

Desarrollo de un método analítico para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de cacao criollos venezolanos

Development of an analytical Method for the Determination of Glucose, Fructose and Sucrose in Venezuelan Cocoa Samples

Dra. María del Rosario Brunetto-de-Gallignani,^I Lic. Wendy Orozco-Contreras,^I Dra. Yelitza Delgado-Cayama,^I Dra. Sabrina Clavijo-Roa,^I Dr. Máximo Gallignani-de-Bernardi,^I Dr. Carlos Ayala-Montilla,^I MSc. Alexis Zambrano-García^{II}

*brunetto@ula.ve; cianurow@hotmail.com; yelitzad@ula.ve; sabrina@ula.ve; maximo@ula.ve;
carlosayala@ula.ve; alexisz@ula.ve*

^IGrupo de Espectroscopia Molecular, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Estado Mérida, República Bolivariana de Venezuela; ^{II}Grupo de Investigación de Análisis Químico Industrial y Agropecuario, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Estado Mérida, República Bolivariana de Venezuela

• Resumen

Se optimizó y validó un método sensible y selectivo por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM) para la determinación de fructosa, glucosa y sacarosa en muestras de cacao. Los analitos se extrajeron desde el polvo de cacao desgrasado y molido con agua (70 °C) y sonicación durante 15 minutos. Seguidamente se derivatizaron con N-metil-trimetilsilil-trifluoacetamida (MSTFA) utilizando irradiación con microondas a una potencia de 630 W durante 60 s para lograr su volatilidad. Bajo las condiciones óptimas, el método proporcionó recuperaciones cuantitativas de los analitos (98-108 %, CV < 3,68 % $n = 5$) y una precisión con un CV < 3,31 % ($n = 5$). Se analizaron 90 muestras de diferentes variedades de cacao criollo venezolano tomadas antes, durante y después de los procedimientos de fermentación y tostado.

Palabras claves: CG/EM, microondas, cacao, glucosa, fructosa, sacarosa.

• Abstract

A selective and sensitive gas chromatography method with mass spectrometric detection (GC/MS) was optimized and validated for the determination of fructose, glucose and sucrose in cocoa beans. Analytes were extracted by ultrasonication from defatted milled cocoa powder using purified water (18 Ω) at 70 °C. Then, these were derivatized with N-methyl-trimethylsilyl trifluoroacetamida (MSTFA) assisted by microwave irradiation at a power of 630 W for 60 s, in order to achieve its volatility. Under optimal conditions, the method provided quantitative recoveries of analytes (98-108 %, CV < 3,68 % $n = 5$) and a precision with a CV < 3,31 % ($n = 5$). Ninety samples of four varieties, with different genotypes, of cocoa beans grown in Venezuela, taken before, during and after the fermentation and roasting stages, were analyzed.

Keywords: GC/MS, microwaves, cocoa, glucose, fructose, sucrose.

• Introducción

El cacao, conocido científicamente como *Theobroma cacao L*, es una planta nativa de la selva tropical amazónica. Su gran demanda comercial se debe a que su fruto es la materia prima para la fabricación del chocolate, como consecuencia del aroma y sabor que desarrollan los granos una vez fermentados, secos y tostados.

El sabor, determinado por el gusto y el aroma, es la característica principal que determina la calidad de los granos de cacao y se encuentra influenciado por diversos factores como: el material genético o genotipo, condiciones de clima y suelo donde se desarrolla la planta, manejo agronómico que se le dé a la plantación y las tecnologías poscosecha. Este último factor constituye el punto más importante para preservar y mejorar las características organolépticas del cacao, especialmente, la correcta fermentación y secado a los que se someten los granos. Durante el proceso de fermentación tiene lugar una serie de reacciones bioquímicas en el interior del grano de cacao que origina la muerte del embrión y la formación de los precursores del aroma (aminoácidos, péptidos y azúcares reductores), los cuales interaccionan en la etapa de tostado desarrollando el aroma específico del cacao /1/. Por ello, para poder evaluar correctamente la calidad del cacao, no basta con estudiar los compuestos asociados directamente con el aroma y el sabor, sino que también es necesario estudiar los compuestos que los originan en las almendras:

antes, durante y después de los procesos de fermentación y tostado. Entre los precursores del aroma, los aminoácidos y azúcares reductores cumplen un rol relevante. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar un método analítico para evaluar el perfil de la sacarosa, glucosa y fructosa en almendras de cacaoos criollos venezolanos durante los procesos de fermentación y tostado. La información obtenida permitirá mejorar y fortalecer la base productiva del país en este importante rubro, priorizando la tendencia actual de producir un cacao fino de aroma y sabor característico.

En la literatura se han descrito varios métodos para la determinación de estos analitos como colorimétricos /2,3/, enzimáticos /4,5/, electroquímicos /6-8/, espectroscopía infrarrojo por transformadas de Fourier /9/, análisis por inyección en flujo /10-12/, los cuales han contribuido en la determinación de carbohidratos en diferentes matrices, particularmente de forma individual. No obstante, debido a la complejidad de las matrices alimentos, los métodos que se destacan son los que utilizan la cromatografía de gases (CG) y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) /13-15/, los cuales permiten la separación, identificación y cuantificación simultánea de los carbohidratos presentes en las muestras reales /16-19/.

La CG es una técnica sensible y selectiva que permite un fácil acoplamiento con la espectrometría de masas (EM) como sistema de detección. Simplifica la identificación de forma prácticamente inequívoca de cualquier compuesto, ya que proporciona un espectro de masas característico de cada molécula /20/, sin embargo se encuentra restringida al análisis de compuestos volátiles. La glucosa, fructosa y sacarosa son compuestos que en sus estructuras moleculares contienen grupos funcionales con hidrógenos activos ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$) que los convierten en compuestos altamente polares, hidrofílicos y poco volátiles, por ello, para su determinación por cromatografía de gases, es necesario involucrar, en la etapa de tratamiento de la muestra, una reacción de derivatización para mejorar su volatilidad. De acuerdo con Little y col /21/, las condiciones bajo las cuales se realice esta reacción dependerán, principalmente, del tipo de compuesto a derivatizar, la matriz en la que se encuentre y el tipo de reactivo derivatizante a utilizar. Por lo general, involucran un calentamiento convencional entre 50 y 80 °C por largos tiempos de reacción, 30-180 min /21-24/.

En este trabajo se seleccionó una reacción de sililación de los analitos utilizando el reactivo N-metil-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) para obtener derivados volátiles y estables

térmica e hidrolíticamente. En adición, con el fin de acelerar la reacción de derivatización de los carbohidratos, se asistió la reacción con radiación por microondas (MW, por sus siglas en inglés) /25/, lo que permitió disminuir significativamente el tiempo de reacción.

En virtud de todo lo expuesto, se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas y derivatización asistida por microondas para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de cacaos venezolanos durante el proceso de fermentación y tostado. El método propuesto es sensible y selectivo y representa una excelente alternativa para la determinación de estos carbohidratos por CG, que es una técnica analítica accesible a la mayor parte de los laboratorios de análisis.

• Parte experimental

Reactivos, solventes y patrones

Se emplearon reactivos grado analítico y solventes grado HPLC; los gases Aire (99,999 %), Nitrógeno (99,999 %) y Helio (99,999 %) se obtuvieron a través de AGA de Venezuela; acetonitrilo (MeCN) (J.T. Baker, Phillisburg, NJ, USA). Se utilizó agua purificada en un sistema Milli-Q SP TOC (Waters, Millipore, Milliford, MA. Se empleó como agente derivatizante N-metiltrimetilsililtri-fluoroacetamida (MSTFA) + 1 % trimetilclorosilano (TMCS) y ATN (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Los patrones de glucosa, fructosa y sacarosa se obtuvieron de Sigma–Aldrich Química S.A (Madrid, España). Las soluciones madres de los distintos analitos (10 000 µg/mL) se prepararon en agua y almacenaron en frascos ámbar, bajo refrigeración a 4 °C. Las soluciones de trabajo a los diferentes niveles de concentración se prepararon diariamente por disolución sucesivas en acetonitrilo.

Equipos

Se utilizó un cromatógrafo de gases VARIAN modelo 3800 acoplado a un espectrómetro de masas VARIAN Saturno 2000 (con analizador de trampa de iones) y un automuestreador VARIAN modelo 8200 con un carrusel para 48 viales de 2,0 y 0,1 mL. El procesamiento de los

datos y el control de los parámetros instrumentales se llevaron a cabo mediante un computador Dell (OptiPlexGxa) equipado con el software correspondiente. Para la identificación de los analitos se utilizaron las librerías WILEY y NIST integradas al software del equipo.

Muestras de cacao

Se emplearon muestras de cacao suministradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas de Mérida (INIA–Mérida). Las variedades de cacao criollo estudiadas fueron Guasare, Criollo Merideño Zea, San Juan y Porcelana; las tres primeras provenientes del banco genético de San Juan de Lagunillas (INIA–Mérida, Venezuela) y la última del banco genético de la Estación Local Chama (CORPOZULIA, Venezuela).

Las muestras se tomaron durante 2 años en dos ciclos de cosecha diferentes y se les aplicaron las metodologías de poscosecha establecidas en el Campo Experimental San Juan de Lagunillas del INIA, municipio Sucre, estado Mérida, Venezuela. Las almendras se sometieron a fermentación durante tres días en cajas de madera de 60 cm³. El volteo de la masa en fermentación se realizó cada 24 h. Se tomaron muestras para el análisis (tres réplicas) en cada día de fermentación. Se secaron las almendras fermentadas durante seis días. Posteriormente, se molió una parte de las muestras, se tamizó (≤ 42 de malla) y desgrasó de acuerdo con el método de extracción de Soxhlet (IOCCC, 1996 /26/) y se almacenó bajo refrigeración a -20 °C hasta su análisis. Otra parte de las muestras fermentadas y secas se sometió a torrefacción a 110 °C por 25 min, se molió, tamizó y desgrasó. Todas las muestras fueron suministradas en recipientes sellados de PTFE.

Extracción de los analitos de las muestras de cacao y derivatización

En un tubo de ensayo se pesaron 0,800 g de polvo de cacao desgrasado y se sometieron a un proceso de extracción con 15 mL de agua desionizada (18 Ω). El tubo se colocó en un baño ultrasónico a 60 °C durante 15 min. El extracto obtenido se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 2 000 r.p.m. El sobrenadante se transvasó a un matraz aforado de 25 mL, se enrasó con agua y se filtró al vacío utilizando filtros Millipore de 0,22 μm (Waters Corporation, Milford, Massachussets USA). Se tomaron 200 μL del filtrado en un tubo de ensayo para someterlos a la reacción de derivatización de los analitos, de acuerdo al siguiente protocolo.

En primer lugar, el volumen del filtrado se llevó a sequedad en un baño de agua a 80 °C con flujo de N₂ puro y seco. Posteriormente, el residuo se reconstituyó en 25 µl de acetonitrilo, se trasvasó a un vial de vidrio con tapa y se le adicionaron 100 µL de MSFTA. La mezcla se agitó y sometió a irradiación con microondas en un horno de microondas doméstico (LG Intelowave, MS-0745V) a una potencia de 630W durante 60 s. Por último, los derivados se analizaron en el sistema cromatográfico propuesto.

• Resultados y discusión

Optimización de la reacción de derivatización

La reacción de derivatización de glucosa, fructosa y sacarosa se realizó mediante sililación utilizando el reactivo MSTFA. El mecanismo de esta reacción (figura 1) corresponde al de una sustitución nucleofílica SN₂, sobre el átomo de silicio del trimetilsilil del agente derivatizante.

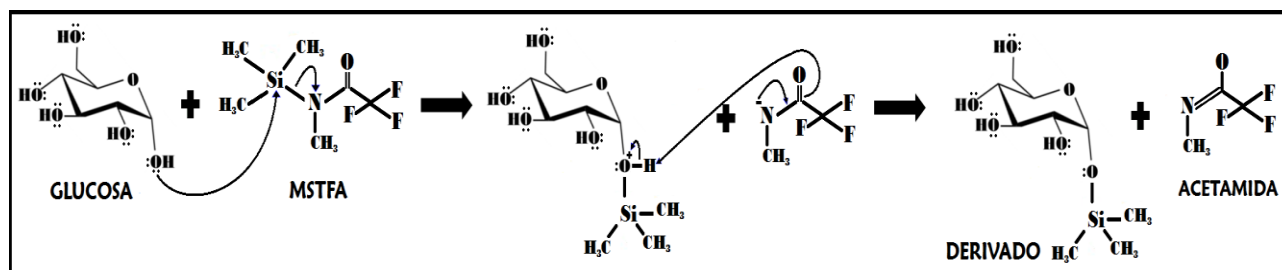


Fig. 1. Mecanismo de la reacción de derivatización

El grupo saliente acetamida, más electronegativo, facilita la reacción de sustitución SN₂, lo que trae consigo la disminución del tiempo de reacción. Se utilizó la radiación de microondas como forma de calentamiento.

Los parámetros a optimizar al momento de utilizar las MW son la potencia de irradiación, que establece la temperatura a la que se realizará la reacción y el tiempo de reacción. Para este trabajo se estudiaron 4 tiempos de reacción (30, 60, 90 y 120 s) a tres potencias de irradiación 210, 420 y 630 W, correspondientes a una potencia baja, intermedia y alta, respectivamente. Los resultados obtenidos para cada analito se observan en la figura 2.

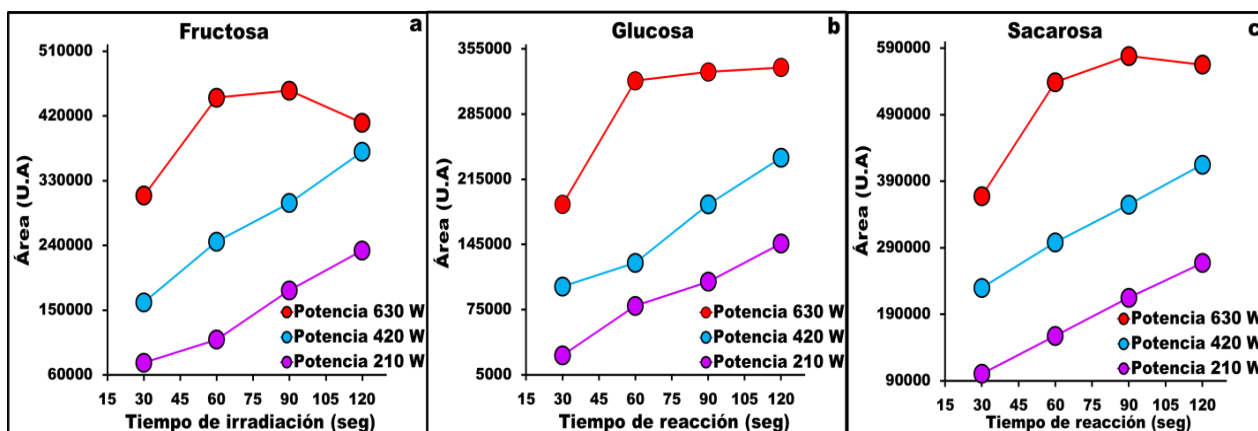


Fig. 2 Efecto del tiempo de irradiación con microondas a tres potencias distintas para la reacción de sililación de una mezcla en acetonitrilo de 5 $\mu\text{g/mL}$) de fructosa (a), glucosa (b) y sacarosa (c)

Se puede apreciar, en general, como a medida que se incrementa el tiempo de irradiación tiene lugar un aumento progresivo en el área de pico de cada analito, con un máximo al utilizar una potencia de 630 W. Adicionalmente, se observa que al usar esta potencia de irradiación la reacción de derivatización para la fructosa y la glucosa presenta un máximo a los 60 s y a valores superiores el cambio no es significativo. Se estableció como tiempo óptimo de irradiación 60 s a una potencia de 630 W para el resto de los análisis. Para corroborar que el calentamiento por MW no disminuía la eficiencia de la reacción de derivatización, se realizó la reacción de sililación de los analitos empleando el calentamiento convencional en un baño termostatzado a 70 °C durante 3 horas /24/. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en el gráfico de la figura 3.

Se puede observar que el empleo de las MW incrementó significativamente la velocidad de la reacción, ya que las áreas de los picos de los derivados de cada analito fueron mayores que las obtenidas con calentamiento convencional. En consecuencia, se puede decir que el uso de radiación por MW como forma de calentamiento permitió disminuir significativamente los tiempos de reacción de 3 horas a 60 s, sin afectar el rendimiento de reacción.

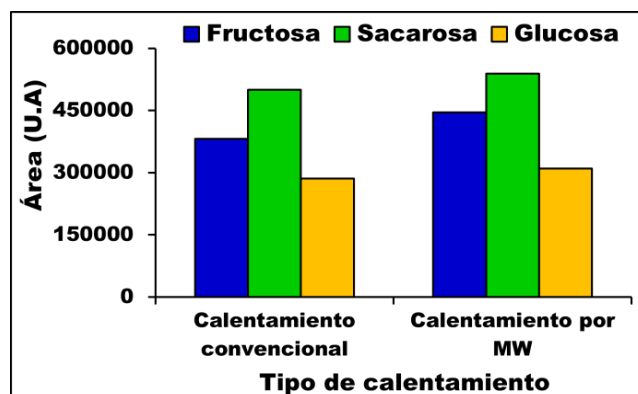


Fig. 3 Comparación de las áreas de los derivados obtenidos en la reacción de derivatización de una solución de fructosa, glucosa y sacarosa en acetonitrilo de 5 $\mu\text{g/mL}$ por calentamiento convencional (3 horas a 70 $^{\circ}\text{C}$) y por MW (60 s a 630W)

Optimización de la separación cromatográfica

La separación de los analitos se realizó en una columna capilar de sílice, fundida con un 5% fenil, 95% metilpolisiloxano (VA- 5MS) de 30 m \times 0,25 mm, con un espesor de película de 0,25 μm , suministrada por VARIAN. El programa de temperatura del horno que permitió la mejor resolución de los derivados fue de 100 $^{\circ}\text{C}$ (3 min) hasta 170 $^{\circ}\text{C}$ (5 min) a una velocidad de calentamiento de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y luego hasta 300 $^{\circ}\text{C}$ (3 min) a 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Se utilizó Helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector se fijó en 280 $^{\circ}\text{C}$ y se utilizó en la modalidad de inyección splitless, con una apertura de la válvula fijada en 0,7 min. El detector de masas se trabajó bajo la forma de impacto electrónico (70 eV). Las temperaturas de la línea de transferencia, manifold y trampa de iones fueron de 230 $^{\circ}\text{C}$, 40 $^{\circ}\text{C}$ y 280 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. En la figura 4 se muestran los cromatogramas obtenidos para una mezcla de patrones de glucosa, fructosa y sacarosa a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ (fig. 4.a) y para una muestra de cacao (fig. 4.b).

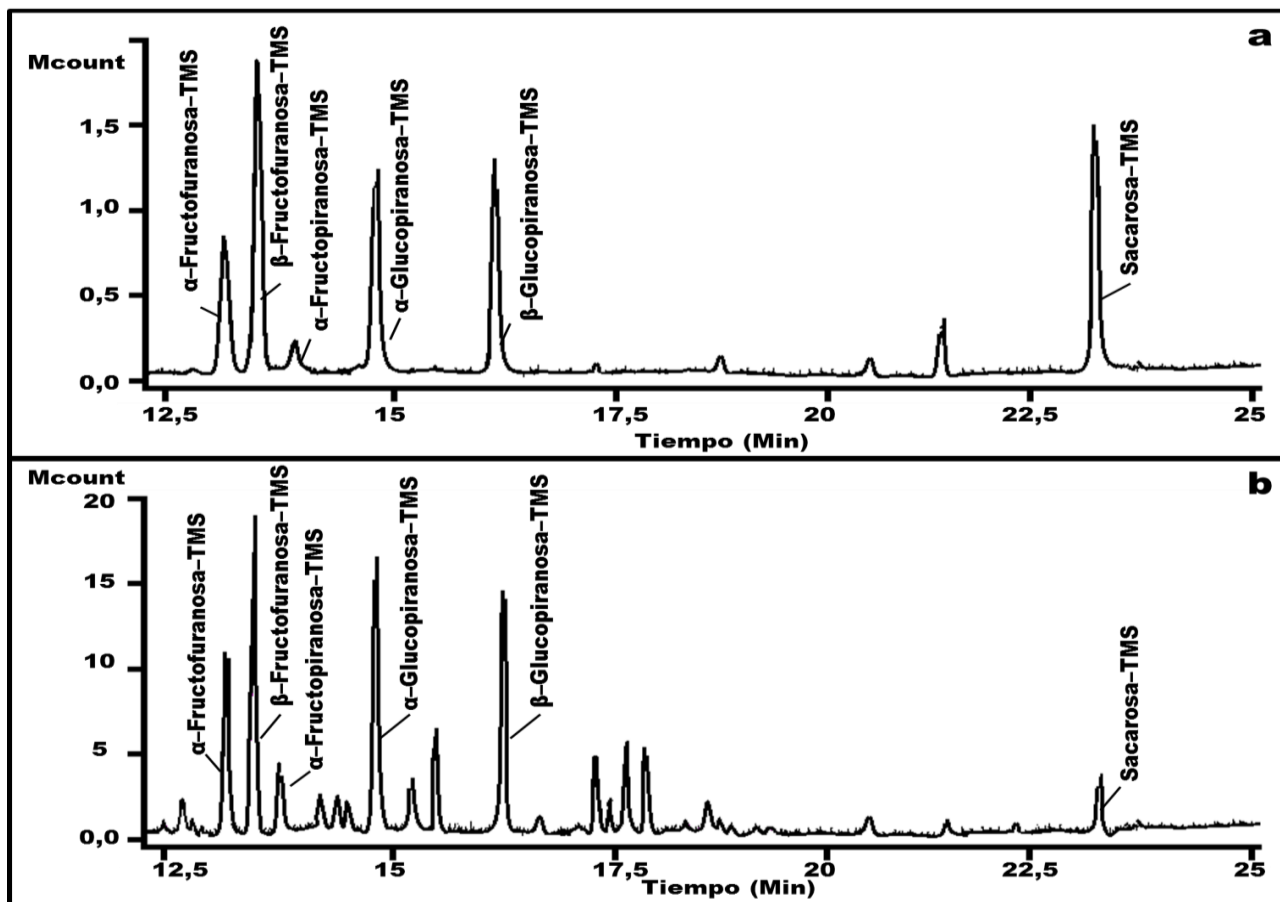


Fig. 4 Cromatogramas obtenidos bajo las condiciones optimizadas para un volumen de inyección de 1 μ L de (a) solución patrón de analitos derivatizados de concentración 0,5 μ g/mL y (b) una muestra de cacao

La identificación de cada analito se llevó a cabo inyectando de manera individual cada uno de los patrones derivatizados. Se puede observar la presencia de tres picos (13,48; 13,61 y 13,75 min) para el derivado TMSi-fructosa, los cuales se han asociado al predominio de las formas anoméricas de este analito, que presentan propiedades físicas diferentes, lo que permite su separación por CG. Los dos primeros picos (13,48 y 13,61 min) presentaron el mismo espectro de masas (fig. 5a y 5b), cuyo ion de fragmentación más abundante fue m/z 217 asociado a las formas α - y β - furanosa de la TMS-fructosa /24, 27, 28/. En el caso del tercer pico (13,75 min), su espectro de masas mostró una disminución en el ion de fragmentación m/z 217 y la aparición de los iones m/z 204 y 191, que se asocian a la α -piranososa de la TMSi-fructosa (fig. 5c) /24, 27, 28/.

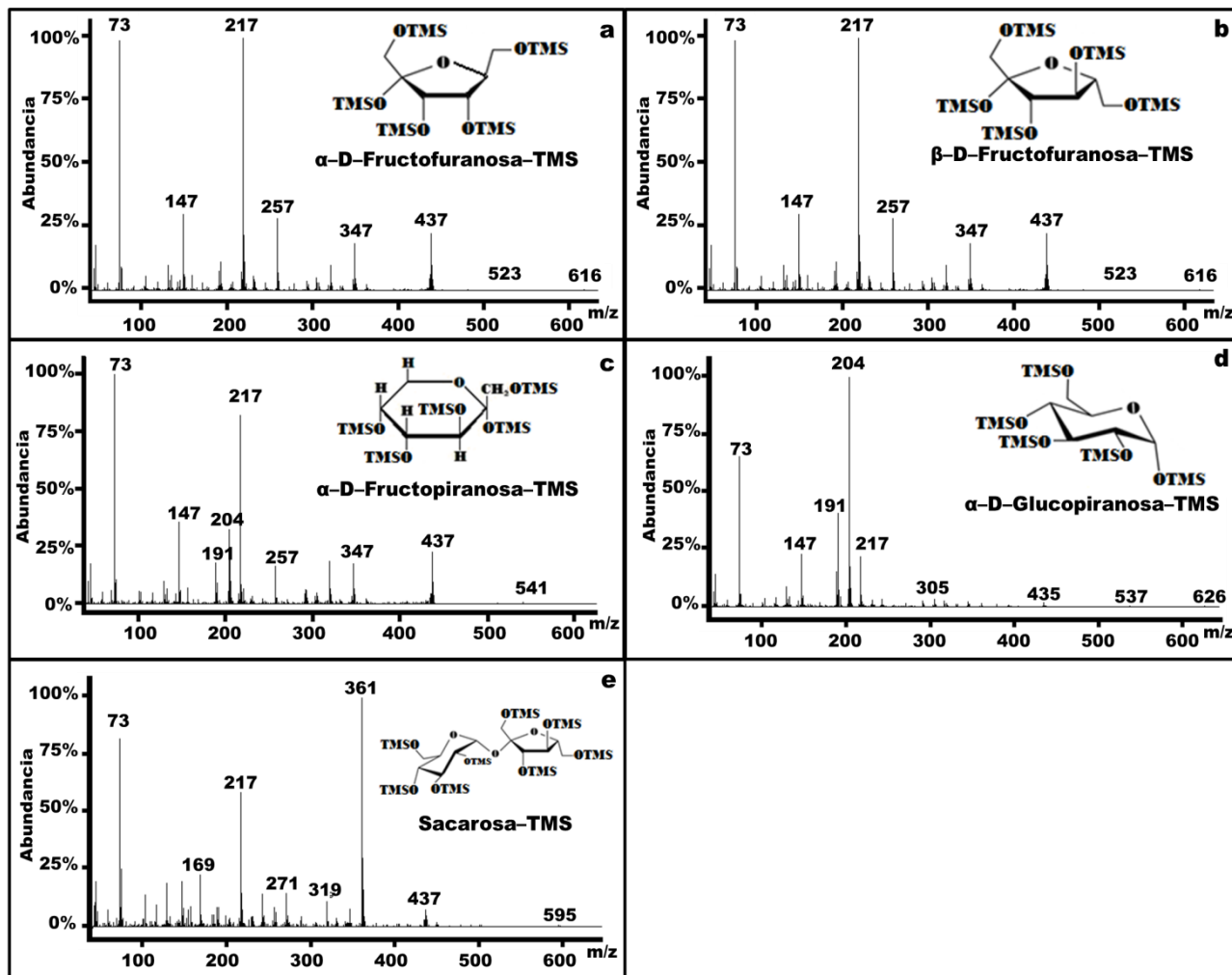


Fig. 5 Espectros de masas obtenidos para los derivados con MSTFA de: fructosa (a, b y c), glucosa (d) y sacarosa (e)

El mismo protocolo se utilizó para la identificación de los picos asociados a los derivados de la glucosa y sacarosa (figuras 5d y 5e). En la tabla 1 se resumen los tiempos de retención, los iones de fragmentación predominantes y los anómeros asociados a cada pico de los derivados de los analitos.

Tabla 1. Tiempos de retención e iones de fragmentación de los trimetilsilil derivados

Compuesto	Tiempo de retención (min)	m/Z
Fructosa-TMS	13,48 (α -furanosa)	217 , 147
	13,61 (β -furanosa)	
	13,75 (α -piranosa)	217 , 204, 191, 147
Glucosa-TMS	14,83 (α -piranosa)	204 , 191, 217
	15,89 (β -piranosa)	
Sacarosa-TMS	23,93	217, 361

Validación del método

La validación del método se realizó evaluando la linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y límites de cuantificación para la fructosa, glucosa y sacarosa.

La precisión del método se evaluó para 5 réplicas de los derivados de soluciones mezclas de patrones de los analitos a diferentes niveles de concentración durante un mismo día y en diferentes días. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2, donde se puede apreciar un $CV < 3,25\%$ ($n = 5$) para los estudios realizados en un misma día, lo que indica una buena repetibilidad instrumental y de la reacción de derivatización. En el caso de los estudios de precisión en días diferentes, se obtuvo un $CV < 3,31\%$ ($n=5$) para todos los casos que demostró una buena estabilidad del sistema cromatográfico.

La exactitud del método se estimó realizando estudios de recuperación de los analitos desde las muestras de cacao. Para ello se analizaron por el método propuesto muestras de cacao enriquecidas a diferentes niveles de concentración (tabla 2). Para todos los casos los valores de los porcentajes de recuperación estuvieron comprendidos en el intervalo 98-108 %, con un coeficiente de variación $< 3,68\%$ ($n = 5$). Estos resultados comprobaron una buena exactitud del método, ya que los valores de los porcentajes de recuperación son cuantitativos. Por otra parte, la buena exactitud del procedimiento descrito indicó el alto rendimiento del procedimiento de extracción y de la reacción de derivatización de los analitos.

Los estudios de linealidad y del efecto de la matriz en el análisis se realizaron a través de la construcción de curvas de calibrado de soluciones patrones de los azúcares en un intervalo de

concentración entre 1,0-30,0 $\mu\text{g/mL}$ y de muestras de cacao enriquecidas a los mismos niveles de concentración utilizando el método de adición estándar.

Tabla 2. Características analíticas del método CG-EM para la determinación de fructosa, glucosa y sacarosa en soluciones patrones y muestras de cacao

ANALITO	FRUCTOSA		GLUCOSA		SACAROSA	
	Patrón	Muestra	Patrón	Muestra	Patrón	Muestra
Intervalo lineal ($\mu\text{g/mL}$)	1,0-30,0	1,0-30,0	1,0-30,0	1,0-30,0	1,0-30,0	1,0-30,0
Ecuación de la recta	48 966 x	48 899 x + 4 ^{e+5}	23 924 x	23 888 x + 5 ^{e+5}	44 252 x	44 304 x + 3 ^{e+5}
Coefficiente de correlación (r)	0,996 6	0,999 4	0,993 9	0,999 5	0,998 9	0,999 8
Reproducibilidad mismo día (5,15,20 $\mu\text{g/mL}$) %C.V (n = 5)	3,10	3,25	3,11	2,99	2,80	3,02
	2,25	2,43	2,03	2,34	1,29	2,55
	2,49	3,11	2,41	2,76	1,63	2,21
Reproducibilidad entre días (5,15,20 $\mu\text{g/mL}$) % C.V (n = 5)	3,01	2,56	2,45	2,99	2,22	2,78
	2,89	3,02	1,78	2,21	1,98	2,30
	2,76	3,31	3,02	3,21	2,56	2,22
% de recuperación (5, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$) (n=5)	98,5 \pm 2,06		99,0 \pm 3,68		99,0 \pm 2,76	
	98,0 \pm 2,33		107,0 \pm 3,01		102,0 \pm 3,05	
	108,0 \pm 3,11		101,0 \pm 2,99		103 \pm 3,67	
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	0,08		0,08		0,09	
Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	0,04		0,04		0,06	

Cada curva de calibrado incluyó una serie de siete puntos y un blanco medidos un mínimo de tres veces. Los resultados mostraron que las curvas de calibrado fueron lineales en el intervalo de concentración estudiado, con $r > 0,9939$ para todos los casos. Por otra parte, la comparación de las pendientes de las curvas de calibración de los estándares y de la adición estándar no presentó diferencias significativas ($P < 0,05$). Este comportamiento permitió concluir que no existía interferencia de la matriz en el análisis y que se podían evaluar los niveles de concentración de glucosa, fructosa y sacarosa en las muestras de cacao utilizando la curva de calibrado de cada uno de estos patrones.

Los límites de detección definidos como la concentración de los analitos que cumplen con una relación señal:ruido de 3:1 con una buena reproducibilidad y exactitud, fueron 0,04; 0,04 y 0,06 $\mu\text{g/mL}$ para la fructosa, glucosa y sacarosa respectivamente. Para el caso del límite de cuantificación definido como la concentración de analito que proporciona un área de pico que guarda una relación 10:1 con respecto al ruido de fondo (señal:ruido) se obtuvieron valores de 0,09 $\mu\text{g/mL}$ para la sacarosa y de 0,08 $\mu\text{g/mL}$ para la fructosa y la glucosa respectivamente.

• Aplicación del método desarrollado a muestras de cacao

El método propuesto se aplicó a la determinación de fructosa, glucosa y sacarosa en 90 muestras de diferentes variedades de cacao criollo venezolano tomadas antes y durante los tres días de fermentación y posterior al tostado. En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos, donde se graficó el contenido de fructosa, glucosa y sacarosa en función de los días de fermentación para cada variedad estudiada. Se puede apreciar como, a medida que transcurre la fermentación, el contenido de sacarosa disminuye, mientras que el de los azúcares reductores (glucosa y fructosa) aumentan, hasta alcanzar un máximo entre el segundo y el tercer día de fermentación.

Los granos de cacao sin fermentar ($t_f = 0$) presentaron un alto contenido de sacarosa entre 8 y 12 g/Kg, que representó cerca del 95 % del contenido de azúcares totales. Por su parte, el contenido para la glucosa se encontró entre 0,097 y 0,375 g/kg, y para la fructosa entre 0,083 y 0,357 g/kg, que representó menos del 5% restante de los azúcares totales presentes en los granos. Sin embargo, al final de la fermentación, predominaron los azúcares reductores, donde la fructosa fue

el azúcar mayoritario con un contenido entre 2,2 y 3,8 g/kg, seguido de la glucosa 0,78-1,05 g/kg, mientras que el contenido de sacarosa estuvo entre 0,78 y 1,30 g/kg para las distintas variedades de cacao.

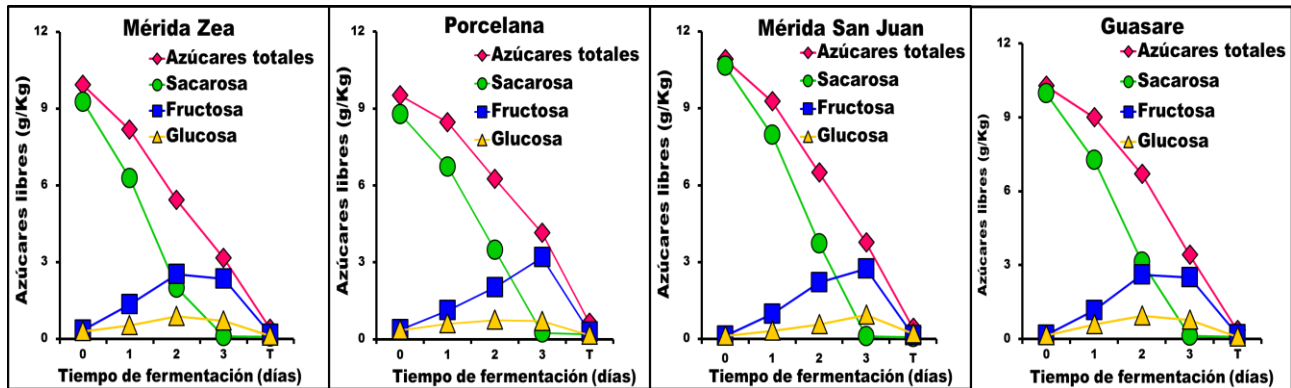


Fig. 6 Perfil del contenido de fructosa, glucosa y sacarosa durante el proceso de fermentación y tostado en las variedades de cacao criollos venezolanos

Estos resultados demuestran que la sacarosa se consume durante los 3 días de fermentación, comportamiento que podría atribuirse a la hidrólisis enzimática de la sacarosa, por la acción de la enzima invertasa /29-31/. Durante la fermentación ocurre la muerte del embrión y se origina una serie de reacciones bioquímicas y enzimáticas que conducen a una modificación en la composición química de los granos, lo que favorece la formación tanto de la fructosa como de la glucosa, precursores del aroma y sabor del cacao. Comportamientos similares han sido reportados por varios autores. Reineccius y col /32/ estudiaron estos azúcares en granos de cacao provenientes de Trinidad; su análisis arrojó un contenido de 15,8 g/kg para la sacarosa y trazas de fructosa, glucosa y otros azúcares reductores en las almendras sin fermentar. Por su parte, Berbert /33/ reporta que el contenido de sacarosa en los granos sin fermentar representa alrededor del 90 % (24,8 g/kg) de los azúcares totales, mientras que la fructosa y la glucosa solo contribuyen con el 6 %. Hashim y col /30/ también reportaron un predominio de la sacarosa: 18,78 g/kg correspondiente a un 95 % de los azúcares totales en los granos de cacao sin fermentar y un bajo contenido de fructosa y glucosa de 0,33 g/kg y 0,21 g/kg respectivamente.

Por otra parte, algunos investigadores /29, 30, 32/ han reportado que el contenido de azúcares reductores o de sacarosa al final de la fermentación puede significar un criterio para evaluar el proceso de fermentación del cacao. Según Hashim /30/, cuando las muestras de cacao presentan un contenido de sacarosa al final de la fermentación menor a 1 g/kg se habla de una buena fermentación para estos granos. Otros utilizan la relación fructosa/glucosa para evaluar el grado de fermentación de los granos, un valor de la relación de 1:1 (p/p) se asocia a granos poco o no fermentados y 2:1 a granos ligeramente fermentados, es decir, a medida que se incrementa la relación a favor de la fructosa, mayor será el grado de fermentación que presenten los granos de cacao /32/. En nuestro caso, los niveles de sacarosa disminuyeron a valores entre 0,78 y 1,30 g/kg y la relación fructosa/glucosa fue ≥ 3 para todos los casos, lo que demuestra que los granos de los cacaos estudiados en este trabajo fueron sometidos a un adecuado proceso de fermentación.

En este punto es importante indicar que, si bien la tendencia de los resultados de este trabajo concuerda con lo reportado en la bibliografía, se observaron diferencias en las cantidades individuales para cada analito, que pueden atribuirse principalmente al genotipo de los granos de cacao estudiados en cada uno de estos trabajos y a las diferencias entre las formas de realizar los procedimientos de cosecha y fermentación.

En la figura 7 se han agrupado los resultados obtenidos en un gráfico de barras donde se muestra el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa para el día cero (sin fermentar) y para el último día de fermentación (día 3) para las diferentes variedades de cacao estudiadas.

Se puede observar que a mayor contenido de sacarosa en los granos sin fermentar, mayor será el contenido de fructosa y glucosa al final de la fermentación. Adicionalmente, se pueden apreciar diferencias significativas en el contenido de los azúcares entre las variedades Merideño San Juan y Zea que son cacaos genéticamente equivalentes, pero cultivados en zonas diferentes. Estas diferencias se pueden atribuir a diferencias en las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrolló el cultivo y la cosecha. Zambrano y col /34/ estudiaron algunos parámetros asociados con los compuestos de aroma y sabor para estos cacaos y reportaron diferencias en el contenido de grasas, azúcares totales, pirazinas, cafeína y teobromina, justificando que las diferencias en las condiciones edafoclimáticas generaron cambios en el comportamiento químico de los precursores de aroma y sabor.

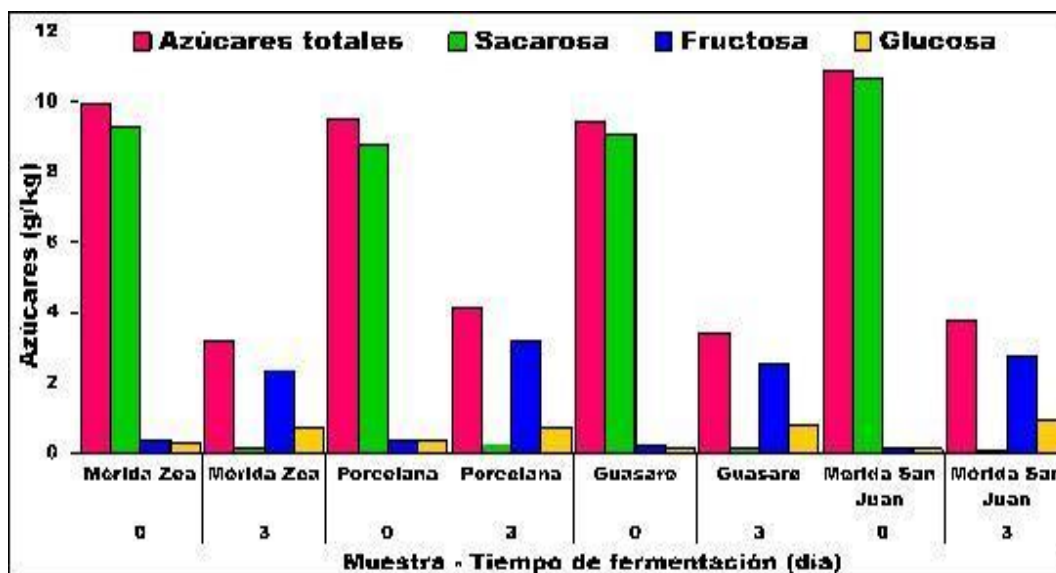


Fig. 7 Variación del contenido de azúcares entre el primer y último día de fermentación para las 4 variedades de cacao criollo venezolano

Una vez finalizada la fermentación de los granos de cacao se someten a un proceso de torrefacción o tostado, donde se expresa el sabor y aroma final a chocolate. Durante esta etapa se agregan nuevos compuestos volátiles a la fracción aromática, ya sea aumentando el contenido de algunos que ya estaban disponibles o disminuyendo el nivel de otros /35/. Varios trabajos realizados sobre la caracterización del impacto de los compuestos volátiles sobre el aroma del cacao reflejan la importancia de la fermentación y el secado en la expresión de los materiales en la calidad aromática /35-38/. Es decir, que sin los precursores necesarios y en las cantidades adecuadas como resultado de una buena fermentación, la torrefacción no puede cumplir a cabalidad su función de culminar el desarrollo aromático, lo cual limita la fracción volátil en recepción sensorial del aroma y sabor a chocolate. Durante esta etapa, se observó una disminución muy significativa del contenido de los azúcares reductores (fig. 5), como consecuencia de su participación en la reacción de Maillard, durante el tostado, para la formación de los compuestos heterocíclicos, como las pirazinas, con aromas y sabores característicos /39/.

• Conclusiones

Se comprobó un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas que representa una buena alternativa para evaluar selectivamente el perfil de sacarosa, glucosa y fructosa en muestras de cacao.

El empleo de sonicación durante la extracción de los analitos con agua de las muestras de cacao favoreció el procedimiento, puesto que disminuyó el tiempo de extracción de 30 a 15 minutos con relación a lo reportado en la bibliografía. Se utilizó MSTFA como agente derivatizante, que transformó a los analitos polares en derivados volátiles y térmicamente estables para su separación e identificación por CG-EM. La reacción se asistió con irradiación por MW, lo que permitió disminuir los tiempos de reacción de 1 hora a 1 min.

Los distintos parámetros de validación aplicados al método propuesto indicaron una buena precisión y estabilidad del sistema cromatográfico empleado y confirmaron que los procedimientos de extracción utilizados fueron eficaces.

El método se aplicó con éxito en el análisis de muestras de cacao donde, de forma general, se pudo observar que, a medida que transcurre la fermentación de los granos, tiene lugar la hidrólisis de la sacarosa, lo que genera un aumento del contenido de fructosa y glucosa. El contenido de fructosa en las muestras analizadas tiende encontrarse en cantidades tres a cuatro veces mayores que la glucosa al final de la fermentación, lo que indica un buen proceso de fermentación. Finalmente se pudo comprobar que la acumulación de los azúcares reductores (fructosa y glucosa) durante la fermentación tiene un efecto muy significativo en la formación del aroma del cacao durante el proceso de torrefacción.

• Bibliografía

1. SCHAWN, R. F.; ROSE, A. H.; BOARD, R. G. "Microbial fermentation of cacao beans with emphasis on enzymatic degradation of the pulp". *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*. 1995, vol. 79, p. 96-107.
2. MENDEL, B.; KEMP, A.; MYERS, D. K. "A colorimetric Micro-method for the Determination of Glucose". *Biochemical Journal*. 1954, vol. 56, núm. 4, p. 639-646.

3. DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. A.; REBERS, P. A.; SMITH, F. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *Analytical Chemistry*. 1956, vol. 28, núm. 3, p. 350-356.
4. THAVANINGKUL, P.; SUPPAPITNARM, P. "Batch Injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection". *Biosensors & Bioelectronics*. 1999, vol. 14, núm. 1, p. 19-25.
5. FILIPIAK, M.; FLUDRA, K.; GOŚCIMIŃSKA, E. "Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode". *Biosensors & Bioelectronics*. 1996, vol. 11, núm. 4, p. 355-364.
6. WANG, H. CH., et al. "A bis-boronic acid modified electrode for the sensitive and selective determination of glucose concentrations". *Analyst*. 2013, vol. 138, núm. 23, p. 7146-7151.
7. BURATTI, S.; BRUNETTI, B.; MANNINO, S. "Amperometric detection of carbohydrates and thiols by using a glassy carbon electrode with Co oxide/multi-wall carbon nanotubes catalytic system". *Talanta*. 2008, vol. 76, núm. 2, p. 454-457.
8. DEO, R. P.; WANG, J. "Electrochemical detection of carbohydrates at carbon-nanotubes modified glassy carbon electrodes". *Electrochemical Communication*. 2004, vol. 6, núm. 3, p. 284-287.
9. LETHANH, H.; LENDL, B. "Sequential injection Fourier transform infrared spectroscopy for the simultaneous determination of organic acids and sugars in soft drink employing automated solid phase extraction". *Analytica Chimica Acta*. 2000, vol. 422, núm. 1, p. 63-69.
10. SARTINI, R.; OLIVEIRA, C. C. "Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry". *Analytical Chimica Acta*. 1998, vol. 366, núm. 1-3, p. 119-125.
11. KRONKA, E.; PAIM, A.; BOAVENTURA, F.; COSTA, J.; LAPA, R. "Determination of glucose in soft drink and sugar-cane juice employing a multi commutation approach in flow system and enzymatic reaction". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1999, vol. 364, núm. 4, p. 358-361.

12. CHEN, Z.; HIBBERT, D. "Simultaneous amperometric and potentiometric detection of sugars, polyols and carboxylic acids in flow systems using copper wire electrodes". *Journal of Chromatography A*. 1997, vol. 766, núm. 1-2, p. 27-33.
13. MONTERO, M.; RODRÍGUEZ, M.; SÁNCHEZ, G. "Analysis of Low Molecular Weight Carbohydrates in Food and Beverages: A Review". *Chromatographia*. 2004, vol. 59, núm. 1-2, p. 15-30.
14. RUIZ MATUTE, A.; HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, O.; RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, S.; SANZ, M.; MARTÍNEZ CASTRO, I. "Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses". *Journal of Chromatography B*. 2011, vol. 879, núm. 17-18, p. 1226-1240.
15. LILLA, Z.; SULLIVAN, D.; ELLEFSON, W.; WELTON, K.; CROWLEY, R. "Determination of "Net Carbohydrates" using High-Performance Anion Exchange Chromatography". *Journal of American of Analytical Chemistry International*. 2005, vol. 88, núm. 3, p. 714-719.
16. SENILA, L.; GOG, A.; SENILA, M.; ROMAN, C.; SILAGHI DUMITRESCU, L. "Analysis of Carbohydrates obtained from Wood by Gas Chromatography-Mass Spectrometry". *Rev. Chim. (Bucharest)*. 2011, vol. 62, núm. 2, p. 149-153.
17. MÍGUEZ, M.; DE LA MONTAÑA, J.; GARCÍA, J. "HPLC determination of sugar in varieties of chestnut fruits from Galicia (Spain)". *Journal of Food Composition and Analysis*. 2004, vol. 17, núm. 1, p. 63-67.
18. BERNAL, J.; DEL NOZAL, M.; TORIBIO, L.; DEL ALAMO, M. "HPLC Analysis of Carbohydrates in Wines and Instant Coffees Using Anion Exchange Chromatography Coupled to Pulsed Amperometric Detection". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, vol. 44, núm. 2, p. 507-511.
19. KATONA, Z. S.; SASS, P.; MOLNÁR-PERL, I. "Simultaneous determination of sugar, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. 1999, vol. 847, núm. 1-2, p. 91-102.
20. CHRISTIAN, G. *Química analítica*. 6a ed. México. Mc Graw Hill, 2009. 828 p. ISBN: 0-471-21472-8

21. LITTLE, J. L. "Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them". *J. Chromatography A*. 1999, vol. 844, núm. 1-2, p. 1-22
22. SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B. M. R.; WENNIG, R.; MILLET, M. "Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis". *Talanta*. 2009, vol. 77, núm. 4, p. 1473-1482.
23. RUIZ MATUTE, A. I.; BROKL, M.; SORIA, A. C.; SANZ, M. L.; MARTÍNEZ CASTRO, I. "Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of tri- and tetrasaccharides in honey". *Food Chemistry*. 2010, vol. 120, núm. 2, p. 637-642.
24. MEDEIROS, P.; SIMONEIT, B. "Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry". *J. Chromatography A*. 2007, vol. 1141, núm. 2, p. 271-278.
25. PRADO GONJAL, J.; MORÁN, E. "Síntesis asistida por microondas de sólidos inorgánicos". *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 2011, vol. 107, núm. 2, p. 129-136.
26. INTERNATIONAL OFFICE OF COCOA, CHOCOLATE AND SUGAR CONFECTIONARY (IOCCC). *Determination of the Fat Content of Cocoa Powder by Soxhlet Extraction*. Analytical Method. Núm. 37. 1990.
27. MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M.; MIHAIESCU, D. E.; ISTRATI, D.; MOGOSANU, D. E.; BUTEICA, S. A. "Identification of sugars from *Silene Albae Herba* using GC-MS Technique". *U.P.B. Sci. Bull. Serie B*. 2011, vol. 73, núm. 2, p. 101-108.
28. SIMONEIT, B., et al. "Sugar-dominant water soluble organic compounds in soils and characterization as tracers in atmospheric particulate matter". *Environmental Science & Technology*. 2004, vol. 38, núm. 22, p. 5939-5949.
29. ROHAN, T. A.; STEWART, T. "The precursors of Chocolate aroma: Production of Reducing Sugars during Fermentation of Cocoa Beans". *J. Food Science*. 1967, vol. 32, núm. 4, p. 399-402.
30. HASHIM, P.; SELAMAT, J.; MUHAMMAD, S. K. S.; ALI, A. "Changes in Free Amino Acid, Peptide-N, Sugar and Pyrazine Concentration during Cocoa Fermentation". *J. Science Food and Agriculture*. 1998, vol. 78, núm. 4, p. 535-542.

31. DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. 2a ed. Washington, USA: American Society for Microbiology, 2001. 872 p. ISBN: 1-55581-208-2.
32. REINECCIUS, G.; ANDERSEN, D.; KAVANAGH, T. "Identification and quantification of the free sugar in cocoa beans". *J. Agricultural and Food Chemistry*. 1972, vol. 20, num. 2, p. 199-202.
33. BERBERT, P. R. F. "Contribuição para o conhecimento dos açúcares componentes da amêndoa e do mel de cacão". *Review of Theobroma (Brazil)*. 1979, vol. 9, p. 55-61
34. ZAMBRANO, A., et al. "Evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao Criollo Merideño durante la fermentación en dos condiciones edafoclimáticas". *Agronomía Tropical*. 2010, vol. 60, núm. 2, p. 211-219.
35. CROS, E. "Factores condicionantes de la calidad del cacao". En: *Memorias del 1er Congreso Venezolano del Cacao y su Industria*. Noviembre 1997. Maracay, Estado Aragua, Venezuela. p. 6-32.
36. CROS, E.; JEANJEAN, N. "Cocoa quality: effect of fermentation and drying". *Plantations, recherché, développement*. 1995, vol. 2, núm. 3, p. 21-27.
37. VOIGT, J.; BIEHL, B. "Precursors of Cocoa-Specific Aroma Components are Derived from the Vicilin-Class (7S) Globulin of the Cocoa Seeds by Proteolytic Processing". *Botanica Acta*. 1995, vol. 108, núm. 4, p. 283-289.
38. COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; OUWERX, C.; COLLIN, S. "Use of Gas Chromatography–Olfactometry to Identify Key Odorant Compounds in Dark Chocolate. Comparison of Samples before and after Conching". *J. Agricultural and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, núm. 8, p. 2385-2391.
39. AFOAKWA, E. O.; PATERSON, A.; FOWLER, M.; RYAN, A. "Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, vol. 48, núm. 9, p. 840-857.