 2006; Guehi et al, 2010; Landero, E, 2014).

Costos del método

Uno de los criterios relevantes en la selección del método, adicional a las condiciones óptimas del método son los costos, de allí que se haya determinado un valor global, en el que se consideraron los costos directos (reactivos, materiales, mano de obra, uso equipo) y costos indirectos administrativos.

Diseño de experimentos

La selección del solvente y las condiciones de obtención del extracto etéreo se basó en un esquema de aleatorización completamente al azar DCA y se realizó una Análisis de Varianza (ANAVA) para identificar las diferencia entre los tratamientos evaluados descritos en la Tabla 7, donde la variable independiente fue los tratamientos aplicados con diferentes solventes y la variable respuesta el porcentaje del extracto etéreo obtenido, con tres repeticiones y un nivel de confianza de 95 %. La homogeneidad de la varianza fue verificada por un aprueba Levin y la normalidad por Shapiro-wilk. Se realizó una comparación mínima significativa honesta (DMSH) de Tukey entre los tratamientos para identificar las diferencia entre ellos.

Tabla 7. Esquema de aleatorización de los tratamientos evaluados

Repeticiones	Tratamientos					
1	F	A	B	D	C	E
2	D	E	C	A	F	B
3	C	B	F	E	D	A

A: Cloroformo-Metanol; B: Ciclohexano; C: Dietil éter; D: Éter de petróleo; E: metanol; H: Hexano

La decisión entre los tratamientos diferentes estará dado por el mayor porcentaje pero también estará determinado por el costo del ensayo y condiciones operativas.

Todos los análisis se realizaron con el software estadístico R Studio (Versión 0.98.1103 GNU Affero General de licencias públicas) (MONTGOMERY, Peck, & Vining, 2012).

Resultados y análisis

Análisis de la normativa internacional

La Norma Técnica Colombiana 1252 de 2003 con vigencia actual comprende los aspectos descritos en la Tabla 8, con los cuales debe dar cumplimiento para la venta o compra del grano de cacao fermentado y seco, criterios de los cuales dependerá el rechazo o aceptación, seguido por la definición del valor comercial de acuerdo a la clasificación del grano, ya sea en la categoría superior o Premio, Corriente o la de menor calidad, denominada Pasilla.

Tabla 8. Requisitos de calidad exigidos para el cacao bien fermentado y seco según la norma NTC 1252 de 2003

Requisitos	Premio	Corriente	Pasilla
Contenido de humedad en % (m/m)	7	7	7
Contenido de impurezas o materias extrañas en % (m/m), máx.	0	0.3	0.5
Grano mohoso interno, numero de granos /100 granos máx.	2	2	3
Grano dañado por insectos y/o germinados, numero de granos/100 grano máx.	1	2	2
Contenido de pasilla, numero de granos/100 granos, máx.	1	2	
Contenido de almendra en % (m/m). min.	-	-	40-60
Masa (peso), en g/100 granos, min.	120	105-119	40
Granos bien fermentados, numero de granos/100 granos, min.	65	65	60
Granos insuficientemente fermentados, numero de granos/100 granos máx.	25	35	40
Granos pizarrosos, numero de granos/100 granos, máx.	1	3	3

Como se puede observar la mayoría de los requisitos son cualitativos y no están soportados por métodos de análisis que eviten la decisión de una clasificación basados en simples observaciones o apreciaciones subjetivas. Adicionalmente, no hay una diferenciación entre Cacao Fino o de Aroma y el Corriente, aspecto que si es tomado en cuenta a nivel internacional para la determinación del valor comercial.

Con el fin de dar respuesta a las exigencias internacionales y mejorar los parámetros de calidad que posicione el cacao colombiano, así mismo que permita una trazabilidad de las condiciones de producción de las etapas de poscosecha que son decisivas en el desarrollo de los precursores de aroma y pueden generar mayor rigurosidad en las exigencias tanto para los agricultores como para los compradores, para esto se realizó una revisión de las normas de países productores de Cacao Fino de Aroma (Ecuador y Venezuela), Común (México) e importador (Argentina) para identificar las diferencias de los requisitos comparados con la NTC colombiana, como se muestra en la Tabla 9 .

Tabla 9. Resumen de las normas que se refieren a granos de cacao

Nombre de la Norma	País	Año	Análisis en granos de cacao
Codex-stan-141-1983, cacao sin cáscara ni germen, cacao en pasta, Pará uso en la fabricación de productos de cacao y chocolate.	Nivel mundial	1983	Alcalinizantes, Agentes neutralizantes, Emulsionantes, Aromatizantes, contaminantes (arsénico, cobre, plomo)
Resolución Conjunta SPReI N° 186/2012 y SAGyP N° 938/2012 Productos estimulantes o fruitivos : Cacao y chocolate	Argentina	2012	Contenido de granos mohosos, granos pizarrosos, granos dañados por insectos, germinados o aplastados, grano partido fragmentado, humedad, cenizas, fibra, almidón de cacao, cascara, alcaloides (Teobromina y Cafeína) Contaminantes (arsénico, plomo y cadmio)
NMX-F-352-S-1980. Cacao en grano fermentado	México	1980	Contenido de granos mohosos, granos pizarrosos, granos dañados por insectos, germinados o aplastados, grano partido Fragmento, Aflatoxinas, contenido de contaminantes como piretrinas, Butóxido de piperonilo, fosforo de aluminio diclovos
NORMA VENEZOLANA : COVEVIN 50	Venezuela	1995	Contenido de granos mohosos, granos pizarrosos, granos dañados por insectos, germinados o aplastados, grano partido fragmentado, humedad, aflatoxinas, material extraño
NORMA Oficial Mexicana NOM186SSA1/SCFI2002 Cacao y sus productos derivados	México	2002	Contenido de granos mohosos, granos pizarrosos, granos dañados por insectos, germinados o aplastados, grano partido fragmentado, Microbiológicas, Contaminantes, Materia extraña, acidez, humedad
Norma tecnica Colombiana NTE INEN 176:2006 Cuarta Revisión Cacao en grano	Ecuador	2006	Contenido de granos mohosos, pizarrosos, dañados por insectos, germinados, aplastadoso, grano partido fragmentado. Peso de 100 granos.

De la información recolectada se puede evidenciar que las características físicas predominan y coinciden con los parámetros requeridos para granos de cacao en Colombia, aunque difieren en las exigencias para la clasificación según los límites de peso.

Los parámetros que difieren con la NTC colombiana, porque no están incluidos comprende tres perfiles. El primer perfil que se destaca es el químico como el contenido de compuestos responsables de la capacidad antioxidante (epicatequina y catequina), alcaloides (cafeína y teobromina) que su relación puede ser un indicador de cada variedad, así como la determinación de metales pesados y algunos minerales. El segundo es el bromatológico con exigencias que comprende el contenido de extracto etéreo que influye en el rendimiento y aprovechamiento para el sector industrial. Finalmente, el biológico que define límites para la presencia de mohos, levaduras y aflotoxinas.

Cada una de las exigencias reportadas, son de importancia para la industria y la salud del consumidor y esencial para el control de calidad. Hoy en día, la calidad alimentaria es un concepto complejo que a menudo se mide en términos nutricionales, microbiológicos, y fisicoquímicos (Cardello, 1995). No obstante, algunos otros factores influyen en la denominación del grado de excelencia de un alimento, en el caso específico del cacao se requiere establecer diferentes parámetros que contribuyan a definir la clasificación de Cacaos Finos o de Aroma y Cacao Común.

Araujo y Fernández en 2014 desarrollaron un concepto conocido como índice de calidad el cual se refiere a las propiedades, los procesos de beneficio, y las características químicas, biológicas y físicas del producto como una alternativa para mejorar la calidad del grano de cacao en Brasil (Araujo, a.F. Fernandes, et al., 2014).

Para la obtención de dicho índice de fermentación se estipulo los tres principales sectores donde tiene impacto el cacao, se asignaron valores a cada uno de ellos, para un total de 100 puntos como se detalla en la Tabla 10, siendo 40, 35, 25, para la industria del chocolate, para el sabor del chocolate, según los beneficios del chocolate respectivamente.

Asimismo se establecieron valores a cada parámetro de análisis, es importante tal denominación ya que permite destacar que para cada sector los requerimientos son diferentes.

Tabla 10. Funciones e indicadores, con sus respectivos pesos que componen la propuesta para la determinación del Índice de la calidad del cacao realizado por Araujo y Fernández en 2014

Calidad del cacao en términos de los diferentes sectores en los que tiene impacto	Componente	Puntuación
Interés para la industria	Contenido de grasa*	20
	pH*	15
	Acidez*	20
	Contenido de polifenoles*	10
	(-) epicatequina , (+) catequina*	10
interés en el sabor del chocolate	Ácidos orgánicos (acético y láctico)*	10
	Presencia de metales pesado	10
	Contenido de aminoácidos	20
	Cafeína*	15
	Teobromina*	15

Calidad del cacao en términos de los diferentes sectores en los que tiene impacto	Componente	Puntuación
	pH*	10
	Contenido de polifenoles*	20
	Ácidos orgánicos (acético y láctico*)	10
Interés en los beneficios que tiene para la salud	Azúcares	20
	(-) epicatequina , (+) catequina*	20
	Teobromina*	15
	Cafeína*	15
	Aminoácidos	10
	Presencia de metales pesado	10
	Ácidos orgánicos (acético y láctico)*	10
	Macronutrientes	10
	Micronitrientes	10

*Pruebas consideradas en este trabajo para ser consideradas su inclusión en la actualización de la NTC 1252 de 2003.

Mientras que en las circunstancias actuales, el control de calidad se lleva a cabo principalmente por funcionarios de las cooperativas y los compradores, es altamente deseable que, en el contexto de la producción sostenible de cacao sea más moderna la comercialización y en este caso los agricultores puedan desempeñar un papel más importante en la comercialización de este. Con el tiempo, deben hacerse cargo del control de calidad y llevarlo a cabo a nivel de explotación antes de vender los granos de cacao, tomando así una mayor responsabilidad por la calidad del producto y lo que les permite alcanzar precios de venta más altos. En un enfoque de mayor participación de los agricultores en el proceso de producción de cacao y comercialización.(Board on the word cocoa economy, 2009)

Los resultados anteriores conllevan a una profunda revisión de la Norma actual basados en la inclusión de pruebas antes mencionadas aspecto que pueden ser resumidas como:

Bromatológico: contenido de cenizas, extracto etéreo, fibra, humedad y proteína total

Químicos: acidez,

Físico: revisión de rango de pesos, pH, color y aspectos físicos.

Microbiológicos: aflotoxinas, mohos y levaduras.

Estandarización del método de acidez y contenido de extracto etéreo

Alrededor del mundo existe un gran número de publicaciones que se resumen en normas nacionales, estándares reportados por organizaciones internacionales de referencia en este sector productivo, producciones bibliográficas indexadas, así como informes expuestos en congresos de carácter internacional, la mayoría de ellos en los que se detallan los métodos mediantes los cuales se establecen parámetros como: contenido de extracto etéreo, proteína, fibra, cenizas, acidez, color, índice de fermentación, así como la composición química, lo que conlleva a herramientas de primera mano para clasificar el cacao en categorías de alta, mediana o baja calidad, aspectos genotípicos con miras a identificar materiales promisorios o lograr determinar si las etapas de beneficio fueron ejecutadas con éxito.

Entre los métodos reportados, existen algunas coincidencias en las condiciones de operación, pero sin llegar a metodologías que puedan ser adoptadas en su totalidad, ya sea por su falta de reproducibilidad, pocos detalles sobre los parámetros aplicados, así como la heterogeneidad de resultados, lo cual hace que para el establecimiento de métodos estandarizados en cada centro de investigación o productivo deban adaptar y basarse en procedimientos validados con un fuerte soporte estadístico para generar confianza en los resultados

Existen algunas de propiedades críticas en la caracterización del cacao fresco, fermentado o seco, entre ellas el contenido de grasa o extracto etéreo y la acidez.

El contenido de extracto etéreo es un parámetro que se caracteriza por ser determinante debido a que representa un porcentaje superior al 50 % en la mayoría de los materiales, lo que implica un valor económico representativo para la industria en la obtención de un subproducto de amplia aplicación como es la manteca de cacao, también ha sido empleado el valor de este porcentaje como un indicador para distinguir entre materiales vegetales, así un cacao Criollo se caracteriza por tener mayor cantidad que el Forastero o Trinitario, finalmente el extracto etéreo puede ser considerado como un interferente para pruebas de caracterización posterior como la cuantificación de polifenoles, acrilamida, entre otros.

En la Tabla 11 se reportan algunos de los métodos reportados para obtener el extracto etéreo tanto por el método tradicional recomendado por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) y de mayor uso en la industria de chocolates para la caracterización de la materia prima, así como la extracción por

ultrasonido que ha empezado a tener un mayor auge, pero con variaciones en sus resultados que conllevan a diferencias significativas con el método tradicional.

Tabla 11. Revisión de los métodos reportados entre 2010 y 2016 para la extracción del extracto etéreo del cacao y subproductos

Referencias	Matriz alimentaria	Método de determinación de extracto etéreo	Solvente
(Ramirez-Sanchez, Maya, Ceballos, & Villarreal, 2010)	Semillas de cacao crudo y pulverizado	Extracción por agitación y recuperación del sobrenadante con centrifugación, no se utilizó temperatura, ni fuerza mecánica sobre la muestra.	Hexano
	Cocoa en polvo con un porcentaje de cacao del 85%, 72% , 70%		
	Chocolates comerciales: Hershey's, chocolate oscuro, chocolate de leche, con un porcentaje de cocoa del 60 %, 60 %, 40 % respectivamente.		
(Voigt et al., 1994)	Well-fermented cocoa beans (Ivory Coast) were obtained from Jacobs-Suchard Research and Development	Extracción por Soxhlet a 70 °C durante 16 horas, realizando dos repeticiones cada una de 8 horas	Éter de petróleo
(Hue et al., 2016)	Granos fermentados de (Ecuador, Madagascar, Camerún, Ghana, Indonesia, República Dominicana y Trinidad y Tobago)	Se hace referencia al tamaño de partícula el cual es de 0,5 mm	Cloroformo: Etanol
(Sandhya et al., 2016)	Granos de cacao, tipo Forastero de la región de Karnataka, India	Extracción por S Soxhlet a 60 °C durante 8 horas	Éter de petróleo
(Esatbeyoglu, Wray, & Winterhalter, 2015)	Granos de cacao fermentado y NO seco, de la región Minchen, Alemania	Las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido hasta congelación, se realizó la molienda y posteriormente se determinó el tamaño de partícula el cual fue de 1mm	Hexano
(Diomande et al., 2015)	Granos de cacao de costa de marfil	Extracción por Soxhlet a 90 °C durante 2 horas	Ciclohexano
(Oracz & Nebesny, 2014)	Granos de cacao fermentado y seco , de Brasil (Forastero), Ecuador (Nacional), Papua Nueva Guinea (Trinitario), Venezuela (Trinitario), Ghana (Alto Amazon Forastero híbrido, UAF), Camerún (Trinitario × Alto Amazonas Forastero híbrido, T × UAF) e Indonesia (Trinitario × Alto Amazonas Forastero híbrido, T × UAF)	Agitación en vortex rotacional a 300 rpm y centrifugada a 6000 rpm x 10 min	Éter de petróleo
(F. Ioannone et al, 2015)	Granos de cacao fermentado y seco , tipo : Criollo, región de Roma, Italia	Se realiza la extracción 3 veces, luego de esto se evapora el solvente restante bajo una corriente de nitrógeno.	Hexano

Referencias	Matriz alimentaria	Método de determinación de extracto etéreo	Solvente
(Hu, Kim, & Baik, 2016)	Granos de cacao fermentado y seco , tipo : Forastero , región Seongnam, Corea	Extracción por Soxhlet durante 17 horas	Dietil éter
(Carrillo, Londoño-Londoño, & Gil, 2014)	Granos de cacao crudo, SIN fermentar, SIN secar, de diferentes regiones del Departamento del Huila. Colombia	Congelar con nitrógeno líquido, moler , liofilizar y almacenar a -20 °C, para desengrasar la muestra con hexano sonicar 15 min y centrifugar a 1565 g (13000 rpm) x 10 min repetir 3 veces.	Hexano

Como se puede observar existe una variedad importante en el solvente empleado el tiempo de extracción y el manejo de la muestra posterior al análisis, lo cual implica afrontar ensayos preliminares para adoptar cualquiera de los métodos descritos.

En la Tabla 12 se describen los resultados obtenidos para el rendimiento de la extracción, el porcentaje de extracto etéreo obtenido, a partir de los cuales se realizó la comparación de los tratamientos, para lo cual se obtuvo un cumplimiento de los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk: valor p: 0.9439) y homogeneidad de varianzas (Levene: valor p: 0,7632). Por su parte el ANAVA fue significativa ($p<0.05$) como se muestra en la Figura 6, lo que implica que existen diferencias entre los tratamientos.

Figura 6. Representación por bloques de las diferencias de medias entre los tratamientos según el ANAVA.

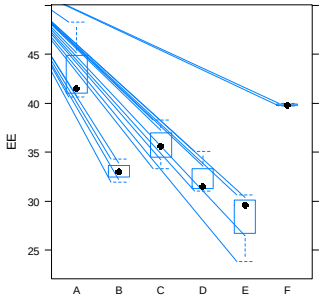
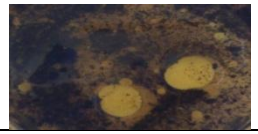


Tabla 12. Resultados de la evaluación de rendimiento de extracción, porcentaje de extracto etéreo y valor del método

Tratamiento	Extracto etéreo (%)	Coeficiente de variación, CV	Costo del método ($)	OBSERVACIONES	Fotografías del extracto etéreo
A: Cloroformo-metanol	43,4 ± 4,2	0,03	580.223	Se puede observar que el solvente presenta partículas negras, lo que da un indicio de que el aceite sufrió degradación. Al traspasar el aceite obtenido al recipiente ámbar se identificaron partículas carbonizadas, además el olor presenta una nota rancia.	
B: Ciclohexano	33,1 ± 1,2	0,01	1.266.272	Presenta un color más pálido comparado con el aceite extraído por hexano, además la manteca pasa a su estado sólido con mayor rapidez con comparación que con la extracción realizada con hexano	
C: Dietil éter	35,8 ± 2,5	0,02	919.598	El solvente se evapora durante la inmersión más rápido que los demás solventes evaluados ($T_{evaporación=}$ 30°C), por esta razón en el momento de hacer la extracción se debe cambiar la perilla de paso del solvente durante la recuperación para recoger la mayor cantidad de solvente y que este no se evapore antes de terminar la extracción, aunque el porcentaje de recuperación es inferior al 5 %.	
D: Éter de petróleo	32,5 ± 2,2	0,05	675.102	El aceite obtenido de la extracción presenta una coloración amarillo-blanco translucido, su aroma es característico a la manteca de cacao, el solvente tiende a evaporarse rápido porque hay que controlar la recuperación con el manejo del equipo	
E: Metanol	28,0 ±3,7	0,02	86.490	De forma similar a la extracción con cloroformo y metanol, se presentaron partículas carbonizadas, olores a rancidez. La coloración del aceite podría indicar que además del extracto etéreo, el solvente puede estar extrayendo o reaccionando con otros componentes como las proteínas.	
F: Hexano	39,8 ± 0,2	0,02	317.480	El aceite obtenido de la extracción tiene una coloración amarilla translucida y su aroma es característico de la manteca de cacao.	

Según la prueba de Tukey existen unas diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos descritos a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13. Diferencias entre los valores medios del porcentaje de extracto etéreo de acuerdo a la prueba de Tukey

Tratamientos	Valor promedio del porcentaje de extracto etéreo obtenido
A^{a}	43,4 ± 4,2
F^{ab}	39,8 ± 0,2
C^{bc}	35,8 ± 2,5
B^{c}	33,1 ± 1,2
D^{cd}	32,5 ± 2,2
E^{d}	28,0 ±3,7

[a,b,c,d] Los superíndices iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos

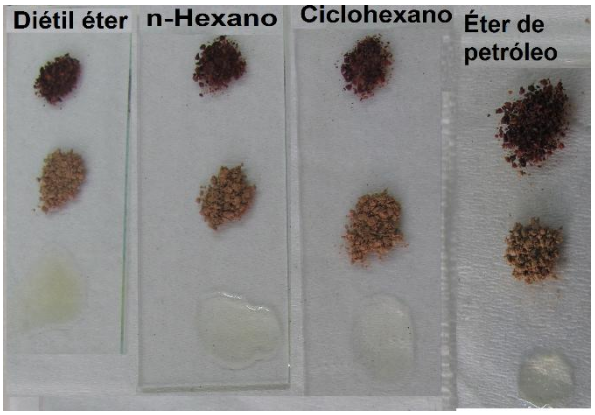
De esta información se puede evidenciar claramente que la mezcla de cloroformo-metanol empleada en Indonesia para la evaluación de cacao fermentado de diferentes orígenes como se mencionó al inicio fue la que presentó el mayor rendimiento, pero no difiere significativamente del obtenido con hexano, pero según se observa en la fotografía del extracto detallada en la Tabla 12, el aceite tenía una apariencia quemada y un olor a rancio, posiblemente a la reacción del cloroformo no solo con el contenido graso de la semilla sino también con la proteína, lo cual ha sido reportado con anterioridad (Southgate, 2006).

Así mismo, no existen diferencias significativa entre la extracción con hexano y dietil éter, pero debido a la naturaleza volátil de este último, no hay una recuperación del solvente al alcanzar esta etapa al final del tratamiento. Además, se observa una perdida rápida durante las etapas de Inmersión y lavado, lo cual implica controlar que el solvente se mantenga en contacto con la muestra regulando la recirculación del solvente.

Los demás solventes no tuvieron el mejor rendimiento durante la extracción, alejándose en el caso del éter de petróleo de la recomendación realizada por la AOAC para productos de cacao. Para la situación específica del ciclohexano fue el que generó el mayor costo, contrario a la extracción con metanol que tiene el menor valor a pesar de demorarse mayor tiempo que los demás solventes para evaporarse completamente una vez terminado este ciclo, pero la apariencia del aceite en color y olor es similar al reportado para la mezcla con cloroformo, sumado a que es un reactivo restringido, por lo que se descarta como opción para la extracción.

En la Figura 7 se muestra la apariencia y color del extracto, cacao desengrasado y muestra inicial sin ser sometida a extracción.

Figura 7. Apariencia y color del extracto etéreo (abajo) y cacao desengrasado (medio) comparado con la muestra inicial sin extracción (arriba) para cada uno de los tratamientos empleados.



Se puede observar un cambio en el color del cacao desengrasado con respecto a la semilla sin tratamiento. Además se observa una apariencia más pálida para los aceites

obtenidos con ciclohexano y éter de petróleo. Por lo que finalmente se define el hexano como el mejor solvente para su extracción.

A partir del solvente seleccionado se realizó la extracción hasta agotar la muestra de forma que no se obtuviera más de 1 % en la última etapa de extracción y se llegó a un proceso de extracción de 18 h en cuatro baches de 3 h de extracción, 1 h de lavado y 30 min de recuperación de solvente. Los resultados 54,58 ± 0,02 % (ver Tabla 13) fueron superiores a los reportados por los métodos que se tomaron como referencia, así Ramírez-Sánchez, *et al* (2010) obtuvieron 49 %, Hu et al (2016) reportaron 45,6 % y el máximo porcentaje reportado fue 50,0 % por Dankyi et al, (2015), debido posiblemente a la condición de garantizar la obtención de una cantidad inferior al 1 % de extracto etéreo y las diferencias de orígenes, materiales vegetales y tratamientos en los procesos de poscosecha.

De igual forma sucede con la acidez, prueba determinante para el seguimiento de la calidad en el proceso de fermentación y al final del secado. Existe diversidad en los métodos empleados para determinar la acidez de cacao y subproductos como se detalla en la Tabla 14.

Tabla 14. Revisión de los métodos reportados entre 2010 y 2015 para la determinación de acidez en cacao y subproductos

Referencias	Matriz	Peso de la muestra	Cantidad de solvente	Temperatura	Filtración
(Portillo et al., 2011).	Granos de cacao tipo:Criollo en diferentes días de fermentación	10 g	90 mL	100 °C	NO
(Rodriguez-Campos, Escalona-Buendía, Orozco-Avila, Lugo-	Granos de cacao tipo: Forastero	5 g	100 mL	100 °C	Papel filtro N° Whatman 4

Referencias	Matriz	Peso de la muestra	Cantidad de solvente	Temperatura	Filtración
Cervantes, & Jaramillo-Flores, 2011)					
(Guehi, S., Dabonne, S., Ban-Koffi , L., Kedjebo, D. K. and Zahouli, 2010)	Granos de cacao fermentado	5g	45 mL	100 °C	Papel filtro N° Whatman 4
(Di Mattia et al., 2013)	Granos de cacao tipo: Trinitario	10 g	200 mL	NO	Papel filtro N° Whatman 4
(P. C., Leonor, 2008.)	Cacao seco y fermentado del Ecuador	11 g	100 mL	100°C	Papel filtro N° Whatman 4

Conclusiones

La norma actual colombiana 1252 de 2003 que define los parámetros para granos de cacao fermentado y seco para estar a nivel competitivo con respecto a las exigencias internacionales requiere una actualización que comprenda la inclusión de pruebas físicas, químicas, bromatológicas y biológicas, lo cual le permitirá al productor y representantes de la industria mejorar la calidad, definir características que conlleven a la diferenciación por variedad y calidad en general que se podrá ver reflejado en el valor comercial.

Desde el punto de vista de mejoramiento de la calidad es necesaria la estandarización de los métodos para la caracterización del cacao en las diferentes etapas de la poscosecha requiere de una adaptación soportada de herramientas estadísticas, equipos robustos y rigurosidad en la aplicación de los parámetros operativos para obtener resultados confiables.

En ese orden de ideas, de la evaluación de diferentes metodologías basados en reportes previos conlleva a que el mejor solvente es el n-hexano desde el punto de vista de rendimiento del extracto obtenido, recuperación de solvente, aspecto físico del extracto etéreo y costo.

Con respecto a la prueba de acidez total, la introducción de una centrifugación para la separación del material particulado en la mezcla objeto de estudio en lugar de la aplicación de un sistema de filtración reduce el tiempo de operación de hasta 3 h a 25 min, sin la limitante del equipo, lo que permite realizar mayor número de análisis simultáneos, sin que se afecten los resultados.

Estandarización de métodos de análisis bromatológicos, físicos y químicos a partir del estudio de materiales vegetales de Antioquia

El segundo capítulo de este Trabajo de Investigación comprende los resultados alcanzados para dar respuesta al segundo objetivo específico de estandarizar los métodos para la ejecución de los análisis bromatológico, físicos y químicos del cacao fermentado y seco bajo los estándares internacionales y, el tercer objetivo que tiene como alcance definir los procedimientos y parámetros para la actualización de la Norma Técnica Colombiana para el grano de cacao.

Para la estandarización de los métodos elegidos como relevantes para incluir en la actualización de la Norma Técnica Colombiana 1252 de 2003 para grano de cacao, según la revisión realizada en el Capítulo I, se tomó como material vegetal, varios clones provenientes del nordeste antioqueño, como aporte a los materiales de estudio que comprende el proyecto que soporta esta investigación.

Al igual que el capítulo I, el desarrollo comprenderá la metodología, análisis de resultados y conclusiones.

Materiales y métodos

Reactivos

Para los análisis bromatológicos se utilizó hexano, acetona, ácido sulfúrico, hidróxido de potasio, catalizador (K_2SO_4 – $CuSO_2$), hidróxido de sodio, ácido bórico, indicador de Tashiro todos los anteriores grados reactivos de la marca Merck, Se utilizaron reactivos de grado analítico Sigma (St. Louis, MO, USA) como Trolox (6-hidroxi-2,5,7-

terametilcroman-2-acido carboxílico), fluoresceína, AAPH (2,2′-azobis(2-methylpropionamidina) dihidrocloruro para la determinación de las sustancias bioactivas.

Los estándares de catequina, epicatequina, teobromina, cafeína, teofilina fueron adquiridos Sigma Aldrich (Italia), el acetonitrilo utilizado en las lecturas cromatográficas fue grado masas (Merck), y el agua fue MilliQ.

Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en Maceo, Antioquia ubicado en la subregión del Magdalena Medio que limita por el Norte con el municipio de Yolombó, por el Este con Puerto Berrío, por el Sur con los municipios de Puerto Berrío y Caracolí, y por el Oeste con San Roque y Yolombó como se muestra en la Figura 8. Sus coordenadas son 6°33’12´N 74°47´14´O Altitud Media 950 m. s. n. m.

Figura 8. Ubicación del municipio de Maceo, Antioquia

Fuente : Google maps

La unidad experimental seleccionada fue la Finca Cannes ubicada en la vereda de Betulia, con un promedio de producción de 1800 kilos/ hectárea.

El material vegetal escogido para el estudio consistió en cuatro híbridos identificados por las características fenotípicas como Criollo (Maceo 14 y San Vicente 155) y Forastero (*Iquitos Marañón Collection* - IMC 67 y Caucasia 51).

La toma de muestra del material vegetal identificado como Criollo se realizó a partir de dos lotes ubicados en un terreno plano y en pendiente localizados en la Fase III, así mismo se realizó la recolección de la muestra correspondiente a los híbridos Forasteros en los lotes ubicados en la Fase I.

Tratamiento del material vegetal posterior a su cosecha

Luego de recolectadas las mazorcas fueron sometidas a tres tratamientos diferentes:

Semillas fermentadas y secas: se realizó la apertura de las mazorcas en la Finca, luego las semillas en baba (con su respectivo mucilago) fueron llevadas a fermentación en cajones de madera, cubiertos con costales de fique y cada muestra fue separada en mallas de polipropileno de alta densidad. El proceso de fermentación que tuvo un período anaerobio de 24 h seguido por uno aerobio con agitación periódica, tardó entre 4 y 6 días dependiendo de cada material. Una vez terminado esta etapa, los granos de cacao bien fermentados fueron secados en marquesina durante cinco días, hasta que el grano presentó las características de sequedad y crocancia identificada por el agricultor.

Las semillas fermentadas y secas se empacaron en bolsas herméticas y dentro de un recipiente de plástico dispuesto con silica gel, para evitar la absorción humedad hasta su transporte al Laboratorio de Trazabilidad y Residualidad de la Corporación Universitaria Lasallista.

Semillas sin fermentar: las mazorcas fueron lavadas con abundante agua luego se retiró toda la humedad, se cubrieron completamente con papel absorbente y se empacaron en bolsas herméticas, se dispusieron en neveras de Icopor, equipadas con gel refrigerante y se transportaron al Laboratorio. Posteriormente, se realizó la apertura de la mazorcas y los granos existentes fueron divididos en dos partes la primera mitad para la determinación en cacao crudo sin fermentar y la segunda mitad para el cacao sin fermentar seco. La muestra de cacao crudo fueron procesadas una vez se realizó la apertura de la mazorca, pero la cantidad restante se almacenó en bolsas herméticas a 20 °C.

Semillas secas sin fermentar: las semillas separadas de su mazorca se secaron en una estufa Memmert (modelo UN55) con aire conectivo a 40 °C hasta alcanzar una humedad menor a 7 %.

Cada una de las muestras obtenidas por los tres tratamientos fueron sometidos a un tratamiento previo para la realización de los análisis bromatológicos, físicos y químicos que consistió en retirar la cascarilla y reducir el tamaño de partícula con ayuda de un molino de cuchillas (Cuisinart), el producto resultante de la molienda se pasó por un tamiz y se recolectó solo la muestra que correspondió a un tamaño de partícula menor a 0.45 micras. El producto final se empacó en frascos de polietileno tapa rosca y se

almacenaron en un recipiente plástico con silica gel dispuesto en un cuarto a temperatura ambiente (19 °C) con humedad relativa controlada (65 %).

Identificación morfológica de las mazorcas

Se realizó el registro fotográfico de las mazorcas para identificar la forma, rigurosidad del fruto, la profundidad de los surcos, ápice y base del fruto.

Parámetros de calidad de fermentación

Las pruebas para determinar los parámetros de calidad de fermentación en la norma colombiana está determinada por el grado de fermentación que conlleva al cumplimiento de los requisitos de peso y apariencia para clasificar el grano de cacao como premio, Corriente o Pasilla, pero existen otros métodos reportados por diferentes autores que permiten por medio de pruebas fotométricas definir el índice de fermentación, como es el contenido de antocianinas o según las observaciones basadas en la referencia de la Figura , clasifican el grano como bien fermentado, ligeramente fermentado, deficientemente fermentado o pizarroso que corresponde a granos con mohos.

Este parámetro de gran importancia en el reconocimiento de la calidad durante el desarrollo de un buen proceso de fermentación y secado requiere de un conjunto de pruebas cuantitativas que puedan relacionar una escala de valores con este indicador. Por esta razón, se propuso como pruebas de acidez, color y contenido de antocianinas totales, descritas a continuación.

Grado de fermentación

De acuerdo con la Norma Técnica Colombiana NTC 1252 de 2003, el grado de fermentación se realizó mediante un corte longitudinal de la almendra. El análisis incluye características cualitativas del cotiledón que definen una categorización usando un tamaño de muestra de 100 granos. Para un mínimo de 65 almendras que presentan color marrón o pardo rojizo oscuro (color chocolate) con alvéolos bien definidos de forma arriñonada y la masa promedio mínimo de 120 g se vincula a una categoría Premio, entre 105 y 119 g categoría Corriente. Para un mínimo de 60 granos bien fermentados con una masa promedio de 40 g se clasifican como Pasilla (Icontec internacional, 2003).

Índice de fermentación

El índice de fermentación del cacao durante la fermentación se obtiene mediante el cálculo de la relación de absorbancia a 460 nm y 530 nm, a partir de 0,5 g semillas de cacao de molidos que previamente fueron sometidos a una extracción con 50 mL de mezcla de metanol:HCl (97:3). El homogeneizado se deja reposar a (8 °C) de 16 a 19 horas y luego se filtra a vacío hasta un volumen aforado en 50 mL. Las lecturas se realizan por triplicado (Gourieva y Tserrevitinov, 1979).

Color

Se tomaron 10 gramos de muestra y se dispusieron en cajas de Petri, se realizó una distribución homogénea de la muestra, posteriormente con la ayuda de un Nanocolor UV/Vis, fuente de luz D65, el barrido se realizó de 360 nm a 830 nm. Se registró el color

en coordenadas R, G, B y los datos tomados fueron procesados para obtener las coordenadas L*, a*, b* por medio del Software ColorMine.org (Ref XX).

El índice de color (IC) se calculó a partir de la ecuación 1:

$$IC = \frac{a \,.1000}{L \,.\, b} \quad (1)$$

a*, b* y L* son los parámetros del sistema color CIELAB, donde *L** proporciona un valor de luminancia o brillo de la muestra, *a** indica la zona de variación entre el rojo y el verde del espectro y *b** se refiere a la zona de variación entre el amarillo y el azul del espectro (VIGNONI et al., 2006).

Acidez total (AT) y pH

La acidez total (AT) y el pH de las semillas de cacao durante la fermentación y al final del secado se determinará según la norma internacional A.O.A.C 925.34 de 1990 con algunas modificaciones sugeridas por Nazzaduri (2006) y Guehi (2010). Para muestras frescas, se tomaron 10 almendras, a las cuales se les extrajo la testa del cotiledón con la ayuda de un bisturí. La testa se colocó en 100 mL de agua destilada y se licuó hasta formar una solución fina; mientras que el cotiledón se sometió a una reducción de tamaño en un molino y se tamizó posteriormente para recoger mínimo 10 g de polvo de cada una de las muestras entre 594 y 420 µm, las mismas que se vertieron en 100 mL de agua destilada y fueron sometidas a ebullición, la testa durante dos minutos y el cotiledón por una hora. La mezcla de la testa se filtró con papel Whatman N° 4 y se tomaron 50 mL para registrarle el pH por medio de un

potenciómetro (Modelo InoLab® pH 7110 New (pH 720) WTW) a una temperatura entre 20 y 25°C.

La mezcla obtenida del cotiledón se centrifugó durante 25 min a 15 °C y 5000 rpm y a 25 mL del sobrenadante se le midió pH. Otra alícuota de 25 mL del sobrenadante fue titulada con una solución de NaOH al 0.01 N hasta alcanzar un pH con rango de 8.27 – 8.33. Los valores de la acidez total (AT) se reportaron como mmoles de hidróxido de sodio por 100 g semilla seca y como meq de NaOH por 10 g de cacao seco (meq de NaOH. 10 g^{-1}) (AOAC, 1990; Nazaruddin, et al, 2006; Guehi et al, 2010; Landero, E, 2014).

Análisis bromatológico

Contenido de extracto etéreo, EE

Se pesaron 3 g (P1) de muestra triturada y seca, luego se llevó a un dedal de celulosa. Posteriormente se adicionaron 90 mL de n-hexano en un crisol previamente pesado (P0). Se llevó al montaje de Soxhlet y la extracción se efectuó durante 12 horas en tres baches de 4 h. Se evaporó el solvente, se transfirió a un desecador y se pesó (P2). Para calcular el porcentaje de extracto etéreo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{P_2 - P_0}{P_1}\ x\ 100 \qquad \text{Ec. 2}$$

Contenido de proteína cruda

El contenido de proteína cruda se cuantificó utilizando el método A.O.A.C 970.22 (2012) con algunas modificaciones adaptadas para muestras alimentarias (FAO, n.d.). Se pesaron 0,3000 g de muestra seca en un papel filtro previamente tarado, se llevó al tubo digestor y posteriormente se adicionaron 4 g de catalizador (K_2SO_4 – $CuSO_2$) y 10

mL de ácido sulfúrico al 96%, de igual forma se preparó un blanco utilizando un papel filtro. Los tubos digestores se llevaron al equipo de Digestión de Nitrógeno (Velp Scientifica, Italia) durante 45 min a 420°C y se dejaron enfriar. Pasado este tiempo se llevó a la unidad de destilación automática (Velp Scientifica, Italia) se programó el respetivo protocolo de adición de reactivos (50 mL de m agua destilada, 50 mL de NaOH 40 % y 50 mL H_3BO_3), luego de recoger el destilado se procedió a titular, adicionado 3 gotas de indicador de Tashiro y se valoró con solución volumétrica de HCl 0.1N hasta que el destilado viró de color verde a violeta y permaneció por 30 segundos.

El cálculo del contenido de proteína se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{(14\ {}^{mg}/_{meq}) * (Vm - Vb) * N}{W} x100 \qquad \text{Ec. 3}$$

Contenido de fibra cruda

El contenido de fibra cruda se cuantificó utilizando el método N° 930.20 de la norma A.O.A.C con algunas modificaciones.

Se parte de la muestra sometida a calentamiento a 105°C durante 1 hora hasta peso constante o hasta 5-10 % de humedad final. Se pesa exactamente 0,3 g de muestra en cada uno de los crisoles, valor registrado como **(F0)**. Se aseguran los crisoles con la muestra en el equipo y se adicionan 125 ml de H_2SO_4 (1,25%) previamente calentados hasta ebullición. 3-5 gotas de n-octanol son adicionados como agente antiespumante, una vez la mezcla está en ebullición se deja la digestión durante 30 minutos. El ácido sulfúrico es drenado y la muestra se lava 3 veces con 30 mL de agua caliente. Luego de drenar el último lavado, se adicionan 150 mL de KOH (1,25%) en ebullición y se

repite el mismo procedimiento realizado con el ácido. Se hace un último lavado con agua fría destilada destinada a enfriar los crisoles y luego con 25 mL de acetona fría, se repite por triplicado agitando cada vez con aire comprimido. Los crisoles se pesan una vez se han evaporado las trazas de acetona, después de secarlos en el horno a 105°C durante 1 hora o hasta peso constante y de llevarlo al desecador para enfriar. Este peso representa la fibra cruda más el contenido de cenizas en comparación al peso inicial **(F1).**

Para cuantificar las cenizas restantes en la muestra que no son removidas por la digestión ácido-básica, se llevaron los crisoles a la mufla a 550°C durante 3 horas, se enfriaron en el desecador y se pesan nuevamente **(F2)**.

Para calcular el porcentaje de fibra cruda se aplica la siguiente ecuación:

$$Porcentaje\ de\ Fibra\ (\%F) = \frac{F_1 - F_2}{F_0} X100 \quad \text{Ec. 4}$$

Contenido de humedad

Se determinó por el método gravimétrico (931.04) descrito por la metodología AOAC 2012. El método consistió en pesar 10 gramos de semilla **(P0)** y se llevaron a secado en estufa convencional a 105±0.2 °C hasta alcanzar un peso constante **(P1).** El resultado se reportó como el contenido de humedad en base húmeda (X_{bh}), según la siguiente ecuación:

$$Contenido\ de\ humedad_{bh}(X_{bh}) = \frac{P_1 - P_0}{P_0} \quad \text{Ec. 5}$$

Contenido de cenizas

Es necesario calcinar los crisoles vacíos a 550°C durante 2 h, dejar enfriar (hasta ± 40°C) en la mufla y llevar al desecador y pesar a temperatura ambiente **(C0)**. Pesar 2 g de muestra en un crisol previamente tarado y deshumedecido **(C1)**. Colocar los crisoles con la muestra en la mufla y calcinar a 550°C durante 1 h retirar y dejar enfriar hasta temperatura ambiente, se adiciona 3 gotas agua destilada y se vuelve a calcinar durante 5 h hasta cenizas blancas o grisáceas. Pre-enfriar en la mufla apagada (hasta ± 40°C) y luego traspasar al desecador y pesar a temperatura ambiente **(C2)**. Si el residuo al terminar la incineración es negro se debe de solubilizar con 2mL de agua destilada y volver a calcinar (AOAC, 2007).

Para calcular el porcentaje de cenizas (% p/p) se aplica la siguiente ecuación:

$$Porcentaje\ de\ Cenizas\ (\%C) = \frac{C_2 - C_0}{C_1}\ x\ 100 \qquad \text{Ec. 6}$$

Caracterización analítica

Las muestras de semillas cacao obtenidas por los tres tratamientos: fermentado y seco, crudos sin secar y crudos secos, fueron acondicionadas para la caracterización analítica con respecto al contenido de fenoles, alcaloides (cafeína y teobromina), monómeros de procianidinas (catequina y epicatequina) y antioxidantes.

Desengrasado: el primer acondicionamiento de las muestras consistió en llevar 100 mg de muestra a un tubo de reacción plástico de 2 mL con 1.5 mL de hexano y se llevaron a un baño ultrasonido por 10 min a 25 Hz de frecuencia, 99 % potencia. Luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 10 °C. El sobrenadante se separó en un

tubo de ensayo, se repitió el procedimiento cinco veces combinando los sobrenadantes. Posteriormente, se evaporó el solvente quedando como resultado la manteca de cacao. Se registraron los pesos obtenidos de manteca de cacao para asegurar que la extracción de la manteca de cacao coincidiera con el contenido de extracto etéreo cuantificado por Soxhlet (Carrillo et al., 2014).

Extracción: la segunda fase de acondicionamiento se realizó para obtener el extracto a partir del cacao desengrasado al cual le fue adicionado 1 mL de una solución de acetona / agua MilliQ / ácido acético (70/29,5/0,5, v/v/v). La mezcla se agitó en un Vortex durante un minuto y sometió a un baño ultrasonido 3 min, 25 Hz de frecuencia y 99 % potencia. Luego, se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min a 10 °C. El sobrenadante se almacenó en un frasco ámbar de 4 mL. El procedimiento anterior se repitió el una vez más y se combinaron los dos extractos (Ortega et al., 2010).

Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

La capacidad antioxidante fue determinada usando el método capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés). Para ello se midió la disminución en la fluorescencia de la fluoresceína como resultado del daño oxidativo causado por el AAPH como fuente de radicales peróxido (ROO)(Ou, Hampsch-Woodill et al. 2001). De esta manera se midió la capacidad de los antioxidantes presentes en las muestras para proteger la fluoresceína del daño oxidativo, midiendo la intensidad de fluorescencia en un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Para la curva de calibración se utilizó el análogo soluble en agua del tocoferol conocido como

Trolox en concentraciones de 5,10, 25, 50, 100, 150, 200 µM, en buffer de fosfato 10Mm a pH 7,4.

En una microplaca de 96 pozos (Costar, USA) se adicionaron en estricto orden fluoresceína, buffer fosfato (B), la dilución respectiva de Trolox (5,10, 25, 50, 100, 150, 200 µM) y la muestra previamente extraída se diluyó en un buffer fosfato en una relación 1/200. Se llevó el plato al lector de placas donde se incubó durante 30 min a 37 °C.

Pasado este tiempo se le adicionó a cada pozo la solución de AAPH y se procedió a la medición por triplicado de la intensidad de la fluorescencia cada 2 min durante 2 horas con una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente.

La protección del antioxidante se midió a partir del área de fluorescencia bajo la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, donde el antioxidante no está presente. La AUC se calculó mediante la siguiente expresión:

$$AUC = \left(0{,}5 + \left(\sum_{i=1}^{i=31} \frac{f_i}{f_1}\right)\right) xCT \qquad \text{Ec. (7)}$$

Dónde:

I = número de ciclos

F = unidades de fluorescencia

CT = tiempo de cada ciclo en minutos. En este caso, CT=2

El área neta bajo la curva (AUC neta) se encontró por diferencia entre el AUC de la muestra y el AUC del blanco. Esta AUC neta (y) se representó delante de la concentración de Trolox como patrón (X) obteniendo la recta de regresión lineal; a partir de aquí, se calcularon las moles equivalentes de Trolox (ET) por litro de muestra.

$$ORAC = \frac{ABC_{AH}}{ABC_{Trolox}} x \frac{[Trolox]}{[AH]} \quad \text{Ec. 8}$$

Dónde:

ABC AH: Área bajo la curva en presencia de antioxidante.

ABC Trolox: Área bajo la curva de Trolox.

[Trolox]: Concentración de Trolox.

[AH]: Concentración de Antioxidante

Contenido de fenoles

El contenido de fenoles totales fue determinado usando el reactivo de Folin-Ciocalteau y mediante la lectura de la absorbancia en un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico en concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL, preparados a partir de una solución madre de 1000 µg/mL de ácido gálico en agua destilada. Con las muestras previamente extraídas y diluidas en una relación 1/60, se procedió al ensayo espectrofotométrico utilizando una microplaca de poliestireno de 96 pozos (Costar, USA) agregando los reactivos en el siguiente orden: agua destilada, dilución respectiva de ácido gálico (10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL), cada muestra a las diluciones indicadas (Factor de dilución). A todos los pozos se les adicionó carbonato de sodio reactivo de Folin excepto al blanco (Agua destilada). La microplaca con las muestras, blanco y estándares se llevó al lector de placas a 25 °C durante 60 min. Se registró la absorbancia a 760 nm por triplicado (Kahkonen *et al*., 1999). La curva de calibración fue construida mediante la ecuación de regresión lineal y=mx+b. Los valores interpolados de x corresponden a la

concentración en µg/mL equivalentes de ácido gálico en la muestra. El modelo de cálculo para expresar los resultados cómo GAE (mg/g) o (mg/100mL) fue:

$$\text{GAE(mg/g seco)} = \frac{\left(\frac{\mu g}{ml}\text{ de la curva}\right)\left(\frac{1mg}{1000\ ug}\right)(\text{FactorDilución})(10ml)}{2\ \text{gramos}} \qquad \text{Ec. 9}$$

Los valores de GAE de los tres experimentos independientes se expresaron como la Media ± Desviación Estándar.

Alcaloides y monómeros de procianidinas

La determinación de alcaloides y monómeros de procianidinas se llevó a cabo con el método reportado por Ortega y Col (2010) con algunas modificaciones (Serra, Maci, Romero, Piol, & Motilva, 2011).

Los extractos de cacao de cada muestra se sometieron a una extracción específica mediante el uso de cartuchos antes de someterse al análisis cromatográfico. Los cartuchos Sep-pack C18 se acondicionaron con 1 mL de metanol y 1 mL de agua MiliQ. Posteriormente, se adicionaron 400 mL del extracto y se separaron los azucares con 1800 µL de agua MiliQ, los analitos de interés se eluyeron con 720 µL de una solución de acetona/agua MilliQ/ácido acético (70/29.5/0.5, v/v/v). A continuación se vertieron en viales de cromatografía 500 mL previamente filtrados por un cartucho de 0.22 µm junto con 200 mL de la fase móvil que consistió en una mezcla de agua al 0.1% de ácido fórmico y acetonitrilo, en una proporción de 95:5 respectivamente.

La separación de los compuestos se realizó en un equipo UPLC Acquity, Waters con una columna Acquity BEH C18 (2,1 mm de diámetro interno 100 mm, tamaño de partícula 1,8 mm) (Waters, Milford, MA, EE.UU.) y una fase binaria a una velocidad de

flujo de 0.2 mL/min. La fase móvil A es agua/ácido fórmico (95/5, v/v) y B es acetonitrilo. El gradiente de elución a 30 °C es: 0-0.5 min, 95:5 (A:B); 0.5 a 3.0 min, 80:20 (A:B); 3.0 a 3.1 min, 95:5 (A:B).

Las condiciones de detección MS/MS se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas de triple cuadrúpolo detector (TQD) (Waters, Milford, MA, EE.UU.), utilizando una ionización por *Electrospray* (ESI) fuente Z-spray^{TM}. Para todos los patrones y las muestras, la detección se realizó en modo positivo. Las transiciones fueron evaluadas por el monitoreo de reacción seleccionada (SRM) de las siglas en inglés *Selected Reaction Monitoring* (Tabla 15). Las condiciones de trabajo de la fuente de ionización fueron los siguientes: tensión capilar, 3 kV; temperatura de la fuente 150 °C; tasa de flujo de gas del cono 80 L/h y el gas de desolvatación velocidad de flujo 800 L/h; temperatura de desolvatación, 400 °C. El nitrógeno (> 99% de pureza) y argón (99% de pureza) se utilizaron los nebulizadores y los gases de colisión, respectivamente. Las tensiones y energías de colisión (Ortega et al., 2010)

Tabla 15. Condiciones óptimas de SRM para el análisis de alcaloides y monómeros de procianidinas

COMPUESTO	SRM 1 (cuantificación)	Voltaje del cono	Energía de colisión	SRM 2 (confirmación)	SRM 3 (confirmación)	Voltaje del cono	Energía de colisión
Catequina	290.983>138.924	45	10	290.983>122,923	290.983>167,938	45	15
Epicatequina	290.983>138.924	45	10	290.983>122,923	290.983>164.939	45	15
Cafeína	194.985>137.97	45	15	194.985>41.879	194.985>109,929	45	20
Teobromina	180.905>162.922	45	15	180.905>66.917	180.905>107,573	45	10
Teofilina	180.841>123.898	45	15	180.841>68.87	180.841>95,865	45	10

Diseño de Experimentos

Las diferencias entre las variedades de los materiales vegetales estudiados (Criollos modernos y Trinitarios) evaluados según las pruebas bromatológicas: proteína, fibra, humedad, cenizas y extracto etéreo. Físicas: color y pH. Químicas: antocianinas, contenido de alcaloides (relación de teobromina/cafeína), monómeros de procianidinas (epicatequina y catequina), polifenoles y capacidad antioxidante (ORAC), se analizaron a través de un esquema aleatorio de bloques al azar (DBA) y un modelo factorial por un Análisis de Varianza (ANAVA) de una sola vía y comparación final en la etapa de secado con una prueba Tukey al 95% de nivel de confianza ($p < 0.05$).

Para la evaluación de los efectos entre los tratamientos durante el secado se siguió el modelo descrito en la Ecuación 10:

$$X_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}, \qquad i = 1,2,\dots,k; j = 1,2,\dots,r \qquad \text{Ec. 10}$$

Donde:

X_{ij}: $la\ j-$ésima $repetición\ del\ i-$ésimo $tratamiento$,
μ: $media\ general\ de\ la\ población$
τ_i: $efecto\ del\ i-$ésimo $tratamiento$ $(\mu_i - \mu)$
β_j: $efecto\ del\ j-$ésimo $bloque$
ε_{ij}: desviación de la j − ésima repetición del i − ésimo tratamiento respecto a la media, μ_i, del i − ésimo tratamiento

Todos los análisis se realizaron con el software estadístico R Studio (Versión 0.98.1103 GNU Affero General de licencias públicas) (MONTGOMERY, Peck, & Vining, 2012).

Resultados y análisis

Análisis físicos de las mazorcas

Para la selección de los clones utilizados en el estudio se fijaron varias características importantes. El clon Maceo 14 “Criollo moderno” fue elegido ya que ha tenido un comportamiento positivo en las etapas de beneficio, presenta buenos rendimientos y no se tienen reportes acerca de su composición química, mientras que el clon San Vicente 155 se encuentra bajo la misma variedad que Maceo 14 pero de este si se tienen reportes lo que ofrece un punto de comparación para determinar las cualidades promisorias del clon Maceo 14.

Los clones IMC 67 y CAU 39 se escogieron ya que de estos se tiene un gran número de reportes y que sirven como puntos de comparación para verificar la efectividad de los métodos propuestos por la presente investigación, además el clon IMC 67 es el escogido para realizar el patronaje del proyecto “fomento al cultivo de cacaos especiales en Antioquia “del cual se deriva el presente estudio.

Caracterización física de las mazorcas utilizadas en el estudio

En la Figura 9 se describe la clasificación del material vegetal estudiado, de acuerdo a su forma, rigurosidad, profundidad de los surcos, ápice y base del fruto.

Figura 9. Clasificación del material vegetal estudiado, de acuerdo a su forma, rigurosidad, profundidad de los surcos, ápice y base del fruto.

CLASIFICACION	FOTOGRAFIA DE LA MAZORCA	FOTOGRAFIA DEL POLVO DE CACAO
Forma: Eliptico Rigurosidad del fruto: Fruto La profundidad de los surcos : Intermedio Ápice : Dentado Base del fruto : Ausente		
Forma : Ovado Rigurosidad del fruto : Intermedia La profundidad de los surcos : Intermedio Ápice : Atenuado Base del fruto : Ausente		
Forma : Ovado Rigurosidad del fruto : Intermedia La profundidad de los surcos : Intermedio Ápice : Atenuado Base del fruto : Intermedio		
Forma : Ovado Rigurosidad del fruto : Intermedia La profundidad de los surcos : Intermedio Ápice : Apezonado Base del fruto: Intermedio		

Forma : Eliptico Rigurosidad del fruto : Ligera La profundidad de los surcos : Superficial Ápice : Atenuado Base del fruto : Ausente		
Forma: Orbicular Rigurosidad del fruto : Ligera La profundidad de los surcos : Superficial Ápice : Dentado Base del fruto : Ausente		

Parámetros de calidad de fermentación

Índice de fermentación

En las etapas de beneficio del cacao se realizan mezclas de los diferentes clones existentes en la fincas productoras, estás mezclas en la mayoría de los casos son de cacaos Trinitarios y Forasteros, y en una proporción más baja de cacaos Criollos El peso de 100 granos de cacao es uno de los principales indicadores acerca de la efectiva fermentación del grano, de este depende los valores de compra y venta de cacao, como se puede apreciar en la Tabla 16, las normas que rigen la calidad del cacao en los diferentes países estipulan una denominación, según el peso de 100 granos, para los clones evaluados en el presente estudio se debe hacer hincapié en la designación que reciben los clones de la variedad Criollo los cuales se encuentran en las categorías más altas según las tres normas revisadas , en contraste los clones de la

variedad Forastero se sitúan en niveles inferiores de esta clasificación. Esta es una de las principales razones por las cuales el cultivo de cacaos Criollos es relevante en la calidad del producto final.

Tabla 16. Peso de 100 granos de cacao, y su clasificación según 3 normas técnicas (Colombia, Venezuela, Ecuador)

ITEM	PESO DE 100 GRANOS DE CACAOS SECOS Y FERMENTADOS	NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 176:2006	NORMA ICONTEC 1252 CACAO 2003	NORMA VENEZOLANA : COVEVIN 50:1995
San Vicente pendiente	164,95	Summer plantación selecta	Premio	Extra fino
San Vicente plano	145,45	Summer plantación selecta	Premio	Extra fino
Maceo pendiente	171,00	Summer plantación selecta	Premio	Extra fino
Maceo plano	164,29	Summer plantación selecta	Premio	Extra fino
IMC 67 plano	138,81	Summer plantación selecta	Premio	Extra fino
IMC 67 pendiente	101,00	No reporta	Pasilla	Fino de segunda
Caucasia plano	98,00	no reporta	Pasilla	no reporta
Caucasia pendiente	102,00	arriba superior época	Pasilla	fino de segunda

Según lo reportado por ATLAS DE CACAO en 2006 en un estudio que se realizó a cacao ecuatoriano y cacao proveniente de África, se reportó que el cacao del complejo Nacional Trinitario exportados a Europa tuvo un peso mucho mayor que el cacao de Ghana y Costa de Marfil, aunque la producción de África represente un 70 % de la exportación a nivel mundial, este cacao está clasificado como común y es el de menor calidad.

Antocianinas

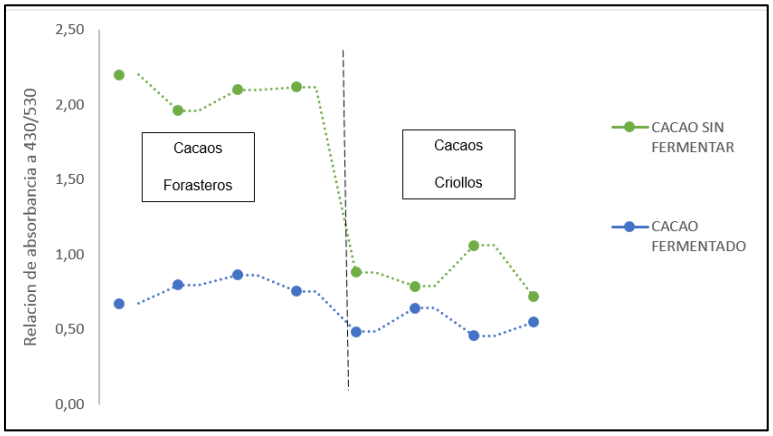
La coloración del cacao según la variedad es responsabilidad de diversos compuestos químicos presentes, entre dichos compuestos se encuentran el grupo de las antocianinas, una de las pruebas que se realiza para verificar el debido proceso de fermentación es el contenido de las mismas, ya que son compuestos que participan

activamente en las modificaciones bioquímicas en el interior de las almendras durante la fermentación. Una de ellas, la oxidación enzimática, causada por la oxidación y la disminución del contenido de polifenoles, a través de la hidrólisis de las antocianinas y la polimerización de los monómeros y oligómeros de flavonoles, transformándolos en compuestos insolubles (Calderón, 2002; Amores et al, 2007).

Como resultado disminuye la astringencia y el amargor, influyendo positivamente sobre la calidad sensorial del cacao, en las almendras violetas, este fenómeno es incompleto o no se ha producido, por lo que la intensidad de amargor y astringencia se encuentra asociada a una mayor concentración final de flavonoides (polifenoles y antocianinas). Si la fermentación es bien llevada, la concentración de flavonoides reducirá significativamente (Calderón, 2002; Amores et al, 2007).

El comportamiento expuesto anteriormente se ve reflejado en la Figura 10 como también se puede apreciar como decrece el contenido de antocianinas en el sector de cacaos Criollos lo que concuerda con un estudio realizado por Elwers en 2009 donde determinó que hay un contenido muy bajo casi nulo de antocianinas en los granos de cacao Criollo, registrando un contenido más alto en variedades de Trinitario y Forastero (Elwers, Zambrano, Rohsius, & Lieberei, 2009).

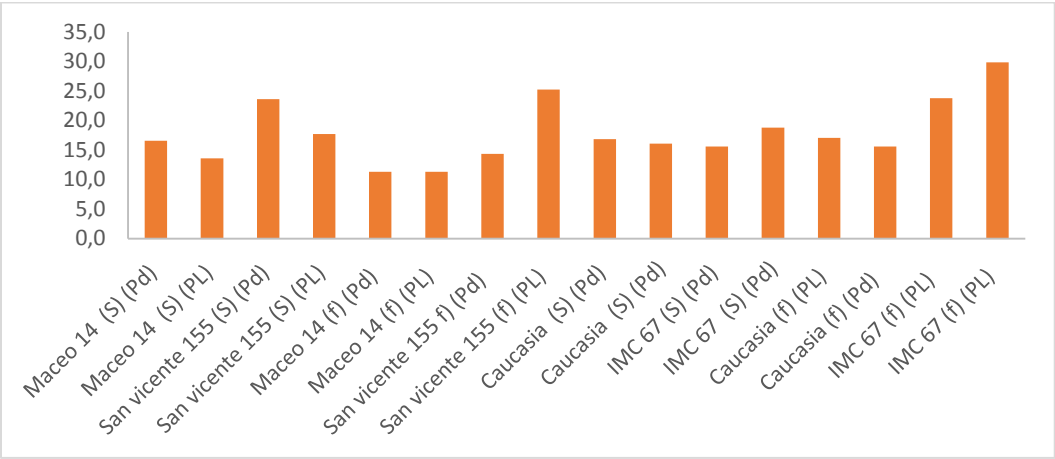
Figura 10. Diferencias entre las relación de absorbancias 530/460 para cacaos Criollos y Trinitarios



Color

Con respecto al color del cacao desengrasado se puede observar por los cambios en las coordenadas a*, b* y la escala de luminosidad L*, que el matiz que estaba en la región del “rojo” no tuvo mayor variación, pero al evaluar el cambio el ∆b* si existe un aumento hacia el amarillo más marcado, además el aumento en la luminosidad hace que la muestra desengrasada sea más clara como se observa en la Figura 11.

Figura 11. Resultados de índice de color IC (variable respuesta), en los cuatro clones evaluados después del secado con o sin fermentación

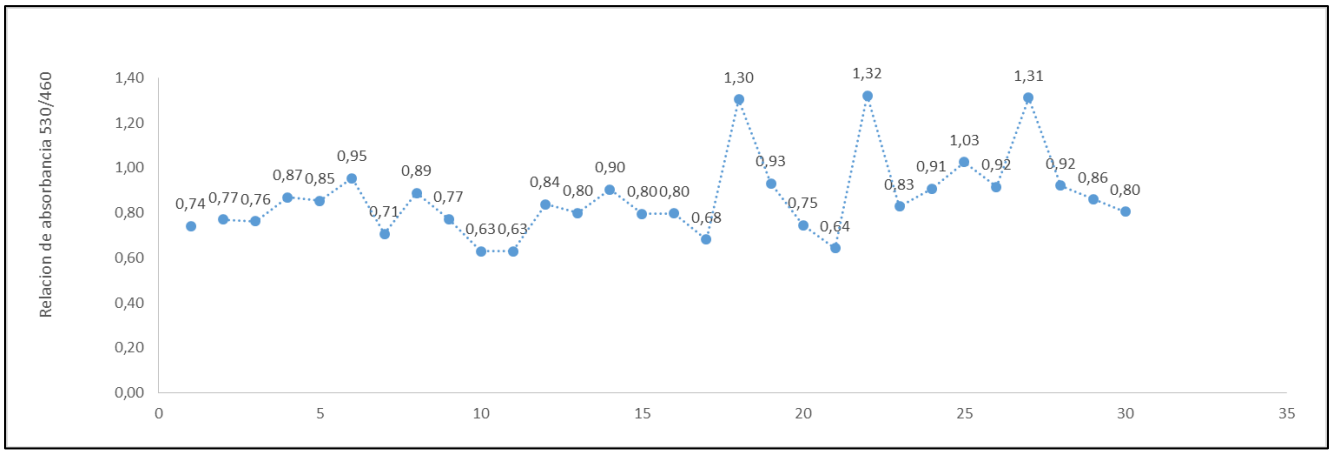


Pd: terreno pendiente; PL: terreno plano; S: cacao sin fermentar y seco; F: cacao fermentado y seco

Como se puede observar las muestras que se encuentran dentro del rango de IC* (+2 a +20) corresponde a un color entre amarillo pálido y naranja intenso y solo los materiales de San Vicente 155 fermentado y proveniente de terreno plano y en pendiente, así como el IMC 67 obtenido de terreno plano presentaron un color más intenso y por esta razón se ubican en el rango de IC* (+20 a +40): naranja intenso al rojo profundo.

En el municipio de Maceo, Antioquia fueron recolectadas 30 muestras de granos de cacao en centro de venta local, se solicitud al productor seleccionar 100 granos de cacao de su cosecha que para su conocimiento y experiencia estuvieran bien fermentados, a dichas muestras se les midió el contenido de antocianinas como se describe en la Figura 12, lo que se espera es que los valores fueran inferiores a uno < 1.

Figura 12. Relación de absorbancias a 530/460, para cacaos fermentados



De las 30 muestras seleccionadas el 86.67 % estuvo por debajo de 1, este fenómeno se puede asociar a 2 situaciones, la primera es que el cacao se encuentra

bien fermentado y en consecuencia se redujo el contenido de antocianinas, y la segunda es que la cantidad de cacao Criollo estuviera en una cantidad mayor, cualquier que fuera la explicación da como resultado un producto con la calidad exigida por el mercado.

Acidez y pH

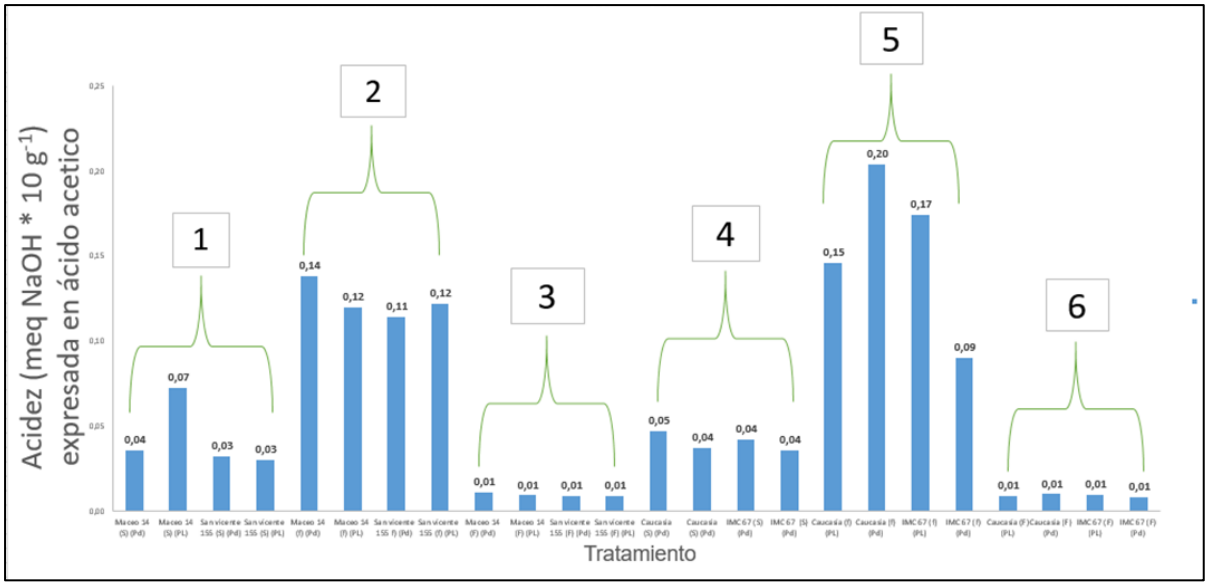
La acidez en una de las pruebas más importantes para determinar la calidad del grano debido a su proceso de fermentación, de esto paramento también dependen muchas de las características organolépticas del grano lo cual hace variar su designación (cacao fino y de aroma, cacao común) y en consecuencia modificar su precio en el mercado.

En las Figuras 13 y 14 se detallan los resultados obtenidos, se puede apreciar cómo varia la acidez y el pH en las diferentes etapas del proceso, esto se debe a ciertos parámetros químicos de la fermentación que explican las variaciones de pH y acidez de la pulpa durante la fermentación esto se atribuye al metabolismo del ácido cítrico por acción de las levaduras anaeróbicas, ya que el etanol formado es oxidado a ácido acético (bacterias acéticas) el cual migra hacia los cotiledones. Con respecto a los taninos existe una disminución lenta del contenido durante las primeras 48 horas de fermentación, obteniéndose una reducción del 4,5 al 7,5% de taninos totales durante la fermentación (Portillo, Graziani De Farinas, & Betancourt, 2007).

Con respecto a la variación entre el cacao crudo y el cacao seco sin fermentar este fenómeno ocurre debido a que en el transcurso del proceso de secado, la testa de la semilla de cacao se hace cada vez más compacta, evitando de esta manera, la pérdida

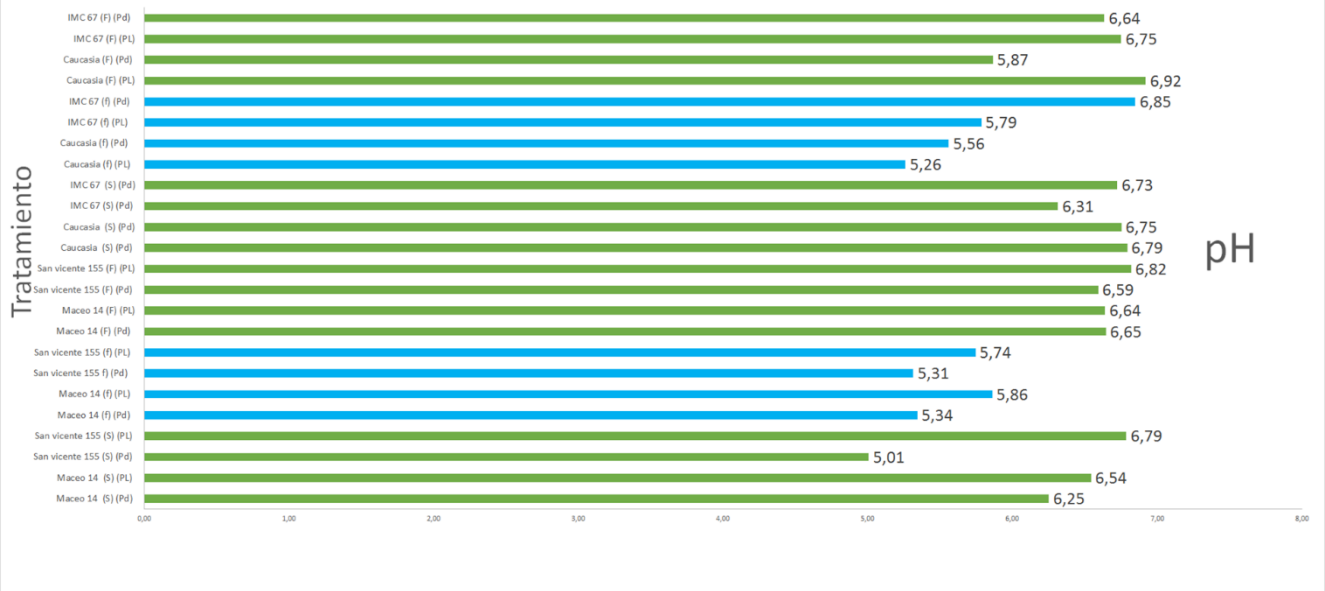
de ácidos hacia el exterior, lo que hace que dichos ácidos se concentren en los cotiledones. (Alexis Zambrano, Álvaro Gómez, Gladys Ramos, Carlos Romero, 2010)

Figura 13. Acidez de 4 clones de cacaos cultivados en Maceo, Antioquia en las diferentes etapas del beneficio. 1)Cacaos Criollos seco sin fermentar 2) cacaos Criollos fermentados 3) cacaos Criollos crudos 4) cacaos Forasteros seco sin fermentar 5) cacaos Criollos fermentados 6) cacaos crudos sin fermentar.



Pd: terreno pendiente; PL: terreno plano; S: cacao sin fermentar y seco; F: cacao fermentado y seco

Figura 14. *Valores de pH de cuatro clones de cacaos cultivados en Maceo, Antioquia en las diferentes etapas del beneficio*



Entre las pruebas más básicas cuantitativas para determinar la calidad de los procesos de fermentación y secado son la acidez y el pH. En el caso del cacao fermentado y seco evaluado, los resultados de pH lo ubican entre 5.2 y 5.4, valor que se encuentra reportado por Portillo et al (2007) como un cacao con potencial aromático por estar entre el rango de 5.0-5.5, de igual forma se encuentra clasificado como un cacao bien fermentado y seco (rango de pH entre 4.8 y 5.5) valores que concuerdan con resultados de acidez que encajan en el rango recomendado entre 0.1 y 0.2 meq $NaOH/10g^{-1}$ (Portillo E, Graziani L, 2007)(Guehi, S., Irie, G., Zahouli, B., Fae, A., Ban-Koffi , L. and Nemlin, 2010). Los clones de cacao fermentados y secos estuvieron dentro del rango, excepto para el IMC 67 sembrado en pendiente que al tener valores por encima es un indicador de sobre fermentación.

Análisis bromatológico

Alrededor del mundo existe un gran número de publicaciones que se resumen en normas nacionales, estándares reportados por organizaciones internacionales de referencia en este sector productivo, producciones bibliográficas indexadas, así como informes expuestos en congresos de carácter internacional, la mayoría de ellos en los que se detallan los métodos mediantes los cuales se establecen parámetros como: contenido de extracto etéreo, proteína, fibra, cenizas, lo que conlleva a herramientas de primera mano para clasificar el cacao en categorías de alta, mediana o baja calidad, aspectos genotípicos con miras a identificar materiales promisorios o lograr determinar si las etapas de beneficio fueron ejecutadas con éxito.

Entre los métodos reportados, existen algunas coincidencias en las condiciones de operación, pero sin llegar a metodologías que puedan ser adoptadas en su totalidad, ya sea por su falta de reproducibilidad, pocos detalles sobre los parámetros aplicados, así como la heterogeneidad de resultados, lo cual hace que para el establecimiento de métodos estandarizados en cada centro de investigación o productivo deban adaptar y basarse en procedimientos validados con un fuerte soporte estadístico para generar confianza en los resultados.

Existen algunas de propiedades críticas en la caracterización del cacao fresco, fermentado o seco, entre ellas el contenido de grasa o extracto etéreo

El contenido de extracto etéreo es un parámetro que se caracteriza por ser determinante debido a que representa un porcentaje superior al 50 % en la mayoría de los materiales, lo que implica un valor económico representativo para la industria en la obtención de un subproducto de amplia aplicación como es la manteca de cacao,

también ha sido empleado el valor de este porcentaje como un indicador para distinguir entre materiales vegetales, así un cacao Criollo se caracteriza por tener mayor cantidad que el Forastero o Trinitario. Finalmente, el extracto etéreo puede ser considerado como un interferente para pruebas de caracterización posterior como la cuantificación de polifenoles, acrilamida, entre otros.

A partir del solvente seleccionado se realizó la extracción hasta agotar la muestra de forma que no se obtuviera más de 1 % en la última etapa de extracción y se llegó a un proceso de extracción de 18 h en cuatro baches de 3 h de extracción, 1 h de lavado y 30 min de recuperación de solvente. Los resultados 54,58 ± 0,02 % fueron superiores a los reportados por los métodos que se tomaron como referencia, así Ramírez-Sánchez, *et al* (2010) obtuvieron 49 %, Hu et al (2016) reportaron 45,6 % y el máximo porcentaje reportado fue 50,0 % por Dankyi et al, (2015), debido posiblemente a la condición de garantizar la obtención de una cantidad inferior al 1 % de extracto etéreo y las diferencias de orígenes, materiales vegetales y tratamientos en los procesos de poscosecha.

Para el análisis del contenido de cenizas en cacao se siguió el procedimiento descrito en AOAC 972.15 (2012) se sometió a 550 °C la muestra de cacao, pasado este tiempo se observó que el material presentaba una coloración negra, siguiendo las indicaciones de la norma introdujo nuevamente en la mufla por 3 horas más y pasado este tiempo la muestra de cacao continuaba presentando el mismo comportamiento, se repitió este proceso por 6 horas, terminado este tiempo se determinó que el momento en el cual se debe detener el proceso es cuando la diferencia de peso entre varios pesos consecutivos es de menor de 1 mg.

Luego de realizar los experimentos necesarios para definir los protocolos para el análisis de cacao, se ejecutaron los mismos en dos variedades diferentes de cacao (ver en el apartado de metodología: Descripción del material vegetal), con cuatro momentos. El primero fue determinar si los parámetros bromatológicos son una referencia para la clasificación de cacao Criollo y cacao Forastero, en segundo lugar suministrar información sobre clones de los que no se tenían reportes como MACEO 14, un tercer momento fue comparar los resultados obtenidos con las investigaciones previas de clones ya estudiados para confirmar la efectividad de los métodos, por ultimo determinar si el proceso de fermentación influye en la calidad bromatológica del cacao.

En la Tabla 17, se presentan el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos de los dos clones MACEO 14, SAN VICENTE 155 ubicados en la variedad de Criollos modernos, Aide Villamir en el año 2013 obtuvo valores de extracto etéreo para San Vicente 155 correspondientes 58.1%, para proteínas 12.5, para fibra 5.5, además según el informe reportado por Nubia Martínez en el año 2015 el porcentaje del extracto etéreo del mismo clon se encuentra en el rango de (56,7 -59,8), como se puede apreciar los valores obtenidos se localizan en estos rangos.

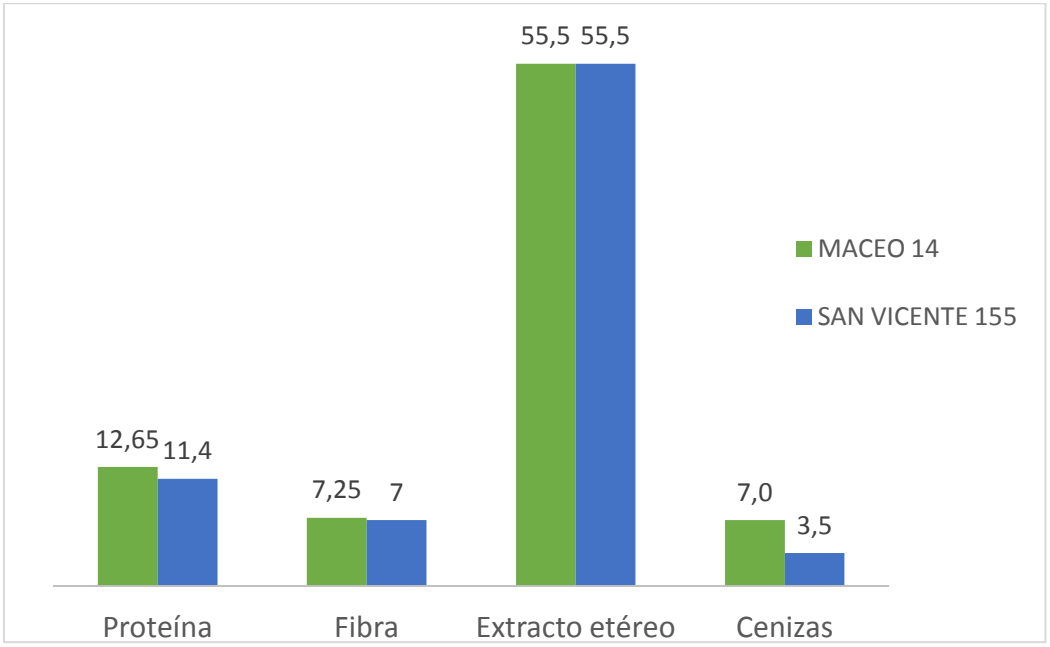
Tabla 17. Resultados de análisis bromatológicos de cacaos de Maceo, Antioquia

Variedad	Clon	Terreno	Proteína	Fibra	Extracto etéreo	Cenizas	Humedad
			Fermentado y seco	Fermentado y seco	Fermentado y seco	Fermentado y seco	Fermentado y seco
Criollo	Maceo 14	Plano	12,5 ± 0,152	12,5 ± 0,297	54% ± 0,00	7% ± 0,0317	5% ± 0,00117
		Pendiente	12,8 ± 0,00	12,8 ± 1,19	57% ± 0,013	7% ± 0,008	5% ±0,0001
	San Vicente 155	Plano	11,3 ± 0,08	11,3 ± 0,63	55% ± 0,004	3% ± 0,011	10% ± 0,00013
		Pendiente	11,5 ± 0,46	11,5 ± 0,49	58% ± 0,012	4% ± 0,0167	7% ± 0,000

El clon San Vicente 155 es proveniente del departamento del Santander, mientras que el clon Maceo 14 es originario del municipio de Maceo, Antioquia, este último es

relativamente nuevo, y se obtuvo de los cruces realizados por los agricultores con el objetivo de mejorar en términos de rendimiento y calidad organoléptica del grano, se puede observar en la Figura 15, que el contenido de grasa de los dos clones es igual, mientras el porcentaje de cenizas, fibra y proteínas es mayor para el clon Maceo 14 . Estos resultados reflejan un primer acercamiento para conocer la composición química del clon Maceo 14, a partir de esto aprovechar su potencial en la consolidación de cacaos finos y de aroma en el Departamento de Antioquia.

Figura 15. Comparación de dos clones de las variedades “Criollos modernos “en términos de sus características bromatológicas



Los clones correspondientes a la variedad Forastero fueron CAUCASIA 39 e IMC 67, estos han sido estudiados y se conocen los paramentos bromatológicos de los mismos, es por esto que es importante comparar dichos valores con los obtenidos en la presente investigación con el fin de acreditar las metodologías de análisis propuestas.

Tabla 18. Resultados bromatológicos de las dos clones de cacaos Forasteros

RESULTADOS SEGÚN :	Caucasia 39			IMC 67		
	Proteína	Fibra	Extracto etéreo	Proteína	Fibra	Extracto etéreo
Trabajo de investigacion presente	14,2	9,65	53%	13	8,2	55%
El beneficio y las caracteristicas fisicoquimicas del cacao	16,13	2,92	55,53	13,38	2	55,89
Caracterizacion fisicoquimica y beneficio del grano de cacao en Colombia 2005	11,94	7,48	51,3	12,81	8,34	57,64
	No reporta	No reporta	No reporta	No reporta	No reporta	55,9
	No reporta	No reporta	No reporta	13,25	3,53	55,5
Carasteristicas de calidad del cacao de Colombia , catalogo de 26 cultivares 2013	12,3	3,1	59,7	13,1	4,3	58,8

Como se puede apreciar en la Tabla 18 los resultados obtenidos en la presente investigación comparados con los informes presentados por la Federación Nacional de Cacaoteros en 2004, 2005 (Fedecacao, 2005) (Fedecacao, 2004) son similares, lo que sugiere que los métodos utilizados para llegar a dichos resultados fueron efectivos y pueden ser propuestos como metodologías oficiales en al análisis de cacao.

Aunque puede existir variaciones en estos parámetros como se puede observar en el contenido de fibra, esto se puede atribuir a el cambio que cada clon puede tener dependiendo de la zona donde ha sido cultivado tomando en cuenta las diferencias geofísicas que pueden afectar la calidad del grano.

Por último se presenta la Tabla 19, la cual resume los resultados obtenidos, en esta están incluidos los resultados de los análisis a cacaos secos sin fermentar, es muy importante conocer si el proceso de fermentación tiene algún impacto en los valores, ya que no todos los cacaos que se llevan a estudio son sometidos y dicho proceso de beneficio, y la intención es suministrar información que permita hacer una comparación a otros investigadores, además de esto, hay que tener certeza que los análisis

bromatológicos derivan propiamente del grano y no del manejo que se haya realizado con este en la etapa de la poscosecha, ya que dichos procedimientos son variables dependiendo del productor.

Tabla 19. Cuadro resumen de los análisis realizados a 4 clones de cacao, seco fermentado y sin fermentar

Variedad	Clon	Terreno	Proteína		Fibra		Extracto etéreo		Cenizas		Humedad	
			Sin fermentar y seco	Fermentado y seco	Sin fermentar y seco	Fermentado y seco	Sin fermentar y seco	Fermentado y seco	Sin fermentar y seco	Fermentado y seco	Sin fermentar y seco	Fermentado y seco
Criollo	Maceo 14	Plano	13 ± 0,54	12,5 ± 0,152	9 ± 0,62	7,1 ± 0,297	54% ± 0,01	54% ± 0,00	5% ± 0,01609	7% ± 0,0317	>7%	5% ± 0,00117
		Pendiente	13 ± 0,418	12,8 ± 0,00	12 ± 1,143	7,4 ± 1,19	56% ± 0,039	57% ± 0,013	6% ± 0,006	7% ± 0,008	>7%	5% ±0,0001
	San Vicente 155	Plano	13,3 ± 3,875	11,3 ± 0,08	10 ± 0,833	7,4 ± 0,63	52% ± 0,038	55% ± 0,004	7% ± 0,023	3% ± 0,011	>7%	10% ± 0,00013
		Pendiente	12,1 ± 0,63	11,5 ± 0,46	5,1 ± 1,02	6,6 ± 0,49	55% ± 0,018	58% ± 0,012	5% ± 0,005	4% ± 0,0167	>7%	7% ± 0,000
Forastero	IMC 67	Plano	13 ± 0,02	13,6 ± 0,75	7,9 ± 2,209	9,5± 0,199	55% ± 0,02	53% ± 0,0262	7% ± 0,001	3% ± 0,00027	>7%	5% ± 0,0017
		Pendiente	13 ± 0,243	12,4 ± 0,32	9,5 ± 0,675	6,9 ± 0,28	53% ± 0,013	57% ± 0,00	5% ± 0,001	5% ± 0,0009	>7%	5% ± 0,0006
	CAUCASIA 37	Plano	13,3 ± 0,163	14,3 ± 0,62	11,6 ± 1,30	10,9 ± 0,14	57% ± 0,05	55% ± 0,039	9% ± 0,004	4% ± 0,0006	>7%	5% ±0,000
		Pendiente	12,1 ± 0,22	14,1± 0,587	11,4 ± 2,50	8,4 ± 0,85	55% ± 0,018	51% ± 0,00	7% ±0,003	6% ± 0,003	>7%	5% ±0,0015

Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, contenido de fenoles, concentración de monómeros de procianidinas en cacao

Para los análisis de la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles, y la concentración de monómeros de procianidinas en cacao (Epicatequina y Catequina) se eliminó el contenido de grasa de la muestra utilizando una metodología distinta a la requerida para calcular el contenido de extracto etéreo ya que existen desventajas en la extracción con hexano en Soxhlet las cuales incluyen la toxicidad del solvente, grandes cantidades de solvente para extracción, imposibilidad para agitar la mezcla de extracción mientras se da dicho proceso, y más importante aún, tiempos de extracción extendidos y la posibilidad de descomposición térmica de los compuestos presentes en la muestra, dado que el proceso de extracción usualmente se da en el punto de ebullición del solvente (Wang & Weller, 2006).

Debido a lo anterior se evaluó la utilización de la técnica ultrasonido la cual tiene gran importancia en los procesos de extracción cuando el analito es termosensible como es el caso de algunos antioxidante y vitaminas; la efectividad de esta metodología radica en los eventos que ocurren cuando la burbuja colapsa; en algún punto, la búrbuja no puede absorber eficientemente la energía del ultrasonido, por lo que implosiona y se genera una rápida compresión adiabática de gases, produciendo temperaturas y presiones extremas, pero debido al tamaño tan pequeño de las burbujas en comparación con el volumen total del líquido, no hay cambios drásticos en las condiciones ambientales del mismo. Cuando ocurre el proceso de implosión en presencia de una estructura sólida como el material vegetal, el líquido se expande a altas velocidades ocasionando fuertes impactos sobre la superficie sólida (Luque-García & Luque De Castro, 2003), esto incrementa la penetración del solvente en la superficie.

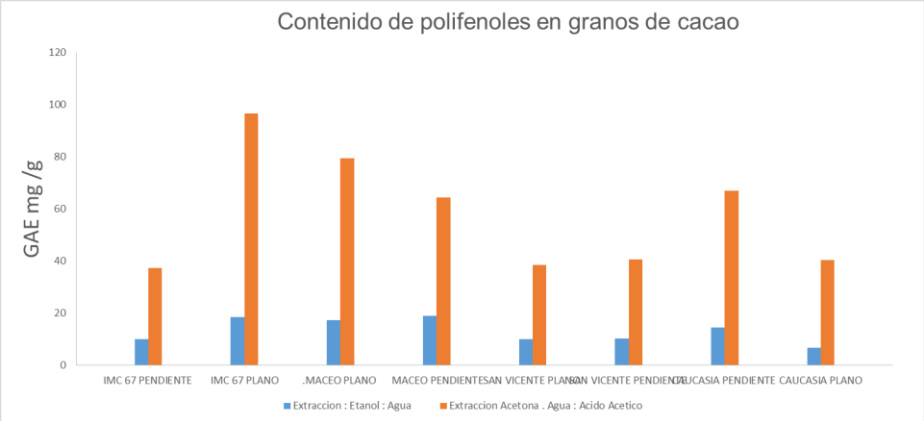
En la Tabla 20 se presentan el porcentaje de grasa extraído por ultrasonido obteniendo en el 93.75 % de los casos un porcentaje superior al 50%,Gil Quintero, 2012 realizó un estudio para determinar la influencia del desengrasado en los valores de cuantificación del contenido de sustancias bioactivas, dicho estudio revelo que no existen diferencias entre el cacao desengrasado y no desengrasado, pero se debe hacer énfasis en la sensibilidad y resolución de la técnica cromatografía utilizada en el presente estudio (HPLC MS/MS) y en la influencia que pueden tener interferentes en la resolución de los picos, dicho esto es indispensable tener un cacao desengrasado para realizar la cuantificación de estas sustancias.

Tabla 20. Porcentaje de grasa extraído por el método de ultrasonido en cacaos fermentados y no fermentados

Ítem	GRANOS DE CACAO SIN FERMENTAR		GRANOS DE CACAO FERMENTADO	
	Porcentaje de extracto etéreo	Porcentaje de cacao desengrasado	Porcentaje de extracto etéreo	Porcentaje de cacao desengrasado
CAUCASIA PLANO	52%	62%	48%	62%
CAUCASIA PENDIENTE	51%	62%	52%	63%
SAN VICENTE PLANO	55%	57%	51%	64%
SAN VICENTE PENDIENTE	56%	58%	53%	65%
MACEO PENDIENTE	56%	57%	55%	61%
MACEO PLANO	56%	57%	55%	60%
IMC 67 PENDIENTE	59%	55%	53%	62%
IMC 67 PENDIENTE	59%	55%	54%	60%

Para el proceso de extracción de las sustancias de interés se evaluaron dos combinaciones diferentes de solventes la primera fue una mezcla de Etanol: Agua 70:30 respectivamente y la segunda Acetona: Agua Milli-Q: ácido acético (70:29.5:05) respectivamente, obteniéndose resultados en el contenido de polifenoles superiores utilizando la segunda mezcla como se puede apreciar en la Figura 16, este comportamiento fue similar a lo reportado por (Wollgast, 2000) donde describe la poca eficiencia de la primera mezcla.

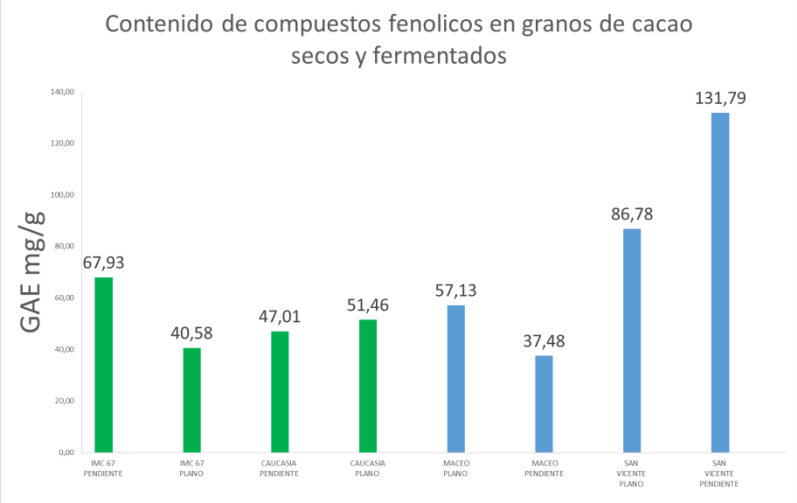
Figura 16. Contenido de polifenoles en granos de cacaos con 2 diferentes metodologías de extracción



Luego de la estandarización del solvente de extracción se condujo con determinar el contenido de compuestos fenólicos de cacaos fermentados y secos de los cuatro clones propuestos como se detalla en la Figura 17. Estos valores son similares a los reportados Villamizar en el 2013 donde describe que el rango en el contenido de polifenoles es de 47.63 -55.65 mg / g para los clones IMC 67, FSV 155, CAU 39, así mismo Aranzazu en el 2015 reporta un contenido de 52 mgAG/g IMC 67, 54 mgAG/g FSV 155, 54 mgAG/g CAU 39 .

Zambrano en 2010 realizó un estudio en el que reporta valores para dos diferentes variedades de cacao para la variedad de Criollo el valor es de 53.23 mg Ag / g así mismo para la variedad de cacaos Forasteros es de 53.64 mg Ag / g.

Figura 17. Compuestos fenólicos en cacaos fermentados



Dadas las diferencias de coloración entre los cacaos Criollos y Forasteros y conociendo que los polifenoles son responsables del color del grano se sugiere que la determinación del contenido de polifenoles es una herramienta para determinar la variedad del grano en estudio, dicho esto los datos fueron sometidos a un análisis estadísticos en el programa R Studio (Versión 0.98.1103 GNU Affero General de licencias públicas).

En relación a los datos obtenidos en la Figura 18 frente a la capacidad de absorción de radicales de oxígeno en las muestras evaluadas se puede observar que los datos son superiores a los reportado en la base de datos desarrollada en Estados Unidos, por el servicio de investigación en agricultura, del laboratorio de nutrientes perteneciente al Departamento de Agricultura, está reportado que el valor ORAC para el cacao, y el polvo de cacao seco es 55653 µmol TE/ 100 g, situándose en el vigésimo lugar de los alimentos con mayor actividad antioxidante, dentro de una recopilación de valores ORAC para 326 alimentos (Haytowitz & Bhagwat, 2010)

Estos valores también son superiores a los suministrados por Martínez en 2015 en que se encuentran valores de 1340.9 IMC 67 µM trolox / g, 1314.40 µM trolox CAU 39, 1322. 5 µM trolox FSA 155,

Dichos valores son por el contrario menores a los reportados por Carrillo en 2013 donde el reporte más bajo es de 38729 µM trolox / 100 g para muestras de cacao liofilizadas sin fermentar, es impórtate entonces destacar la influencia que tiene los procesos de beneficio en los granos de cacao.

Figura 18. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno en muestras de cacao fermentado

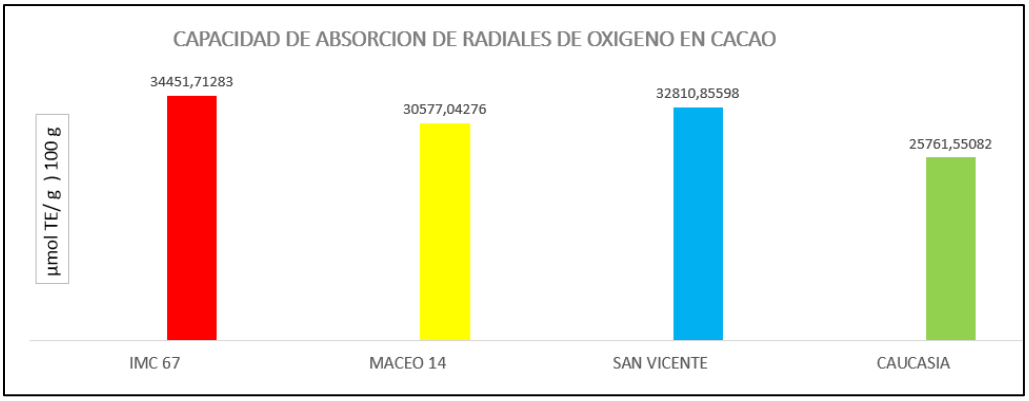
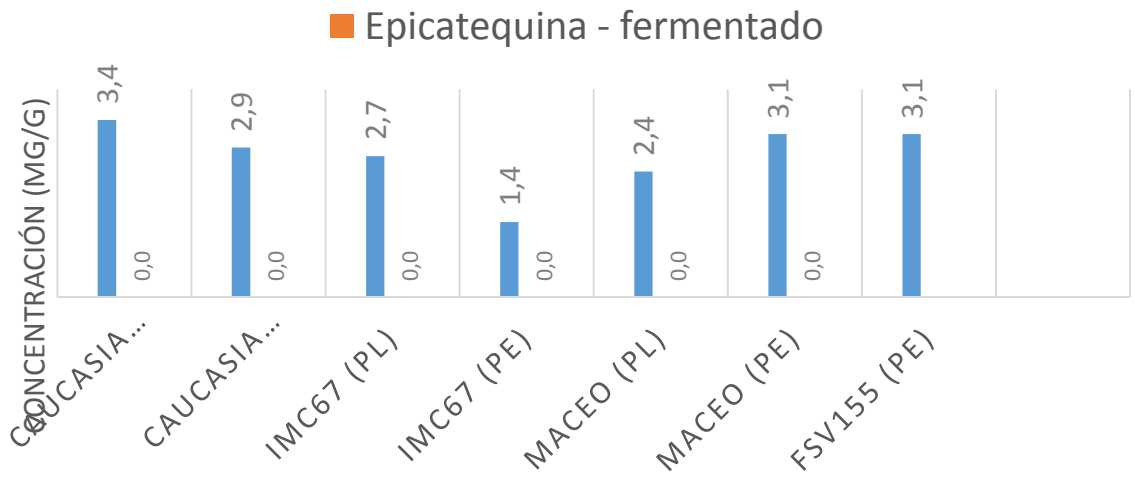


Figura 19: contenido de epicatequina en material vegetal



Dada la importancia que han tenido las sustancias responsables de la actividad antioxidante en alimentos, es significativo realizar un análisis más detallado, para esto se debe contar con herramientas que produzcan datos más selectivos y específicos como la cromatografía liquida acoplada a detectores MS/MS , lo que conlleva a un gran reto en el análisis, en el estudio de monómeros de procianidinas en muestras vegetales se han desarrollado una gran cantidad de procedimientos, esto refleja la alta complejidad de estas matrices en el análisis y la diversidad de escenarios que se pueden presentar en este reto analítico (Markham & Bloor, 1998).

Dicho esto, se realizaron diferentes ensayos variando la cantidad los factores que pueden influir en la separación de los picos presentes en muestras reales, evitando fenómenos de solapamiento de picos o cambios en los tiempos de retención, debidos a la presencia de metabolitos primarios y demás componentes de los granos de cacao que pudieran alterar el comportamiento de los analitos de interés ; como conclusiones acerca de dichos ensayos es la importancia de la eliminación del extracto etéreo y la separación de los azucares mediante la utilización de cartuchos.

Según lo reportado por Bhagwat, Haytowitz, & Holden en 2013 para la USDA los valores para (-) epicatequina se encuentran en el rango de 18.00 mg/100g - 73.03 mg/100g, y para (+) catequina 12.07 mg/100g - 29.74 mg/100g.

Contenido de alcaloides, parámetro diferenciador en variedades de cacaos

Uno de los principales objetivos del presente escrito es determinar las diferencias medibles de forma analítica entre cacaos Criollos y Forasteros y entre las metodologías que mejor pueden demostrar tal diferencia se encuentra la relación teobromina / cafeína se ha reportado con anterioridad que altos valores para la relación teobromina/cafeína,

están asociados con una menor calidad aromática la cual es un factor clave para definir cacaos finos y de aroma si esta relación se acerca o superan la cifra de 10,ciertamente corresponderá a cacao corriente; en cambio aquellos para la los cuales la relación teobromina/cafeína corresponde a rangos entre 4-5 sugieren ser cacaos de gran valor de exportación para los diferentes países (Amores, Palacios, Jiménez, & Zhang, 2009)

Hasing en 2004, señala que en un estudio de análisis comparativo realizado en Santa Catalina, con muestras de cacao venezolano Guasaré previamente sometido a un proceso de beneficiado, obtuvo un valor de 1.58 en R. T/C, siendo ubicado este valor dentro del grupo de los Criollos así mismo fue evaluada una muestra de cacao Forastero procedente de Ghana, la cual obtuvo un valor de 10 en T/C., de acuerdo a este mismo estudio se ubicó al clon CCN 51 dentro del grupo de los Trinitarios, y a otros Trinitarios como el ICS – 95 entre valores cercanos a 6.

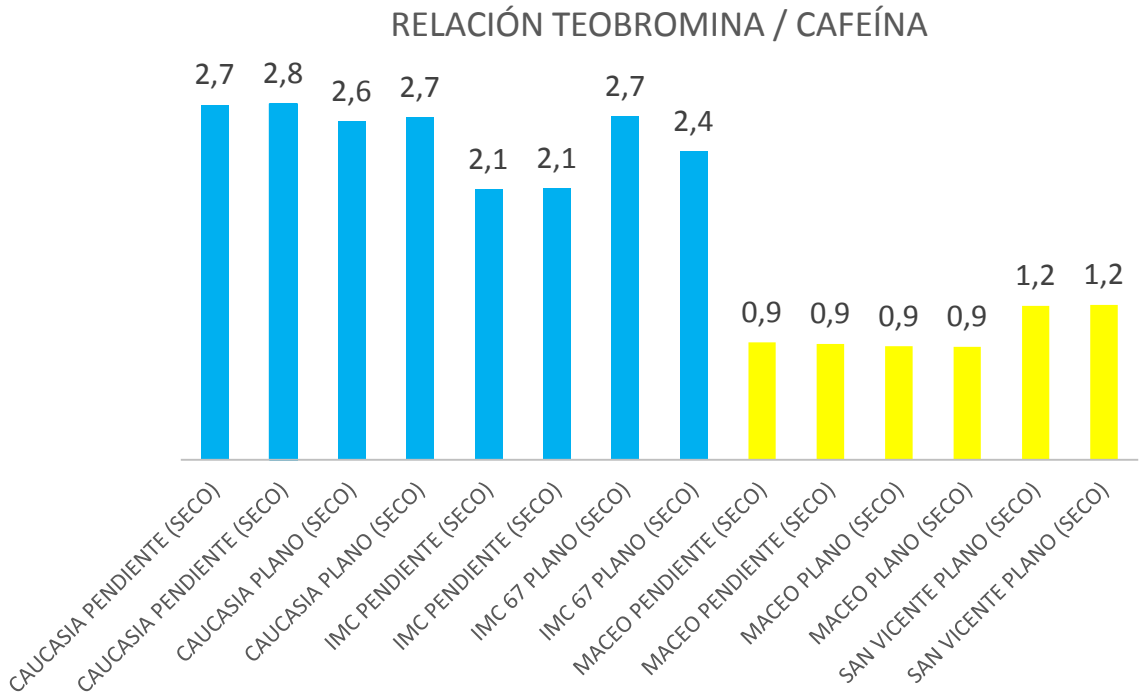
Como se ha mencionado en varios momentos de este escrito la composición química del cacao puede variar según las condiciones climáticas, el terreno y la cosecha, pero en el reporte final del proyecto INIAP / APROCAFA / CORPEI (2006), ninguna de las épocas de sembrado afectaron en forma significativa la relación Teobromina / Cafeína. (Palacios Cedeño, 2008)

Otros autores como Chapelin en 1998 y Davrieux en 2004 detallan que la relación teobromina/cafeína varía en un rango de 5 a 6,92 y está define con claridad las tres variedades de materiales de cacao: El Criollo, el Forastero y el Trinitario siendo para cacaos Criollos del orden de teobromina/cafeína de 2 a 5, los cacaos de tipo Trinitario de 5 a 10 y los Forasteros de 10 en adelante.

En el comportamiento de los dichos alcaloides al final de la etapa de fermentación hay un aumento, este comportamiento se ha descrito con anterioridad por Brunetto y Col en 2007, en cacaos Criollos y Forasteros dichos autores explicaron este fenómeno ya que en la fermentación la testa del cacao se hace permeable a los alcaloides presentes y dado que estas se encuentran en la pulpa, la cáscara y el interior del grano, es posible que ocurra una migración hacia el interior y debido a esto se observe un incremento en sus concentraciones. A pesar de que no hay cambios bruscos en la concentración de los alcaloides durante las etapas de procesamiento, si se observa una disminución progresiva y consistente desde el inicio del secado al sol de los granos de cacao, contrario a esto autores como Nazaruddin y Col en 2006, establecieron que el contenido los alcaloides no se ve afectado en gran medida por la fermentación, secado o los procedimientos durante la industrialización, observándose un contenido más homogéneo durante estos procesos, a pesar de que existe una tendencia clara a su disminución. Estos autores sugieren que debido a este comportamiento, los alcaloides no juegan un papel importante dentro de los cambios fisiológicos que le ocurren a los granos de cacao durante la fermentación.

Según los reportado por Aranzazu en 2015 para el clon IMC 67 la relación teobromina/cafeína obtuvo un valor de 6, el clon CAU 39 con un valor de 6.2 ubicando los dos en el grupo de los Trinitarios, mientras que el clon FSV 155 2.9 estando en el grupo de Criollos.

Figura 20: relación teobromina / cafeína en material vegetal evaluado



Análisis estadístico

Tabla 21. Análisis estadístico de la diferenciación por variedad

Bloque	Repetición	Variedad	Tratamiento	Fenoles totales	Proteína	Antocianinas	Relación Teobromina/Cafeína
Plano	Repetición 1	Trinitarios	A	b			
		Criollos	B	a			
	Repetición 2	Trinitarios	C	b			
		Criollos	D	a			
Pendiente	Repetición 1	Trinitarios	A	b			
		Criollos	B	a			
	Repetición 2	Trinitarios	C	b			
		Criollos	D	a			
Valor P				0.0024	0.000132	0.00206	3.88 x 10-5

En la Tabla 22 se presentan el resultado del análisis estadístico realizado con los datos suministrados por los diferentes análisis a los que fueron sometidos el material vegetal.

Los parámetros que permitieron diferenciar las variedades fueron fenoles totales, proteínas, antocianinas y la relación teobromina/cafeína.

Propuesta de Norma Técnica Colombiana Actualizada

En el Anexo 1, se presentan la propuesta de modificación de la norma técnica colombiana 1252 de 2003, se realizaron 2 modificaciones importantes

1. La inclusión de metodologías para el análisis de acidez, antocianinas , contenido de extracto etéreo , contenido de fibra cruda, contenido de cenizas , contenido de humedad , contenido de proteínas, contenido de alcaloides (teobromina, cafeína)
2. Las clasificaciones según las características físicas, el grado de fermentación, las características bromatológicas, el contenido de alcaloides.

El apartado de definiciones y la descripción de la forma en la cual se debe tomar la muestra se conservó, ya que cuenta con lo exigido.

Conclusiones

Las pruebas de acidez, pH, relación de absorbancias 460/530 (contenido de antocianinas), color y peso son las pruebas necesarias para realizar la verificación de la correcta fermentación del cacao. Con respecto a estas pruebas el clon IMC 67 no estuvo en el rango establecido para la medida de pH, mientras que Caucasia 39 cuando fue evaluado el peso se situó bajo la referencia de tres de las normas latinoamericanas estudiadas como cacao Pasilla o de segunda categoría.

El clon Maceo 14 presentó características superiores comparado con San Vicente 155 en términos de contenido de proteínas, contenido de fibra, contenido de cenizas, lo que sugiere que es un clon promisorio y que se deben evaluar sus aspectos físicos más a fondo.

Los clones correspondientes a las variedades Trinitarios IMC 67 y Caucasia 39 presentaron valores para los análisis bromatológicos que se encontraban en el rango de los estudios realizados, lo que confirma que las metodologías utilizadas son las idóneas para ser propuestas en la norma.

Referente a la capacidad antioxidante se estableció que la extracción asistida por ultrasonido es la mejor herramienta para retirar el extracto etéreo, así como la mezcla de acetona:agua:ácido acético es la mejor mezcla para realizar la extracción de metilxantinas, y monómeros de procianidinas .

Se establecieron los valores para la capacidad antioxidante atribuida a la epicatequina principalmente donde se evidencio que dichos valores estaban por encima del valore reportado la USDA y otras investigaciones, pero también se puede observar como decae la actividad antioxidante con los procesos de beneficio del cacao.

Los parámetros de contenido de proteínas, fibra, antocianinas, fenoles, relación teobromina / cafeína son una herramienta para la diferenciación cuantitativa a partir de los parámetros químicos de las variedades Criollo, Trinitario y Forastero.

Referencias

Amores, F., Palacios, A., Jiménez, J., & Zhang, D. (2009). Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nor oriente de la provincia de esmeraldas, 120 (*Boletín Técnico*, 135). 41

Araujo, Q. R., a.F. Fernandes, C., Ribeiro, D. O., Efraim, P., Steinmacher, D., Lieberei, R.,… Araujo, T. G. (2014). *Cocoa Quality Index – A proposal. Food Control*, 46, 49–54. http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.003 7

Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2013). USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Prepared by. USDA *Agricultural Research* Service, 14.

Board on the word cocoa economy. (2009). guidelines on best known practices in the cocoa value chain. 8

Borbor, F. y Vera,M. 2007.Manual del cultivo de cacao para productores. Unidad ejecutora del programa Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones CORPEI, y Co – ejecutor Asociación Nacional de Exportadores de cacao Anecacao. Enero del 2007. Guayaquil, Ecuador. 47

Brunetto, M. del R., Gutierrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gomez, Alvaro,… Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline

and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100(2), 459–467. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.007.462

Cardello, A. V. (1995). Food quality: Relativity, context and consumer expectations. *Food Quality and Preference*, 6(3), 163–170. http://doi.org/10.1016/0950-3293(94)00039-X . 1

Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273–280. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019. 2

Centro de exportaciones e inversiones de Nicaragua. (2012). Perfil de mercado: cacao orgánico - Europa. 4

Cubillos, G., Merizalde, G. J., & Correa, E. (2008). Manual de beneficio del cacao Para: técnicos, profesionales del sector agropecuario y productores. 8, 9, 10

Escobar, J. G., & Rojas, M. R. (2001). Acuerdo Sectorial de Competitividad de la Cadena del Cacao y su Agroindustria, 40. Retrieved from http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=iicacr.xis&expresion=SECTOR

AGROINDUSTRIAL&cantidad=50&formato=2&proxdoc=51&ascendente=&tc= .5

Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C., & Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (Theobroma cacao L.). *European Food Research and Technology*, 229(6), 937–948. http://doi.org/10.1007/s00217-009-1132. 940

Fedecacao. (2005). Caracterización fisicoquímica y beneficio del grano de cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia. 24

FAO. (n.d.). Determinación de nitrógeno total y proteínas. in manuales de calidad de los alimentos (p. 182).180

Federacion Nacional de cacaoteros (2004). El beneficio y características físico químicas del cacao (Theobroma cacao L.). *Retrieved from* http://www.fedecacao.com.co/site/index.php/1pub-publicaciones. 23

Fedecacao. (2005). Caracterización fisicoquímica y beneficio del grano de cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia.23

Fedecacao, F. N. D. C. (2004). El beneficio y características físico químicas del cacao (Theobroma cacao L.). Retrieved from http://www.fedecacao.com.co/site/index.php/1pub-publicaciones.20

Gil Quintero, J. A. (2012). Extracción y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos Colombianos durante los procesos de pre-industrialización, 119. http://doi.org/10.5334/ai.1615 .20

Guillén Luque. (n.d.). Estructura Y Propiedades De Las Proteínas, 1–4. Retrieved from http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf .1

Guehi, S., Dabonne, S., Ban-Koffi , L., Kedjebo, D. K. and Zahouli, G. (2010). Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2, 163–171. http://doi.org/http://www.researchgate.net/publication/45087796_Effect_of_Turning_Beans_and_Fermentation_Method_on_the_Acidity_and_Physical_Quality_of_Raw_Cocoa_Beans .164

Guehi, S., Irie, G., Zahouli, B., Fae, A., Ban-Koffi , L. and Nemlin, J. G. (2010). Effect of drying methods on the chemical quality traits of Cocoa Raw Material. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2, 184–190. http://doi.org/http://www.researchgate.net/publication/45492320_Effect_of_Drying_Methods_on_the_Chemical_Quality_Traits_of_Cocoa_Raw_Material.186

Guerreo, N. M. (2015). Fondo nacional del cacao Avances en investigación.4

International Cocoa Organization (ICCO). (2014). ICCO Annual Report 2012/2013, 72. Retrieved from http://www.icco.org/ .60

Kerimi, A., & Williamson, G. (2015). The cardiovascular benefits of dark chocolate. *Vascular Pharmacology*. http://doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.011 .3

Landero, E. (2014). Requerimientos de habilidades técnicas para la renovación de plantaciones de cacao en tabasco, México. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.14

Luque-García, J. L., & Luque De Castro, M. D. (2003). Ultrasound: A powerful tool for leaching. TrAC - *Trends in Analytical Chemistry*, 22(1), 41–47. http://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00102-X.43

Mojica, A., Joaquín, P., & Vega, P. (2006). Ensayos sobre economía regional: características del cultivo del cacao en Santander. Bucaramanga. 9

Nazaruddin, Seng, Hassan, & Said, 2006) Fabio Aranzazu H. (2015). Cacao. in modelos de siembra en cacao para apoyar los retos de producción y calidad del cacao. viii foro nacional de cacao honduras.

Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (Theobroma Cacao) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1), 87–94. http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.03.013

Ortega, N., Romero, M. P., Macio, A., Reguant, J., Angel, N., Morello, J. R., & Motilva, M. J. (2010). Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(3), 298–305. http://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.005

Palacios Cedeño, Á. L. (2008). Establecimientos de parámetros (físicos, químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao (theobroma cacao l.) producido en dos zonas identificadas al norte y sur del litoral ecuatoriano, 136.

Salinas, N., & Bolivar, W. (2012). Ácidos Grasos En Chocolates Venezolanos Y Sus Análogos. Ciencia de Los Alimentos, 25(5), 34–41. 35

Southgate, D. A. T. (2006). Examen de métodos de análisis. In B. A. Burlingame & U. R. . Charrondiere (Eds.), Datos de composición de alimentos: obtención, gestión y utilización (1st ed., pp. 107–162). Food & Agriculture Org. 110

Superintendencia de Industria y Comercio. (2014). Cadena productiva del cacao: diagnóstico de libre competencia. Retrieved from http://www.sic.gov.co/drupal/sites/default/files/files/Cacao.pdf. 3

Serra, A., Macia, A., Romero, M. P., Piñol, C., & Motilva, M. J. (2011). Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B: *Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(19), 1519–1528. http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.042

Villamir, A, (2013). Carasteristicas de calidad del cacao de Colombia, catálogo de 26 cultivares (Federacion). Universidad Industrial de Santander

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17(6), 300–312. http://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004 309

Zambrano, A., Romero, C., Gómez, Á., Ramos, G., & Lacruz, C. (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.

Apéndices

Apéndice A. propuesta de actualización: norma técnica colombiana NTC 1252

2003-05-28

CACAO EN GRANO

OBJETIVO

Esta norma tiene por objeto establecer la clasificación y los requisitos que debe el cacao en grano, destinado a la industrialización para consumo humano.

DEFINICIONES Y DESIGNACIÓN

DEFINICIONES

Proceso adecuado a que se somete el grano de cacao para mejorar el saber, aroma y para facilitar su secado.

Grano bien fermentado. Grano de cacao cuyo proceso de fermentación ha sido completo y que presenta las siguientes características: cascara o tegumento de color marrón, rojo o pardo rojizo oscuro (color chocolate) con alveolos bien definidos de forma arriñonada y con olor a chocolate.

Grano insuficientemente fermentado. Grano de cacao con una fermentación incompleta, cuyos cotiledones (almendra) presentan un color violeta o marrón violeta, de estructura semicompacta con cascara difícilmente separada.

Grano pizarroso. Grano de cacao sin fermentar, el cual presenta un color interior de gris negruzco y estructura completamente compacta.

Pasilla: Conjunto de granos de cacao planos, tan delgados que se dificulta su partida longitudinal

Grano infestado: Grano de cacao invadido de insectos, larvas o adultos dañinos en el mismo.

Grano dañado por insectos: Grano o pedazo de grano de cacao que aparece alterado en su apariencia y cuya estructura presenta perforaciones o daños causados por insectos.

Grano mohoso: grano con forma interna de estructura de hongo perceptible a la vista, con olor y saber desagradable.

Impurezas o materias extrañas: Cualquier material o elemento diferente al grano de cacao

Grano germinado: Grano de cacao cuya testa o tegumento ha sido perforada o quebrada debido al crecimiento del embrión o radícula.

Grano ahumado: Grano con olor o sabor a humo o que muestres signos de contaminación con el humo.

Grano múltiple: Unión de dos o más granos de cacao debido a ataques de hongos en la mazorca o a la falta de separación, volteo y remoción de los granos durante la fermentación y secado.

DESIGNACIÓN

El cacao en granos se designa por su nombre. Ejemplo cacao en grano premio, cacao en grano corriente y cacao en grano pasilla.

REQUISITOS GENERALES

Determinación del tamaño de la muestra

Tamaño del lote en sacos	Sacos para muestra
2 a 8	2
9 a 15	3

Tamaño del lote en sacos	Sacos para muestra
16 a 25	5
26 a 50	8
51 a 90	13
91 a 150	20
151 a 280	32
281 a 500	50
501 a 1200	80
1201 a 3200	125
3201 a 10000	200
10001 a 35000	315
35001 a 150000	500
150001 a 500000	600
500001 y mas	1250

Cuando el muestreo se vaya a efectuar sobre arrumes que tienen largo tiempo de haber sido conformados, se recomienda seguir el procedimiento indicado en el numeral

Extracción de muestras de los sacos

Es necesario que la longitud de la parte penetra equivalga al menos a la mitad de la diagonal del saco. Se debe introducir la sonda en diagonal hasta la mitad del saco y llenarse. Se debe introducir la sonda una vez más preferiblemente por debajo del saco a lo largo de la otra diagonal hasta el cuarto inferior. La sonda se introduce con la ventana hacia abajo en el saco y luego se le da la vuelta y se llena.

a) Si se utiliza una sonda que consta de una sonda dentro de otra de diámetro diferente, se introduce en posición cerrada con las aberturas hacia arriba. Haciendo girar el tubo interior, se abre la sonda y una vez llena, se cierra otra vez y se saca.

b) Inmediatamente después de extraída la sonda, se vacía su contenido en la caja o saco destinado a contener la muestra global. En algunos casos (por ejemplo para una determinación de impurezas) es preciso abrir el saco antes de sondear.

c) Cuando se tomen muestras de los lotes pequeños, la muestra global debe tener un volumen talque se pueda deducir de ellas las muestras de expedición y de reserva.

Toma de muestras

Productos homogéneos empacados: El número de sacos de los que se toma la muestra parcial, depende del número total de ellos. Se escogen aleatoriamente, pero repartidos sobre el lote completo, los sacos de los cuales se deben tomar las porciones que sumadas forman la muestra global.

Para asegurarse de que la muestra se toma aleatoriamente debe utilizarse una Tabla de números aleatorios, para lo cual se enumeran las unidades del lote y de la Tabla, obteniéndose al final una serie de números igual al número de unidades que van a extraerse. Esta serie de números se ordenan ascendentemente y en esta forma se deben sondear los sacos.

Preparación de la muestra global

Se reúnen inmediatamente y en su totalidad las muestras parciales en una caja o en un saco impermeable al vapor de agua. Durante estas operaciones el empaque no debe quedar abierto y expuesto al sol. La caja o el saco debe ser suficientemente grande para que la totalidad de las muestras parciales ocupen como máximo la mitad. Tan pronto se hayan reunido todas las muestras parciales, se mezcla perfectamente el contenido de la caja o saco.

Preparación de la muestra reducida o muestra de expedición

La muestra de la expedición se debe deducir de la muestra global mediante un aparato divisor adecuado, la cantidad de la muestra reducida dependerá de las determinaciones que se vayan a efectuar.

la muestra de la expedición se debe embalar en recipientes de buen cierre impenetrables e impermeables. La descripción de la muestra en el papel no adhesivo debe incluirse en el recipiente. También se debe aplicar en el exterior del empaque. La descripción completa de la muestra comprenderá:

a) Los nombres de los operadores que tomaron las muestras.

b) La fecha de la operación.

c) El lugar.

d) La designación del producto.

e) La designación del lote: es decir, nombre del navío, numero de los vagones, etc.

f) Mención de que el procedimiento de muestreo se ha hecho siguiendo la presente norma.

Inmediatamente después de llenar los envases, estos se deben presentar con lacre, o sellarlos convenientemente.

Preparación de las muestras de reserva

Si no se indica lo contrario, al hacer las muestras de expedición se deben preparar muestras de reserva que en volumen y en número correspondan a las muestras de

expedición. Estas muestras se preparan, designan, marcan y presentan como las muestras de expedición. Las muestras de reserva quedaran bajo la custodia de las partes interesadas, que las guardaran durante dos meses.

Preparación de las muestras para análisis

La muestra que llega al laboratorio deber ser mínimo de 1000g se deja el tiempo necesario para tomar la temperatura local, pues de lo contrario la humedad del aire seria absorbida rápidamente.

Una vez efectuadas estas determinaciones la muestra sobrante se divide por cuarteo, hasta obtener una masa de 500g y de ella se toman aleatoriamente 100 granos, para realizar los ensayos correspondientes a los demás parámetros enunciados en la Tabla de requisitos.

El cacao en grano que no cumpla los requisitos especificados en esta norma, se considerara no clasificado. En caso de discrepancia se repetirán los ensayos sobre la muestra de reserva para tales efectos. Cualquier resultado no satisfactorio en este segundo caso será motivo para rechazar.

ENSAYOS

Pruebas físicas

- **Peso**

Se toman 100 granos representativos de la muestra, y se llevan a una balanza debidamente calibrada, se registra el valor y se reporta en gramos por 100 granos (g/100 granos).

- **Granos defectuosos**

Se toma una muestra representativa del saco donde se encuentren un número de granos mayor a 100, y se distribuyen en una superficie limpia, seca y de tonalidad clara. Se separan los materiales extraños de los granos, dichos materiales se pesan, posteriormente se realiza una inspección de los 100 granos para determinar cuántos de estos se encuentran germinados o han sido atacados por insectos, aplastados o fracturados, se debe registrar el peso de los mismos en % (m/m), máx.

- **Color**

Se toman 100 granos de cacao, se llevan a congelación a una temperatura menor a 4 grados centígrados, hasta que están completamente congelados, se retiran del congelador e inmediatamente después se reduje el tamaño de partícula con ayuda de un molino de cuchillas, o un mortero, se separan 3 partes diferentes del polvo obtenido y se llevan a un tamiz donde se asegure que el tamaño de partícula es menor 500 micras , se registran las mediciones de color en parámetros R,G, B y con ayuda de un software se obtienen las coordenadas L, a*, b* , se registra el índice de color siguiendo la ecuación 1 .

$$IC = \frac{a * 1000}{L * b}$$

- **pH**

Se realiza una reducción de tamaño a los granos de cacao, y se llevan a un tamiz donde se asegure que el tamaño de partícula es menor 500 micras, se toman 10 gramos de producto obtenido del tamiz, y se vierten 100 ml de agua destilada se lleva a una plancha de calentamiento durante 1 hora a 90°C, seguido a esto se centrifuga durante 25 min a 15 °C y 5000 rpm y a 25 ml del sobrenadante se le mide el pH.

Pruebas químicas

- **Acidez**

De la solución centrifugada en el procedimiento para medir pH se toma una alícuota de 25 mL del sobrenadante y es titulada con una solución de NaOH al 0.01 N hasta alcanzar un pH con rango de 8.27 – 8.33. Los valores de la acidez total (AT) se reportaran como mmoles de hidróxido de sodio por 100 g semilla seca y como meq de NaOH por 10 g de cacao seco (meq de NaOH. 10 g-1)

- **Antocianinas**

Se pesan 0.5 g de polvo de cacao (tamaño de partícula menor a 500 micras) en tubos de ensayo, seguido a esto se adicionan 50 ml de mezcla de metanol:HCl (97:3) se agita vigorosamente la mezcla . El homogenizado se deja reposar a (8 °C) durante 18 horas y luego se filtra a vacío hasta un volumen aforado en 40 mL. Se realizan lecturas de absorbancia con un espectrofotómetro a 460 y 530 nm , y se reporta la relación teobromina/cafeína.

Pruebas bromatológicos

- **Contenido de extracto etéreo**

Se pesan 3 g (P1) de muestra triturada y seca, luego se llevan a un dedal de celulosa. Posteriormente se adicionan 90 mL de n-hexano en un crisol previamente pesado (P0). Se llevan al montaje de Soxhlet y la extracción se efectúa durante 15 horas en 3 baches de 5 h. Se evapora el solvente, se transfiere al desecador y se pesa (P2). Para calcular el porcentaje de extracto etéreo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Extracto\ etéreo = \frac{P2 - P0}{P1} x100$$

$$\%\ Sólido\ desengrasado = \frac{D1 - D0}{P1} x100$$

- **Contenido de fibra cruda**

Se pesan exactamente 0,3 g de muestra en cada uno de los crisoles, se registra el valor como (F0). Se aseguran los crisoles con la muestra en el equipo y se adicionan 125 ml de H2SO4 (1,25%) previamente calentados hasta ebullición. 3-5 gotas de n-octanol son adicionados como agente antiespumante, una vez la mezcla está en ebullición se deja la digestión durante 30 minutos. El ácido sulfúrico es drenado y la muestra se lava 3 veces con 30 mL de agua caliente. Luego de drenar el último lavado, se adicionan 150 mL de KOH (1,25%) en ebullición y se repite el mismo procedimiento realizado con el ácido. Se hace un último lavado con agua fría destilada destinada a enfriar los crisoles y luego con 25 mL de acetona fría, se repite por triplicado agitando cada vez con aire comprimido. Los crisoles se pesan una vez se han evaporado las trazas de acetona, después de secarlos en el horno a 105°C durante 1 hora o hasta peso constante y de llevarlo al desecador para enfriar. Este peso representa la fibra cruda más el contenido de cenizas en comparación al peso inicial (F1).

Para cuantificar las cenizas restantes en la muestra que no son removidas por la digestión ácido-básica, se llevan los crisoles a la mufla a 550°C durante 3 horas, se enfrían en el desecador y se pesan nuevamente (F2**).**

Para calcular el porcentaje de fibra cruda se aplica la siguiente ecuación:

$$Porcentaje\ de\ fibra\ cruda = \frac{F2-F1}{F0} x100$$

- **Contenido de cenizas**

Es necesario calcinar los crisoles vacíos a 550°C durante 2 h, dejar enfriar (hasta ± 40°C) en la mufla y llevar al desecador y pesar a temperatura ambiente (C0). Pesar 2 g de muestra en un crisol previamente tarado y deshumedecido (C1). Colocar los crisoles con la muestra en la mufla y calcinar a 550°C durante 1 h retirar y dejar enfriar hasta temperatura ambiente, se adiciona 3 gotas de agua destilada y se vuelve a calcinar durante 10 horas retirar y dejar enfriar hasta temperatura ambiente y registrar el peso, posteriormente se vuelve a calcinar durante 1 hora más se retiran y dejan enfriar hasta temperatura ambiente y se registra el peso si es este no tiene un cambio superior a 1 mg , Pre-enfriar en la mufla apagada (hasta ± 40°C) y luego traspasar al desecador y pesar a temperatura ambiente (C2).

$$Porcentaje\ de\ Cenizas\ (\%C) = \frac{C_2 - C_0}{C_1}\ x\ 100$$

- **Contenido de humedad**

Pesar 10 gramos de polvo de cacao (P0) y se llevarlos a un crisol previamente deshumedecido registrar el peso (P1) a una estufa de secado convencional a 105±0.2 °C hasta alcanzar un peso constante (P2). El resultado se reporta como el contenido de humedad en base húmeda, según la siguiente ecuación:

$$Porcentaje\ de\ humedad\ (\%) = \frac{P2 - P1}{P0} x100$$

- **Contenido de proteínas**

Se pesan 0,3000 g de muestra seca en un papel filtro previamente tarado, se llevan a un tubo digestor y posteriormente se adicionan 4 g de catalizador (K2SO4 – CuSO2) y 10 mL de ácido sulfúrico al 96%, de esta misma manera se preparan el blanco utilizando un papel filtro. Los tubos digestores se llevan al equipo de digestión de Nitrógeno (Velp Scientifica, Italia) durante 45 min a 420°C y se dejan enfriar. Pasado este tiempo se llevan a la unidad de destilación automática (Velp Scientifica, Italia) se programa el respetivo protocolo de adición de reactivos (50 mL de agua destilada, 50 mL de NaOH 40 % y 50 mL H3BO3), luego de recoger el destilado se procede a titular, adicionado 3 gotas de indicador de Tashiro y se valora con solución volumétrica de HCl 0.1N hasta que el destilado vira de color verde a violeta y permanece por 30 segundos.

El cálculo del contenido de proteína se realizó utilizando la siguiente fórmula

$$\%N = \frac{\left(14\ {}^{mg}/_{meq}\right) * (Vm - Vb) * N}{W} x100$$

$$\%P = \%N * F$$

Pruebas analíticas

- **Contenido de alcaloides (teobromina , cafeína)**

Para determinar el contenido de alcaloides se deben realizar 4 etapas:

1. La primera etapa consiste en realizar un desengrasado de la muestra por ultrasonido: Pesar 100 mg de cacao seco SIN fermentar en un tubo de reacción de plástico con capacidad de 2 mL con 1.5 mL de hexano y se lleva a un baño

ultrasonido por 10 min a 25 Hz de frecuencia, 99 % potencia. Luego se centrifuga a 14.000 rpm durante 15 min a 10 °C. El sobrenadante se separa en un tubo de ensayo, se repite el procedimiento cinco veces combinando los sobrenadantes. Posteriormente, se evapora el solvente quedando como resultado la manteca de cacao. Se registraron los pesos obtenidos de manteca de cacao para asegurar que la extracción de la manteca de cacao coincida con el contenido de extracto etéreo cuantificado por Soxhlet.

2. La Segunda fase de acondicionamiento se realiza para obtener el extracto a partir del cacao desengrasado al cual le es adicionado 1 mL de una solución de acetona / agua MilliQ / ácido acético (70/29,5/0,5, v/v/v). La mezcla se agita en un Vortex durante un minuto y sometió a un baño ultrasonido 3 min, 25 Hz de frecuencia y 99 % potencia. Luego, se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 min a 10 °C. El sobrenadante se almacena en un frasco ámbar de 4 mL. El procedimiento anterior se repite una vez más y se combinan los dos extractos
3. Una tercera etapa consiste en realizar una extracción específica a partir de los extractos obtenidos mediante el uso de cartuchos antes de someterse al análisis cromatográfico. Los cartuchos Sep-pack C18 se acondicionan con 1 mL de metanol y 1 mL de agua MiliQ. Posteriormente, se adicionan 400 mL del extracto y se separan los azucares con 1800 µL de agua MiliQ, los analitos de interés se eluyen con 720 µL de una solución de acetona/agua MilliQ/ácido acético (70/29.5/0.5, v/v/v). A continuación se vierten en viales de cromatografía 500 mL previamente filtrados por un cartucho de 0.22 µm junto con 200 mL de la fase móvil que consiste en una mezcla de agua al 0.1% de ácido fórmico y acetonitrilo, en una proporción de 95:5 respectivamente.
4. Se recomienda realizar el procedimiento en el equipo equipo UPLC Acquity, Waters

   Bajo los siguientes parámetros: con una columna Acquity BEH C18 (2,1 mm de diámetro interno 100 mm, tamaño de partícula 1,8 mm) (Waters, Milford, MA, EE.UU.) y una fase binaria a una velocidad de flujo de 0.2 mL/min. La fase móvil A es agua/ácido fórmico (95/5, v/v) y B es acetonitrilo. El gradiente de elución a

30 °C es: 0-0.5 min, 95:5 (A:B); 0.5 a 3.0 min, 80:20 (A:B); 3.0 a 3.1 min, 95:5 (A:B).

Clasificación

Según las características físicas

Requisitos	Premio	Corriente	Pasilla
Contenido de impurezas o materias extrañas en % (m/m), máx.	0	0.3	0.5
Contenido de material aplastado o fragmentado en % (m/m), máx.	1	2	2
Grano dañado por insectos y/o germinados, numero de granos/100 grano máx.	1	2	2
Masa (peso), en g/100	120	105-119	40

granos, min.			

- **Según el grado de fermentación**

Características	Color	Antocianinas	pH
Unidades de medida	Índice de color	Relación de Absorbancia A 460/530 nm	Escala de pH de 1-14
	Rangos de tolerancia		
Cacaos bien fermentado		< 1	4,8-5,5
Cacao insuficientemente fermentado		> 1	> 6

- **Según las características bromatológicas**

CARACTERÍSTICAS	**RANGOS DE TOLERANCIA**		
	BAJO	**MEDIO**	**ALTO**
Contenido de extracto etéreo	**<40 %**	**40 % - 50 %**	**>50 %**
Contenido de humedad	**< 7 %**	**7% - 8%**	**>8 %**
Contenido de proteínas	**< 10 %**	**10% - 13%**	**> 13 %**
Contenido de fibra	**< 5 %**	**5 % - 12%**	**>12 %**
contenido de cenizas	**< 3 %**	**5% - 7%**	**>9 %**

***El contenido debe ser menor a 7 para evitar la proliferación de microorganismos y hongos**

- **Según el contenido de alcaloides**

Grupos	Valor de Teobromina / Cafeína
Cacaos Forasteros	15-10
Cacao Trinitario	2-10
Cacaos Criollos	2-1

EMPAQUE Y ROTULADO

EMPAQUE

El cacao podrá transportarse en empaques flexibles y apropiados u otro material que garantice la conservación del producto en condiciones normales de almacenamiento y transporte.

El empaque con su contenido debe permitir su cierre uniendo las dos orillas que forman la boca, es decir que no se permitirá que el producto sobrepase la parte superior del empaque. No se debe usar relleno.

ROTULADO

Las inscripciones en el rotulo se harán en la planilla de recibo en forma legible a simple vista, redactadas en español y en otro idioma si las necesidades de comercialización así lo dispusieran.

En la planilla debe indicarse como mínimo lo siguiente:

a) Nombre del producto
b) Procedencia
c) Nombre o marca del vendedor o del productor.
d) Designación, de acuerdo don lo indicado en el numeral 2.2
e) Contenido neto, en kilogramos.