





LIBERTAD Y ORDEN
MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA
Y DESARROLLO TERRITORIAL



OFERTA Y POTENCIALIDADES DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DEL GÉNERO *THEOBROMA* EN EL ENRIQUECIMIENTO DE LOS SISTEMAS PRODUCTIVOS DE LA REGIÓN AMAZÓNICA

EDITORES

Luz Marina Melgarejo. PhD
María Soledad Hernández. PhD
Jaime Alberto Barrera. MSc
Marcela Carrillo. MSc

Melgarejo, Luz Marina; Hernández, María Soledad; Barrera, Jaime Alberto; Carrillo, Marcela.

Oferta y potencialidades de un banco de germoplasma del género *Theobroma* en el enriquecimiento de los sistemas productivos de la región amazónica. Luz Marina Melgarejo; María Soledad Hernández; Jaime Alberto Barrera; Carrillo, Marcela. Bogotá, Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas- Sinchi, Universidad Nacional de Colombia, 2006

1. THEOBROMA 2. COLECCIONES DE MATERIAL GENÉTICO 3. CONSERVACIÓN DE RECURSOS 4. AMAZONIA

ISBN: 958-97950-8-0

© Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – Sinchi
Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial
© Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología

Primera edición: Octubre de 2006

Producción editorial

Diagramación, fotomecánica, impresión y encuadernación:

Editorial Scripto Ltda.

Cra. 33 No. 73-63, Bogotá D. C.

Tel: 240 16 97 Fax: 630 24 31

Reservados todos los Derechos

Queda rigurosamente prohibida su reproducción con fines comerciales.

Disponible en: Instituto Sinchi, calle 20 No. 5-44 Tel.: 444 20 77 - 283 67 55
www.sinchi.org.co

Impreso en Colombia

Printed in Colombia



LUZ MARINA MANTILLA CÁRDENAS
Directora General

ROSARIO PIÑERES VERGARA
Subdirectora Administrativa y Financiera

Equipo Técnico

Maria Soledad Hernández G.

Luz Marina Melgarejo M.

Jaime Alberto Barrera G.

Marcela Carrillo

Yovanny Moreno P.

Guillermo Vargas

Olga Lucia Rodríguez

Claudia Moratto

Diana Carolina Guerrero

Amanda Denis Leon

Claudia Elena Hernández L.

Sandra Calderón

Solanyi Hernández

Marby Baron

Andres Villada

Orlando Martínez

Yurani Montealegre

Johana Paola Parra



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

MOISES WASSERMANN LERNER
Rector

JORGE ERNESTO DURAN PINZON
Vicerrector General

FERNANDO MONTENGRO
Vicerrector Sede Bogotá

IGNACIO MANTILLA
Decano Facultad de Ciencias

FERNANDO ZALAMEA TRABA
Vicedecano Académico

JHON DONATO
Director Departamento de Biología

AGRADECIMIENTOS

A cada una de las entidades involucradas en el desarrollo del proyecto Oferta y potencialidades de un banco de germoplasma del género Theobroma en el enriquecimiento de los sistemas productivos de la región amazónica; Instituto Sinchi, Universidad Nacional de Colombia y Empresa Agrícola Paraíso.

Al profesor Luis Enrique Cuca del departamento de química de la Universidad Nacional de Colombia

A la Universidad de la Amazonia

A Colciencias por la financiación del proyecto de investigación

INTRODUCCIÓN

La palabra theobroma deriva del griego (theo = Dios y bromo = alimento) que significa alimento de los dioses. Se han descrito 22 especies de las cuales nueve son nativas de la Amazonia. El género *Theobroma* es típicamente tropical, distribuido a lo largo del hemisferio occidental entre 18°N y 15°S. Este género ampliamente difundido a través de la cuenca amazónica y la orinoquía, es uno de los más antiguos y con mayor potencial para su uso local, regional y mundial

El banco de germoplasma *ex situ* del género *Theobroma* custodiado por el Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI, se encuentra localizado en San José del Guaviare (Departamento del Guaviare, Colombia) y surge inicialmente como parte de una estrategia de soporte al desarrollo de sistemas productivos alternativos a los cultivos ilícitos, por medio del cual se generan opciones de producción sostenible ambiental y económica con recursos genéticos caracterizados de material nativo, promisorio y accesibles al cultivador.

La utilización sostenible de *Theobroma grandiflorum* (copoazú) y *Theobroma bicolor* (maraco o bacao), constituye una garantía rentable en la medida que exista una tecnología apropiada para su aprovechamiento y un acompañamiento técnico-científico para el manejo del cultivo y la agroindustria; es así que a través del desarrollo de los diferentes capítulos del libro se presentan resultados sobre las potencialidades de estas dos especies en el enriquecimiento de los sistemas productivos de la región.

El capítulo I muestra los resultados alcanzados del proceso de caracterización molecular, mediante el uso de las técnicas RAPD (*Random Amplified Polymor-*

pbic DNA) y AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), como una contribución al conocimiento de la variabilidad genética de las especies *T. bicolor* y *T. grandiflorum*, con el fin de generar herramientas y criterios para la selección y/o mejoramiento de aquellos materiales que puedan ser de mayor interés en el enriquecimiento de los sistemas productivos, capaces de soportar la demanda existente para producción de licor de cacao de buena calidad (chocolate y bacalate) y otros productos derivados, con miras al fortalecimiento agroindustrial de la región.

El capítulo II presenta los resultados de la Caracterización del crecimiento y desarrollo vegetativo de las especies *T. bicolor* y *T. grandiflorum* bajo condiciones de la Amazonia Colombiana, en el que se incluye monitoreo fitosanitario y manejo de las especies.

El capítulo III presenta los resultados de Crecimiento y desarrollo de los frutos de *T. bicolor* y *T. grandiflorum*, bajo condiciones de la Amazonia Norte Colombiana. Se reportan variables físicas (peso, longitud, diámetro del fruto), fisiológicas (intensidad respiratoria) y químicas (pH, grados Brix, índice de madurez, vitamina C) de los frutos durante precosecha y poscosecha.

El capítulo IV reporta resultados sobre el aprovechamiento de las semillas de los frutos de *Theobroma* bajo condiciones de la Amazonia Colombiana. Con un potencial reconocido y una creciente demanda los resultados presentados en este capítulo abren posibilidades reales de industrialización y acceso a mercados. Se presenta el proceso para la obtención de licor de cacao y chocolate de mesa de copoazú y maraco.

El capítulo V presenta Otras aplicaciones de los frutos y semillas de *T. bicolor* y *T. grandiflorum*, entre estas: caracterización fisicomecánica de semillas; extracción de la grasa (manteca) para producción de chocolate y diseño de un prototipo para la extracción de grasas de copoazú y maraco; extracción y caracterización fisicoquímica de los aceites contenidos en las semillas de copoazú y maraco y su posible utilización como fuentes alternativas de industria; cultivo *in vitro* para conservación de germoplasma.

ÍNDICE

1. Caracterización molecular de accesiones del banco de germoplasma del género <i>Theobroma</i> de la región amazónica colombiana	15
1.1 Banco de germoplasma del género <i>Theobroma</i>	15
1.2 Extracción de ADN de <i>T. grandiflorum</i> y <i>T. bicolor</i>	17
1.3 Protocolo de extracción de ADN obtenido para la caracterización de los materiales de <i>T. grandiflorum</i> Will ex Spreng (Shum) y <i>T. bicolor</i> H.B.K. del banco de germoplasma	18
1.4 Caracterización molecular mediante RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	20
1.5 Caracterización molecular mediante AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	32
1.6 Análisis comparativo del uso de RAPD y AFLP para el análisis de los materiales del banco de germoplasma del género <i>Theobroma</i>	47
2. Caracterización del crecimiento y desarrollo vegetativo de especies promisorias del género <i>Theobroma</i> bajo condiciones de la Amazonia colombiana	67
2.1 Copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i> (Will ex Spreng) Shum)	68
2.2 Bacao o Maraco (<i>Theobroma bicolor</i> H.B.K)	85
3. Crecimiento y desarrollo de los frutos de especies promisorias del género <i>Theobroma</i>, bajo condiciones de la Amazonia norte colombiana	109

3.1 Crecimiento y desarrollo de los frutos	109
3.2 Fisiología de la maduración del fruto	112
3.3 Maraco (<i>Theobroma bicolor</i>)	114
3.4 Copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>)	125
4. Aprovechamiento integral de las almendras de los frutos de especies promisorias del género <i>Theobroma</i> bajo condiciones de la Amazonia colombiana	139
4.1 La industria del chocolate	140
4.2 El proceso de obtención de chocolate	144
4.3 Procesamiento del cacao para la obtención de chocolate	144
4.4 Otras etapas de la producción del chocolate	153
4.5 Los cacaos amazónicos	157
4.6 Obtención de licor de COPOAZÚ (<i>Theobroma grandiflorum</i> (Will ex Spreng) Schum) y MARACO (<i>Theobroma bicolor</i> H.B.K.)	162
4.7 Determinación de puntos críticos en el proceso de molienda, conchado y atemperado de Maraco y Copoazú)	179
5. Otras aplicaciones	187
5.1 Determinación de algunas propiedades fisicomecánicas de las almendras para su aplicación en otros procesos	187
5.2 Diseño de un prototipo para la extracción de grasas a partir de almendras de Copoazú y Maraco	195
5.3 Evaluación del posible uso de grasas a partir de almendra de <i>T. grandiflorum</i>	200
5.4 Aprovechamiento bioenergético de las cáscaras de Copoazú y Maraco	202
5.5 Aprovechamiento de la pulpa extraída de los frutos de especies promisorias del género <i>Theobroma</i> en la Amazonia colombiana	205
5.6 Extracción y caracterización fisicoquímica de los aceites contenidos en las semillas de Copoazú y Maraco y su posible utilización como fuentes alternativas en la industria alimenticia	212
5.7 Estudio preliminar del establecimiento <i>In vitro</i> de Copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>) como alternativa de conservación y recuperación de materiales promisorios con potencial económico	213

1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL GÉNERO *Theobroma* DE LA REGIÓN AMAZÓNICA COLOMBIANA

Yovany Moreno¹, Luz Marina Melgarejo², Soledad Hernández², Lorena Quintero³, Guillermo Vargas³.

1.1 Banco de germoplasma del género *Theobroma*

El banco de germoplasma *ex situ* del género *Theobroma* custodiado por el Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI, se encuentra localizado en San José del Guaviare (Departamento del Guaviare, Colombia) y surge inicialmente como parte de una estrategia de soporte al desarrollo de sistemas productivos alternativos a los cultivos ilícitos, por medio del cual se intenta generar opciones de producción sostenible ambiental y económica con recursos genéticos caracterizados de material nativo, promisorio y accesibles al cultivador (Vargas y Argüelles, 2000).

El banco de germoplasma del género *Theobroma* contiene entradas o accesiones de las especies *T. grandiflorum* (19 años de establecido) y *T. bicolor* (5 años de establecido) (Vargas *et al*, 2002). Se ha realizado registro de algunas características botánicas y morfoagronómicas. Debido a la antigüedad del banco de *T. grandiflorum*, no existen los datos de pasaporte de los mate-

¹ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia

² Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

³ Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI

riales y se presume su procedencia de tres regiones geográficas diferentes: Iquitos (Ecuador), Belem do Pará (Brasil) y San José del Guaviare (Colombia) (G. Vargas, comunicación personal). Los materiales fueron clasificados en ecotipos dependiendo de sus características morfológicas y/o agronómicas: 12 grupos para *T. grandiflorum* (3001 al 3012) y 4 para *T. bicolor* (MB1 a MB4), algunos de ellos poseen características agronómicas de interés para llevar a cabo su explotación comercial (Vargas y Argüelles, 2000; Vargas *et al.*, 2002). En el caso de *T. bicolor*, solo se han logrado adquirir datos de las características botánicas de las diferentes entradas.

Dentro de los resultados de las caracterizaciones realizadas se presentaron individuos a los que no fue posible clasificar dentro de los diferentes grupos.

Se tienen de esta forma dos situaciones: la primera, en la cual algunos individuos no pudieron ser agrupados claramente con base en sus características morfoagronómicas y la segunda, la necesidad de adelantar y/o completar la clasificación del material disponible en algún nivel. Es así que la opción de complementar la caracterización del banco de germoplasma mediante el uso de marcadores moleculares es una herramienta útil y ventajosa en las labores de evaluación de la variabilidad genética, a razón que los descriptores morfológicos son sensibles a factores ambientales. Con base en esto, se utilizaron las técnicas RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) para llevar a cabo esta caracterización.

El presente capítulo, muestra los resultados alcanzados del proceso de caracterización molecular, como una contribución al conocimiento de la variabilidad genética de especies del género *Theobroma* en la región amazónica y en el banco de germoplasma, con el fin de generar herramientas y criterios para la selección y/o mejoramiento de aquellos materiales que puedan ser de mayor interés en el enriquecimiento de los sistemas productivos, capaces de soportar la demanda existente para producción de licor de cacao de buena calidad (Chocoazu y bacalate) y otros productos derivados, con miras a enriquecer la agroindustria regional amazónica.

Los materiales utilizados para la caracterización molecular del banco se presentan en la tabla 1.1

Tabla 1.1 Listado de los materiales utilizados para la caracterización molecular del banco de germoplasma del género *Theobroma* custodiado por el Instituto SINCHI. En el caso de los materiales de *T. grandiflorum* se muestra el número del material seguido del grupo morfoagronómico (# - 30XX) dependiendo de si el material ha sido clasificado.

<i>Theobroma grandiflorum</i>							
Banco de germoplasma Instituto SINCHI (Número de individuo - grupo morfoagronómico)							
1	34	71-3003	94-3005	123	153-3009	178-3009	203
2	35	72	99	125-3001	154-3004	179	205-3003
4	36	74-3003	100	126-3001	156-3001	180-3005	206
5	37-3002	75-3002	102-3012	131-3006	157-3001	181	208-3006
8	41	76-3006	103-3012	132-3002	158-3001	182	210-3008
9-3001	43-3011	79	104	133	163-3007	184	213
13	44	80	106-3004	134-3012	161-3007	185-3007	214
15	45-3003	83	107-3007	135	164	186	217
17	46	85	109-3010	137	166-3009	192-3010	220
19	47	86-3005	111-3003	141	169	194	222
23-3004	48-3003	87-3001	112	143	170-3009	195	224-3009
24	50-3006	88	114-3009	146-3005	171	196-3007	225-3009
26-3002	51-3006	89	115	148-3012	172	197-3001	226-3001
29	52	91-3005	116-3002	149	173	199	227
31	61	92	119-3005	151-3003	175-3004	201-3005	228
32-3002	69-3010	93-3008	120-3003	152-3010	177	202	229-3001
Materiales externos a la colección							
GG	Municipio Infrida, Dpto Guainía (Col)			GOL1	Leticia, Dpto Amazonas (Col)		
				GOL2	Leticia, Dpto Amazonas (Col)		
				GLS	Leticia, Dpto Amazonas (Col)		
<i>Theobroma bicolor</i>							
Banco de germoplasma Instituto SINCHI (Ecotipo - número individuo)							
Ecotipo MB1	Ecotipo MB2	Ecotipo MB3	Ecotipo MB4				
B1-1	B2-1	B3-1	B4-1				
B1-2	B2-2	B3-2					
B1-3	B2-3	B3-3					
B1-4	B2-4	B3-5					
B1-5	B2-6	B3-6					
B1-6							
Materiales externos a la colección							
BLS	Leticia Dpto Amazonas (Col)						

1.2 Extracción de ADN de *T. grandiflorum* y *T. bicolor*

Para la extracción de ADN a partir de los materiales de *Theobroma* fue necesario probar algunas metodologías a fin de obtener un protocolo que se adaptara a las condiciones del trabajo. Se evaluaron varios protocolos, entre estos los siguientes: Doyle y Doyle (1990), utilizado previamente para *T. grandiflorum* por Alves *et al.* (2003a); Dellaporta *et al.* (1983), reportado por Wilde *et al.* (1992) para *T. cacao*. Mediante el uso de estos protocolos se obtuvo un rendimiento para *T. grandiflorum*, de 4.25 µg de ADN

x g⁻¹ de tejido y 3.00 µg de ADN x g⁻¹ de tejido respectivamente, los cuales no son satisfactorios para los propósitos requeridos. Como consecuencia del bajo rendimiento en la extracción de ADN, se procedió a probar algunas de las modificaciones reportadas sobre estos, (Keb-Llanes *et al.*, 2002; Stein y Raoult, 1992; Szmidt, 2004) y algunos protocolos desarrollados particularmente para *T. cacao* (Perry *et al.* 1998, Couch y Fritz, 1990). Para el caso del protocolo de Couch y Fritz (1990), se utilizó únicamente el procedimiento para obtención de pellets nucleares en un buffer a pH 6.0 y posteriormente se extrajo el ADN de los núcleos mediante el protocolo de Doyle y Doyle (1990). Los resultados obtenidos con estos métodos tampoco fueron aceptables, en la mayoría de los casos por su rendimiento con valores similares o menores a los obtenidos inicialmente con los protocolos estándar o por la calidad del ADN obtenido (degradación) en el caso particular de la modificación del protocolo de Couch y Fritz (1990).

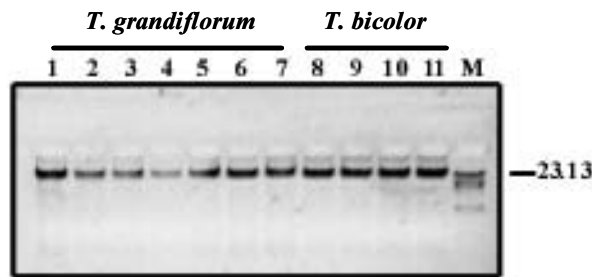
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se elevó la concentración del detergente CTAB del 2% al 3% en el buffer de extracción de Doyle y Doyle (1990) tal como lo sugieren dichos autores. Esta modificación permite extraer ADN tanto de *T. grandiflorum* como de *T. bicolor* de manera eficiente con rendimientos en promedio de 30.3 µg y 58.8 µg. de ADN x g⁻¹ de tejido respectivamente.

1.3 Protocolo de extracción de ADN obtenido para la caracterización de los materiales de *T. grandiflorum* Will ex Spreng (Shum) y *T. bicolor* H.B.K. del banco de germoplasma

Adicionar a 0.2 g de hojas maceradas 0.8 ml de buffer de extracción [CTAB 3%, NaCl 1.4M, 2-mercaptoetanol 0,2%, PVP-40 1%, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8.0] y dejar incubar a 65°C durante 60 min. Realizar una extracción adicionando 0.8 ml de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1) con agitación suave y recuperar la fase acuosa con posterior centrifugación a 1800g durante 10 min. Precipitar el ADN adicionando 0.6 ml de Isopropanol y centrifugar a 7000g durante 10 min. Adicionar 1 ml de solución de Acetato de Amonio 10 mM en Etanol al 76%, y centrifugar nuevamente a 7000g durante 10 min. Secar el pellet obtenido a temperatura ambiente y resuspender en 50 ml de buffer TE. Adicionar 1 ml de RNasa A (10 mg/ml) y dejar incubar a 37°C durante 30 min. Cuantificar el ADN

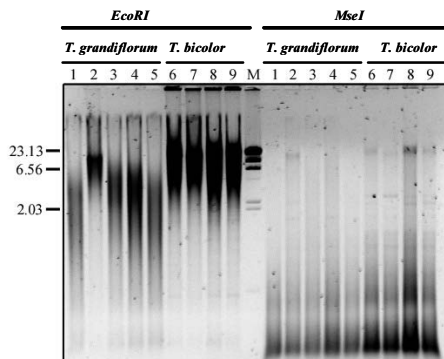
por fluorometría utilizando Hoescht dye en un fluorómetro DynaQuant 2000 (Hoefler), verificar su calidad por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, tinción con Bromuro de Etidio y visualización en transiluminador UV (Figura 1.1).

Figura 1.1. ADN de *T. grandiflorum* y *T. bicolor* extraído mediante la modificación del método de Doyle & Doyle (1990). Electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Muestras en carriles: 1. 126-3001; 2. 113-3002; 3. 128-3005; 4. 76-3006; 5. 109-3010; 6. 134-3012; 7. 52; 8. MB1-1; 9. MB2-4; 10. MB3-5; 11. MB4-1; M. Marcador, fago I digerido con *Hind III* (longitud en los fragmentos en Kpb)



Para verificar ADN apto para los posteriores análisis se realiza una prueba de digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* bajo las condiciones sugeridas por los fabricantes (Invitrogen). En la Figura 1.2 se muestra que el ADN obtenido es digerible por las enzimas de restricción y como se observará más adelante, amplificable.

Figura 1.2. Prueba de digestión del ADN obtenido con la modificación del protocolo de Doyle & Doyle (1990). Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de restricción de ADN de *T. grandiflorum* y *T. bicolor* con las enzimas *EcoRI* y *MseI*. Muestras en carriles: 1. 163-3007; 2. 71-3003; 3. 99; 4. 119-3005; 5. 210-3008; 6. MB1-6; 7. MB2-4; 8. MB3-6; 9. MB4-1; M. Marcador, fago I digerido con *HindIII* (longitud en los fragmentos en Kpb).



1.4 Caracterización molecular mediante RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

La característica principal de la técnica RAPD es la utilización de “primers” cortos, por lo general de 10 nucleótidos y condiciones de PCR poco astringentes, lo cual genera una alta probabilidad de encontrar segmentos complementarios en el ADN (Hadrys *et al*, 1992; Hansen *et al*, 1998). Las regiones entre dos segmentos son amplificadas en contracorriente generando fragmentos de tamaños diversos y que pueden ser discriminados en un gel de agarosa (Williams *et al*, 1990).

1.4.1 Selección de “primers”

Efecto de la concentración del ión Mg^{2+}

Para determinar el efecto de la concentración de ión Mg^{2+} sobre los perfiles de los productos de amplificación, se evalúan 11 concentraciones de $MgCl_2$ en la reacción de PCR: desde 1.5 mM hasta 6.0 mM; utilizando el “primer” OPR-12 y las muestras 163-3007 y MB3-6. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.4% en buffer TBE 0.5X, bajo tales condiciones.

Se observa ausencia o baja tasa de amplificación en concentraciones de 1.5 mM de ión Mg^{2+} , y en el rango de concentraciones de 1.5 –3.0 mM la aparición de nuevos productos de amplificación con el aumento en la concentración. En el rango de 3.0 a 4.5 mM, no hay aparición de nuevas bandas sino disminución en el barrido y aumento en la capacidad de resolución de la electroforesis. En concentraciones por encima de 4.5 mM del ión Mg^{2+} hay disminución en el número de productos amplificados y se observa que variaciones pequeñas en la concentración de este ión, genera variaciones considerables en los patrones de bandeo.

Se determina que la concentración de ión Mg^{2+} óptima para la generación de marcadores RAPD en especies de *Theobroma* es 4.0 mM. Como criterio de selección se utiliza la presencia de bandas bien definidas con poco «barrido» y dentro de un rango de concentraciones que asegure que las variaciones pequeñas en la concentración de Mg^{2+} no generen variaciones considerables en los perfiles de los productos de amplificación.

Efecto de la concentración de dNTP's

Se determinó 200 μM como la concentración a utilizar en los ensayos siguientes. El criterio utilizado para la selección de la concentración óptima de dNTP's, fue la generación de bandas bien definidas dentro de un rango de concentraciones que permita la reproducibilidad de la lectura.

Efecto de la concentración de ADN

Se observa en general, que los perfiles de amplificación no difieren por variación en las concentraciones de ADN y que la adición de la plantilla de ADN en concentraciones tan bajas como 0.1 ng/ μl genera perfiles de amplificación muy similares a los obtenidos con concentraciones mayores, corroborando que la adición de ADN plantilla en la reacción elimina las bandas “fantasma” en los productos de reacción.

Con base en los criterios utilizados a lo largo del proceso de adecuación se determina como 2.0 ng/ μl el valor de concentración de ADN a utilizar en los ensayos siguientes.

Existen posiciones controversiales respecto a la selección de un factor que presenta mayor sensibilidad en la reacción. Según Michelmore *et al* (1992), la relación de concentraciones de ADN y “primer”, es el factor más sensible a las condiciones de reacción. Esta afirmación se basa en que la competencia de los sitios blanco dentro de la plantilla de ADN por el “primer” determinará el éxito de la amplificación de un fragmento. Por otro lado McPherson *et al* (1992) da mayor importancia a la concentración del ión Mg^{2+} por su efecto estabilizador del anillamiento del “primer”, incluyendo el anillamiento inespecífico.

En este trabajo se observa un efecto mayor de la concentración de ión Mg^{2+} en la reacción en comparación al efecto mostrado por la variación en la concentración de ADN, similar a lo reportado por McPherson *et al* (1992). Este resultado está posiblemente influenciado por la secuencia en que se plantearon los ensayos de adecuación.

Igualmente, para evitar malas interpretaciones en el análisis, también se debe tener en cuenta que las bandas que fueron anotadas para la generación de matrices binarias no comigren con las bandas del control negativo.

Esta recomendación, fue planteada por Pan *et al* (1997), quien mostró que estas bandas no se originan como producto de contaminación en los reactivos de la reacción y que sus secuencias no corresponden a ninguna secuencia conocida, por ende son derivados de procesos de auto- iniciación de la reacción.

Selección de los “primers” RAPD para la caracterización del banco

Los “primers” seleccionados inicialmente son OPR - 01, OPR - 02, OPR -03, OPR -07, OPR -08, OPR - 09 OPR - 10, OPR - 12, OPR -15 y OPR -20. Estos “primers” se evalúan en su capacidad de generación de polimorfismos con 6 materiales de *T. grandiflorum* (32-3002, 99, 111-3003, 134-3012, 163-3007, 210-3008) y 4 de *T. bicolor* (MB1-6, MB2-4, MB3-6, MB4-1). El número total de bandas polimórficas obtenido de esta manera oscila entre 2 y 11, presentándose siempre un número mayor para los materiales de *T. grandiflorum* respecto a *T. bicolor*.

Los “primers” utilizados finalmente para la caracterización del banco de *Theobroma* son: OPR-03, OPR -07, OPR -08, OPR -09 y OPR -15, seleccionados con base en su mayor número de bandas polimórficas con respecto a otros “primers” evaluados en este ensayo.

1.4.2 Generación y anotación de marcadores RAPD en los materiales del banco

Sistema de notación de bandas

Se generan perfiles de bandeo a partir de la utilización de los 5 “primers” previamente seleccionados. Con las bandas determinadas se construye una matriz de presencia–ausencia que representa el análisis con marcadores RAPD del banco de germoplasma del género *Theobroma*.

A partir de los 145 materiales analizados pertenecientes al banco de germoplasma, se evalúan 114 bandas distribuidas así: 56 bandas para *T. grandiflorum* (83.9% polimórficas), 45 bandas para *T. bicolor* (26.7% polimórficas) y 13 bandas compartidas entre las dos especies (61.5 % polimórficas). En la Tabla 1.2 se presenta el número de bandas analizadas para cada uno de los “primers” con los que se evaluó el banco.

Tabla 1.2. Sumario de los 5 “primers” utilizados y número de bandas generadas en la caracterización molecular por RAPD del banco de germoplasma del género *Theobroma* bajo custodia del instituto SINCHI en Amazonia Norte Colombiana.

Cebador	Secuencia	<i>T. grandiflorum</i>		<i>T. bicolor</i>		compartidas		Total
		Bandas totales	% Bandas polimorficas	Bandas totales	% Bandas polimorficas	Bandas compartidas	%Bandas polimorficas	
OPR-03	5'-ACACAGAGGG-3'	13	92.3	3	33.3	0	---	16
OPR-07	5'-ACTGGCCTGA-3'	15	93.3	11	45.5	3	66.6	23
OPR-08	5'-CCCGTTGCCT-3'	16	68.8	16	0.0	5	80.0	27
OPR-09	5'-TGAGCACGAG-3'	10	70.0	14	7.1	2	0.0	22
OPR-15	5'-GGACAACGAG-3'	15	73.3	14	42.9	3	66.6	26
		69	79.7	58	22.4	13	61.5	114

Sobresale la mayor frecuencia del número de polimorfismos presentes en *T. grandiflorum* respecto a los de *T. bicolor*. Este factor muestra a nivel preliminar capacidad de discriminación de materiales de especies diferentes por esta técnica.

1.4.3 Estimación de la semejanza entre materiales. Generación de dendrograma

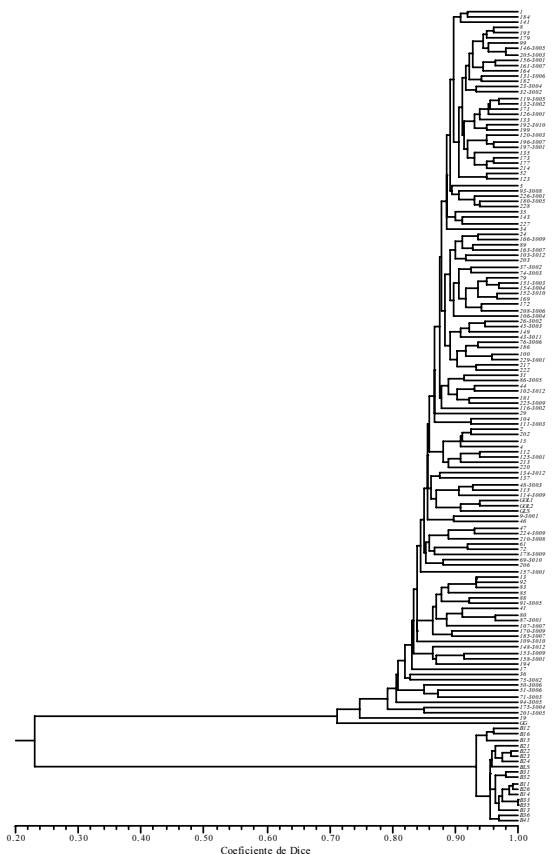
Una vez construida la matriz de presencia y ausencia se calculan los valores de semejanza entre los materiales del banco mediante la utilización del índice de Dice (1945), el cual representa la probabilidad que dos bandas sean compartidas entre dos individuos (Moreno, 2001; citado por Parra, 2001).

Dicha matriz de semejanza está representada en un dendrograma construido mediante análisis de conglomerados utilizando el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*), resultado que se presenta en la Figura 1.3.

El índice de correlación cofenética (r); medida del nivel de distorsión de la representación con respecto a los valores de la matriz de semejanzas, presentó un valor de 0.99439 para este dendrograma (*T. grandiflorum* y *T. bicolor*). Indicando que este tipo de representación es bueno para la interpretación total de la matriz de semejanza obtenida (Rohlf, 1998). Sin embargo, es concerniente resaltar que los valores de este coeficiente obtenidos para cada especie analizada de manera independiente presentaron un menor valor:

- i. $r_{T. grandiflorum} = 0.77481$
- ii. $r_{T. bicolor} = 0.76450$

Figura 1.3. Dendrograma UPGMA ($r = 0.99439$) derivado de los valores de semejanza estimada mediante el índice de Dice (1945) utilizando marcadores RAPD de los materiales del banco de germoplasma del género *Theobroma*.



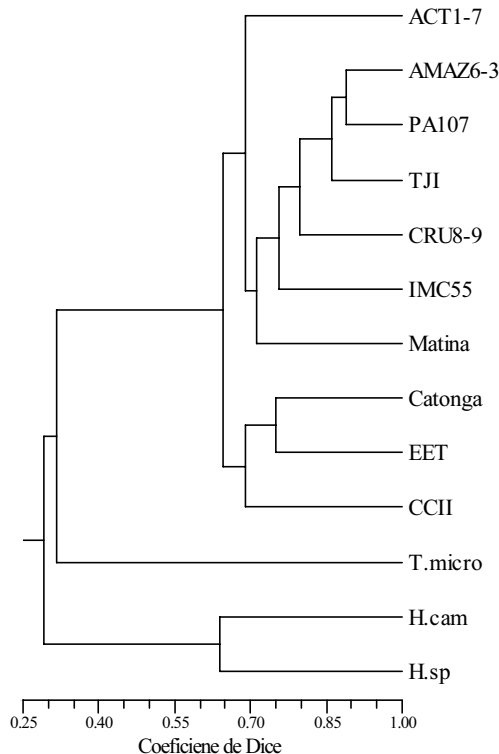
Esto indica que la representación de los resultados de cada especie de manera independiente presenta un grado de distorsión mayor pero que también es aceptable para la interpretación de las relaciones a nivel intra específico de los materiales del banco.

El dendrograma (Figura 1.3) está constituido por dos grandes ramas que agrupa la totalidad de los materiales analizados en un valor de semejanza de 0.23: La primera, correspondiente a los materiales de la especie *T. grandiflorum*.

florum agrupada con un valor de semejanza de 0.70. La segunda rama en la que se agruparon los materiales de *T. bicolor* en un valor de semejanza de 0.93.

Debido a la carencia de reportes en literatura sobre estas dos especies, estos valores encontrados solo se pudieron comparar con respecto a los presentados por Wilde *et al.* (1992), para materiales de *T. cacao*. Para esto, se construyó un dendrograma mediante UPGMA a partir de los valores de semejanza estimada mediante el uso de marcadores RAPD reportados por este autor, los cuales fueron igualmente calculados por el coeficiente de Dice (1945). La Figura 1.4 muestra el dendrograma generado. En este, los materiales de *T. cacao* analizados se agrupan en valores cercanos a 0.65 y estos con respecto a un material de *T. microcarpum* en 0.32, valores de semejanza cercanos al de 0.70 mostrado por *T. grandiflorum* y de 0.23 calculado para la totalidad de los materiales.

Figura 1.4. Dendrograma UPGMA derivado de los valores de semejanza reportados por Wilde *et al* (1992) para diferentes materiales de *T. cacao* mediante el índice de Dice (1945) utilizando marcadores RAPD



Es evidente la alta semejanza intraespecífica en los materiales de *T. bicolor* (0.93-1.00), este resultado posiblemente refleja el hecho que los materiales tienen la misma procedencia ubicada en la zona geográfica del Municipio de Calamar (Departamento de Guaviare); sin embargo el material BLS proveniente de Leticia (Departamento del Amazonas) utilizado como externo a los materiales conservados no muestra una separación apreciable del conjunto de los individuos analizados. Esto genera una segunda posibilidad, que la utilización de marcadores RAPD no es eficiente para detectar diferencias a nivel del genoma de esta especie debido a la baja frecuencia de los polimorfismos detectados y por tanto es necesaria la utilización de otro tipo de marcadores, por ejemplo AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Perry *et al* (1998), quienes muestran que la utilización de marcadores RAPD para *T. cacao*, colectados en Malasia, fue poco satisfactoria para discriminar entre variedades de esta especie, a diferencia de los marcadores AFLP.

Esto difiere, seguramente por la selección de materiales evaluados, de los obtenidos previamente por Wilde *et al.* (1992), quienes mostraron que el uso de los marcadores RAPD para la caracterización de clones de cacao es una alternativa viable para la labor de curación de colecciones de germoplasma de esta especie, siendo utilizados posteriormente en trabajos como los de Lerceteanu, *et al.* (1997a, 1997b).

De esta manera, es de particular importancia para el caso de los materiales de *T. bicolor*, la realización de nuevas colectas de materiales pertenecientes a poblaciones ya sean cultivadas o silvestres, y comparar los datos obtenidos en este trabajo por marcadores RAPD con otro tipo de marcador molecular.

A pesar de la alta semejanza intraespecífica encontrada, particularmente en *T. bicolor*, los resultados obtenidos por la técnica RAPD, permiten la distinción del 99% de los materiales de la colección con base en los perfiles de bandas generados. Solo dos materiales de *T. bicolor* (MB3-3 y MB3-5) presentan patrones similares de bandeos.

En *T. grandiflorum*, la totalidad de los individuos analizados se agrupan sobre un valor de semejanza de 0.70. Los materiales conservados en el banco lo hacen sobre valores cercanos a 0.75. El material denominado GG (proveniente del Departamento de Guainía) y utilizado como externo al banco es el que presenta menor semejanza con el resto de la colección.

Los materiales de *T. grandiflorum* provenientes de Leticia (Departamento del Amazonas), se agrupan junto con los materiales pertenecientes al banco. Sin embargo, es importante recordar nuevamente que dos de estos individuos generan 3 bandas no presentes en los materiales del banco, de manera tal que la diferencia que genera la separación clara del material GG del resto de los materiales, consiste en que este genera un número menor de bandas en sus perfiles de amplificación con respecto al resto de la colección.

Teniendo en cuenta estos resultados, no es posible proponer la formación de agrupamientos a nivel intraespecífico con base en la posición de los materiales dentro del dendrograma generado.

Se podría suponer en principio que la razón de esto podría residir en el índice de semejanza utilizado, ya que para el cálculo del índice de Dice (1945), no se tienen en cuenta las coincidencias por ausencias de bandas en dos individuos. Contrario a esto, los resultados de Duarte *et al.* (1999) muestran que en general el uso de diferentes coeficientes de semejanza, incluyendo aquellos que tienen en cuenta las coincidencias negativas, no producirá cambios estructurales significativos en los dendrogramas y en los diferentes grupos formados a partir de este. Solo se ven alteradas algunas de las relaciones entre cultivares con alto grado de semejanza, a partir de datos RAPD para el agrupamiento y ordenamiento de 27 cultivares de *P. vulgaris* L.

Se llega a la misma conclusión al construir un dendrograma a partir de la matriz de semejanza calculada por el coeficiente de apareamiento simple con los datos de *T. grandiflorum* y *T. bicolor*. Este coeficiente tiene en cuenta tanto el número de coincidencias positivas como negativas para estimar la semejanza ($S_{sm} = m/n$, siendo m el número de coincidencias (positivas o negativas) y n el tamaño total de la muestra). De manera tal que inclusive bajo el supuesto que la ausencia de bandas entre dos individuos cuenta para la semejanza, con un conjunto de datos suficiente no se debe afectar mayormente la estructura de los posibles dendrogramas generados por el uso de diferentes tipos de coeficientes.

El uso de coeficientes como el de Dice (1945) es particularmente imperativo para el manejo de datos RAPD dada su naturaleza (Williams *et al.*, 1990): la ausencia en la amplificación de una banda en dos genotipos no representa necesariamente una semejanza entre estos, así que la posibilidad de utilizar otros coeficientes que tengan en cuenta las ocurrencias negativas entre dos genotipos es una opción no recomendable.

1.4.4 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales realizado a partir de los datos totales obtenidos en este trabajo, incluyendo individuos externos al banco se presenta en la Figura 1.5. La representación en 2 dimensiones representa el 72% de la variación total encontrada y muestra concordancia con el resultado obtenido inicialmente del análisis de conglomerados, es decir, una separación evidente entre los materiales de *T. grandiflorum* y *T. bicolor*, uniformidad en los de *T. bicolor* y una variación más amplia y continua en los de *T. grandiflorum*.

Sin embargo, al realizar este mismo análisis utilizando los datos obtenidos únicamente para los materiales de *T. grandiflorum* del banco de germoplasma (no se tuvieron en cuenta las bandas generadas por los individuos externos al banco) se logra apreciar relaciones entre los materiales que en el dendrograma no son tan evidentes y generar agrupamientos.

La representación en 3 dimensiones de los componentes principales (Figura 1.6), que representa el 74% de la variación total, muestra las posibles relaciones obtenidas en estos materiales.

Con el fin de evidenciar con mayor claridad las relaciones entre individuos obtenidos mediante este análisis, se genera un dendrograma UPGMA a partir del cálculo de las distancias de cada pareja de puntos en la representación tridimensional. Para esto se construyó previamente una matriz de distancias euclidianas a partir de los datos de la proyección de los 3 componentes principales representados (coordenadas en los ejes x, y, z).

En la Figura 1.7 se presenta el dendrograma generado, el cual muestra en otro tipo de representación gráfica los resultados obtenidos mediante el análisis de componentes principales, lo cual permite establecer de manera muy sencilla una clasificación de 19 grupos (tg1Rcp a tg19Rcp) para los 128 materiales de *T. grandiflorum* del banco.

Figura 1.5. Representación de los 2 componentes principales de variación (72%) obtenidos por el análisis de componentes principales (ACP) de marcadores RAPD en los 150 materiales analizados en este trabajo

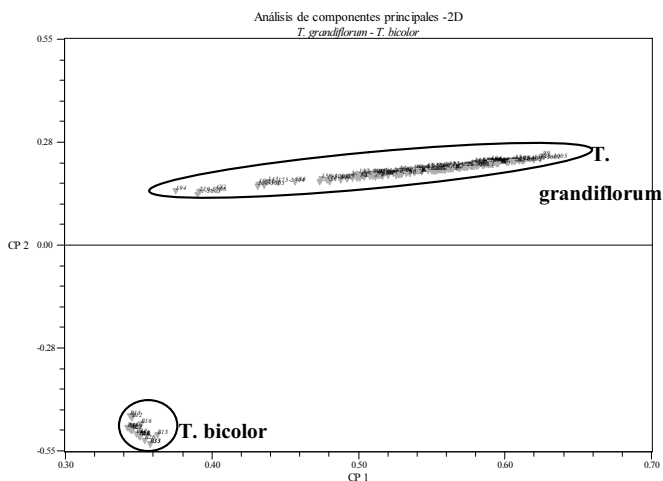


Figura 1.6 Representación de los 3 componentes principales de variación (74%) obtenidos por el análisis de componentes principales (ACP) de marcadores RAPD en 128 materiales de *Theobroma grandiflorum* del banco de germoplasma custodiado por el Instituto SINCHI.

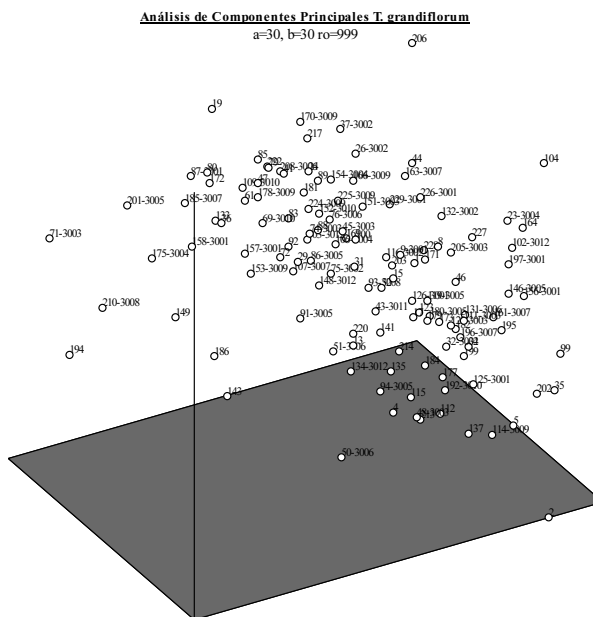
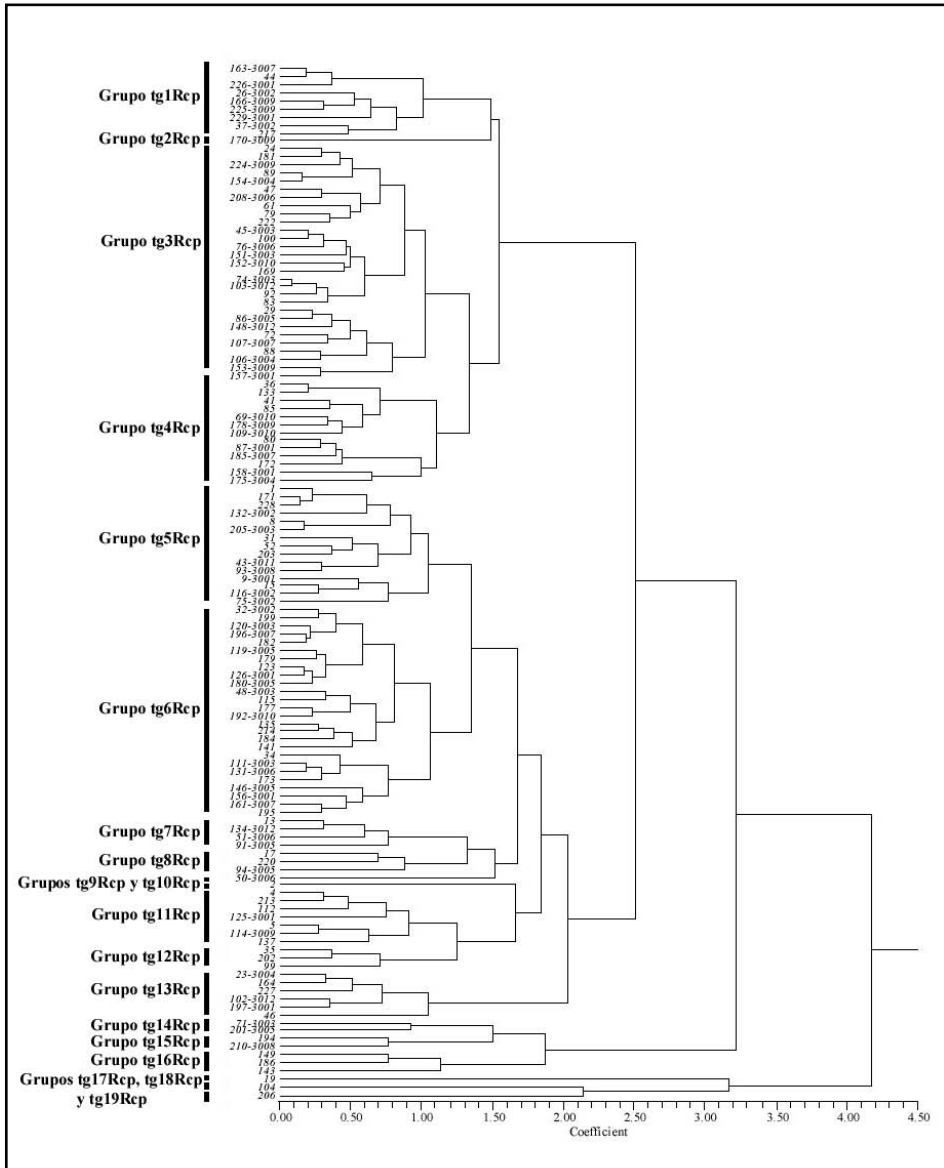


Figura 1.7. Dendrograma UPGMA derivado de la matriz de distancias euclidianas calculadas entre los puntos de la proyección de los 3 componentes principales de variación obtenido mediante el ACP de marcadores RAPD para los materiales de *Theobroma grandiflorum* del banco de germoplasma custodiado por el Instituto SINCHI



Donde **tg**= *T. grandiflorum*, **1**= número del grupo, **R**= generados a partir de datos RAPD, **cp**= por el análisis de componentes principales.

La conformación de los 19 grupos indica que el perfil de amplificación de algún integrante de un grupo determinado será muy parecido al perfil de un integrante del mismo grupo, que al presentado por otro integrante de otro grupo.

1.4.5 Relación con la caracterización morfoagronómica del banco

Los trabajos de caracterización morfoagronómica en varios materiales del banco demuestran la conformación de 12 grupos homogéneos de materiales de *T. grandiflorum* y 4 de *T. bicolor* (Vargas y Argüelles, 2000; Vargas *et al.*, 2002), de manera tal que uno de los resultados esperados al inicio de este trabajo consistía en reflejar en alguna medida los resultados obtenidos de dicha caracterización morfoagronómica.

Tanto al analizar los mapas de bandeo como los índices de semejanza calculados o los grupos asignados por el ACP e intentar relacionar con el grupo morfoagronómico asignado a determinado material se llega a la conclusión que existe heterogeneidad a nivel molecular de los 12 grupos morfoagronómicos de *T. grandiflorum* conformados previamente a este trabajo, es decir, que un material clasificado en un grupo morfoagronómico determinado no tendrá necesariamente un perfil de bandeo RAPD similar a otro individuo del mismo grupo y por ende es factible que este se encuentre más relacionado a nivel molecular con otros materiales, inclusive de diferente grupo morfoagronómico.

Esto puede deberse a que los caracteres morfológicos y agronómicos que fueron tenidos en cuenta para la evaluación inicial del banco presentan alguna de las siguientes condiciones o su combinación: Son influenciados por factores ambientales, No reflejan la variabilidad presente en el banco, No fueron suficientes para una evaluación exhaustiva de este.

Lo anterior conduce a proponer la continuación y complementación del trabajo de caracterización morfoagronómica en los materiales del banco y su integración con los datos moleculares a fin de establecer una matriz conjunta de datos y acceder a una aproximación más completa de la variación genética del banco. Para esto puede ser de mucha utilidad la integra-

ción al análisis de los 19 descriptores botánicos y agronómicos propuestos recientemente por Alves *et al* (2003b), los cuales fueron seleccionados utilizando diferentes criterios estadísticos a partir de una lista inicial de 53; que no han sido tenidos en cuenta en su totalidad para la evaluación inicial del banco custodiado por el instituto SINCHI y entre los cuales se encuentran parámetros de mucho interés agronómico como el número de incidencias del hongo fitopatógeno *Crinipellis perniciososa*.

1.5 Caracterización molecular mediante AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

La técnica AFLP combina las fortalezas de dos métodos: la reproducibilidad del análisis de fragmentos de restricción y la capacidad de la PCR (Mueller y Wolfenbarger, 1999). Consiste en la amplificación selectiva mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los fragmentos de restricción obtenidos en una digestión total de ADN genómico en un procedimiento que implica básicamente 3 pasos (Vos *et al.*, 1995): Restricción del ADN y ligación de los oligonucleótidos adaptadores, Amplificación selectiva de un conjunto de fragmentos de restricción y Análisis en gel de los fragmentos amplificados.

En el presente trabajo la técnica de generación de AFLPs se utiliza para contrastar los resultados obtenidos previamente con RAPD

Para ello se seleccionan un conjunto de muestras de materiales representativos, a partir del dendrograma y del análisis de componentes principales generado con los datos RAPD para obtener los perfiles AFLPs.

1.5.1 Procedimiento general seguido para realizar la caracterización del banco mediante el uso de la técnica AFLP

El procedimiento consta de los siguientes pasos:

- i.* Extracción de ADN: realizada previamente y descrita en el ítem 1.3
- ii.* Selección de combinaciones de “primers”.
- iii.* Obtención de perfiles de amplificación en todos los materiales.

- iv. Construcción de matrices binarias.
- v. Análisis estadísticos: generación de índices de semejanza, construcción de dendrogramas y análisis de componentes principales.

Se utilizó el kit comercial AFLP® Analysis System I y AFLP® Starter Primer Kit (Invitrogen, cat No. 10544-013 y 10483-014) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, el cual está diseñado para permitir la amplificación selectiva con 64 posibles combinaciones de “primers”. 5 de estas combinaciones fueron seleccionadas a partir de las 20 reportadas por Risterucci *et al*, (2000) en la generación de un mapa de ligamiento en la especie *Theobroma cacao*. L.

Para su selección se utiliza como criterio el número de bandas generadas, sus porcentajes de polimorfismo y el uso de solo un par de “primers” por reacción de amplificación selectiva. Las otras 5 combinaciones evaluadas fueron seleccionadas al azar. En la Tabla 1.3 se muestran las combinaciones de “primers” E+3 y M+3 evaluadas.

Tabla 1.3. Combinaciones de “primers” para AFLP evaluadas en los materiales de *T. grandiflorum* y *T. bicolor* del banco de germoplasma custodiado por el instituto SINCHI.

No.	Combinación	Fragmentos Detectables	Marcadores Polimorficos	% Marcadores Polimorficos	Referencia
1	EAAG/MCAA	66	17	25.7	Risterucci <i>et al</i>
2	EAAG/MCTT	71	8	11.2	
3	EAAC/MCAA	77	7	9.1	
4	EACG/MCAA	56	15	26.8	
5	EACT/MCTT	61	11	18	
6	EAGG/MCAG				
7	EACT/MCAT				
8	EACC/MCTC				
9	EAGC/MCTA				
10	EACA/MCTG				

El segundo aspecto evaluado es la reproducibilidad en los patrones de bandeo de las combinaciones de “primers” seleccionadas de la evaluación preliminar. Para esto, se evalúan los patrones de bandeo generados por el procesamiento independiente de dos muestras en 4 materiales de cada especie.

El proceso de generación de marcadores AFLP consiste en la realización de reacciones de digestión con enzimas de restricción, ligación, amplificación preselectiva (PCR+1), amplificación selectiva (PCR+3) y electrofore-

sis, visualización y lectura de los patrones de bandeo con 86 materiales: 81 custodiados en el banco y 5 externos.

La amplificación selectiva de marcadores, se lleva a cabo mediante el uso de 3 combinaciones de “primers” y para la visualización de los productos de amplificación se utilizó un protocolo de tinción con Plata previa separación en gel denaturante de acrilamida.

Para la lectura de geles, se tienen en cuenta aquellas bandas que se visualizaran e identificaran fácilmente, es decir bandas que presentaran una buena tinción y que sean fácilmente discernibles. El manejo de los resultados para su análisis se realiza de manera similar a como se procede con los marcadores RAPD.

1.5.2 Selección de combinaciones de “primers” AFLP para la caracterización del banco

Evaluación de 10 combinaciones de “primers”

Se evalúa tanto el número total de bandas generadas como sus polimorfismos en los materiales 94-3005, 99, 163-3007 y 227 de *T. grandiflorum* y MB1-5, MB2-4, MB3-6, MB4-1 de *T. bicolor*. Los resultados generales son presentados en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Resultados de la evaluación preliminar de 10 combinaciones de “primers” para la amplificación selectiva de marcadores AFLP en 10 materiales del banco de germoplasma

No	Combinación	<i>T. grandiflorum</i>		<i>T. bicolor</i>		Total	
		Bandas totales	Bandas Polimórficas	Bandas totales	Bandas Polimórficas	Bandas totales	Bandas Polimórficas
1	EAAG/MCAA	52	9	64	1	116	10
2	EAAG/MCTT	48	4	31	2	79	6
3	EAAC/MCAA	24	0	37	1	61	1
4	EACG/MCAA	57	35	51	10	108	45
5	EACT/MCTT	48	19	46	0	94	19
6	EAGG/MCAG	38	18	37	1	75	19
7	EACT/MCAT	33	3	34	1	67	4
8	EACC/MCTC	31	7	15	0	46	7
9	EAGC/MCTA	25	4	16	0	41	4
10	EACA/MCTG	58	13	41	1	99	14

Todas las combinaciones de “primers” evaluadas generan patrones complejos; entre 25 y 58 bandas para *T. grandiflorum* y entre 15 y 64 bandas para *T. bicolor*, igualmente se generan polimorfismos en al menos una de las dos especies en los materiales evaluados, entre 1 y 45 bandas polimórficas. 4 combinaciones muestran ser monomórficas a nivel intraespecífico en este ensayo, estas son EAAC/MCAA para *T. grandiflorum* y EACC/MCTC, EACT/MCTT y EAGC/MCTA para *T. bicolor*.

Prueba de reproducibilidad

Para esta prueba se seleccionan previamente, las mejores 4 combinaciones de “primers” con base en el número de bandas polimórficas. Las combinaciones seleccionadas son:

- i.* Combinación 4 (EACG/MCAA).
- ii.* Combinación 5 (EACT/MCTT).
- iii.* Combinación 6 (EAGG/MCAG).
- iv.* Combinación 10 (EACA/MCTG).

Estas, son evaluadas con 8 materiales del banco (71-3003, 99, 163-3007 y 210-3008 de *T. grandiflorum* y MB1-6, MB2-4, MB3-6, MB4-1 de *T. bicolor*), para lo cual se realiza el procedimiento completo de generación de marcadores en dos réplicas independientes desde la extracción de ADN. Los resultados de los geles se compendian en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Resultados de la prueba de reproducibilidad en la generación de bandas de 4 combinaciones de “primers” y 8 materiales del banco

No	Combinación	<i>T. grandiflorum</i>		<i>T. bicolor</i>		% Bandas reproducibles
		Bandas contadas	Bandas no reproducibles	Bandas contadas	Bandas no reproducibles	
4	EACG/MCAA	62	37	51	17	52.2
5	EACT/MCTT	65	0	54	0	100
6	EAGG/MCAG	43	0	37	0	100
10	EACA/MCTG	55	1	39	0	98.9

Se evalúan 406 bandas en total. Inesperadamente, la combinación de “primers” 4 (EACG/MCAA), que muestra el mayor número de bandas polimórficas en el ensayo preliminar presenta una baja reproducibilidad en los

perfiles de bandas generadas (48%), en consecuencia, su utilización es inadecuada para la caracterización de los materiales del banco.

Las combinaciones 5, 6 y 10 muestran por el contrario una reproducibilidad en total de 99.6%. Tan solo una banda en 1 material de la combinación 10 muestra no ser reproducible; todas las bandas evaluadas en las combinaciones 5 y 6 se presentan en las réplicas de todos los individuos analizados en este ensayo, mostrando la alta reproducibilidad de la técnica.

La selección de las combinaciones de “primers” se realiza con base en el número de bandas polimórficas producidas, su relativa facilidad para realizar el conteo de bandas y su reproducibilidad; bajo las condiciones de trabajo las combinaciones 5 (EACT/MCTT), 6 (EAGG/MCAG) y 10 (EACA/MCTG) muestran ser aptas para realizar la caracterización molecular de los materiales seleccionados.

Debido a la gran capacidad reportada para la técnica, no es necesario utilizar un número elevado de amplificaciones selectivas para lograr el discernimiento entre materiales. Por esta razón, se plantea como primer paso, la selección de las 3 combinaciones para realizar la caracterización del banco.

1.5.3 Generación y anotación de marcadores AFLP en materiales del banco

Sistema de notación de bandas

Con el fin de facilitar la identificación de bandas se continua con el sistema de notación de bandas empleado anteriormente, el cual refleja tres características de cada banda anotada:

- i.* El tipo de marcador utilizado, en este caso AFLP se denota como a.
- ii.* La combinación de “primers” utilizada para su generación (5, 6 o 10).
- iii.* El tamaño estimado del fragmento amplificado con respecto al marcador de tamaño utilizado (30 – 330 pb), en este caso se expresa en pares de bases.

De esta forma el código:

a10_288

representa un fragmento obtenido mediante la técnica AFLP, utilizando la combinación de “primers” 10 (EACA/MCTG) y cuya longitud estimada es de aproximadamente 288 pb.

A partir de los 81 materiales analizados mediante la técnica AFLP se evalúan en total 375 bandas de las cuales 263 son exclusivas para *T. grandiflorum* (91.3% polimórficas), 156 bandas exclusivas para *T. bicolor* (82.1% polimórficas) y 44 bandas compartidas para las dos especies (72.7% polimórficas). La Tabla 1.6 muestra el sumario de las bandas analizadas para cada una de las combinaciones de “primers” utilizadas en esta caracterización.

Tabla 1.6. Sumario de las 3 combinaciones de “primers” utilizadas para la caracterización por AFLP del banco de germoplasma del género *Theobroma*

Combinación	Secuencia	<i>T. grandiflorum</i>		<i>T. bicolor</i>		compartidas		Total
		Bandas totales	% Bandas polimórficas	Bandas totales	% Bandas polimórficas	Bandas compartidas	%Bandas polimórficas	
5	EACT/MCTT	72	84.7	64	78.1	21	47.6	115
6	EAGG/MCAG	103	91.2	52	90.4	18	94.4	137
10	EACA/MCTG	88	96.6	40	77.5	5	100.0	123
		263	91.3	156	82.1	44	72.7	375

En comparación con los marcadores RAPD, el porcentaje de bandas polimórficas obtenidas es mayor. Entre las posibles alternativas de esto se encuentra tanto (i) la longitud de los fragmentos amplificados, mayores en el caso de RAPD (entre 200 y 2000 pb) lo cual aumenta la probabilidad de no detectar diferencias en composición y secuencia entre dos bandas clasificadas como homólogas, como (ii) la mayor capacidad de discriminación de los fragmentos amplificados ofrecida por la electroforesis en gel de acrilamida utilizada para AFLP, la cual en el mejor de los casos, permite detectar diferencias en las longitudes de hasta 1 nucleótido.

Los materiales externos a la colección no muestran generación de bandas exclusivas para la especie.

1.5.4 Estimación de la semejanza entre materiales. Generación de dendrograma

Al igual que con los marcadores RAPD, se calculan los valores de semejanza entre los materiales de la colección a partir de la matriz de presencia y ausencia construida con datos de marcadores AFLP mediante la utiliza-

ción del índice de Dice (1945). Los valores obtenidos se tabulan en una matriz de semejanzas para posteriormente ser representada en un dendrograma generado mediante análisis de conglomerados utilizando el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*). El resultado de este procedimiento se presenta en la Figura 1.8.

Figura 1.8 Dendrograma UPGMA ($r=0.99297$) derivado de los valores de semejanza estimada mediante el índice de Dice (1945) utilizando marcadores AFLP de 86 materiales del banco de germoplasma del género *Theobroma*.



El índice de correlación cofenética (r) presenta un valor de 0.99297 para el dendrograma total (*T. grandiflorum* y *T. bicolor*).

Los valores obtenidos para cada especie analizada de manera independiente son:

$$\begin{aligned} r_{T. \textit{grandiflorum}} &= 0.87387 \\ r_{T. \textit{bicolor}} &= 0.77914 \end{aligned}$$

Como se observa en la Figura 1.8, el dendrograma generado está constituido por dos grandes ramas que agrupan la totalidad de los materiales analizados en un valor de semejanza de 0.22:

- i. La primera, correspondiente a los materiales de la especie *T. grandiflorum* agrupada con un valor de semejanza de 0.69
- ii. La segunda agrupa los materiales de *T. bicolor* en un valor de semejanza de 0.74.

Tanto los valores de semejanza intra como inter específicos son muy cercanos a los reportados por Wilde *et al* (1992) utilizando marcadores RAPD para algunos materiales de *T. cacao* (0.65) y de estos con respecto a un material de *T. microcarpum* (0.32).

Los valores de semejanza en los cuales se agrupan tanto la totalidad de los materiales (0.22) como los pertenecientes a la especie *T. grandiflorum* (0.69) son también muy cercanos a los encontrados mediante utilización de marcadores RAPD, sin embargo, al realizar la comparación con respecto a los de *T. bicolor* es evidente que existe una gran divergencia del resultado obtenido por las dos vías de análisis utilizadas.

Se corrobora que los valores de agrupamiento de los materiales de *T. grandiflorum* y del conjunto total de materiales corresponde a los encontrados mediante marcadores RAPD.

A diferencia de lo encontrado previamente con los materiales de *T. grandiflorum* externos a la colección, en donde el material denominado GG (Departamento del Guainía) se separó del resto de la colección y los materiales GOL1, GOL2 y GLS (Departamento de Amazonas) se ubican en un mismo agrupamiento; el comportamiento mostrado por estos a partir del

uso de marcadores AFLP es diferente, el material GG se ubica al interior del agrupamiento generado por todos los materiales del banco y los materiales externos originarios del Departamento del Amazonas no generan agrupamientos.

Para los materiales de *T. grandiflorum* tampoco se observan agrupamientos claros con base en el posicionamiento de los materiales dentro del dendrograma generado. Sin embargo, en algunos casos se aprecia que las relaciones entre materiales pertenecientes al mismo grupo morfoagronómico son más evidentes que las que se determinaron para RAPD.

Si bien esta observación no es concluyente, se pueden citar ejemplos de agrupamientos entre parejas de materiales de un mismo grupo morfoagronómico, caso que no se presenta en el análisis con marcadores RAPD: Materiales 51, 76 y 50 del grupo 3006; Materiales 74 y 48 del grupo 3003; Materiales 71 y 111 del grupo 3003; Materiales 102 y 103 del grupo 3012.

Inclusive a niveles más amplios de observación, se aprecian zonas en el dendrograma en donde, a determinados puntos de corte para generar un posible agrupamiento se sigue presentando heterogeneidad de grupos morfoagronómicos en los materiales que lo conforman, pero se aprecia alguna tendencia a contener materiales de determinado(s) grupo(s), por ejemplo la cercanía de los materiales 74, 48, 71, y 111 del grupo 3003 y a su vez con los materiales 114 y 153 del grupo 3009.

Debido a la carencia de los datos de cada material con los que se realizó la caracterización morfoagronómica no se logra realizar un análisis más profundo que permitiera relacionar algún conjunto de caracteres fenotípicos con el análisis molecular mediante AFLP, de manera que permitiera validar la posible relación entre estos análisis.

Esto es claramente discordante con las conclusiones obtenidas en el análisis por la técnica RAPD de los materiales del banco, respecto a las posibles causas por las cuales no se logró relacionar las características morfoagronómicas con el análisis molecular.

Por ejemplo, al observar el comportamiento de los materiales externos al banco, cuya separación corresponde a su procedencia, da también indicios de una posible relación de los resultados obtenidos por el uso de la técnica

ca RAPD con sus orígenes, de manera tal que podría plantearse que los marcadores AFLP están más relacionados a las características morfoagronómicas mientras que los RAPD hacia las procedencias de los materiales.

Para responder a esto es recomendable realizar nuevas colectas que permitan el enriquecimiento del banco con algunos materiales de procedencia conocida, y evaluar por las dos técnicas moleculares utilizadas su relación con caracteres morfoagronómicos, tanto los tenidos en cuenta previamente como los propuestos por Alves *et al* (2003b). Si bien, esto es una tarea larga y costosa, podría ser de valiosa utilidad no solo para el trabajo de conservación de los materiales, sino enfocado hacia el mejoramiento de la especie.

Contrario a lo obtenido tanto por RAPD como por AFLP para *T. grandiflorum*, en *T. bicolor* se observa la generación de agrupamientos de materiales en el dendrograma (Figura 1.8).

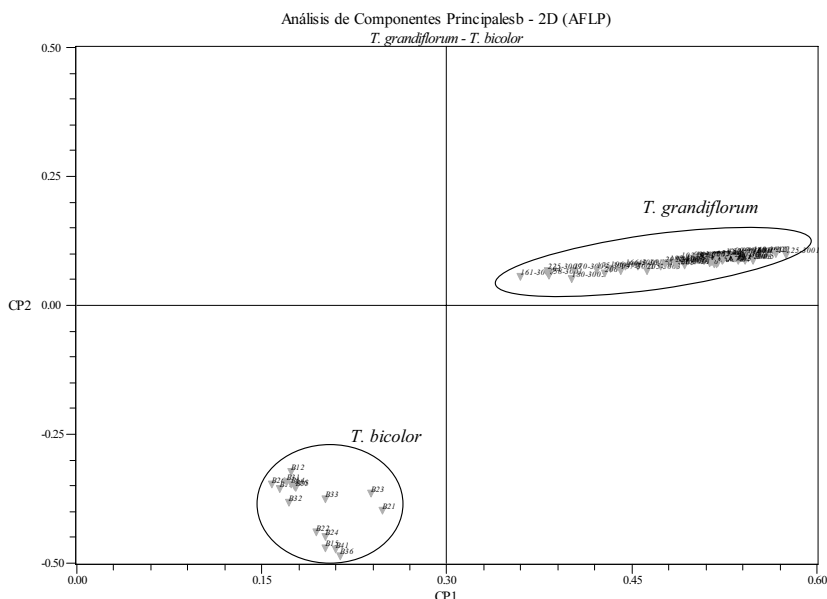
Utilizando un valor de semejanza de 0.77 como punto de corte para la generación de agrupamientos, se observa que los materiales de esta especie se clasifican en 4 grupos denominados del tb1As al tb4As. Donde **tb**= *T. bicolor*; **1**= número del grupo; **A**= generados a partir de datos de AFLP; **s**= por el análisis de valores de semejanza

Se observa que existe una alta relación entre los agrupamientos generados y la clasificación por ecotipos asignada a los materiales, esto particularmente para el grupo tb1As conformado por materiales pertenecientes al ecotipo MB1; y el grupo denominado tb2As conformado por materiales del ecotipo MB3. En el grupo tb3As se ubicaron la mayoría de los individuos del ecotipo MB2 y el grupo tb4As conformado por tan solo un material del MB2.

1.5.5 Análisis de componentes principales

En la Figura 1.9 se muestra la representación en dos dimensiones del conjunto total de materiales analizados por esta técnica (tanto *T. grandiflorum* como *T. bicolor*), la cual representa el 51% de la variación total encontrada, y que muestra la separación entre los materiales de estas dos especies, en concordancia con el resultado mostrado en el dendrograma de semejanzas de la Figura 1.8. Para este análisis no se tuvieron en cuenta los materiales externos a la colección.

Figura 1.9. Representación de los 2 componentes principales de variación (51%) obtenidos por el análisis de componentes principales (ACP) de marcadores AFLP en los 80 materiales analizados.



Posteriormente se procedió a realizar el mismo análisis utilizando los datos generados por cada especie de manera independiente.

Análisis de componentes principales para *T. grandiflorum*

La Figura 1.10, muestra la representación de los tres componentes principales, que representan el 50% de la variación encontrada para *T. grandiflorum*. La representación obtenida fue igualmente compleja debido al número de puntos sobre la representación, razón por la cual se calcularon agrupamientos mediante UPGMA a partir de los valores calculados de distancia de cada punto sobre la representación.

El procedimiento anterior permite, al igual que con el procesamiento de los datos generados por RAPD, la generación de un dendrograma en el cual se puede apreciar la formación de agrupamientos entre los materiales analizados (Figura 1.11)

De acuerdo a lo anterior, se realizó una clasificación de estos en 8 grupos denominados del tg1Acp al tg8Acp así:

Figura 1.10 Representación de los 3 componentes principales de variación (50%) obtenidos por el análisis de componentes principales (ACP) de marcadores AFLP en 65 materiales de *Theobroma grandiflorum* del banco de germoplasma custodiado por el Instituto SINCHI

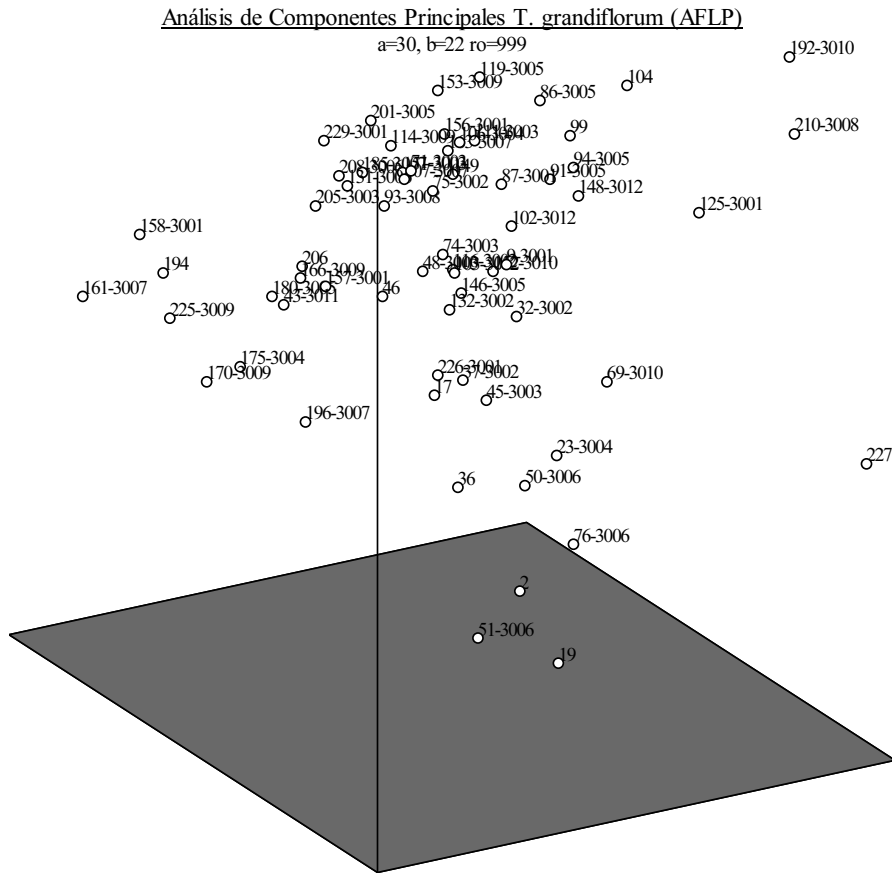
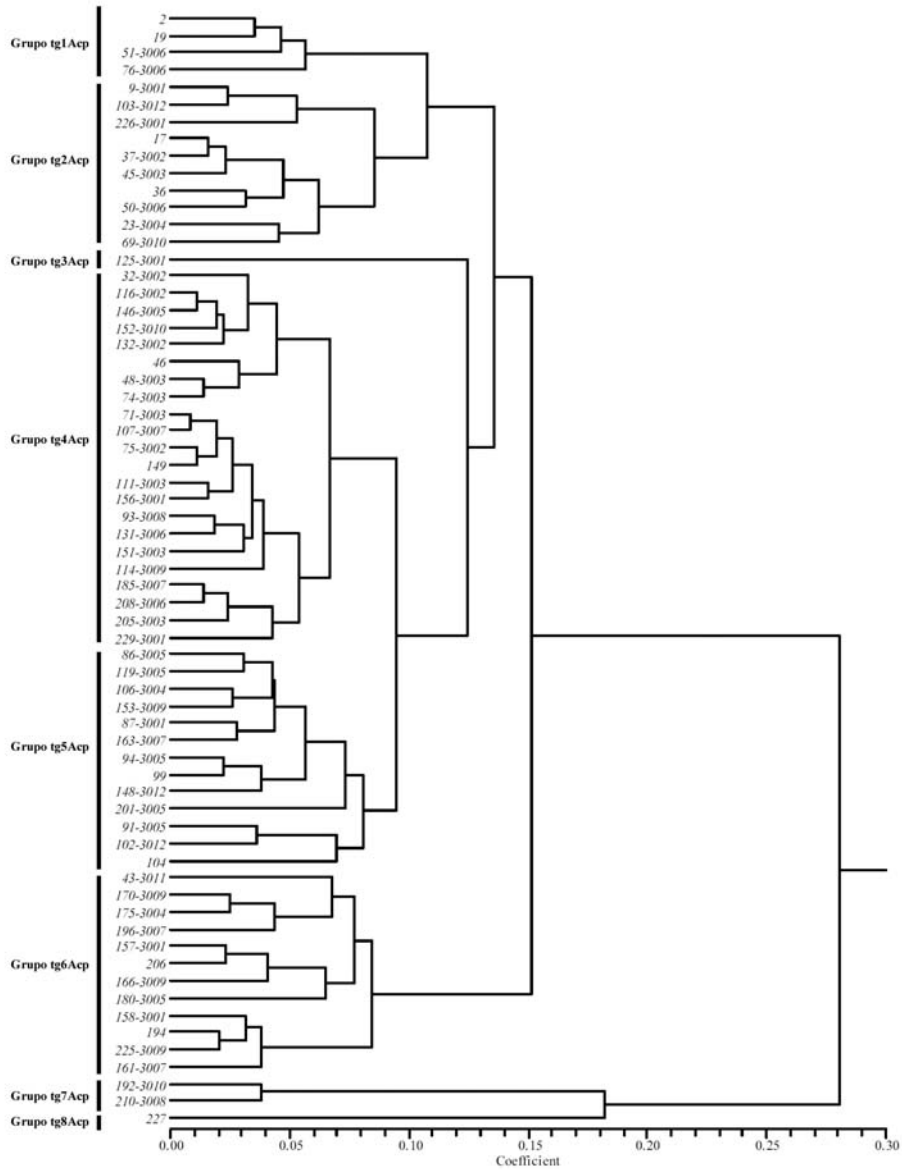


Figura 1.11. Dendrograma UPGMA derivado de la matriz de distancias euclidianas calculadas entre los puntos de la proyección de los 3 componentes principales de variación obtenido mediante el ACP de marcadores AFLP para 65 materiales de *Theobroma grandiflorum* del banco de germoplasma custodiado por el Instituto SINCHI



tg= *T. grandiflorum*; **1**= número del grupo; **A**= generados a partir de datos de AFLP; **cp**= por el análisis de componentes principales

Se encuentra que si bien no hay una correspondencia total entre los grupos generados mediante el análisis molecular por AFLP y los morfoagronómicos, se observa la tendencia de los materiales de ciertos grupos morfoagronómicos a integrarse dentro de un grupo particular, por ejemplo 6 de los 7 materiales analizados del grupo 3003 se clasificaron como tg4Acp; 5 de los 7 analizados del grupo 3005 como tg5Acp y 3 de los 5 del grupo 3009 en el grupo tg6Acp.

Esto refuerza la evidencia sobre la correspondencia entre los dos tipos de análisis. De ser así, el uso de las técnicas y metodologías de análisis presentadas en este capítulo pueden constituirse en un aspecto ventajoso en el proceso de enriquecimiento y evaluación del banco para su posterior uso, por ejemplo para permitir seleccionar a partir de posteriores colectas, material de interés en estadios tempranos de crecimiento y validar en posterior evaluación morfoagronómica, la cual debe realizarse en fase productiva.

Análisis de componentes principales *T. bicolor*

En la Figura 1.12 se muestra la proyección de los tres componentes principales, que representan el 78% de la variación encontrada para *T. bicolor*.

A partir del resultado del análisis de componentes principales de *T. bicolor* (Figura 1.12) y el dendrograma generado (Figura 1.13), se conformaron 4 grupos denominados del tb1Acp al tb4Acp; donde **tb**= *T. bicolor*; **1**= número del grupo; **A**= generados a partir de datos de AFLP; **cp**= por el análisis de componentes principales.

Los resultados generados muestran gran correspondencia con lo obtenido por el análisis de los valores de semejanza y por la clasificación en ecotipos de estos:

El grupo tb1Acp corresponde al grupo 1 generado por el análisis de semejanzas (tb1As), el cual está conformado inicialmente por materiales del ecotipo MB1 y ahora presenta la inclusión del material MB2-6 que en el análisis de semejanzas se clasificó como tb3As.

Figura 1.12. Representación de los 3 componentes principales de variación (78%) obtenidos por el análisis de componentes principales (ACP) de marcadores AFLP en 16 materiales de *Theobroma bicolor* del banco de germoplasma custodiado por el Instituto SINCHI.

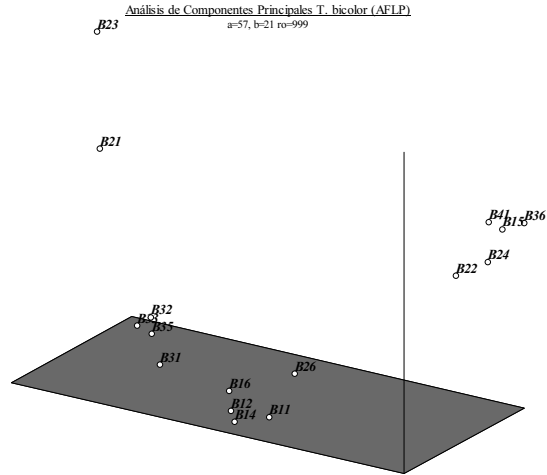
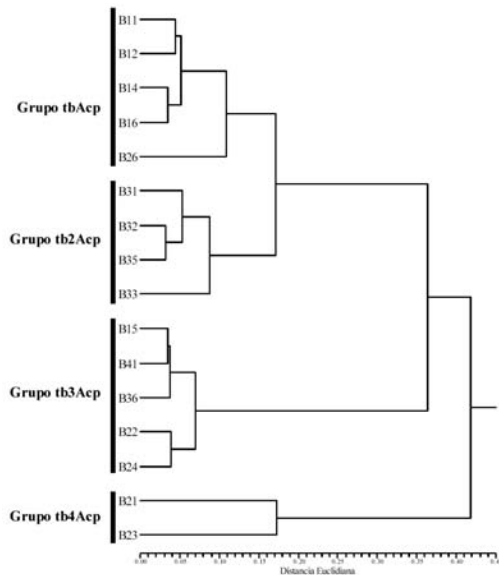


Figura 1.13. Dendrograma UPGMA derivado de la matriz de distancias euclidianas calculadas entre los puntos de la proyección de los 3 componentes principales de variación obtenido mediante el ACP de marcadores AFLP para 16 materiales de *Theobroma bicolor* del banco de germoplasma custodiado por el Instituto SINCHI



Algunos materiales clasificados inicialmente en el grupo tb3As corresponden igualmente al tercero generado por componentes principales (tb3Acp) y contiene materiales clasificados inicialmente en varios ecotipos.

El grupo tb2Acp corresponde al denominado tb2As, y está conformado en su totalidad por materiales clasificados en el ecotipo MB-3. El grupo 4 (tb4Acp), el cual está conformado inicialmente por el material MB2-3 incluye ahora a MB2-1.

Del resultado conjunto entre el análisis de semejanza y el de componentes principales se puede afirmar que la mayoría de materiales que conforman los ecotipos MB1 y MB3 son homogéneos a nivel molecular.

Los materiales MB1-5, MB2-2, MB2-4, MB3-6 y MB4-1 conforman un grupo homogéneo y por tanto se propone su reclasificación con base en los datos moleculares con fines de su evaluación para usos posteriores.

1.6 Análisis comparativo del uso de RAPD y AFLP para el análisis de los materiales del banco de germoplasma del género *Theobroma*

Los métodos utilizados en este trabajo detectan polimorfismos mediante el ensayo de subconjuntos de la cantidad total de variación en la secuencia de ADN de un genoma (Powell *et al*, 1996), por ende su principal diferencia radica en el cubrimiento realizado por cada técnica del genoma en estudio, además del número de fragmentos informativos de ADN generados por ensayo y su demanda tanto técnica como en tiempo (Uptmoor *et al*, 2003).

Con el fin de facilitar la selección de una tecnología apropiada para una determinada aplicación, se debe considerar en primer lugar, la cantidad de información generada por un tipo de marcador para lo cual, se han construido varios índices a fin de comparar en términos semejantes los diferentes sistemas.

Según Powell *et al* (1996), dos medidas del contenido de información obtenido mediante un sistema de marcadores son (i) la heterocigocidad teórica (H), la cual corresponde a la probabilidad de que dos alelos tomados aleatoriamente de una población puedan ser distinguidos utilizando el marcador en cuestión; y (ii) La razón multiplex (MR), la cual define el

número de loci (bandas) analizadas simultáneamente en un experimento. Estas dos métricas son representadas en un solo parámetro universal, denominado el índice del marcador (MI) y que ha sido utilizado para representar la cantidad de información obtenida por experimento para un sistema de marcadores determinado.

El segundo aspecto a considerar, y tal como se ha observado durante este trabajo, es la habilidad para determinar relaciones entre accesiones basadas en las estimaciones de las semejanzas genéticas, debido a que puede diferir de un sistema de marcadores a otro. Para comparar el grado de relación entre las matrices de semejanza obtenidas por dos sistemas diferentes se utiliza comúnmente la prueba de Mantel (Mantel, 1967), el cual es un procedimiento de regresión en el que las variables son los valores contenidos en la matriz de semejanza (o distancia).

El uso de la información obtenida mediante estos análisis comparativos ha sido utilizado para el diseño racional de programas de mejoramiento, conservación de germoplasma y manejo de recursos genéticos (p. ej. Powell *et al*, 1996; Uptmoor *et al*, 2003; Belaj *et al*, 2003; García-Mas *et al*, 2000; Maguirre *et al*, 2002). De aquí que la comparación a partir de los resultados experimentales generados del uso de los marcadores utilizados en este trabajo para la caracterización de las especies del género *Theobroma*, puede contribuir al manejo posterior de los materiales del banco debido a que el establecimiento de estas diferencias proveerá criterios válidos para la utilización de determinada técnica de acuerdo a los alcances requeridos y a los recursos disponibles para determinada labor.

1.6.1 Metodología

Determinación de los coeficientes de variación

Para su determinación se calculan los coeficientes de variación de la semejanza estimada a partir de la matriz de datos original y de sub-muestras generadas de esta matriz. Estas sub-muestras, se construyen mediante la selección aleatoria de bandas para formar conjuntos de matrices de determinado número de bandas (p. ej. 6, 100,....263 bandas).

El coeficiente de variación de cada una de las sub-muestras se calcula de acuerdo a la expresión:

$$CV = \frac{\delta}{\bar{s}} * 100$$

En donde \bar{s} , es la semejanza promedio de la matriz de semejanza generada a partir de las matrices binarias construidas y δ , el valor de la desviación estándar de dichos valores de semejanza (Daniel, 1979).

Derivación de la relación efectiva multiplex y del índice de marcador

Con base en lo reportado por Powell (1996), para un marcador genético, la heterocigocidad teórica (H_n), puede calcularse a partir de la sumatoria de las frecuencias de los alelos al cuadrado:

$$H_n = 1 - \sum p_i^2$$

donde p_i es la frecuencia alélica para el i -ésimo alelo. Esta expresión también es conocida como índice de diversidad o nivel de heterogeneidad, en particular cuando se trata de marcadores de tipo dominante como RAPD o AFLP.

Se puede calcular la media aritmética de la heterocigocidad (H_{av}) para cada clase de marcador:

$$H_{av} = \frac{\sum H_n}{n}$$

donde n , es el número de marcadores (loci) analizados.

En la práctica, los loci que son no-polimórficos en el germoplasma de interés son usualmente excluidos del experimento, lo cual no es posible con los marcadores de alto radio múltiplex como los AFLP. Así, para generar un tratamiento uniforme en ambas situaciones, es ventajoso considerar los loci polimórficos (p) y no-polimórficos (np) por separado:

$$H_{av} = \frac{(\sum H_p + \sum H_{np})}{(n_p + n_{np})}$$

en donde los sub – índices n y np están relacionando los valores calculados para las fracciones polimórficas y no – polimórficas de marcadores respectivamente.

Considerando que $\sum H_{np} = 0$, y que la fracción de loci polimórficos (β) es:

$$\beta = \frac{n_p}{n_p + n_{np}}$$

entonces, la heterocigocidad promedio (H_{av}) para todos los marcadores es igual al promedio de la heterocigocidad de los marcadores polimórficos multiplicada por la fracción de marcadores que son polimórficos (β):

$$H_{av} = \beta \frac{\sum H_p}{n_p}$$

Si n loci independientes son analizados simultáneamente (en cada carril de gel, como en AFLP y en RAPD), y el promedio de la heterocigocidad (la probabilidad que dos alelos diferentes sean observados por cada loci, promediada sobre todos los loci considerados) es H_{av} , entonces para un par de genotipos comparados, el número de marcadores polimórficos por carril de gel es el índice del marcador (MI):

$$MI = nH_{av}$$

o

$$MI = n\beta H_{av(p)}$$

El número de loci polimórficos en el germoplasma de interés, analizado por experimento, se denomina la relación efectiva múltiple (E), y es definida como:

$$E = n\beta$$

El índice del marcador, es el producto de la relación efectiva múltiple y el promedio de la heterocigocidad teórica para los marcadores polimórficos:

$$MI = EH_{av(p)}$$

Para la comparación de los marcadores RAPD y AFLP, en este trabajo se utilizan los 86 materiales que fueron caracterizados mediante las dos técnicas.

Evaluación de la capacidad de los marcadores RAPD y AFLP para inferir relaciones genéticas entre materiales del banco de germoplasma de Theobroma

Coefficientes de variación: efecto del tamaño de muestra

Con el fin de especificar el efecto del tamaño de muestra y evaluar la confiabilidad de las determinaciones realizadas, se calcula el coeficiente de variación en diferentes sub-muestras de la matriz binaria. Se evalúa inicialmente la evolución de este coeficiente respecto al número de “primers”, o combinaciones de estos; para lo cual las sub-muestras construidas consisten en las posibles combinaciones de bandas obtenidas directamente por el uso de un conjunto determinado de “primers”. Por ejemplo, con los 5 “primers” RAPD utilizados se generan 5 matrices de bandas obtenidas con los datos de cada “primer”, y a partir de esta: 10 matrices de posibles combinaciones de 2 “primers”; 10 matrices de posibles combinaciones de 3 “primers”; 5 matrices de posibles combinaciones de 4 “primers”; 1 matriz que agrupa los datos obtenidos por los 5 “primers”

Sobre cada una de las 30 matrices de semejanza obtenidas, se calcula el coeficiente de variación, cuya evolución promedio, respecto al número de “primers” utilizado se presenta en la Figura 1.14, la cual muestra que a medida que se aumentan el número de “primers”, decrece el coeficiente de variación alcanzando valores, en el caso de marcadores RAPD de 6.86% para *T. grandiflorum* y 2.50% para *T. bicolor*; y para los marcadores AFLP de 9.03% para *T. grandiflorum* y 11.16% para *T. bicolor*.

Sin embargo, con el fin de visualizar de forma menos compleja el grado en el cual la adquisición de nuevas bandas afecta al conjunto de los valores de semejanzas genéticas, se realiza un procedimiento similar al anterior, esta vez sin la distinción de la generación por un “primer” en particular de una banda determinada. Para esto, las sub-muestras construidas de la matriz original se realizan por selección aleatoria de bandas.

La figura 1.15 muestra los resultados obtenidos de este procedimiento, en

los cuales se pueden apreciar, con base en la tendencia mostrada por todas las curvas que, la adquisición de un número mayor de bandas no alteraría radicalmente el resultado obtenido.

Figura 1.14. Gráfica del promedio del Coeficiente de Variación (%) de los valores de semejanza vs. Número de “primers” utilizados para la caracterización molecular de *T. grandiflorum* y *T. bicolor* mediante las técnicas RAPD y AFLP

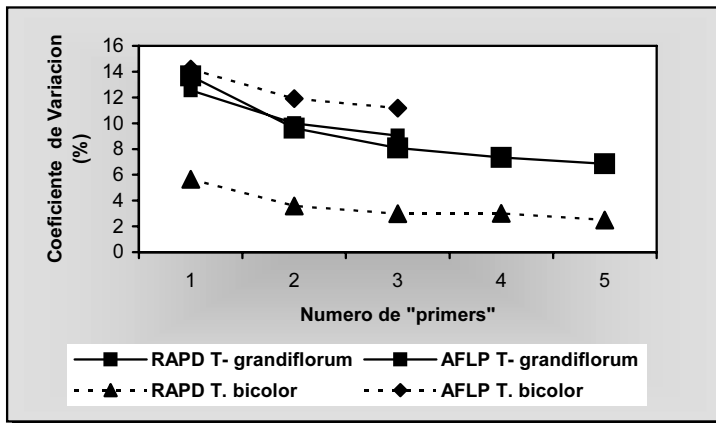
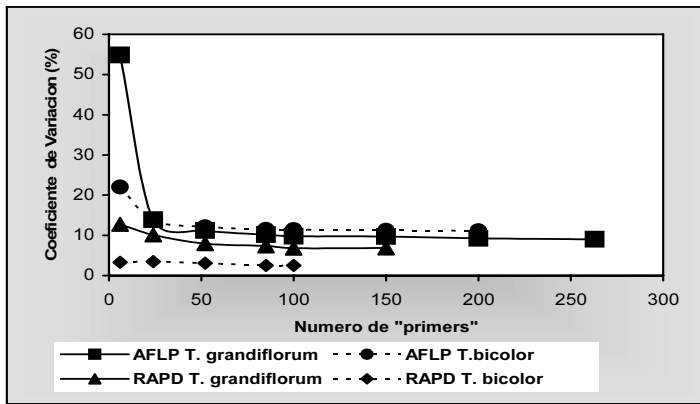


Figura 1.15. Gráfica del promedio del Coeficiente de Variación (%) de los valores de semejanza vs. Número de bandas generadas para la caracterización molecular de *T. grandiflorum* y *T. bicolor* mediante las técnicas RAPD y AFLP



1.6.2 Relaciones genéticas entre los materiales del banco

En la Tabla 1.7, se presenta un resumen de los valores de semejanzas genéticas calculados entre los materiales del banco para ambos sistemas de marcadores empleados. En el histograma de la Figura 1.16 se muestra la distribución de los valores de semejanza encontrados entre los tres posibles casos de parejas: (i) *T. bicolor* – *T. bicolor*; (ii) *T. grandiflorum* – *T. grandiflorum* y (iii) *T. grandiflorum* – *T. bicolor*. Se corrobora la mayor eficiencia, de la técnica AFLP para la discriminación en general de materiales, aunque para los casos de las semejanzas entre materiales de *T. grandiflorum* y entre *T. grandiflorum*– *T. bicolor* las diferencias entre estas distribuciones obtenidas por ambas técnicas no son marcadamente diferentes como sucedió en el caso de las semejanzas intra-específicas de *T. bicolor*, indicando la baja efectividad de la técnica RAPD para la detección de diferencias en esta especie.

Tabla 1.7 Valores promedios, máximos y mínimos de las semejanzas genéticas según Dice (1945) encontradas mediante el análisis de marcadores RAPD y AFLP en los materiales del banco de germoplasma del género *Theobroma*. (2346 parejas de *T. grandiflorum*; 136 parejas de *T. bicolor* y 1173 parejas *T. grandiflorum* y *T. bicolor*). (*)Estos valores corresponden a los máximos encontrados para las semejanzas de parejas *T. grandiflorum* y *T. bicolor*.

	<i>T. grandiflorum</i>		<i>T. bicolor</i>		<i>T. grandiflorum</i> & <i>T. bicolor</i>	
	RAPD	AFLP	RAPD	AFLP	RAPD	AFLP
Media	0.84	0.77	0.95	0.77	0.65	0.60
Máxima	0.98	0.93	1.00	0.96	0.28*	0.35*
Mínima	0.59	0.59	0.90	0.67	0.14	0.14

Correspondencia entre las matrices de semejanza generadas por RAPD y AFLP

Para comparar las relaciones obtenidas por el análisis mediante las dos técnicas se realizó la prueba de Mantel (1967) para las matrices de semejanza y cofenética tanto por especie como para el conjunto total de datos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1.8.

El coeficiente de correlación, para la comparación total de materiales fue de 0.969; valor que muestra una relación muy alta y significativa ($p < 0.001$) entre los resultados derivados independientemente por las técnicas RAPD y AFLP. La Figura 1.17 muestra la relación entre estos valores.

Figura 1.16 Histograma de ocurrencias de los valores de semejanza según Dice (1945) de los materiales del banco de germoplasma del género *Theobroma* analizados mediante marcadores RAPD y AFLP. El valor de las barras indican el número de semejanzas de determinado valor en intervalos de 0.02.

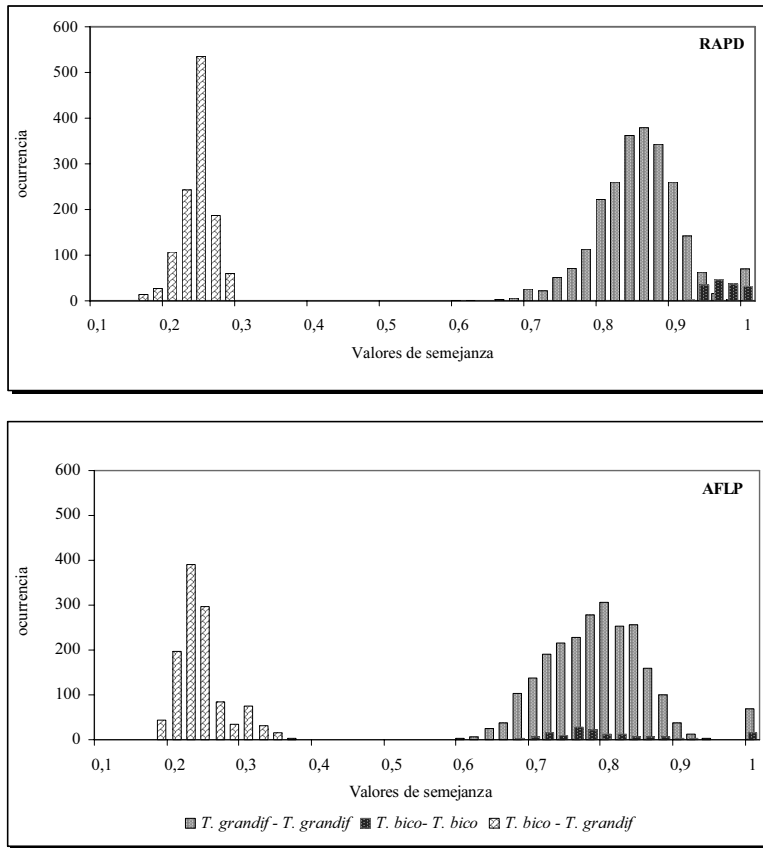
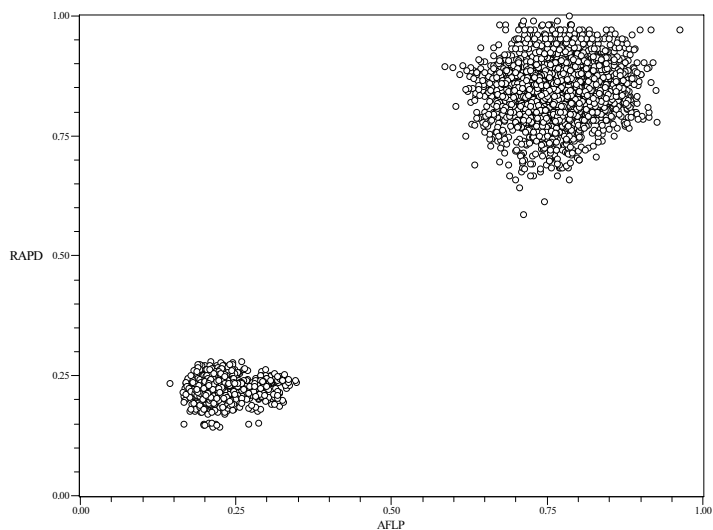


Tabla 1.8 Correlaciones entre marcadores RAPD y AFLP a partir de las matrices de semejanza y cofenéticas obtenidas por el análisis de los materiales del banco de germoplasma del género *Theobroma*.

	Matrices semejanza	Matrices cofenéticas
<i>T. grandiflorum</i> & <i>T. bicolor</i>	0.969	0.978
<i>T. bicolor</i> - <i>T. bicolor</i>	0.10095 (ns)	0.01122 (ns)
<i>T. grandiflorum</i> - <i>T. grandiflorum</i>	0.10838 (ns)	0.05846 (ns)

Figura 1.17. Representación bidimensional de la relación de valores de semejanza genéticas según Dice (1945) estimadas por el análisis de marcadores RAPD y AFLP de materiales del banco de germoplasma del género *Theobroma*



Sin embargo, al evaluar a nivel de relaciones intra-especie los valores de los coeficientes tanto para *T. grandiflorum* como para *T. bicolor* muestra que la correlación de estas dos técnicas fueron muy bajas y no significativas. Esto indica que los resultados generados entre técnicas se relacionan bien cuando el análisis se dirige a grupos de materiales genéticamente distantes, es decir cuando el caso estudio es la relación entre los materiales de las dos especies.

Mientras que no es factible encontrar algún tipo de correspondencia entre los resultados generados por las dos técnicas, cuando el análisis está enfocado a elucidar relaciones entre materiales de la misma especie.

Correspondencia entre las matrices de semejanza y su representación gráfica

Otro aspecto importante que se tiene en cuenta, fue la correlación entre la matriz de semejanza y la cofenética, para cada una de las técnicas empleadas. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 1.9. Estos, dan un estimativo de cómo los materiales agrupados en el dendrograma reflejan acertadamente los estimativos de las semejanzas genéticas en ambos siste-

mas de marcadores. El coeficiente obtenido es mayor en ambas técnicas cuando en el análisis de agrupamiento se tienen en cuenta los materiales de las dos especies, que cuando estas son analizadas de manera independiente.

Tabla 1.9 Correlaciones entre las matrices de semejanza y cofenéticas generadas del análisis de los materiales del banco de germoplasma del género *Theobroma* mediante marcadores RAPD y AFLP

Correlación matrices de semejanza & cofenética		
	RAPD	AFLP
<i>T. grandif</i> & <i>T. bico</i>	0.994	0.993
<i>T. bicolor</i> - <i>T. bicolor</i>	0.775	0.874
<i>T. grandiflorum</i> - <i>T. grandiflorum</i>	0.765	0.779

1.6.3 Comparación de la eficiencia de los marcadores RAPD y AFLP para la detección de polimorfismos y variación genética

Eficiencia en la detección de polimorfismos

Se calculan los valores de heterocigocidad teórica (H) para cada marcador, en este caso debido al carácter dominante de las técnicas empleadas, cada banda es considerada como un marcador en el cual solo se pueden distinguir dos estados (presencia y ausencia), correspondientes a un locus con dos alelos.

Los promedios aritméticos obtenidos se presentan en la Tabla 1.10. Para este cálculo se excluyen las bandas monomórficas, las cuales son incluidas en el cálculo de la relación múltiplex efectiva y el índice del marcador.

Los valores de $H_{ar(p)}$ calculados a partir de marcadores RAPD y AFLP para el análisis de la totalidad de los materiales son significativamente diferentes ($p < 0.001$, prueba de T) mostrando mayor eficiencia para los marcadores RAPD en la detección de cantidad de polimorfismos para la discriminación de las dos especies analizadas; sin embargo estos valores no muestran diferencias significativas en ninguno de los casos independientes, es decir que su eficiencia es similar en cuanto a la detección de polimorfismos a nivel intraespecífico.

Tabla 1.10 Comparación de los promedios de: (i) heterocigocidad teórica para los marcadores polimórficos ($H_{av(p)}$) y sus desviaciones estándar (SD de $H_{av(p)}$); (ii) fracción de marcadores polimórficos (β); (iii) Radio múltiplex efectivo (E); (iv) Índice del marcador (MI), para marcadores RAPD y AFLP, a partir de los datos experimentales obtenidos de 86 materiales analizados del género *Theobroma*.

	RAPD			AFLP		
	<i>T. grandiflorum</i>	<i>T. bicolor</i>	<i>T. grandiflorum</i> & <i>T. bicolor</i>	<i>T. grandiflorum</i>	<i>T. bicolor</i>	<i>T. grandiflorum</i> & <i>T. bicolor</i>
Numero de Bandas	72	58	117	263	156	375
$H_{av(p)}$	0,26	0,33	0,30	0,23	0,35	0,25
SD de $H_{av(p)}$	0,14	0,14	0,13	0,16	0,12	0,12
	0,79	0,24	0,96	0,92	0,82	0,99
E	11,40	2,80	22,40	81,00	42,67	123,67
MI	2,98	0,93	6,81	18,48	14,74	31,25

Índice de marcador

En la Tabla 1.10, se presentan los valores a partir de los datos obtenidos mediante RAPD y AFLP para los materiales del género *Theobroma*. La comparación realizada muestra en todos los casos discutidos la mayor utilidad de los marcadores AFLP. Esto es consecuencia de su capacidad de identificar un número mayor de polimorfismos en un solo ensayo y no en el contenido de información que pueden generar estos marcadores, pues es en los dos casos muy parecida, con excepción de las diferencias encontradas para el análisis del conjunto total de marcadores.

Establecimiento de relaciones genéticas

El resultado arrojado muestra en la mayoría de los casos coeficientes de variación menores al 10%. El único caso que no muestra un coeficiente de variación por debajo de este valor son los materiales de *T. bicolor* analizados con marcadores AFLP (11.16%).

Se ha mostrado que el incremento en el número de bandas provee estimativos más precisos de las relaciones genéticas y reduce la variación causada por el sobre o sub – muestreo de ciertas regiones del genoma, sin embargo es necesario considerar el costo en términos de tiempo y recurso (Zeid, 2003). Según Tivang *et al* (1994) (Citado por Uptmoor *et al*, 2003), un valor del 10% para este coeficiente es considerado como umbral para estimativos confiables de semejanzas genéticas.

En el caso de las determinaciones de *T. bicolor* con marcadores AFLP no se alcanza este umbral y de acuerdo a la tendencia mostrada por la gráfica (Figura 1.14), se requerirían alrededor de 380 bandas para esto (aproximadamente 7 combinaciones de “primers”), lo cual contrasta notablemente con los resultados arrojados con marcadores RAPD, en donde el valor de CV se encuentra por debajo del 10%.

Las diferencias en el valor de CV entre 110 y 156 bandas fue del 0.5% y entre 130 y 156 del 0.1%, indicando que las determinaciones realizadas fueron suficientes pues cumplen con la condición de saturación de datos para reducir la variación generada por muestreo no uniforme del genoma, aspecto indispensable en cualquier caracterización molecular. Por lo tanto el umbral sobre este coeficiente en algunos casos puede no ser estrictamente un indicativo de la confiabilidad de la determinación, como si la evaluación de la evolución de este coeficiente respecto al número de bandas determinadas.

Por ejemplo; Lerceteau *et al* (1997b), muestra que en la evaluación de accesiones de *T. cacao* utilizando 67 bandas RAPD y 122 fragmentos RFLP no se alcanzaron valores de CV menores al 10%. Se aprecia inclusive, una saturación menor aunque suficiente en datos en comparación a la alcanzada en este trabajo; según su estimativo se necesitarían 421 fragmentos RFLP y 506 bandas RAPD para alcanzar el umbral. Bajo estas condiciones, el coeficiente de correlación entre los resultados obtenidos por las dos técnicas fue de 0,77, lo cual valida la confiabilidad de estos.

De esta manera, analizando la evolución presentada para los coeficientes de variación como criterio para determinar la confiabilidad de los resultados presentados se puede afirmar que el tamaño del muestreo utilizado es suficiente para estimar las semejanzas genéticas entre los materiales del banco. Este procedimiento constituye una herramienta importante del análisis realizado para indicar el punto en el cual la cantidad de trabajo experimental logra cubrir con un buen grado de confianza estos estimativos, aspecto de utilidad para la disposición de los recursos del trabajo en costo y tiempo.

A partir de los histogramas de semejanzas (Figura 1.16), se puede apreciar la capacidad de discriminación de los materiales por parte de ambas técnicas; en general mayor para AFLP. Un caso sobresaliente es el de los mate-

riales de *T. bicolor*, los cuales presentaron valores de semejanza calculada a partir de marcadores RAPD entre 0.9 – 1.0 y que después de la comparación con marcadores AFLP permiten concluir que la técnica RAPD posee una baja capacidad de discriminación para los materiales de esta especie.

Dentro de los sistemas de marcadores moleculares más utilizados, la técnica RAPD ha sido una de las más cuestionadas para el establecimiento de relaciones entre materiales debido a su menor capacidad de discriminación a nivel intra-especie (p.ej. Perry *et al*, 1998; Thormann *et al*, 1994). A pesar de esto, la técnica sigue siendo empleada como apta para trabajos de caracterización de germoplasma (p.ej. Offei *et al*, 2004; Raddová *et al*, 2003; Renganayaki *et al*, 2001; Garcia-Mas *et al*, 2000), esto debido a su simplicidad técnica y bajo costo. Esto, junto con los resultados obtenidos en este trabajo indica que la aplicabilidad de esta técnica (y de cualquier técnica en general) dependerá de la relación entre el genoma de la especie a analizar y la naturaleza, condiciones de generación y discernimiento de polimorfismos empleada.

Bajo las condiciones experimentales presentadas, se observa que el uso de marcadores RAPD es efectivo para la discriminación de materiales de *T. grandiflorum* y entre especies (*T. grandiflorum* – *T. bicolor*), y por ende su uso se debe restringir preferiblemente hacia casos en los que se deseen elucidar estas relaciones. Mientras que la técnica AFLP permite un nivel más amplio de discriminación y su aplicación es recomendable para casos de estudio similares en cualquiera de estas dos especies.

Igualmente los coeficientes calculados mostraron una correlación muy alta, debida a la inclusión de dos especies en el análisis; sin embargo, la correlación cuando se tratan ambas especies de manera independiente fue muy baja revelando la no-asociación entre los resultados generados por cada una de las dos técnicas.

Esto concuerda con la interpretación dada por Powell *et al* (1996) para soya cultivada (*Glycine max*) y silvestre (*G. soja*), en donde se generaron coeficientes altos de correlación entre las técnicas AFLP, RFLP, RAPD y SSR debido a la inclusión de las accesiones de *G. soja*. Cuando se realiza este análisis entre los valores de semejanza de solo las accesiones de *G. max*, el valor del coeficiente de correlación disminuye en todos los casos.

A nivel intra-específico, la asociación entre las técnicas RAPD y AFLP son variables, dependiendo del modelo estudiado al igual que de las condiciones experimentales. Muestra de esto es el valor de este coeficiente reportado para varios trabajos: 0.24 para soya cultivada (Powell *et al*, 1996); 0.66 para la grama *Poa arachnifera* Torr (Renganayaki *et al*, 2001); 0.4 en árbol de olivo (Belaj *et al*, 2003). En estos trabajos, es posible apreciar que los valores de estas correlaciones para las diferentes técnicas son reflejadas en las estructuras de los dendrogramas generados para interpretar las relaciones entre materiales.

A lo largo de este trabajo, las diferencias en la estructura de los dendrogramas generados para el banco de germoplasma es evidente, por tanto los valores de coeficiente de correlación reportados proporcionan un estimado cuantitativo de la asociación de los resultados obtenidos por cada técnica, lo cual sustenta su interpretación de manera independiente, contrastante en varios aspectos, y la aplicabilidad de los marcadores para trabajos posteriores de caracterización.

1.6.4 Eficiencia de los marcadores RAPD y AFLP para la detección de polimorfismos y variación genética

Heterocigocidad teórica

La heterocigocidad teórica para los marcadores polimórficos ($H_{av(p)}$) para las especies analizadas de manera independiente no muestran diferencias significativas, indicando que el contenido de información generado por las bandas polimórficas de los sistemas de marcadores RAPD y AFLP es similar. Estos valores fueron consistentes con los reportados en otros trabajos (Powell *et al*, 1996; Garcia-Mas *et al*, 2000; Belaj *et al*, 2003).

La importancia del cálculo a partir de las frecuencias generadas solo por las bandas proporciona elementos que conduce a entender la razón de las partes que componen el índice del marcador (MI). Para considerar esto, basta con citar el caso de *T. bicolor* con marcadores RAPD, el cual ha sido durante este capítulo el más discutido debido a la baja cantidad de polimorfismos generados, lo cual se aprecia a nivel comparativo con las otras técnicas en su valor de la fracción de marcadores polimórficos (β). Sin embargo, los valores de $H_{av(p)}$ no son significativamente diferentes con respecto a los generados por AFLP, indicando que la probabilidad de dos

bandas polimórficas generadas por cualquiera de estos dos sistemas de marcadores para discriminar entre materiales de *T. bicolor* es muy parecida; sin embargo, este valor no proporciona un estimativo del esfuerzo requerido para generar una banda polimórfica de *T. bicolor* mediante la técnica RAPD.

Los valores de $H_{av(p)}$ calculados a partir de las bandas generadas para la totalidad de los materiales es significativamente diferente, mostrando una mayor probabilidad de la técnica RAPD para discriminar entre dos materiales tomados al azar del banco. Esto se debe por una parte a que el número de marcadores polimórficos tenidos en cuenta se aumenta como consecuencia de que para una especie, algunas bandas monomórficas no son necesariamente compartidas con la otra, y al cambio en los valores de las frecuencias de cada loci tenido en cuenta para el cálculo, lo cual es influenciado por la diferencia en el número de materiales de cada especie analizada.

Utilidad del marcador e Índice de marcador

Una vez comprendida la razón de encontrar un balance entre la información obtenida por cada marcador y el esfuerzo requerido para generar polimorfismos, como clave para el uso racional de estos marcadores para el análisis de germoplasma, se puede apreciar que el índice del marcador (MI) es un criterio importante para futuros trabajos relacionados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede considerar la mayor utilidad de los marcadores AFLP. Esta utilidad no reside en la información que generan los marcadores polimórficos, como se desprende del análisis de $H_{av(p)}$, sino en la diferencia en su capacidad para generar polimorfismos en un solo ensayo (E).

La mayor utilidad de los marcadores AFLP ha sido también reportada en otros trabajos concordando en que esto es debido a la capacidad de generación de polimorfismos con respecto a otros sistemas (Powell *et al*, 1996; Garcia-Mas *et al*, 2000; Belaj *et al*, 2003).

Sin embargo, se insiste en que la utilización en este caso de los marcadores RAPD y AFLP deberá determinarse por las propiedades de cada marcador y el problema particular a analizar, lo cual en conjunto con consideraciones de naturaleza práctica y económica, contribuirá eficientemente al manejo posterior del banco de germoplasma del género *Theobroma*.

Referencias Bibliográficas

Alves, R.M., Artero, A.S., Sebbenn, A., Figueira, A. 2003a. Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum., by microsatellite markers. *Genet Mol Biol.* 3: 373 – 379.

Alves, R.M., Franco Garcia, A.A., Cruz, E.D., Figueira, A. 2003b. Seleção de descritores botânico-agronômicos para caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro. *Pesq Agropec Bras.* 38: 807 – 818.

Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L., Trujillo, I. (2003). Comparative study of the discrimination capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing relationships in olive. *Theor Appl Genet.* 107: 736 – 744.

Couch, J.A.; Fritz, P.J. (1990). Isolation of DNA from plant high in polyphenolics. *Plant Mol Biol Rep.* 8: 8 – 12.

Daniel, W.W. (1979). Bioestadística: base para el análisis de la ciencias de la salud. Ed. Limusa. México, D.F. México. 485p.

Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Mol Biol Rep.* 1: 19 - 21.

Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26:297-302.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13 – 15.

Duarte, J.M., Dos Santos, J.B., Melo, L.M. (1999). Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genet Mol Biol.* 22: 427 – 432.

García-Mas, J., Oliver, M., Gómez-Paniagua, H., de Vicente, M.C. (2000). Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor Appl Genet.* 101: 860 – 864.

Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. 1992. Application of random am-

plified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol.* 1: 55 – 63.

Hansen, M., Halldén, C., Torbjörn, S. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Mol Biol Rep* 16:139 - 146.

Keb-Llanes, M., González, G., Chi-Manzanero, B., Infante, D. 2002. A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in *Agavaceae* and other tropical plants. *Plant Mol Biol Rep.* 20: 299a – 299e.

Lerceteau, E., Quiroz, J., Soria, J. Sophie, F. Pétiard, V., Crouzillat, D. 1997a. Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using DNA and morphological analyses. *Euphytica.* 95: 77 – 87.

Lerceteau, E., Robert, T., Pétiard, V., Crouzillat, D. 1997b. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor Appl Genet.* 95: 10 – 19

Maguirre, T.L., Peakall, T.L., Saenger, P. 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theor Appl Genet.* 104: 388 – 398.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209 – 220.

McPherson, M.J., Oliver, R.J., Jurr, S.J. 1992. The Polymerase chain reaction. En: Ed. Gurr, S.J., McPherson, M.J., Bowles, D.J. *Molecular plant pathology: A practical approach.* Vol 1. Oxford University Press, N.Y. p. 123 – 165.

Michelmore, R.W., Kesseli, R.W., Francis, D.M., Fortin, M.G., Paran, I., Yang, C.H. 1992. Strategies for cloning plant disease resistance genes. En: Ed. Gurr, S.J., McPherson, M.J., Bowles, D.J. *Molecular plant pathology: A practical approach.* Vol 2. Oxford University Press, N.Y. p. 233 – 288.

Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol.* 10: 389-394.

Offei, S.K., Asante, I.K., Danquah, E.Y. 2004. Genetic structure of seventy cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*, Linn. Schott) accessions in Ghana based on RAPD. *Hereditas.* 140: 123 – 128.

Pan, Y.B., Burner, D.M., Ehrlich, K.C., Grisham, M.P., Wei, Q. 1997. Analysis of primer-derived, non-specific amplification products in RAPD-PCR. *Biotechniques*. 22: 1071-1074, 1076 – 1077.

Parra, H.M. 2001. Colecta, conservación y análisis de la diversidad genética en ulluco (*Ulluco tuberosum* Caldas) de Colombia. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia. 233p.

Perry, M.D., Davey, M.R., Power, J.B., Lowe, K.C., Bligh, H.F.J., Roach, P.S., Jones, C. 1998. DNA isolation and AFLP™ genetic fingerprint of *Theobroma cacao* (L.). *Plant Mol Biol Rep*. 16: 49 – 59.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Ralfaski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed*. 2: 225 – 238.

Raddová, J., Baránek, M, Oukropec, I., Vachun, M., Pidra, M. 2003. RAPD analysis of Peaches within Czech National Collection. *Czech J Genet Plant Breed*. 39: 113 – 119.

Renganayaki, K., Read, J.C., Fritz, A.K. 2001. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet*. 102: 1037 – 1045).

Risterucci, A.M., Grivet, L., N’Goran J.A.K., Pieretti. I., Flamet, M.H., Lanaud, C. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor Appl Genet*. 101: 948 – 955.

Rohlf, F.J. (1998). NTSys-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.02j.

Szmidt, A. 2004. MPGL – DNA extraction from recalcitrant plant. Ultima actualización: 06/04/2004. <http://genetics.biology.kyushu-u.ac.jp/pgen/method/dnaextraction.htm>.

Stein, A., Raoult, D. 1992. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. *Nucl Acids Res*. 20: 5237 – 5238.

- Thormann, C.E., Ferreira, M.E., Camargo, L.E.A., Tivang, J.G., Osborn, T.C. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor Appl Genet.* 88: 973 – 980.
- Uptmoor, R., Wenzel, W., Friedt, W., Donaldson, G., Ayisi, K., Ordon, F. 2003. Comparative analysis on the genetic relatedness of *Sorghum bicolor* accessions from Southern Africa by RAPD, AFLP and SSR. *Theor Appl Genet.* 106: 1316 – 1325.
- Vargas, G., Argüelles, J. 2000. Clasificación y caracterización morfoagronómica del germoplasma de cinco especies frutales amazónicas. Instituto Amazónico de investigaciones científicas, SINCHI. San Jose del Guaviare, Colombia. 28p.
- Vargas, G., Suárez, S., Cárdenas, D. 2002. Descripción taxonómica de nueve especies frutales establecidas en el banco de germoplasma del Instituto SINCHI. San José del Guaviare, Colombia. 44p.
- Vos, P, Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new DNA technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res.* 23: 4407 – 4414
- Wilde, J., Waugh, R., Powell, W. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet.* 83: 871 – 877.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res.* 18: 6531 – 6535.
- Zeid, M. 2003. Analysis of genetic diversity based on molecular markers (AFLP) and of heterosis in faba bean (*Vicia faba* L.). Tesis doctoral. Georg-August-University Göttingen – Faculty of agricultural sciences. Göttingen (Alemania). 100p.

2. CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO VEGETATIVO DE ESPECIES PROMISORIAS DEL GÉNERO *Theobroma* BAJO CONDICIONES DE LA AMAZONIA COLOMBIANA

Por: Jaime Alberto Barrera¹, María Soledad Hernández¹, Guillermo Vargas Ávila¹, Orlando Martínez W², Luz Marina Melgarejo³, Adriana Emilcen Casas³, José Edgar Zambrano⁴, Carmen Dolores Bedoya⁴

El género *Theobroma*

La palabra *theobroma* deriva del griego (*theo* = Dios y *broma* = alimento) que significa alimento de los dioses. Se han descrito 22 especies pertenecientes al género *Theobroma*, pero usualmente 12 son aceptadas, de estas, nueve son nativas de la Amazonía, de aquí que se sugiere que el centro de distribución genética se localice en el centro – oriente de la región (Gentry, 1996).

La mayoría de los árboles son de tamaño medio y se encuentran en tierras bajas, suelos relativamente buenos. Las hojas siempre oblongas, con una longitud uniforme y peciolo cortos, pulvínulo engrosado que alcanza al

¹ Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI

² Universidad de los Andes

³ Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología y Facultad de Agronomía

⁴ Universidad de la Amazonia

menos un tercio del peciolo (y frecuentemente el peciolo completo). Las hojas de la mayoría de las especies son densamente pubescentes con tricomas en forma de estrella y con el envés más claro que el haz. Las flores y los frutos son ramiformes. Las flores son pequeñas y con estambres conspicuos, los pétalos tienen un apéndice corto espatulado, los frutos son desde elipsoides hasta oblongos, rara vez grandes, con un exocarpo fibroso y las semillas embebidas en la pulpa central (Gentry, 1996).

2.1 Copoazú (*Theobroma grandiflorum* (Will ex Spreng) Shum)

2.1.1 Clasificación taxonómica

CLASE:	Magnoliopsida.
SUBCLASE:	Caryophyllidae.
ORDEN:	Malvales
FAMILIA:	Esterculiaceae
GENERO:	<i>Theobroma</i>
ESPECIE:	<i>grandiflorum</i>
Nombre científico:	<i>Theobroma grandiflorum</i>
Nombre Común:	en Perú: Copoazú; en Brasil: copoacu, cacau, cupuacu verdadeiro; en Colombia: bacau; Ecuador: patas.

2.1.2 Descripción botánica

El árbol puede crecer hasta 18 m. en estado silvestre, cultivado alcanza una altura entre 5 m. a 8 m (Foto 1). Presenta ramificación tricotómica a partir de los 14 meses en promedio, crece en etapas cada metro o metro y medio. Las ramas son plagiotrópicas. La formación o estructura de las mesas o ramificaciones es importante para una producción balanceada de frutos. Las hojas son simples subcoriáceas, lámina foliar oblonga u oblonga-ovalada, glabra de color verde en el haz y verde claro o rosado en el envés. Las inflorescencias están ubicadas en la parte apical de las ramas plagiotrópicas en número de 3 a 5. Flor pentámera, 5 sépalos y 5 pétalos. Ovario súpero pentagonal con 5 lóculos multiovalados. Frutos en baya drupácea de forma elipsoide u oblonga, con exocarpio rígido, leñoso y verde recubierta por una coloración ferruginosa y polvosa que se desprende al manipular. El mesocarpio es blanco de 7 mm de espesor. El fruto

puede contener de 20 a 50 semillas pero existen plantas que producen frutos sin semillas (Vargas y Argüelles, 2000).

Planta leñosa, arbórea, de ciclo perenne, de crecimiento erecto y semierecto, de forma cilíndrica. En árboles de tres años y medio se ha registrado tronco con diámetro de 10cm y altura de 4m. En estado adulto la altura puede llegar a 18m. La hoja es simple, alterna, oblanceolada o elíptica. Los brotes nuevos presentan pubescencia y antocianinas. La flor es solitaria, axilar, con corola de color morado, es pubescente y tiene estípulas en el pedúnculo. El fruto es una baya anfisarca, posee diferentes formas: ova-da, elíptica y oblonga, generalmente tiene ápice y base terminadas en punta. La cáscara es de 1cm de grosor, dura, recubierta por pilosidades de color café rojizo, la pulpa que rodea las semillas es blanca, crema o amarillo cremoso. La forma de las semillas es elíptica-aplanada (Vélez, 1991).

2.1.3 Áreas de distribución de la especie

El género *Theobroma* es típicamente tropical, distribuido a lo largo del hemisferio occidental entre 18°N y 15°S. Este género, ampliamente difundido a través de la cuenca amazónica y la orinoquía, es uno de los más antiguos. Mediante la elevación de los Andes, durante el terciario, el aislamiento de las especies amazónicas favoreció su especiación, presentándose endemismo regional o local. Según Clement (1991), se atribuye a la Amazonia nororiental (sureste del Estado del Pará y noreste de Maranhao, Brasil; en las riberas de los ríos Tocantis, Tapajos, Aranguala y Guama) como centro de distribución.

Kerr y Clement (1980), citados por Zambrano (2004), en un estudio en la región occidental de la hoya amazónica (Manaos-Brasil, Leticia-Colombia, Iquitos-Perú y áreas fronterizas de Colombia-Brasil-Venezuela y Colombia-Brasil-Perú), reportan el Copoazú como un frutal ampliamente conocido y cultivado por los nativos de la vasta región.

El Copoazú se encuentra, en poblaciones naturales, en la parte sur y suroeste de Pará en Brasil (Ducke, 1953, citado por Venturieri, 1985). Ocasionalmente es encontrado en Ecuador, Guayana, Martinica, Costa Rica y Trinidad y Tobago, casi siempre en instituciones de investigación. En Colombia, la distribución de esta especie se reporta de carácter antropogéni-

co, debido a que la semilla se trajo primero del Brasil, específicamente de Manaos hasta el Putumayo, y de allí ha venido extendiéndose al Caquetá.

2.1.4 Características agroecológicas

Esta especie amazónica se encuentra en selvas firmes húmedas, primarias altas y secundarias, en el estrato medio (10-15 m), con 1 o 2 indiv/ha. Además se sugiere que en selvas secundarias ayuda a la regeneración luego de cultivos y abandono (Clement, 1991). Cavalcante (1979) en años anteriores reportó árboles de Copoazú de 20 m, en la selva virgen baja en el río Itacalúmas (Brasil).

La fisonomía general de la Amazonia es uniforme y las variaciones del relieve son poco significativas, se le encuentra en poblaciones naturales en vegas altas de los ríos y caños, llanuras aluviales, terrazas medias y bajas, a una altura máxima de 400 m. Se reporta en Costa Rica a una altura de 600 m. En Palmira-Valle-Colombia, donde fue introducido el Copoazú por Mejía (1985), se encuentra creciendo cerca de los 1.000 m.

El Copoazú pertenece a la zona de vida bosque húmedo tropical, en la cuenca amazónica y crece en condiciones de temperatura de 21.6°C a 27.5°C, humedades relativas entre 64 y 93% y precipitaciones anuales entre 1900 y 3100mm. En el Putumayo el Copoazú se ha encontrado creciendo bien en las siguientes condiciones: temperatura media anual de 26°C; precipitación promedio anual de 4160.7mm y brillo solar de 1405 horas/año (datos promediados de los años 1955 a 1993). En condiciones naturales, el Copoazú se desarrolla en tierras no inundables y de buen drenaje; sin embargo, resiste períodos cortos de anegamiento; en ultisoles y oxisoles de textura arcillo-arenoso o francos, ricos en humus. En Putumayo se ha encontrado adaptación a suelos inundables, ácidos, con bajos porcentajes de materia orgánica y textura arcillosa (Vélez, 1991).

2.1.5 Variabilidad genética

Al parecer la única diferencia entre los árboles silvestres y los cultivados, es su altura. El copoazú en áreas selváticas puede alcanzar hasta 20 m, mientras que en cultivo logra el porte de un cacao típico (5-6 m, máximo 8). Las prácticas de cultivo y la selección deben haber jugado un papel en este sentido, como en muchas otras especies frutales.

Son tres las variedades cultivadas:

Redondo. Este es el común en la Región Amazónica. El fruto tiene un tamaño mediano, terminado en forma redonda, con cerca de 1.5 Kg.

Mamorana. El fruto tiene gran tamaño. Fruto elongado, terminado en punta. Con cerca de 2.5 a 4.0 Kg.

Mamau. Fruto sin semillas (partenocárpico). Puede alcanzar 2.3 Kg, con el 67% de pulpa.

La variedad Mamau fue localizada en solares de nativos residentes de las riberas del río Tocantins, en la Amazonia brasilera. Esta variedad tiene la ventaja de reducir los costos de labor al despulpado, pues carece de semillas, pero desafortunadamente, es susceptible a la “escoba de bruja” y tiene baja producción. Generalmente en los frutos partenocárpico se ve deteriorado fácilmente su sabor y aroma (Venturieri,1985).

Posiblemente las otras dos variedades se encuentran distribuidas por toda el área natural de la especie. Al parecer se han encontrado algunos genotipos resistentes a la “escoba de bruja” (Clement *et al.*, (1982), citados por Zambrano, 2004), pero al respecto no hay precisión de cuáles son.

La acelerada deforestación en las áreas de origen y distribución, ha ocasionado que este frutal presente actualmente una gran erosión genética (variabilidad intraespecífica); por ejemplo, en el sur de Pará, Brasil, centro de origen del Copoazú donde han sido inundadas 2.300 Km² de selva primaria en la cuenca del río Tocantins, y que sufre además de una intensa deforestación por la construcción de una carretera.

De las colectas de Copoazú realizadas por Corpoica - Colombia, se tiene cerca de 15 ecotipos diferentes con una marcada variabilidad; se ha evaluado cantidad de pulpa, sabor y cantidad de semillas. En la actualidad hay un banco de germoplasma de materiales que provienen en su mayoría de la colección de frutales ubicada en Puerto Asís, Putumayo, la cual contiene algunos ejemplares traídos de Manaus (Brasil) en los años 70 (Varón y Rojas., 2001).

Los bancos de germoplasma son utilizados para la regeneración, multiplicación, distribución, caracterización y evaluación con fines de selección y mejoramiento de los materiales promisorios. La caracterización consiste en registrar los descriptores (variables) de alta heredabilidad, es decir, aquellas que pueden detectarse a simple vista y se expresan en todos los ambientes. El color de la flor, número de estructuras florales, número de hojas, disposición de las raíces, etc. son algunas de las características altamente heredables (Painting, 1993).

La evaluación consiste en registrar las características susceptibles a diferencias por efecto del ambiente (genotipo x ambiente = fenotipo). La susceptibilidad a sequía, las tasas de crecimiento en altura, rendimiento biológico y rendimiento agronómico, son algunas de las variables que se tienen en cuenta en las evaluaciones agronómicas (Painting, 1993).

El Instituto Sinchi en Colombia, cuenta con un banco de germoplasma del género *Theobroma*, establecido en la Estación Experimental El Trueno ubicada en la vereda San Antonio del municipio El Retorno – Guaviare, conformado por ecotipos de tres especies así: Copozú (*Theobroma grandiflorum*) establecida en el año de 1983, en la actualidad está conformado por 226 individuos (árboles), de los cuales 106 se encuentran agrupados en 12 ecotipos, producto de la caracterización morfoagronómica realizada en los años 1999 -2000; Maraco (*Theobroma bicolor*), establecida en el año 2000, se encuentra conformada por 21 individuos (árboles) agrupados en 4 ecotipos y Cacao (*Theobroma cacao*) conformado en la actualidad por 111 individuos (árboles) de tres edades diferentes distribuidos en 22 ecotipos.

Estos bancos activos de germoplasma son de gran importancia para el enriquecimiento de los sistemas productivos y la agroindustria regional amazónica; por lo cual actualmente se profundiza en la caracterización y evaluación morfoagronómica y el monitoreo de los periodos de floración de la especie *Theobroma grandiflorum*, y en la caracterización morfológica y fenológica de las especies *Theobroma bicolor* y *Theobroma cacao*, con el fin de determinar parámetros de crecimiento, desarrollo y producción.

Las evaluaciones agrofitosanitarias que se presentan en este documento se realizaron durante 90 días en el banco activo de *T. grandiflorum*, per-

mitiendo la selección de individuos que presentaron la mayor tolerancia a problemas de patógenos como Escoba de Bruja (*Crinipellis perniciososa*) y Moniliasis (*Monilia rozeri*). Esta evaluación se realizó con base en los parámetros definidos por Barros (1981) para el monitoreo en *Theobroma cacao*.

Banco de germoplasma de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*)

Monitoreo fitosanitario en Copoazú

El monitoreo se fundamenta en observaciones, cada 15 días, a todos los individuos (226 árboles), los registros tomados se relacionan con el estado fitosanitario de cada uno de ellos: presencia de Escoba de Bruja (*Crinipellis perniciososa*) en ramas y en frutos y presencia de Monilia (*Monilia rozeri*) en frutos. La valoración del daño se realiza de acuerdo a la propuesta de Barros (1981) para cuantificación del daño de patógenos en cacao.

Escala para evaluación de Incidencia de enfermedades por patógenos en ramas y frutos:

Nula = (0)	Sin presencia del patógeno en ramas o frutos.
Leve = (1)	Presencia del patógeno entre 1 a 3 ramas o frutos por árbol.
Moderada = (2)	Presencia del patógeno entre 4 a 6 ramas o frutos por árbol.
Alta = (3)	Presencia del patógeno en más de 7 ramas o frutos por árbol.

El resultado de las evaluaciones de la incidencia de Escoba de Bruja en estructuras vegetativas (ramas) y reproductivas (frutos) y de Monilia en frutos, se relacionan en la tabla 2.1, que presenta una tabla de frecuencias de doble entrada. Esta permite relacionar el número de individuos y el porcentaje de daño en cuanto a niveles de incidencia por los patógenos.

TABLA 2.1. Grado de incidencia por patógenos Escoba de Bruja (*Crinipellis pernicioso*) y Monilia (*Monilia royeri*) en diferentes individuos del Banco de Germoplasma de Copoazu

VARIABLES	EVALUACIÓN	INCIDENCIA EN NÚMERO Y PORCENTAJE			
		ALTA	MODERADA	LEVE	NULA
ESCOBA DE BRUJA RAMAS Árboles (%)	1	43 19.03	53 23.45	50 22.12	80 35.40
ESCOBA DE BRUJA FRUTOS Árboles (%)		74 32.74	5 2.21	9 3.98	138 61.06
MONILIASIS Árboles (%)		24 10.62	2 0.88	7 3.10	193 85.40
ESCOBA DE BRUJA RAMAS Árboles (%)	2	0 0.00	0 0.00	35 15.49	191 84.51
ESCOBA DE BRUJA FRUTOS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	0 0.00	226 100.00
MONILIASIS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	0 0.00	226 100.00
ESCOBA DE BRUJA RAMAS Árboles (%)	3	5 2.21	13 5.75	31 13.72	177 78.32
ESCOBA DE BRUJA FRUTOS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	0 0.00	226 100.00
MONILIASIS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	0 0.00	226 100.00
ESCOBA DE BRUJA RAMAS Árboles (%)	4	0 0.00	3 1.33	34 15.04	189 83.63
ESCOBA DE BRUJA FRUTOS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	0 0.00	226 100.00
MONILIASIS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	0 0.00	226 100.00
ESCOBA DE BRUJA RAMAS Árboles (%)	5	0 0.00	8 3.54	28 12.39	190 84.07
ESCOBA DE BRUJA FRUTOS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	2 0.88	224 99.12
MONILIASIS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	2 0.00	226 100.00
ESCOBA DE BRUJA RAMAS Árboles (%)	6	1 0.44	3 1.33	18 7.96	204 90.27
ESCOBA DE BRUJA FRUTOS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	4 1.77	222 98.23
MONILIASIS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	1 0.44	225 99.56
ESCOBA DE BRUJA RAMAS Árboles (%)	7	0 0.00	2 0.88	12 5.31	212 93.81
ESCOBA DE BRUJA FRUTOS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	1 0.44	225 99.56
MONILIASIS Árboles (%)		0 0.00	0 0.00	3 1.33	223 98.67

La clasificación de los individuos (árboles) de acuerdo a su tolerancia a problemas fitosanitarios se presenta en la tabla 2.2. Inicialmente se generó la media de la escala para los tres tipos de daño y posteriormente la media de esta nueva variable (sanidad) para las siete evaluaciones.

Se definieron siete grupos de acuerdo a la siguiente escala:

- Grupo 1:** Individuos Árboles Plus (posiblemente resistentes)
- Grupo 2:** Individuos Árboles Altamente Tolerantes
- Grupo 3:** Individuos Árboles Medianamente Tolerantes
- Grupo 4:** Individuos Árboles Poco Tolerantes
- Grupo 5:** Individuos Árboles Poco Susceptibles
- Grupo 6:** Individuos Árboles Medianamente Susceptibles
- Grupo 7:** Individuos Árboles Altamente Susceptibles

TABLA 2.2 Clasificación de los individuos (árboles) del Banco de Germoplasma de Copoazú de acuerdo a su tolerancia a problemas fitosanitarios.

TOLERANCIA	INDIVIDUOS (ÁRBOLES) No.	No. INDIVIDUOS (ÁRBOLES)	(%)
Grupo 1	5, 18, 28, 34, 45, 49, 62, 67, 74, 76, 79, 82, 84, 90, 110, 111, 115, 116, 128, 135, 149, 154, 156, 158, 163, 164, 167, 168, 169, 170, 174, 185, 190, 193, 203, 205, 207, 216, 224, 225.	40	17.70
Grupo 2	4, 14, 15, 20, 21, 22, 25, 36, 37, 56, 75, 78, 83, 85, 86, 88, 91, 97, 101, 113, 132, 133, 134, 136, 143, 144, 152, 153, 157, 160, 162, 166, 171, 186, 187, 189, 191, 192, 206, 208, 215, 217, 219, 220, 226, 230.	47	20.80,
Grupo 3	2, 3, 7, 10, 12, 16, 17, 24, 26, 27, 29, 33, 46, 47, 48, 50, 53, 59, 60, 61, 68, 69, 71, 80, 87, 89, 92, 96, 112, 114, 125, 131, 139, 140, 142, 145, 150, 151, 155, 159, 165, 175, 180, 184, 195, 197, 199, 202, 210, 214, 213, 222, 223.	53	23.45
Grupo 4	1, 8, 11, 1319,, 30, 31, 32, 40, 41, 52, 54, 55, 63, 81, 93, 94, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 120, 121, 123, 127, 129, 130, 137, 141, 146, 161, 176, 178, 181, 188, 200, 201, 209, 211, 212, 218, 221, 228.	45	19.91
Grupo 5	23, 39, 42, 57, 64, 70, 99, 104, 109, 118, 119, 124, 126, 147, 148, 177, 179, 182, 196, 198, 227.	21	9.29
Grupo 6	6, 35, 38, 43, 65, 66, 73, 77, 95, 103, 183, 194, 122, 204, 231.	15	6.64
Grupo 7	9, 58, 72, 172, 58.	5	2.21
Total		226	100

2.1.6 Propagación

Se puede propagar por métodos sexuales y asexuales de acuerdo a los intereses que se persigan. Asexualmente por injerto para mejorar producción y calidad de frutos. La semilla sexual es de comportamiento recalcitrante, por ello debe ser despulpada y sembrada rápidamente, la viabilidad se conserva por 12 días si se mantiene dentro del fruto. La germinación y emergencia se inicia a los 15 días de sembradas.

Para la producción de plántulas se deben seleccionar semillas provenientes de plantas con buena producción, porte bajo, frutos grandes y libres de enfermedades. Para la propagación asexual del Copoazú se pueden hacer dos tipos de injertos: de púa o yema terminal y de yema o escudo. Este tipo de propagación se utiliza para obtener plantas productivas en un menor tiempo, para propagar materiales resistentes o tolerantes a escoba de bruja (*Crinipellis perniciosa*) y para obtener plantas de porte bajo que pueden producir frutos con mayor porcentaje de pulpa, menor porcentaje de cáscara y frutos sin semilla (partenocárpicos). Otro tipo de propagación del Copoazú es el acodo aéreo, que sirve para multiplicar las plantas que sean seleccionadas por algunas características deseables, lo cual es difícil de lograr por vía sexual debido a la alta alogamia que posee la especie, el método requiere un mínimo de insumos por la buena capacidad rizogénica de la especie, y es muy accesible para los productores por su manera fácil de hacer y su bajo costo (Varón y Rojas, 2001).

2.1.7 Fenología

La floración en el Copoazú se produce en el mes de septiembre para los árboles mayores de 10 años en la Amazonia Occidental Colombiana, como respuesta al aumento en la relación P/B (precipitación/brillo solar). Los árboles de 3 años de edad no tienen respuesta uniforme a la variación del P/B que desencadena el fenómeno de la floración (Varón y Rojas, 2001).

El Copoazú, en el suroccidente Colombiano presenta frutos cuajados y en desarrollo durante la mayoría de los meses del año, mientras que la floración ocurre principalmente en noviembre, teniendo su inicio en septiembre; sin embargo se presenta una fuerte caída de flores de aproximadamente 95%, lo que causa poca fructificación. Igualmente se ha registrado la presencia de botones y flores a partir de marzo, y se han presentado

frutos cuajados y en desarrollo provenientes de la floración del año anterior (Varón y Rojas, 2001).

Probablemente los factores que más influyen en la floración del Copoazú son la disminución en la precipitación y el aumento de horas luz por día, esto puede inducir estrés hídrico en las plantas y desencadenar la floración al reanudarse las lluvias (Varón y Rojas, 2001).

El tiempo que transcurre del trasplante a la primera floración es de 21 meses, aproximadamente, bajo condiciones de la Estación Experimental Macagual en Caquetá- Colombia. Teniendo en cuenta los resultados y el análisis de frecuencia de floración y fructificación de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) realizado en Guaviare (tabla 2.3), Amazonia Norte Colombiana, se encontró que la floración se inicia en la primera semana de septiembre en el 23,8% de los individuos del banco activo.

TABLA 2.3 Número y porcentaje de manifestación de la floración y fructificación en individuos (árboles) de Copoazú.

Evaluación	Botón				Flor			Fruto en Formación			Fruto verde			
	0	1-25%	26-50%	51-75%	0	1-25%	26-50%	0	1-25%	26-50%	51-75%	0	1-25%	26-50%
Frec.	128	72	26	0	173	51	2	128	88	10	0	224	1	1
%	56.6	31.8	11.5	0	76.5	22.5	0.88	56.6	38.9	4.42	0.0	99.1	0.44	0.44
Frec.	80	110	29	7	148	74	4	226	0	0	0	226	0	0
%	35.4	48.6	12.8	3.1	65.4	32.7	1.77	100	0.0	0.0	0.0	100	0.0	0.0
Frec.	90	121	14	1	141	77	8	214	11	0	0	226	0	0
%	39.8	53.5	6.19	0.4	62.3	34.0	3.54	95.1	4.89	0.0	0.0	100	0.0	0.0
Frec.	109	106	5	6	153	68	5	201	25	0	0	225	1	0
%	48.2	46.9	2.21	2.6	67.7	30.0	2.21	88.9	11.0	0.0	0.0	99.6	0.44	0.0
Frec.	129	82	13	2	170	53	3	196	29	1	0	224	2	0
%	57.0	36.2	5.75	0.8	75.2	23.4	1.33	86.7	12.8	0.44	0.0	99.1	0.88	0.0
Frec.	153	69	3	1	162	64	0	180	44	2	0	222	4	0
%	67.7	30.5	1.33	0.4	71.6	28.3	0.00	79.6	19.4	0.88	0.0	98.2	1.77	0.00
Frec.	115	95	12	4	171	54	1	183	42	0	1	221	5	0
%	50.8	42.0	5.31	1.7	75.6	23.8	0.44	80.9	18.5	0.0	0.4	97.8	2.21	0.00

La mayor época de floración (botón y flor abierta) se presenta finalizando la segunda semana de octubre, es de importancia anotar que en los días anteriores se presenta una época de sequía (veranillo), que influye positivamente en el aumento de la floración. La fructificación en el mes de diciembre es muy incipiente, pues tan sólo 42 individuos (árboles), que representan el 18.5% del banco activo, presentaron frutos en formación (menores a 10 cm.) con presencia en el árbol entre 1 -25.

2.1.8 Manejo de la especie

La sombra es importante para el desarrollo de las plántulas en el campo, luego del segundo año esta se puede disminuir gradualmente hasta el cuarto año, cuando se deja un 50%. Es necesaria una poda de formación, eliminando las ramas inferiores a 1.5 m, para facilitar las labores y cosecha, y el deshierbe periódico en la base de los árboles al inicio de la plantación.

Es posible que al estudiar los nutrientes disponibles y la biología del suelo en cada uno de los sistemas productivos, las cantidades requeridas y la disponibilidad de nutrimentos para el cultivo de copoazú sean muy distintos.

La polinización es un aspecto importante en el cultivo de Copoazú. Es imprescindible establecer prácticas que favorezcan la polinización cruzada, bien sea manual o por insectos, debido a que no presenta autopolinización. Mejía (1985), en Manaos Brasil, encontró que varias especies de abejas (*Friseomelitta silvestrii* faceta, *Paratrigona impuctata*, *Apis mellifera*, *Ptilotrigona lurida*) son responsables de la polinización. En áreas muy intervenidas sería necesario establecer con rigor programas en ese sentido, debido al bajo porcentaje de flores fecundadas por árbol.

Crecimiento y desarrollo durante la fase vegetativa del Copoazú en la amazonia occidental colombiana

Clavijo (1989), expresa que el análisis de crecimiento es una técnica que usa las matemáticas para cuantificar la relación existente entre el crecimiento de una planta, la producción de materia seca y la expansión del área foliar o entre estos factores y una condición ambiental como la luz, el agua o los nutrientes. El análisis de crecimiento es una aproximación cuantitativa para entender el crecimiento de una planta o de una población de plantas, bajo condiciones ambientales naturales o controladas.

Lyons y Sánchez (1983), aseguran que es el seguimiento en la evolución de los cambios de la acumulación de biomasa y área fotosintética a lo largo del ciclo del cultivo. La evolución del proceso se puede observar mediante curvas de crecimiento analizables mediante modelos matemáticos simples que permiten diferenciar algunos parámetros y efectuar comparaciones.

Para el análisis de crecimiento se requieren dos (2) tipos de mediciones: el peso seco de la planta y el tamaño del sistema asimilatorio o área foliar.

Estos datos se colectan de plantas individuales o derivadas de áreas determinadas; la naturaleza destructiva de la técnica requiere de grupos homogéneos de plantas o parcelas. También sustentan que el crecimiento de las plantas y de sus partes se suele determinar en términos de altura, área foliar, peso seco en relación con el tiempo transcurrido desde la germinación hasta la madurez fisiológica. Así, al graficar los cambios de cualquiera de estos parámetros en función del tiempo, se obtendrá la curva sigmoidea de crecimiento, característica de todos los seres vivos.

Steward (1969), indica una curva sigmoideal en tres (3) fases:

- ♦ Fase de Retardación: Siguiendo el crecimiento de una planta a través de su ciclo de vida encontramos que en general, el peso seco de la planta tiende a disminuir inmediatamente después de la germinación a medida que se acaban las sustancias de reserva de las semillas. En este periodo, el crecimiento es lento y corresponde en el desarrollo al estado de la plántula.
- ♦ Fase Logarítmica o Exponencial: En este periodo el crecimiento es rápido y aumenta en forma lineal a medida que la fotosíntesis prosigue en la planta (Jorgensen y Malaver, 1968); también es un periodo central que corresponde en general al periodo vegetativo de las plantas.
- ♦ Fase de Senectud o vejez: El crecimiento aumenta a un ritmo muy lento, declinando a través del tiempo hasta ser nulo, causando una disminución en el peso seco en la finalización de la fase, momento en que se inicia la senectud (Jorgensen y Malaver, 1968).

Radford (1967), Evans (1972) y Hunt (1982), manifiestan que el análisis de crecimiento ha sido una técnica muy usada en estudios de plantas ya que es el puente entre las aproximaciones a los modelos de crecimiento y desarrollo; dicho proceso conlleva a la toma de datos primarios del área foliar y componentes de peso seco, de los cuales se pueden derivar medidas fisiológicas como Tasa de Asimilación Neta (TAN), Tasa de Crecimiento Relativo (TCR), Relación de Área Foliar (RAF) y Duración de área Foliar (DAF); igualmente, Radosevich y Holt (1984), aseguran que el análisis de crecimiento de una planta o de una población de plantas es una técnica que usa expresiones matemáticas para cuantificar la relación entre el creci-

miento, la materia seca y la expansión foliar. Se requiere entonces la toma de datos del cultivo en forma consecutiva, mediante lo que se conoce como muestreo destructivo.

VARIABLES DIRECTAS DE ANÁLISIS DE CRECIMIENTO

Área Foliar: Para propósitos de estimación y predicción del área foliar en el Copoazú, *Theobroma grandiflorum*, se estableció un modelo polinomial sin intercepto, con base en las medidas directas de radios A y B de las hojas, de la forma $Y = bA + cAB$ con un R^2 de 0.95, donde A es el radio A de la hoja, B el radio B de la hoja y b y c los parámetros del modelo.

Peso seco: En el caso del Copoazú, *Theobroma grandiflorum*, se estableció una metodología que permitiera obtener estos datos en el tiempo sin efectuar un gran número de muestreos destructivos. Los datos obtenidos permitieron postular los modelos polinomiales con las variables altura del árbol (H) y diámetro basal del tallo (D) a 0 y 10 cms, obteniendo una ecuación de tipo $Y = bH + cD_{10} + D_0D_{10}$ con un R^2 de 0.95.

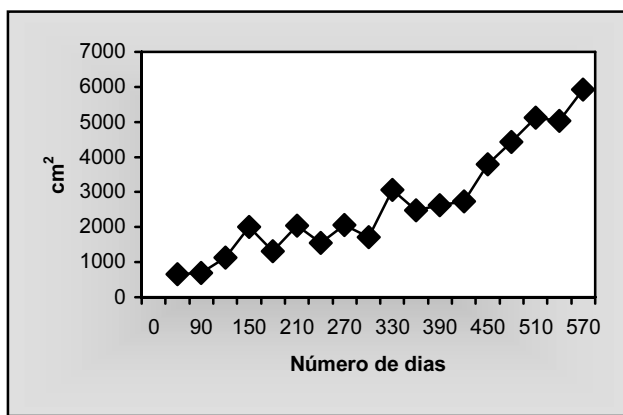
VARIABLES INDIRECTAS DEL ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO

El análisis descrito a continuación presenta el comportamiento de las variables indirectas de crecimiento en árboles de Copoazú establecidos bajo condiciones de la Amazonia Occidental Colombiana (Bosque húmedo tropical, con precipitación promedio de 3500 a 3800mm, temperatura promedio de 26°C, brillo solar de 1800 horas/año y humedad relativa del 85%).

Área Foliar

El comportamiento del área foliar de la planta a través del tiempo (Figura 2.1), indica un aumento progresivo desde los 60 días después de siembra (dds), con valor de 653.37 cm²/cultivo y alcanzando su máximo a los 570 dds, con 5925.97 cm²/cultivo, demostrando en general, un incremento directamente proporcional al tiempo. Se presentan fluctuaciones entre los días 150 y 360, producto de la necesidad de la planta durante este periodo de acumular el máximo de fotosíntetatos para el crecimiento y desarrollo y favorecer así la acumulación de materia seca previos al inicio de la etapa productiva. A partir de ese momento (semana 52) se observa la Fase Logarítmica ó exponencial, donde la planta entra en crecimiento más rápido y aumenta en forma lineal a medida que la fotosíntesis prosigue en ella, hasta el día 540.

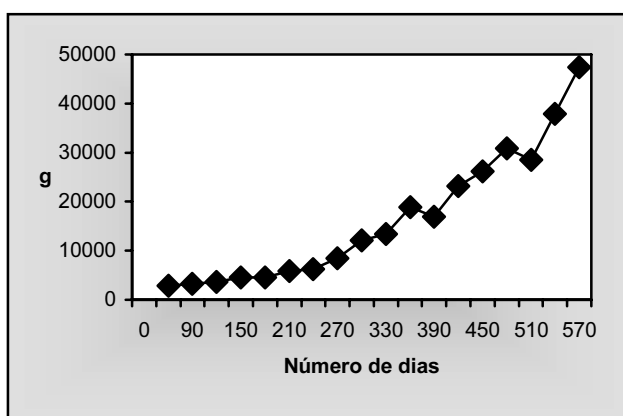
Figura 2.1 Area Foliar del Copoazú durante su crecimiento a primera Floración



Peso Seco

El comportamiento del peso seco (Figura 2.2), presenta una tendencia progresiva durante su etapa de crecimiento, desde los 60 días, con 2908.47 g. hasta encontrar su máximo valor alrededor de 570 dds, con 47401.08 g. Como consecuencia hubo un aumento en tamaño y número de los diferentes órganos (tallos, hojas, raíz), que componen la planta. Es probable, que el incremento de la materia seca de la planta se vea reflejado en el tiempo de desarrollo de la misma, ya que, por una parte en las plantas perennes el crecimiento vegetativo no cesa completamente al iniciar su floración (Montoya *et al.*, 1991), por lo cual se traslapa el crecimiento vegetativo con el reproductivo.

Figura 2.2 Peso Seco del Copoazú durante su crecimiento a primera Floración



Tasa de Asimilación Neta

Es el índice que mide la ganancia neta de asimilados por unidad de área foliar y por unidad de tiempo, cuantificando la eficiencia de la planta o población de plantas como sistema asimilatorio. El comportamiento de la TAN a través del tiempo (Figura 2.3), inicia con $0.019 \text{ gr/cm}^2/\text{día}$ a los 60 dds, oscilando hasta llegar al máximo valor alcanzado con $0.131 \text{ gr/cm}^2/\text{día}$ a los 540 dds, momento en el cual se da la más alta tasa de fotosíntesis que es aprovechada por la planta para aumentar el tamaño de las estructuras (tallo, ramas y hojas).

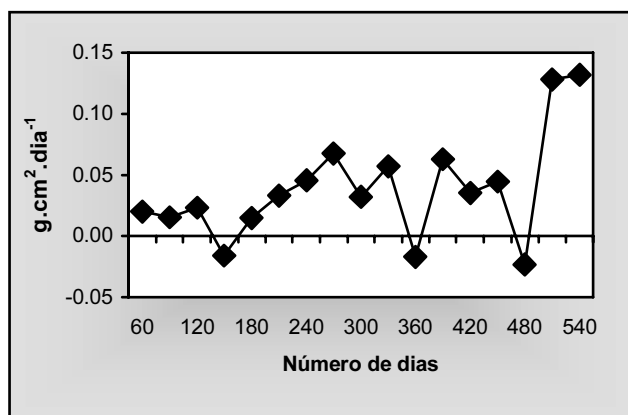


Figura 2.3 TAN del Copoazú durante su crecimiento a primera Floración

Las oscilaciones más importantes las comprenden tres (3) picos negativos, con -0.021 , -0.016 , -0.023 a los 150, 360 y 480 dds respectivamente, posiblemente por una redistribución de fotoasimilados. La TAN nos muestra que posterior a los 480 dds, su valor se incrementa, lo que refleja un comportamiento fisiológico poco normal en la asimilación neta de muchas especies, normalmente esta presenta una curva decreciente cuando hay redistribución de sintetizados o emisión de yemas, flores o frutos. La razón principal de este comportamiento radica básicamente en la arquitectura de la planta. Es decir, la TAN normalmente presenta una curva decreciente, por el simple hecho que a medida que la planta crece, la fotosíntesis disminuye y aumenta la respiración a causa del sombreamiento de las hojas superiores sobre las bajas; esto se traduce en disminución de la ganancia de peso seco por unidad de área en función de tiempo. Para el caso del Copoazú, la planta siempre presenta sus hojas a libre exposición a la luz solar.

Tasa de Crecimiento Relativo

La TCR representa la capacidad de la planta para producir material nuevo (Figura 2.4), este comportamiento inicia a los 60 dds con 0.167g/día, registrando su máximo valor a los 540 dds, con 0.280 g/día, después de presentar fluctuaciones. Al igual que la TAN, se observan tres picos de gran importancia.

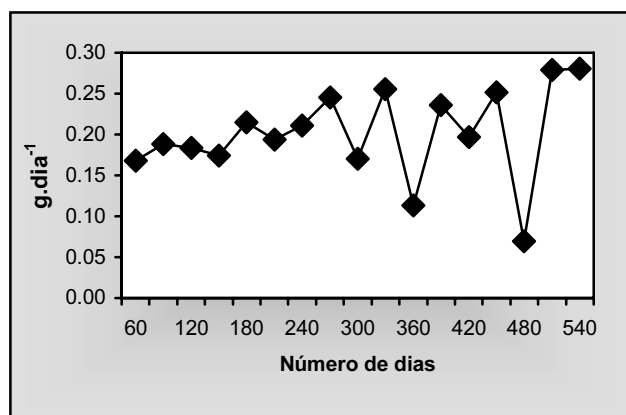


Figura 2.4. TCR del Copoazú durante su crecimiento a primera Floración

Si se comparan las variaciones observadas en la TCR con las registradas en la TAN se notará que el comportamiento de las tasas fue muy homogéneo debido a la dependencia que tienen con la fotosíntesis, la respiración, tamaño de la hoja y arquitectura de la planta (Gardner *et al.*, 1985).

Normalmente la TCR es mayor al inicio y decrece con el tiempo, debido a que las pocas hojas iniciales (que pesan poco) están en capacidad de producir un peso mayor que el suyo; por el contrario, cuando la planta se encuentra en estados más maduros, aumenta en número y tamaño de hojas y por ende, aumentan en peso; esto podrá entonces producir una cantidad menor de peso nuevo porque tiene que mantener no solo hojas, raíces y tallos, sino también frutos.

Otra explicación al respecto es la siguiente; en la planta se producen dos (2) tipos de energía, una de crecimiento y otra de mantenimiento. La primera es mayor que la segunda a lo largo de toda la etapa vegetativa.

Relación del Área Foliar

La RAF, (Figura 2.5), representa la relación de la superficie fotosintética en función de la materia seca total a través del tiempo.

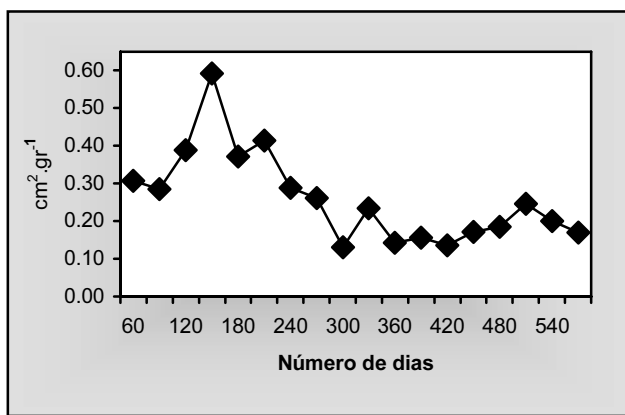


Figura 2.5 RAF del Copoazú durante su crecimiento a primera Floración

Durante los 150 dds se observa un incremento en el área foliar debido a la gran actividad fotosintética del cultivo en las primeras etapas de crecimiento, al presentar la planta una mayor área foliar se tendrá una mayor acumulación de materia seca; posteriormente descende paulatinamente hasta los 300 dds con un valor de $0.131 \text{ cm}^2/\text{g}$ debido a un incremento de materia seca acumulada en sostenimiento con respecto a un menor valor de área foliar. A partir de este instante tiende a estabilizarse hasta los 570 dds producto de un crecimiento constante del área foliar como de la acumulación de materia seca.

Duración del Área Foliar

La DAF (Figura 2.6), empleada para describir la extensión y duración de las hojas como órgano interceptor de luz a través del tiempo, inicia a los 60 dds con $834.55 \text{ cm}^2/\text{día}$, registrando tres (3) valores máximos, a los 150 dds con $1460.98 \text{ cm}^2/\text{día}$, a los 330 dds con $1856.52 \text{ cm}^2/\text{día}$ y a los 480 dds con $1942.98 \text{ cm}^2/\text{día}$.

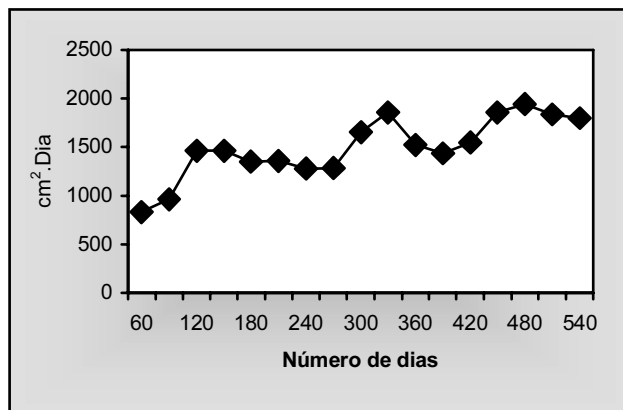


Figura 2.6. DAF del Copoazú durante su crecimiento a primera Floración

El primer valor corresponde al momento en que la planta se encuentra en pleno desarrollo vegetativo y las hojas se están expandiendo, el segundo se registra debido a la acumulación de materia seca para la formación de ramas y hojas y preparación a la fase reproductiva. Por último se incrementa debido a la captación de fotosintetatos necesarios para suplir las necesidades de su fase reproductiva.

2.2 Bacao o Maraco (*Theobroma bicolor* H.B.K)

2.2.1 Clasificación taxonómica

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Caryophyllidae

ORDEN: Malvales

FAMILIA: Esterculiaceae

GENERO: *Theobroma*

ESPECIE: *bicolor*

Nombre científico: *Theobroma bicolor*

Nombre Común: Macambo (Perú), cacau do Perú (Brasil); bacau o Maraco (Colombia); patashte (inglés).

2.2.2 Descripción botánica

El maraco es una planta bastante rústica, que se adapta a diferentes ambientes, tanto en la vega de río como en tierra firme. El porcentaje de germinación y sobrevivencia de la planta es alta, inmediatamente se ha sembrado la semilla, luego de haberla extraído de la fruta. Tarda en germinar entre 10 y 15 días, de ahí transcurre 3 meses en vivero y posteriormente se siembra definitivamente en campo (Barrera, 1999).

El árbol alcanza una altura entre 25 y 30 metros en el bosque natural y de 3 a 10 metros en cultivos de frutales nativos Amazónicos. Las hojas son simples, alternas, con láminas de 22 a 39 cm por 11.5 a 19 cm; las hojas jóvenes son de color rojizo y de forma elíptica (Rivas y Lozano, 2001).

Las inflorescencias son axilares, en racimos de 3 a 5 flores, con estípulas persistentes en el pedúnculo, se abren solo dos botones y se forma un solo fruto. El color de la flor es púrpura, tres a ocho inflorescencias por rama en los últimos 50 cm de longitud. La flor es hermafrodita con cinco pétalos, cinco sépalos y cinco estambres con pubescencias y ovario súpero (Rivas y Lozano, 2001).

2.2.3 Área de distribución de la especie

Es una especie nativa de América tropical, de origen probablemente amazónico. Está distribuida en la cuenca amazónica en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y Perú. En la selva peruana se cultiva principalmente en los departamentos de Loreto, Ucayali y Junín, (1997).

2.2.4 Características agroecológicas

El maraco crece en regiones con temperatura media anual entre 28°C y 30°C, precipitación media anual de 3500 mm a 3900 mm. Altitud variable desde 0 m hasta 1000 msnm. El cacao maraco crece bien en terrenos no inundables, en ultisoles y oxisoles ácidos y pobres en nutrientes, con textura variada desde arenoso, franco arcilloso hasta arcilloso con buen drenaje. Las inflorescencias son axilares, en racimos de 3 a 5 flores. Las flores son de color púrpura, son hermafroditas con 5 pétalos, 5 sépalos y 5 estambres con pubescencias y ovario súpero.

2.2.5 Variabilidad genética

En Colombia hasta el momento no se ha hecho un estudio sobre las variedades existentes de maraco. Sin embargo, en la región del Araracuara los indígenas diferencian las variedades principalmente por la forma, tamaño y sabor de los frutos. Allí se lograron diferenciar cinco cultivares, destacándose el Maraco de Borugo (Fruto grande), la propia (mediano) y la totuma (pequeño) (Barrera, 1999). El instituto SINCHI cuenta con una colección de trabajo compuesta por 21 individuos agrupados en cuatro ecotipos, a partir de los cuales se detallan las siguientes características:

Caracterización morfoagronómica del Maraco (bacao)

Las características morfológicas y agronómicas de los individuos se tomaron de acuerdo a los descriptores propuestos por Vargas y Bolaños (1997) para la evaluación del crecimiento y desarrollo de la planta en general (tallo, ramas, copa, hojas y frutos). Los descriptores se aplicaron a la totalidad de los ejemplares de *Theobroma bicolor* agrupados en ecotipos.

Evaluación del crecimiento: altura de mesa, diámetro de tallo y diámetro de copa

Con base en el análisis de varianza para las tres variables se pudo establecer que no hay diferencias estadísticamente significativas en las tasas de crecimiento mensual en cuanto a diámetro de tallo, altura a la mesa y diámetro de copa. En la tabla 2.4 se presentan los promedios por ecotipo para cada una de las variables analizadas. Solo se registran los resultados de 3 de los 4 ecotipos existentes, porque presentaron un número de individuos representativos.

TABLA 2.4 Promedios y Diferencias para Tasas Absolutas de Crecimiento (TAC) en Maraco

TAC / MES DIÁTALLO		TAC / MES ALTMESA		TAC / MES DIÁCOPA	
PROMEDIO	ECOTIPO	PROMEDIO	ECOTIPO	PROMEDIO	ECOTIPO
CMS		CMS		CMS	
A 0.24583	1	A 0.021667	3	A 0.19000	2
A 0.21250	2	A 0.015000	1	A 0.12667	3
A 0.20500	3	A 0.010000	2	A 0.10250	1

Promedios con por lo menos una letra en común no presentan diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 0.05$), según prueba de Tukey.

Con base en la tabla de frecuencia de doble entrada se pudo determinar que el hábito de crecimiento predominante para los ecotipos de la colección SINCHI es el Semierecto (50%), seguido por el abierto (33.33%); en cuanto al número de ramas que conforman la mesa es de tres (3) en promedio. En la tabla 2.5 se presentan los resultados de la evaluación teniendo en cuenta frecuencia y porcentaje de cada característica.

TABLA 2.5 Promedios hábito de crecimiento y número de ramas en árboles de Maraco

Ecotipo No.	Evaluacion	HABITO DE CRECIMIENTO			TOTAL	No. RAMAS
		Erecto	Semierecto	Abierto	PROMEDIO	
1	Frecuencia (#)	1	3	2	6	3.3333
	Porcentaje (%)	16.67	50.00	33.33		
2	Frecuencia (#)	2	2	2	6	2.8333
	Porcentaje (%)	33.33	33.33	33.33		
3	Frecuencia (#)	0	4	2	6	3.0000
	Porcentaje (%)	0.00	66.67	33.33		
TOTAL	Frecuencia (#)	3	9	6	18	3.0554
	Porcentaje (%)	16.67	50.00	33.33	100.00	

Caracterización del follaje de árboles de Maraco ó Bacao

De acuerdo con el análisis de varianza las variables de ancho de la hoja y longitud del pecíolo presentan diferencias estadísticas significativas al 1% ($\mu=0.01$) entre ecotipos. En la tabla 2.6, se observa la variación del promedio de los individuos de cada ecotipo.

TABLA 2.6 Promedios y comparación de longitud de hoja, ancho de hoja y longitud de pecíolo por ecotipos en árboles de Maraco

LONG. HOJA		ANCHO HOJA		LONG. PECÍOLO	
PROMEDIO	ECOTIPO	PROMEDIO	ECOTIPO	PROMEDIO	PROMEDIO
cm.		cm.		cm	
A 26.3700	2	A 14.1267	2	A 2.86333	2
A 25.1433	1	B A 13.0267	1	B 2.52000	1
A 24.5500	3	B 12.6500	3	C 2.26333	3

Promedios con por lo menos una letra en común no presentan diferencias estadísticas significativas ($\mu = 0.05$), según prueba de Tukey.

Teniendo en cuenta los promedios de las variables evaluadas, se puede observar en la tabla 2.6, que las hojas presentan una longitud entre 24.55 y 26.37 cm y un ancho entre 12.65 y 14.12 cm, mientras que la longitud de pecíolo varía entre 2.26 y 2.86 cm.

Caracterización de forma del ápice, forma del limbo y polimorfismo foliar

En la tabla 2.7 se observa que la forma de ápice predominante para esta especie es el agudo con un 65.56% de las hojas evaluadas, seguido en su orden por la forma obtusa con un 22.22%. La forma de limbo predominante es la oval con un 58.89% y el nivel de polimorfismo se encuentra distribuido entre escaso y frecuente con 50% para ambos casos.

TABLA 2.7 Promedios forma de ápice, forma del limbo y polimorfismo para las hojas de Maraco

Ecotipo	Evaluación	Forma Ápice			Forma Limbo			Polimorfismo	
		Agudo	Ligeramente Puntiagudo	Obtuso	Oval	Elíptico	Obovado	Escaso	Frecuente
1	Frecuencia	18	5	7	15	6	9	5	25
	%	60.00	16.67	23.33	50.00	20.00	30.00	16.67	83.33
2	Frecuencia	16	5	9	24	6	0	25	5
	%	53.33	16.67	30.00	80.00	20.00	0.00	83.33	16.67
3	Frecuencia	25	1	4	14	9	7	15	15
	%	27.78	1.11	4.44	46.67	30.00	23.33	50.00	50.00
TOTAL	Frecuencia	59	11	20	53	21	16	45	45
	%	65.56	12.22	22.22	58.89	23.33	17.78	50.00	50.00

Caracterización del fruto de Maraco

Para la caracterización morfoagronómica del fruto de maraco ó bacao, se tuvieron en cuenta las variables de tamaño y forma. Se analizó sobre la base del ecotipo No. 1, el cual presenta frutos entre octubre a diciembre; en la tabla 2.8 se registran los promedios de cinco características.

Los frutos de este ecotipo se caracterizaron por poseer una longitud de 18.2 cm y un ancho de 11.9 cm en promedio, con forma elíptica predominante, ápice obtuso y con constricción basal leve.

TABLA 2 8. Promedios para forma, ápice y constricción basal del fruto de Maraco

Ecotipo No.	Árbol No.	Repetición	Long. Fruto	Ancho Fruto	Forma Fruto	Constricción Basal	Forma Apice
		cm	cm				
1	1	1	18,2	12,2	Elíptico	Leve	Obtuso
1	1	2	19,4	11,7	Elíptico	Leve	Obtuso
1	1	3	17,3	11,3	Oblongo	Leve	Obtuso
1	2	1	17,8	11,9	Oblongo	Ausente	Obtuso
1	2	2	18,8	12,0	Elíptico	Leve	Obtuso
1	2	3	16,8	11,5	Oblongo	Leve	Obtuso
1	3	1	19,4	12,9	Elíptico	Leve	Obtuso
Promedios			18,2	11,9	Elíptico	Leve	Obtuso

Evaluación agronómica del fruto de Maraco o Bacao

De acuerdo al análisis de las variables para la evaluación del fruto: peso total, peso de la cáscara, peso de semillas, número de semillas por fruto y peso de la pulpa de maraco o bacao, se pudo establecer que un fruto contiene en promedio 46 semillas con un peso aproximado de 196 g (4.3 g por semilla) y un rendimiento en pulpa promedio de 510 g (tabla 2.9). Igualmente se determinó que la pulpa es aproximadamente el 40% y la semilla el 16% del peso total del fruto.

TABLA 2.9. Evaluación de rendimiento en frutos de Maraco

Ecotipo No.	Evaluación No.	Árbol No.	No. Repetición	Peso Fruto(g)	Peso Cáscara(g)	Peso Semillas(g)	Peso Pulpa (g)	Número semillas Fruto
1	1	1	1	1200	580	200	420	37
1	2	1	2	1220	525	250	445	51
1	3	1	3	1050	425	150	475	50
1	1	2	1	1190	460	180	550	50
1	2	2	2	1325	525	220	580	50
1	3	2	3	1000	375	175	450	36
1	1	3	1	1375	525	200	650	45
Promedios				1194	488	196	510	46

2.2.6 Fenología

La floración en maraco o bacao bajo condiciones del Guaviare, se inició en la primera semana de septiembre en el 15 % de los individuos. En la tabla 2.10 se observa que en la tercera evaluación se registró floración en el 66% de los árboles. En esta especie no se diferencia una época de mayor floración, ya que fue constante la presencia de botones y flores en todos los ecotipos durante el período de observación; sin embargo, la cosecha principal se presenta en los meses de febrero a marzo y de septiembre a octubre.

La planta presenta gran susceptibilidad a los periodos secos y cuando la sequía es muy fuerte sus hojas se caen fácilmente; al llegar la época húmeda el árbol comienza a emitir hojas. Su crecimiento es rápido, iniciando su vida productiva al segundo o tercer año, alcanzando producciones máximas de 10 a 15 frutos por árbol por cosecha; la planta disminuye gradualmente su productividad entre los 15 y 20 años, presentando pocos problemas fitosanitarios durante su fase reproductiva (Casas, 1995).

Biología floral

La flor del Maraco presenta fecundación alógama ya que en su morfología manifiesta breviastilia, es decir, los estambres son mas cortos que el estigma, impidiendo así el proceso de autopolinización. Se considera que la polinización es principalmente entomófila, ya que sus flores se encontraron habitadas frecuentemente por hormigas, arañas, cucarroncillos y otros insectos. En Guaviare –Colombia- es frecuente la presencia de hormigas (*Atta* sp), mosquitos (*Forcipomya* sp) y cucarrones (*Ciclophala* sp).

En árboles de dos años de edad el número promedio de yemas florales en el árbol de Maraco oscila entre 1-6, 7-34, y 2-11 en ramas primarias, secundarias y terciarias, respectivamente. La producción floral se da en las ramas más jóvenes cuando el árbol presenta ramas secundarias. La floración se produce a lo largo de toda la rama y en la medida que crecen las ramas terciarias, la aparición en cojines florales se desplaza hacia la parte terminal.

Las flores del maraco siguen una orientación de la hoja lo que al parecer indica geotropismo, ya que el perianto se dirige hacia el suelo en todas las ocasiones. El número de flores por cojín floral puede variar de 20 a 73 flores individuales sin embargo en cada cojín floral abierto el aborto floral puede llegar a un 95 y 100%.

TABLA 2.10 Número y porcentaje de manifestación de la floración y fructificación en árboles de Maraco

Evalua. No.	Ecotip. No.	Valorac.	BOTÓN				FLOR				FRUTO EN FORMACIÓN			
			0 -25%	1 50%	26- 75%	51- 75%	0 25%	1- 50%	26- 75%	51- 75%	0 25%	1- 50%	26- 75%	51- 75%
1	1	#	1	4	1	0	1	4	1	0	3	3	0	0
		%	16.6	66.6	16.6	0.00	16.6	66.6	16.6	0.00	50.0	50.0	0.00	0.00
	2	#	1	4	1	0	3	2	1	0	5	1	0	0
	%	16.6	66.6	16.6	0.00	50.0	33.3	16.6	0.00	83.3	16.6	0.00	0.00	
	3	#	1	4	1	0	4	2	0	0	5	1	0	0
	%	16.6	66.6	16.6	0.00	66.6	33.3	0.00	0.00	83.3	16.6	0.00	0.00	
2	1	#	1	3	2	0	2	3	1	0	1	4	1	0
		%	16.6	50.0	33.3	0.00	33.3	50.0	16.6	0.00	16.6	66.6	16.6	0.00
	2	#	1	3	2	0	3	3	0	0	4	2	0	0
	%	16.6	50.0	33.3	0.00	50.0	50.0	0.00	0.00	66.6	33.3	0.00	0.00	
	3	#	0	6	0	0	2	4	0	0	5	1	0	0
	%	0.00	100	0.00	0.00	33.3	66.6	0.00	0.00	83.3	16.6	0.00	0.00	
3	1	#	1	2	2	1	1	3	2	0	4	1	1	0
		%	16.6	33.3	33.3	16.6	16.6	50.0	33.3	0.00	66.6	16.6	16.6	0.00
	2	#	1	2	3	0	4	2	0	0	4	2	0	0
	%	16.6	33.3	50.0	0.00	66.6	33.3	0.00	0.00	66.6	33.3	0.00	0.00	
	3	#	0	5	1	0	0	6	0	0	4	2	0	0
	%	0.00	83.3	16.6	0.00	0.00	100	0.00	0.00	66.6	33.3	0.00	0.00	
4	1	#	1	4	0	1	1	5	0	0	2	4	0	0
		%	16.6	66.6	0.00	16.6	16.6	83.3	0.00	0.00	33.3	66.6	0.00	0.00
	2	#	2	3	1	0	4	1	1	0	4	2	0	0
	%	33.3	50.0	16.6	0.00	66.6	16.6	16.6	0.00	66.6	33.3	0.00	0.00	
	3	#	0	6	0	0	1	5	0	0	3	3	0	0
	%	0.00	100	0.00	0.00	16.6	83.3	0.00	0.00	50.0	50.0	0.00	0.00	
5	1	#	1	4	1	0	2	2	2	0	3	2	1	0
		%	16.6	66.6	16.6	0.00	33.3	33.3	33.3	0.00	50.0	33.3	16.6	0.00
	2	#	0	6	0	0	4	1	0	1	5	1	0	0
	%	0.00	100	0.00	0.00	66.6	16.6	0.00	16.6	83.3	16.6	0.00	0.00	
	3	#	0	6	0	0	1	2	2	1	3	3	0	0
	%	0.00	100	0.00	0.00	16.6	33.3	33.3	16.6	50.0	50.0	0.00	0.00	
6	1	#	1	4	1	0	1	5	0	0	4	2	0	0
		%	16.6	66.6	16.6	0.00	16.6	83.3	0.00	0.00	66.6	33.3	0.00	0.00
	2	#	1	4	1	0	3	3	0	0	5	1	0	0
	%	16.6	66.6	16.6	0.00	50.0	50.0	0.00	0.00	83.3	16.6	0.00	0.00	
	3	#	0	6	0	0	0	4	2	0	4	2	0	0
	%	0.00	100.0	0.00	0.00	0.00	66.6	33.3	0.00	66.6	33.3	0.00	0.00	
7	1	#	0	4	2	0	1	4	1	0	3	3	0	9
		%	0.00	66.6	33.3	0.00	16.6	66.6	16.6	0.00	50.0	50.0	0.00	0.00
	2	#	1	4	1	0	2	3	1	0	5	1	0	0
	%	16.6	66.6	16.6	0.00	33.3	50.0	16.6	0.00	83.3	16.6	0.00	0.00	
	3	#	1	5	0	0	0	4	1	1	3	3	0	0
	%	16.6	83.3	0.00	0.00	0.00	66.6	16.6	16.6	50.0	50.0	0.00	0.00	
8	1	#	0	5	1	0	2	4	0	0	2	4	0	0
		%	0.00	83.3	16.6	0.00	33.3	66.6	0.00	0.00	33.3	66.6	0.00	0.00
	2	#	1	2	3	0	2	3	1	0	4	2	0	0
	%	16.6	33.3	50.0	0.00	33.3	50.0	16.6	0.00	66.6	33.3	0.00	0.00	
	3	#	5	1	0	0	2	3	0	1	1	3	1	1
	%	83.3	16.6	0.00	0.00	33.3	50.0	0.00	16.6	16.6	50.0	16.6	16.6	

En promedio para las condiciones del Guaviare – Colombia, el número de frutos por rama, en árboles de dos años de edad, va desde ningún fruto en ramas primarias hasta 4 y 2 frutos en ramas secundarias y terciarias respectivamente. El máximo de frutos cuajados por cojín floral es de ocho en una rama secundaria, pero generalmente estos se caen persistiendo solo dos. Vogel *et al.* (1981) mencionan que entre los principales factores de la producción de frutos están la distribución de fotoasimilados en el árbol, esto hace pensar que cantidades importantes de asimilados se utilizan en la actividad vegetativa y pueden hacer falta en frutos en crecimiento, especialmente en determinadas épocas del año.

La Yema floral del Maraco se diferencia como cojín floral cuando alcanza 10 mm de longitud, en este instante los botones florales se empiezan a individualizar, es decir, a diferenciarse como flores solitarias. El ciclo floral completo de yema a flor fecundada a caída es de 46 días aproximadamente, durante los cuales se distinguen 6 etapas:

1. Yema floral a cojín floral (10 mm)
2. Cabeza de botón floral diferenciada (1 mm) a botón floral al momento de la apertura (12 mm)
3. Segundo día de apertura de la flor (perianto 7 mm y diámetro de 10 mm)
4. Tercer día de apertura de la flor
5. Cuarto día de apertura de la flor
6. Quinto día de apertura de la flor

2.2.7 Propagación

La propagación por semilla es el método tradicionalmente utilizado. La semilla tiene viabilidad corta, debe sembrarse inmediatamente se extrae del fruto. Las semillas extraídas de frutos maduros, de plantas selectas, se lavan con agua y arena y orén bajo sombra por 3 días. En ambiente sombreado, se almacigan en cajones de 1 x 1 x 0.2 m conteniendo substrato de aserrín húmedo descompuesto.

La germinación es rápida, se inicia 9 días después de la siembra y se prolonga hasta 28 días. El repique se realiza cuando la planta desarrolla 2 hojas verdaderas, directamente a bolsas plásticas negras de 2 Kg de capacidad, conteniendo substrato mezclado de tierra negra, arena y materia orgánica descompuesta en la proporción de 1:1:1. Cuando las plantas alcancen de 30-40 cm. de altura, estarán en condiciones de ser trasplantadas al campo.

2.2.8 Manejo de la especie

Durante el periodo vegetativo el árbol presenta un número reducido de hojas, las cuales van aumentando progresivamente de tamaño hasta cuando se da inicio al periodo reproductivo (20 meses de edad) en el cual la parte terminal del tallo comienza a dividirse en cuatro ramas primarias. En éstas ramas se da la primera floración y se cuajan algunos frutillos que finalmente caen. A partir de cada rama primaria se emiten dos secundarias y de cada una de éstas, dos terciarias. En las ramas secundarias comienza a encontrarse cuajamiento de fruto, aunque de éstos se cae cerca de un 90% (Casas, 1995).

Crecimiento y desarrollo durante la fase vegetativa del Maraco

El árbol de maraco puede alcanzar hasta 15 m de alto, altura característica de la familia *Sterculiaceae* y copa medianamente ancha, con hojas oblongas y medianamente ovoideas, imparipinadas, haz verde y envés grisáceo, base curvada, truncada o asimétrica u obtusa de 16-40 cm de largo por 9-27 cm de ancho.

Según Watson (1947), un análisis de crecimiento se emplea para evaluar el grado de almacenamiento de energía por las plantas, producción en función de materia seca acumulada por la planta total u órganos cosechables, referida a los órganos de fijación energética como son las hojas o la superficie fotosintética total.

El análisis de crecimiento como técnica ha sido una herramienta valiosa para evaluar el crecimiento de las plantas y cultivos desde que fue sugerido por Blackman en 1919 indicando que el crecimiento generalmente sigue la ley del interés compuesto (Ruselle *et al.*, 1982, Blackman y Wilson, 1951; citados por Zambrano, 2004).

Variables directas de análisis de crecimiento

Área Foliar: Para propósitos de estimación y predicción del área foliar en el Maraco, *Theobroma bicolor*, se estableció un modelo exponencial sin intercepto, con base en las medidas directas de los radios A y B de las hojas, de la forma $Y_i^{0.1} = AB^{0.1}$ con un R^2 de 1.00, donde A es el radio mayor y B el menor de la hoja.

Peso seco: En el caso del Maraco, *T. bicolor*, se estableció una metodología que permitiera obtener estos datos en el tiempo sin efectuar un gran número de muestreos destructivos. Los datos obtenidos permitieron postular los modelos logarítmicos con las variables altura del árbol (H) y diámetro basal del tallo (D) a 0 cms, obteniendo una ecuación de tipo $\text{Log } Y_j = a \text{ Log } H$ con un R^2 de 0.998.

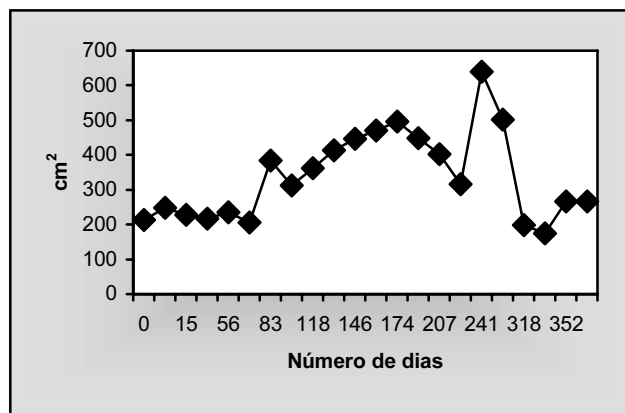
Variables indirectas de análisis de crecimiento

A continuación se presenta el comportamiento de las variables indirectas de crecimiento en árboles de Maraco establecidos bajo condiciones de la Amazonia Norte Colombiana (Zona :bh – T; Precipitación anual de 2900 mm, temperatura promedio de 25.3°C; brillo solar de 1650 horas y humedad relativa del 84%)

Comportamiento del área fotosintética

El comportamiento de esta variable (Figura 2.7) muestra que la expansión del área foliar en el árbol se va dando progresivamente y presenta los valores máximos entre los días 241 y 260. Durante esta etapa éste requiere acumular el máximo de fotosintetatos para iniciar la apertura de la copa del árbol y así lograr una alta acumulación de material para obtener el equilibrio (Carbono/Nitrógeno) adecuado para entrar a la fase reproductiva. Hacia las 48 semanas cesan su expansión para incrementarse en número.

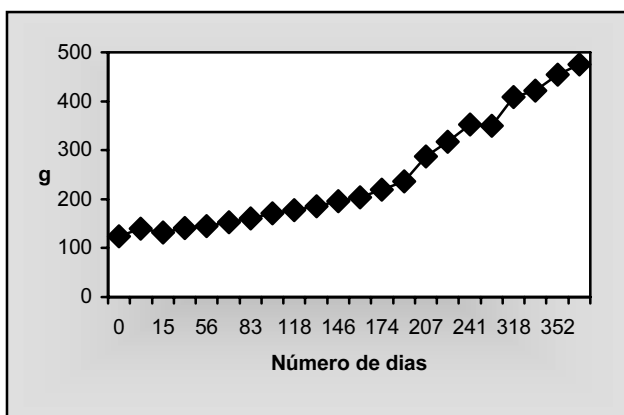
Figura 2.7 Area Foliar de Maraco durante su crecimiento a primera Floración



Acumulación de peso seco

Al observar la tendencia en la Figura 2.8, del peso seco, se aprecia que a través del tiempo, este aumenta progresivamente durante la fase vegetativa para encontrar un máximo el día 364, momento en el cual el árbol entra a su fase reproductiva. Es claro, que el peso seco seguirá incrementándose ya que los árboles al entrar en su fase reproductiva por primera vez son aun muy jóvenes y se encuentran en pleno proceso de formación de sus ramas y por ello se traslapa el crecimiento reproductivo con el vegetativo.

Figura 2.8 Peso seco de Maraco durante su crecimiento a primera Floración

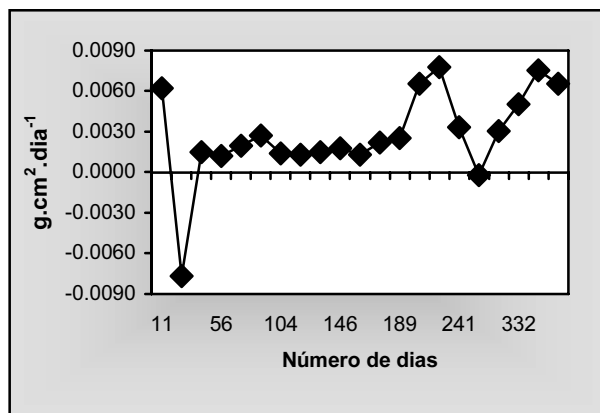


Tasa de asimilación neta TAN

El comportamiento de la Tasa de asimilación neta, se representa en la figura 2.9. Se deduce de ella que hay una producción irregular de materia seca por unidad de área fotosintética y por unidad de tiempo.

Hacia los 218 días de crecimiento se presenta el máximo valor de TAN con un valor de $0,0077727 \text{ mg/cm}^2\text{-día}$, lo que indica el momento donde se presenta la más alta tasa de fotosíntesis, que es aprovechada por la planta para aumentar el tamaño de todas las partes y estructuras, especialmente en las hojas que son los bancos de asimilados de la fotosíntesis. Es necesario resaltar que las fluctuaciones también coinciden con los periodos de alta pluviosidad (abril y noviembre).

Figura 2.9. TAN de Maraco durante su crecimiento a primera Floración



El índice desciende hacia las 37 semanas ya que durante este periodo el árbol acumuló materia seca. A partir del día 310 de nuevo comienza a presentar incrementos significativos, este comportamiento refleja el proceso fisiológico que se sucede en la planta translocando los fotosintetatos producidos para incrementar los requerimientos de los cojines florales en formación, ya que en este periodo la planta entra a la etapa reproductiva.

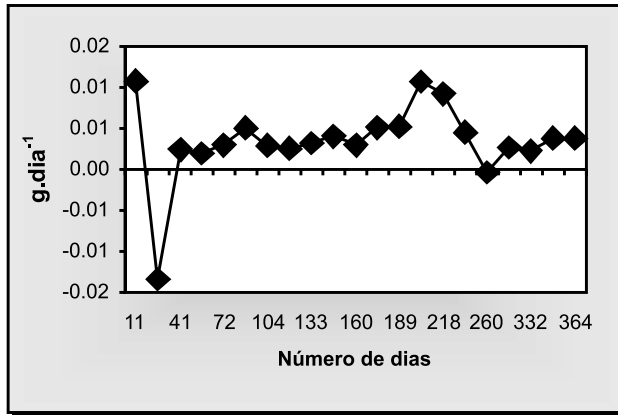
Tasa de crecimiento relativo TCR

La Figura 2.10 muestra el comportamiento promedio de la Tasa de Crecimiento Relativo a través del tiempo.

El día 207 (30 semanas aproximadamente) se presenta el máximo valor con 0,010699 g/día, esto se debe a la tasa de fotosíntesis que en ese momento es aprovechada para la producción de material vegetal con énfasis en las hojas que van a contribuir en la síntesis de los nutrientes para la planta que esta próxima a entrar a su periodo reproductivo.

Si se compara las variaciones observadas en la TCR con los valores registrados en la TAN, se encuentra que el comportamiento de las dos es muy homogéneo. Por lo tanto, el análisis de la tasa de crecimiento relativo se puede explicar en forma análoga a la realizada en la tasa de asimilación neta, debido a que tanto la TAN como la TCR, son dependientes de la fotosíntesis, respiración, condiciones ambientales, tamaño de las hojas y arquitectura del árbol.

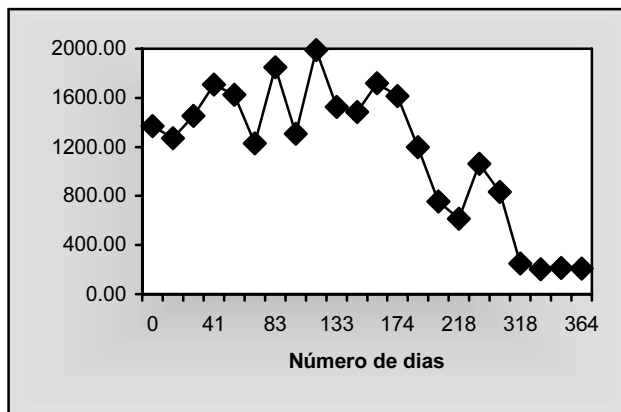
Figura 2.10. TCR de Maraco durante su crecimiento a primera Floración



Índice de Área Foliar IAF

La Figura 2.11 del índice de área foliar muestra la capacidad fotosintética del cultivo, además establece la relación que existe entre el área foliar y la superficie de terreno que ocupa a través del tiempo.

Figura 2.11. IAF de Maraco durante su crecimiento a primera Floración



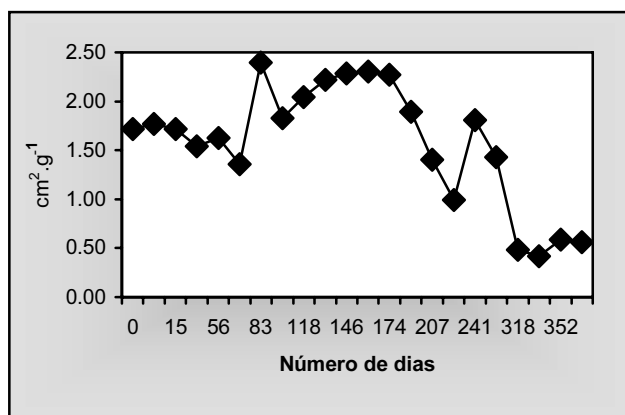
El máximo valor obtenido bajo condiciones de la Amazonia Norte para este índice es de 1988,98 a los 118 días, seguido de un comportamiento irregular con tendencia a disminuir. Al analizar el comportamiento se ob-

serva que a través del tiempo, es mayor el área de suelo ocupada por la planta que la producción de área foliar. Los valores más altos de éste índice se presentan en los primeros estados de desarrollo del árbol, en donde inicialmente la producción de hojas se da a lo largo del tallo y su tamaño se incrementa progresivamente hasta llegar a su máximo, cuando comienza la formación de ramas primarias. A partir de este momento las hojas tienen un crecimiento constante, en tanto que el área de suelo ocupada por el árbol aumenta de manera progresiva ya que el crecimiento de éste se da en forma horizontal.

Relación del Area Foliar RAF

La Figura 2.12 de relación del área foliar muestra la variación de la superficie fotosintética en función de la materia seca total a través del tiempo.

Figura 2.12. RAF de Maraco durante su crecimiento a primera Floración



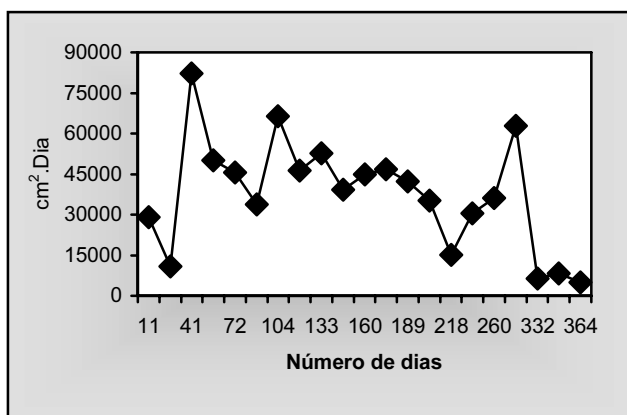
Se observa que el descenso del índice en los primeros 72 días se da cuando el árbol produce un mayor número de hojas, aunque no de gran tamaño, esto explica que se da mayor acumulación de materia seca con menor área foliar. Posteriormente se incrementa ya que las hojas crecen, pero disminuyen en el número y mantienen una posición vertical que impide el máximo aprovechamiento de la luz solar, esto hace que la acumulación de materia seca no sea tan significativa. El aumento presentado entre los días 241 a 318 se explica en el hecho que posteriormente las hojas tienen un incremento constante y que la producción de materia seca se incrementa

porque se tienen ramas primarias, secundarias y terciarias formadas. El leve incremento que se presenta entre los días 332 a 364 se ve favorecido por el comienzo del periodo de lluvias, ya que este es el momento en el cual el árbol inicia el desarrollo de sus ramas.

Duración del área foliar DAF

La Figura 2.13 de duración del área foliar describe la extensión y duración de las hojas como órgano interceptor de luz (Evans 1972, Hunt 1978).

Figura 2.13. DAF de Maraco durante su crecimiento a primera Floración



En condiciones de campo se observan dos valores importantes, uno a los 41 días con 82168,83 cm²/día y el otro a los 318 días con 62946,87cm²/día, estos corresponden a los periodos donde el área foliar es de mayor magnitud y persistencia. El primer valor máximo corresponde al momento donde el árbol estaba en pleno desarrollo vegetativo y las hojas se están expandiendo. El segundo valor máximo se presenta en el momento en que los árboles comienzan la formación de ramas y producen hojas grandes para acumular la materia seca necesaria y así alcanzar la relación Carbono /Nitrógeno adecuada, que le permita pasar de la fase vegetativa a la fase reproductiva.

Referencias Bibliográficas

- Barrera, A. 1999. Determinación de algunas propiedades físico mecánicas de la semilla del Maraco (*Theobroma bicolor* H.B.K.) y Obtención del Baccalate. Tesis de Ingeniería de Alimentos. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Santafé de Bogotá. Páginas 18 – 19.
- Barros, N. O., 1981. Cacao. Manual de Asistencia Técnica No. 23. Bogotá. Ed. Fedecacao.
- Casas F. 1995. Análisis de Crecimiento Vegetativo y caracterización floral del Maraco. Informe Técnico de Pasantía. Instituto SINCHI. Bogotá. P, 66
- Cavalcante P. B. 1979. Frutas comestibles da amazonía III, Belen Inpa. Museo Paraense Emilio Goeldi, p 61.
- Clavijo, J. 1989. Análisis de crecimiento en malezas. Revista COMALFI. 16 (1): 12-16.
- Clement. C. 1991. Recursos genéticos de especies fructíferas da Amazonía Brasileira. Revista Acta Amazónica. 12 (4):
- Evans, G. C. 1972. The quantitative analysis of plant growth. Studies in ecology. Vol 1 Blackwell Scientific Publication. London 45-68 pp
- Gardner, F., Pearce, R. B., Mitchell, Y. R. 1985. Physiology of crop plants. Iowa state University press: AIMES. 187-208.
- Gentry, A. H. 1996. A field guide to the families and genera of woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa. The University of Chicago Press. Chicago (Ill), EEUU. p.799 – 803.
- Hunt, R. 1978. Plant Growth Analysis. Studies in Biology No. 96. Edward Arnold Publishers, London.
- Jorgensen, C. J. y Malaver, L.V. 1968. Crecimiento y desarrollo de frutas y legumbres. En: Introducción a la Fisiología de cultivos tropicales. Univer-

sidad Nacional de Colombia e Instituto Colombiano Agropecuario. Publicación Miscelánea No. 9. Bogotá. p. 380-390. Mimeografiado

Lyons. E., Sanchez, J. E. 1983. Análisis de crecimiento de la fase vegetativa y de formación de espiga de tres cultivares de cebada (*Hordeum vulgare* L.) bajo tres densidades de siembra. Tesis Ingeniero Agrónomo. Bogotá Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. 129p.

Mejía M, 1985. Los frutales amazónicos., pp 23. Bogota.

Montoya, R. Hernandez y Clavijo J. 1991. Determinación de modelos matemáticos para medición de área fotosintética y peso seco en pitaya. COMALFI. 18 (2): 6-11

Painting, K. A. 1993. Guía para la documentación de Recursos Genéticos. Traducción de Aldriana ALERCIA. Copyright IBPGR. Italia.

Radford, P. J. 1967. Growth analysis, formulae. Their use and abuse. Crop. Ser.7:171-175.

Radosevich, S. R. y Holt, J. 1984. Word ecology implications for vegetation manegement. Jhon Wiley and Sons. New York. p. 25 -32.

Rivas, E., Lozano, F. 2001. Especies Promisorias de la Amazonía. Conservación, Manejo y Utilización del Germoplasma. Editorial CORPOICA C.I. Macagual - Caquetá - Putumayo. p. 72 - 74.

Steward F. C, 1969. Analysis of grow. Behavior of plants and their organs physiology. New York Academic press. p. 38 - 41.

Vargas, A. G. y Bolaños. C., 1997. TCA Informes Técnicos sobre Caracterización del Banco de Germoplasma. Estación Experimental, Instituto Amazónico de investigaciones Científicas - SINCHI. San José del Guaviare.

Vargas, A. G., Argüelles, C. J. 2000. Cartilla Técnica Clasificación y caracterización Morfoagronómica del Germoplasma de cinco especies frutales amazónicas. San José del Guaviare.

Varon, E., Rojas, S. 2001. Especies Promisorias de la Amazonía. Conservación, Manejo y Utilización del Germoplasma. Editorial CORPOICA C.I. Macagual - Caquetá -Putumayo. 2001. p. 112 - 118.

Venturieri, G. A. 1985. Cupuacu A especies sua cultura usos e processamentos pesquizadores du instituto nacional de pesquizas de amazonia INPA. Manaus Brasil. 56 p.

Vélez G. A. 1991. Los frutales amazónicos cultivados por las comunidades indígenas de la región del Medio Caquetá (Amazonia Colombiana). Revista Colombia Amazónica. 5 (2): 163-193.

Vogel, M. Machado, R. C. y Alvim, P de T. 1981. Remocao de orgaos jovens como método avalicao das interacoes fisiologicas no crescimento, floracao e fructificacao do cacauteiro. 8a Conf Inter de Pesq em Cacao. Cartagena, Colombia. Mimeo. pp. 24.

Watson, D. J. 1947. Variation in NAR and leaf area between species and varieties and within and between Years. Annals of Botany 11 (2): 41-76.

Zambrano, J. E. 2004. Análisis de crecimiento y desarrollo vegetativo del Copoazú *Theobroma grandiflorum* (Will ex Spreng) Shum. Tesis Ingeniería Agro ecológica. Universidad de la Amazonia Florencia, Caquetá.



Foto 1. Árbol de Copoazú de 3 años de edad. Inicio de etapa reproductiva.



Foto 2. Fruto de Copoazú en madurez fisiológica



Foto 3. Árbol de Copoazú de 3 meses de edad al inicio del ciclo de crecimiento vegetativo



Foto 4.
Desarrollo Floral de Copoazú



Foto 5. Árbol de maraco de 3 años de edad. Inicio de etapa reproductiva

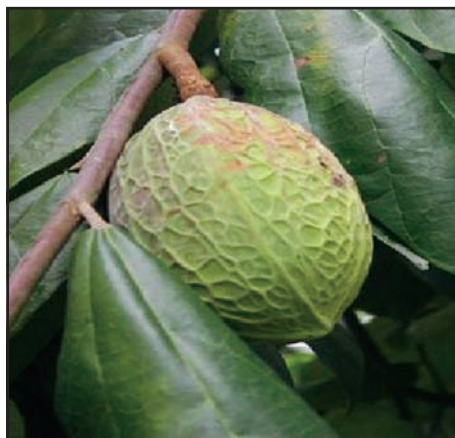


Foto 6. Fruto de Maraco en Madurez fisiológica



Foto7. Árbol de Maraco de 3 meses de edad. Inicio del crecimiento vegetativo

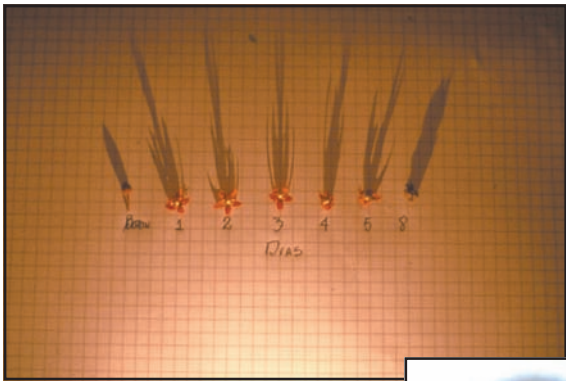


Foto8. Desarrollo Floral de Maraco



3. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS FRUTOS DE ESPECIES PROMISO- RIAS DEL GENERO *Theobroma*, BAJO CONDICIONES DE LA AMAZONIA NORTE COLOMBIANA

*Por: Maria Soledad Hernández¹, Jaime Alberto Barre-
ra¹, Marcela Carrillo¹, Orlando Martínez W², Luz
Marina Melgarejo³, Jesús Antonio Galvis³, Adriana
Emilcen Casas³, Carlos Bolaños³*

3.1 Crecimiento y desarrollo de los frutos

El crecimiento potencial del fruto está claramente determinado por factores genéticos, pues el componente varietal tiene gran influencia sobre la velocidad de crecimiento y el tamaño final del fruto. Casi todos los frutos de un determinado género e incluso dentro de una misma especie, se pueden encontrar dentro de un amplio intervalo de formas y tamaños. La variación en el tamaño final del fruto dentro de una misma especie proviene de las diferencias en el número de ovarios. Existe un gran número de estudios que indican que las condiciones fisiológicas al inicio del crecimiento de flores y de ovarios afectan el crecimiento del fruto antes que los procesos de polinización y formación del fruto ejerzan sus efectos más directos (Coombe, 1976).

¹ Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI.

² Universidad de los Andes.

³ Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología

El crecimiento del fruto implica el desarrollo coordinado de un gran número de tejidos. El intervalo de tiempo que va desde la antesis a la madurez, varía según la especie y puede que llegue a variar de acuerdo con las condiciones ecológicas. La división celular termina en el momento de la antesis o durante el comienzo del período de crecimiento. El volumen celular es el que representa mayor contribución a la expansión total del fruto. La expansión de las células está fuertemente influenciada por el comportamiento de la pared celular, turgencia y constricciones impuestas por la extensibilidad de la epidermis (Barcelló y Sabater, 1985).

El crecimiento del fruto es el cambio cuantitativo, que puede incluir aumento en longitud, peso seco e incremento en la superficie. El cambio en la longitud es fundamentalmente producido por la acción de hormonas como el ácido indol acético (AIA) y las giberelinas (GAs) que en última instancia se sintetizan a causa de la fotosíntesis y la respiración de la planta. El incremento en la superficie es atribuido a la variación en la materia seca (fotoasimilados), la cual depende del balance existente entre la fotosíntesis y la respiración (Coombe, 1976, Roth, 1977).

Cada uno de los frutos presenta diferente velocidad de crecimiento y curvas de crecimiento. Se pueden presentar tres fases de crecimiento así:

Fase I. Crecimiento rápido del pericarpio y aumento en el peso y tamaño de la semilla. En el pericarpio hay un período de división celular, seguido por rápido alargamiento celular. En esta fase el pericarpio y las semillas alcanzan un buen porcentaje de su tamaño definitivo (Hernández, 1980).

Fase II. La velocidad de crecimiento disminuye bruscamente; hay un rápido endurecimiento del endocarpio. El embrión se desarrolla rápidamente y puede alcanzar su máximo tamaño (Hernández, 1980).

Fase III. Hay un aumento final y el crecimiento tanto en tamaño como en peso se reanuda y alcanza una velocidad similar a la fase I. La maduración del fruto tiene lugar hacia el final de esta fase (Hernández, 1980).

Con muy pocas excepciones, el crecimiento de los frutos desde la antesis hasta que alcanzan la madurez, describe una curva de tipo sigmoidea como en el tomate, o doble sigmoidea como en el melocotón, en donde dos fases de crecimiento rápido están separadas por un intervalo o fase inter-

media de crecimiento lento o nulo, de duración variable. No está claro si la fase intermedia de la curva doble sigmoidea se deba a diferencias varietales de división celular y quizá el incremento en peso seco se produzca durante esta fase. Por el contrario otros investigadores sugieren que la fase intermedia de crecimiento lento no está necesariamente regulada por hormonas ni por cambios en la competencia por los carbohidratos entre los tejidos del fruto, sino que es simplemente, el resultado de un cambio en la velocidad inicial de crecimiento con respecto a la segunda fase (Coombe, 1976).

Cuando las células del fruto se elongan rápidamente, los efectos directos de la planta y las influencias del medio ambiente sobre el crecimiento del fruto son evidentes. La temperatura influye sobre los procesos de crecimiento de la planta, y el crecimiento del fruto no es la excepción. A medida que aumenta la temperatura también aumenta la velocidad de la mayoría de los procesos biológicos, pero únicamente, hasta alcanzar el punto óptimo para cada proceso en particular debido al aumento de las velocidades de división y expansión celular (Coombe, 1976).

Las interacciones entre los distintos factores ambientales y fisiológicos ocultan a menudo el efecto de la temperatura sobre el incremento en la velocidad de crecimiento y desarrollo del fruto. Como la floración es un proceso continuo y altas temperaturas negativamente a la polinización, el número de frutos descende, lo que podría incrementar el tamaño de los frutos restantes al eliminar la competencia (Kays, 1997).

El crecimiento de los frutos puede medirse de forma directa mediante el peso fresco y seco, longitud y diámetro, o indirectamente por medio del cálculo de la tasa de crecimiento relativo la cual representa la eficacia de las plantas como productoras de nuevo material.

La tasa de crecimiento relativo se puede obtener mediante la ecuación:

$$R = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{T_2 - T_1}$$

Donde:

W_1 = Peso en el tiempo T_1

W_2 = Peso en el tiempo T_2

$T_2 - T_1 =$ Tiempo relativo
 $R =$ Índice de eficiencia.

Los cambios del ambiente influyen de manera considerable en la producción de materia seca; factores tales como la temperatura, humedad, horas luz y manejo agronómico pueden interferir en el ritmo de su producción (Lagos, 1990; Vásquez, 1990).

3.2 Fisiología de la maduración del fruto

La parte comestible de los frutos carnosos se deriva de diferentes órganos de la flor. El proceso de maduración conlleva reajustes importantes en el metabolismo celular. Estos cambios están bajo estricta regulación génica, en donde se produce una serie de procesos coordinados que dan lugar a la degradación de un pequeño número de proteínas y a la síntesis de otras. Las distintas fitohormonas controlan el inicio y la velocidad de la maduración.

La actividad respiratoria de los frutos los clasifican en dos categorías: climatéricos y no climatéricos, según muestren o no un incremento en intensidad respiratoria durante la maduración, así como la producción de etileno. Normalmente, en los frutos climatéricos la respiración desciende con lentitud a valores bajos, inmediatamente antes del comienzo de la maduración, posteriormente aumenta hasta alcanzar su máximo valor conforme el fruto madura y desciende de nuevo durante la posmaduración o senescencia (Kays, 1997).

Los cambios en la respiración que tienen lugar en los frutos “no climatéricos” son menos conspicuos, decreciendo esta lentamente desde la antesis. Los frutos no climatéricos alcanzan la composición deseada antes de ser cosechados, sin que se altere la disminución de la intensidad respiratoria (Wills *et al.*, 1998; Herrero, 1992).

Los cambios en la composición del fruto están relacionados con la degradación de carbohidratos de reserva, la reducción en el contenido de ácidos orgánicos y polifenoles, los cambios en la pigmentación, la síntesis de mezclas complejas de sustancias volátiles características y con el “ablandamiento” de su textura. Los cambios en la textura están relacionados con la disolución de las uniones intracelulares de la pared celular (Seymour, *et al.*, 1993).

Índice de Cosecha de Frutos

La calidad de las frutas y las hortalizas no se puede mejorar después de recolectar, pero se puede conservar. La mejor calidad se obtiene cuando la cosecha se hace en el mejor estado de madurez.

El término maduración se utiliza independientemente para designar el estado de un fruto apto para su recolección y para un fruto que cumpla con las características exigidas por el consumidor; de acuerdo con esto surgen dos conceptos:

Madurez de recolección: Llamada también premadurez o madurez fisiológica.

Madurez de consumo: Llamada también madurez degustativa o madurez comercial (Galvis, 1992).

Las frutas cosechadas inmaduras resultan de mala calidad y maduran de forma irregular, hay falta de color y pérdida de peso. La maduración en refrigeración es deficiente caracterizándose por falta de color, aroma y sabor. Dada alta transpiración que tiene lugar en la fruta verde y también demasiado madura, es muy fácil la aparición del marchitamiento. Cuando se cosecha tarde, la caída de frutos del árbol es abundante y la duración de la conservación se ve muy reducida por el mayor ataque de enfermedades y pudrición (Durán, 1982).

Los principales índices de cosecha se clasifican en tres grupos:

De tipo cronológico. Se refiere a la edad del fruto, viene dado por los días transcurridos desde la floración hasta el tamaño normal del fruto, cuando se considera que está fisiológicamente desarrollado. Este tiempo se modifica de una variedad a otra y de acuerdo con la región, por lo tanto no es muy confiable (Durán, 1982).

De tipo físico y fisiológico. Se observa o mide el color de la epidermis, pulpa y semillas; la facilidad de desprendimiento del fruto; tamaño, peso y dureza de la pulpa; peso específico o gravedad específica.

De tipo químico. En el que se analizan varios componentes.

- Contenido de almidón: el cual disminuye a medida que el fruto va madurando, se degrada transformándose en azúcares, en consecuencia el contenido de sólidos solubles va aumentando (Herrero, 1992).

- Contenido de ácidos orgánicos: a medida que el fruto madura la concentración de ácidos decrece, así mismo el pH aumenta. Estos índices son aceptables y válidos para determinar el estado de maduración de algunos frutos (Durán, 1982; Kays, 1997).
- Relación azúcares/ácidos orgánicos: esta relación varía al madurar el fruto, disminuyendo los ácidos y aumentando los azúcares.
- Respiración (intensidad respiratoria): es un proceso metabólico fundamental en el fruto, en donde se degradan productos complejos presentes en las células como el almidón, azúcares y ácidos orgánicos a moléculas más simples, CO₂ y H₂O (Bidwell, 1984; Wills, *et al.*, 1998). Midiendo la intensidad respiratoria de la fruta mediante la determinación de absorción de O₂ o producción de CO₂ y representando estos valores durante su desarrollo, se obtiene un patrón característico.

3.3 MARACO (*Theobroma bicolor*)

3.3.1 Características del fruto

Descripción. El fruto es una cápsula voluminosa de diversos tamaños, su peso fluctúa entre 300 y 4000 g y las formas varían desde redondeadas hasta ovaladas. La corteza puede ser reticulada o lisa de color amarillo cuando madura. Las numerosas semillas están rodeadas por una pulpa blanquizca o amarillenta de olor fuerte y sabor agridulce que es de carácter comestible. Actualmente, los frutos maduros se recogen cuando han caído al suelo, no existiendo ningún índice para su cosecha.

3.3.2 Crecimiento y desarrollo del fruto de maraco

En la Tabla 3.1 se presentan las 8 etapas fenológicas que constituyen el desarrollo del fruto de maraco. También se consignan la duración en días de cada una de las etapas, longitud, diámetro, peso fresco y seco alcanzados por el fruto en cada una de ellas y sus características más relevantes. La delimitación de cada una de las etapas se basa en cinco parámetros: longitud, diámetro, peso fresco, peso seco y coloración tanto externa como interna.

Tabla 3.1. Etapas fenológicas del fruto del maraco

Etapas	Días	Longitud	Diámetro (cm)	Peso Fresco (cm)	Características (g)
I	0-8	0.55	0.35	0.047	Cuajamiento del fruto: color verde claro uniforme. Forma ovalada alargada y corteza reticulada. En su interior se forman los esbozos seminales.
II	8-23	3.03	1.23	2.83	Máximas tasas de crecimiento: verde más oscuro. En su interior aparece tejido mucilaginoso coloraciones moradas al rededor de esbozos seminales.
III	23-38	5.01	2.01	12.11	IGUAL CRECIMIENTO EN TODAS SUS DIMENSIONES: Tejido mucilaginoso, aumento en tamaño y grosor.
IV	38-53	8.42	4.67	59.9	INICIO DE MÁXIMA ELONGACIÓN CELULAR: Retículas más profundas, pulpa con mínima succulencia de color amarilla clara, partes del fruto muy adheridas.
V	53-68	12.93	6.32	256.10	INICIO DE MÁXIMA ACUMULACIÓN DE ASIMILADOS: color verde intenso, tejido mucilaginoso únicamente adherido a las semillas.
VI	68-83	12.96	10.16	893.67	AUMENTO DEL VOLUMEN DEL FRUTO: hay llenado de retículas, el interior del fruto bien diferenciado. Disminución del color verde hacia el plano medial.
VII	83-98	21.10	12.2	1310.8	INICIO DE MADURACIÓN: Aparecen coloraciones amarillas en el plano medial del fruto, extendiéndose hacia los ápices, pulpa color curuba claro. Empieza síntesis de compuestos volátiles. Cesa el crecimiento en todas sus dimensiones.
VIII	98-113	21.16	12.55	1399.0	FRUTO MADURO: Predomina el color amarillo. Pulpa color curuba intenso, máxima síntesis de compuestos volátiles.

Para el establecimiento de las etapas I a V el principal aspecto que marcó los cambios de una etapa a la otra fue la acumulación en peso fresco, y el incremento en longitud y diámetro para las etapas VI a VIII junto con los cambios en coloración y forma sufridos por el fruto. La observación de los cambios de textura y coloración en el endocarpio permiten ampliar la cobertura de la escala de crecimiento.

Etapa I. Está comprendida de los cero a los 8 días, cuando alcanza una longitud de 0.55 cm, diámetro 0.35 cm, peso fresco de 0.0479 g. Se define como aquella en que se presenta el cuajamiento. La forma del fruto es ovalada alargada y con costillas en la corteza, la coloración es verde muy clara como resultado de la síntesis de las moléculas de clorofila.

Al observar el interior del fruto se aprecia que apenas se inicia la formación de los esbozos seminales y la coloración de la pulpa se presenta blanca cremosa. Al hacer un corte transversal a mano alzada del fruto, se aprecia que la corteza es más gruesa en comparación con las otras partes (pulpa y esbozos seminales).

Etapa II. La segunda etapa se extiende de los 8 a los 23 días del crecimiento del fruto. Este alcanza un crecimiento en longitud de 3.03 cm, diámetro de 1.23 cm, peso fresco de 2.83 g al final de la etapa. En la coloración externa del fruto se aprecia un verde más intenso y en su interior la pulpa sigue presentando coloración blanco crema, y comienzan a aparecer coloraciones moradas al rededor de los esbozos seminales, empieza a diferenciarse el mucílago característico del tejido parenquimático que constituye la pulpa, parte comestible del fruto (Roth, 1977).

Etapa III. Esta etapa se extiende hasta los 38 días del crecimiento del fruto. La expansión del fruto es rápida y proporcional en todas sus dimensiones; la longitud alcanza los 5.01 cm, diámetro 2.01 cm, peso fresco 12.11g al final de la etapa. La coloración externa del fruto es de un verde más intenso. En su interior se aprecia que las coloraciones moradas alrededor de las semillas desaparecen casi por completo y el tejido parenquimático aumenta en tamaño. La corteza presenta mayor dureza, haciéndose más difícil su corte; esto indica que se presenta suberización y lignificación de los tejidos de la corteza, como consecuencia del desarrollo del fruto.

Etapa IV. Esta etapa se extiende desde los 38 hasta los 53 días. La longitud llega a los 8.42 cm, el diámetro 4.67 cm, peso fresco 59.9 g. El color de la corteza es verde oscuro y en su interior las coloraciones moradas van desapareciendo por completo; la pulpa presenta un color amarillo muy claro, iniciándose la síntesis de pigmentos carotenoides. Se observa que la corteza continúa siendo más gruesa y la diferenciación de las partes internas del fruto (pulpa y semillas) aún no es total, lo que hace imposible la separación de sus partes, la pulpa se caracteriza por su dureza y sequedad. Las costillas de la corteza del fruto se hacen más profundas y definidas.

Etapa V. Va desde los 53 hasta los 68 días del crecimiento del fruto. Durante esta etapa se da inicio a la máxima acumulación de asimilados. La longitud llega a los 12.93 cm, diámetro 6.32, peso fresco 256.10 g (Foto 3.2).

El color externo del fruto es verde oscuro, la corteza se ha lignificado a tal punto que hace imposible su corte con cuchillo, por lo tanto la fracturación de la corteza debe hacerse golpeándola fuerte contra una superficie resistente. En su interior se aprecia que el tejido parenquimático de la pulpa se ha adherido solamente a las semillas separándose de la corteza. Las semillas se recubren de una testa gruesa de color amarillo.

Etapa VI. Su duración se extiende desde los 68 hasta los 83 días. Longitud 12.96, diámetro 10.16 cm, peso fresco 893.67 g. Esta etapa se caracteriza por el aumento en el volumen del fruto; hay llenado de las costillas, haciendo que éste adquiera una forma ovalada. La coloración muestra partes verde oscuras, verdes claras e inicio de pigmentación amarilla, debido a la acción de clorofilasas que degradan la molécula de clorofila y a la síntesis de pigmentos, en este caso, los carotenoides (Wills *et al*, 1998).

A partir de esta etapa en el interior del fruto hay una clara diferenciación de todas sus partes, además se hace posible la separación de la cáscara, pulpa y semillas aunque aún con cierta dificultad, debido a que la firmeza ha descendido notoriamente como consecuencia del rompimiento de la protopectina para dar origen a los ácidos pécticos (Essau, 1977).

Etapa VII. Su duración se extiende desde los 83 hasta los 98 días. Durante esta etapa se da un incremento muy significativo en la longitud, 21.1 cm, diámetro 12.2 cm, peso fresco 1310.77g. Aparición de coloraciones amarillas en el plano ecuatorial, extendiéndose hacia el ápice, aunque la

mayor parte del fruto es de color verde. En su interior el color de la pulpa ha cambiado a curuba claro y se percibe un suave aroma como consecuencia de la síntesis de compuestos volátiles característicos de la maduración, además la corteza del fruto ofrece menor resistencia a la fragmentación.

Desde este período terminan los procesos de síntesis y se da inicio a los procesos de degradación iniciándose con ello la maduración. Durante esta etapa cesa el crecimiento en todas sus dimensiones.

Etapa VIII. En esta ocurre la maduración organoléptica completa del fruto, comprende desde los 98 hasta los 113 días. Las medidas de crecimiento permanecen constantes, longitud 21.16 cm, diámetro 12.55 cm, peso fresco 1399 g. La coloración externa del fruto es amarilla en su mayor parte, aunque aún hay tonalidades verdes. En su interior el color de la pulpa ha cambiado a curuba oscuro y se percibe un aroma muy intenso, característico de la fruta (Foto 3.4). Por su parte la corteza del fruto conserva similar dureza que en la etapa anterior; en cuanto a la pulpa, es más suave y se separa fácilmente de la semilla y de la corteza.

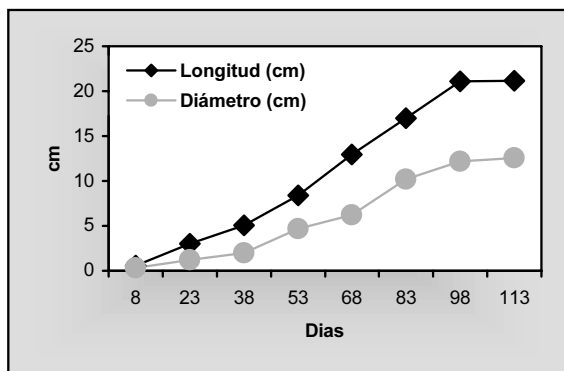
La maduración se puede definir como los máximos cambios en acidez, astringencia, dulzor y en los contenidos de ácidos, fenoles, azúcares y compuestos volátiles asociados con el punto de sazón del fruto (Seymour *et al.*, 1993). A partir de éste momento el fruto es apto para ser consumido ya que alcanza la máxima expresión de sus características organolépticas de sabor, aroma y textura.

Caracterización física del desarrollo del fruto

Longitud y diámetro. En la tabla 3.1 se presentan los valores de la longitud y el diámetro durante el desarrollo del maraco.

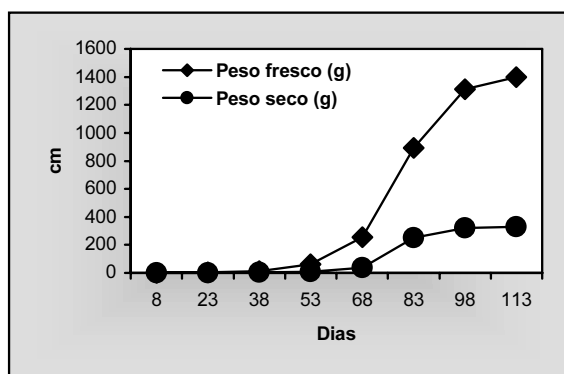
En la Figura 3.1 se presentan las curvas correspondientes al crecimiento en longitud y diámetro, como puede observarse estos parámetros aumentan con el tiempo de desarrollo del fruto y en ambos casos el comportamiento es de tipo sigmoideal exponencial. Mostrándose que después de un rápido crecimiento en ambas dimensiones éste se estabiliza desde los 98 días (Etapa VII), lo cual coincide con la fase de maduración donde se sucede la mayor actividad metabólica.

Figura 3.1. Variación de la longitud y diámetro del fruto



Peso fresco y peso seco. Los datos del peso fresco son mostrados en la Tabla 3.1, y los de peso fresco y seco en la Figura 3.2. El maraco alcanzó un peso fresco máximo de 1399 g y un peso seco de 330,5 g. Este aumento es consecuencia de la acumulación de grandes cantidades de sustancias de reserva en los tejidos de almacenamiento que resulta de la multiplicación y engrosamiento de las células (Bidwell 1984, Barcello y Sabater, 1985). Durante todo el período de crecimiento, el aumento del peso seco constituye el 10% del peso fresco. Para los dos parámetros se aprecia un aumento progresivo desde los 8 hasta los 98 días (Etapas I a VII), observándose un incremento notable entre los días 53 a 98 (Etapas IV a VII), con valores de 318,8 g. en peso seco (figura 3.2) y 1310,77 g en peso fresco (tabla 3.1) respectivamente. A partir del día 98 estas medidas, tienden a estabilizarse ya que la ganancia en peso es mínima.

Figura 3.2. Variaciones del peso fresco y peso seco

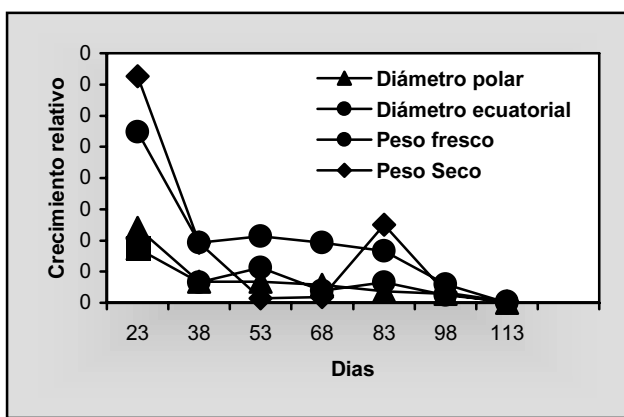


Tasas de crecimiento relativo. En la Figura 3.3 se muestran las tasas de crecimiento relativo de la longitud, diámetro, peso fresco y peso seco durante el desarrollo del fruto.

Para las variables de longitud y diámetro las máximas tasas de crecimiento se observan hacia el día 23, a partir de éste momento las dos descienden. Para la longitud hay un comportamiento prácticamente constante, del día 38 al día 68, luego la tasa desciende hasta el día 113. La tasa de crecimiento para el diámetro se mantiene constante hasta finalizar la etapa reproductiva. Entre los días 38 a 68 se presenta un período crítico de crecimiento en el cual el fruto está sintetizando la mayor cantidad de nutrientes necesarios para su desarrollo; este período está influenciado por factores de tipo agronómico, fisiológico y ambiental. Al finalizar el período de crecimiento se observa un aumento de longitud.

Las tasas de crecimiento relativo para el peso fresco y el peso seco tienen un comportamiento muy similar. En ambas la máxima tasa se presenta en el día 23, posteriormente descienden hasta el día 38, para luego permanecer constantes hasta el día 83. A partir de este momento en ambos casos las tasas descienden hasta finalizar el crecimiento.

Figura 3.3. Tasas de crecimiento relativo para diámetro polar, diámetro ecuatorial, peso fresco y peso seco



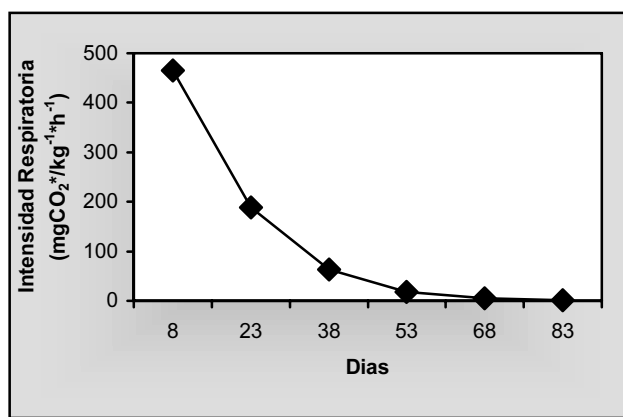
Es de anotar que al comparar las tasas de peso fresco y peso seco con las de diámetro polar y ecuatorial durante el desarrollo del fruto del maraco, se aprecia que es mayor la tasa de peso que la de crecimiento de los otros dos parámetros.

Caracterización fisiológica del desarrollo del fruto

Intensidad respiratoria. En la Figura 3.4 se aprecia que el fruto presenta su máxima tasa respiratoria el día 8, se resalta el comportamiento entre los 53 y los 113 días que corresponden a las etapas VII y VIII. El perfil de la curva de la Figura 3.4 indica que la actividad respiratoria disminuye en la medida que el fruto madura fisiológicamente.

La fase de madurez comercial se contempla desde los 83 días a los 113 días, donde la intensidad respiratoria muestra valores muy bajos, alrededor de $1.4 \text{ mgCO}_2/\text{kg fruto-hora}$, sin observarse ningún incremento, presentándose luego en los 113 días al finalizar el estudio un incremento en la intensidad respiratoria con $2,07 \text{ mgCO}_2/\text{kg fruto-hora}$, característico de los frutos no climatéricos (Seymour, *et al.*, 1993; Duran, 1982). A partir de este momento se da inicio a las transformaciones de tipo bioquímico y anatómico que coinciden con el máximo tamaño en longitud y diámetro del fruto y cambio en la coloración del mismo.

Figura 3.4. Variaciones de la intensidad respiratoria

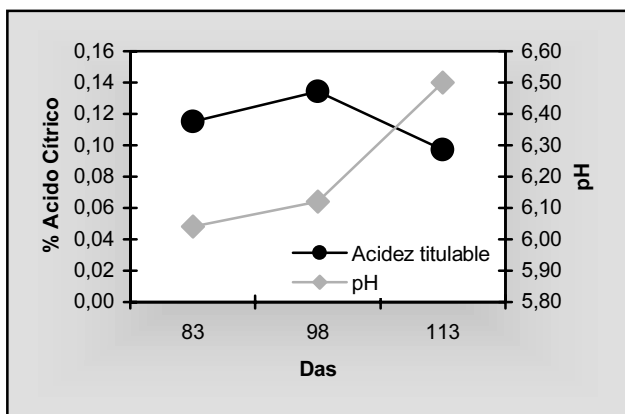


Comportamiento de las variables químicas durante el desarrollo del fruto del maraco:

pH y Acidez. En la Figura 3.5 se muestra el comportamiento del pH y la acidez durante el desarrollo del fruto. El pH asciende desde 6.0 en el día 83 hasta 6.5 en el día 113, en tanto que este comportamiento es inverso para la

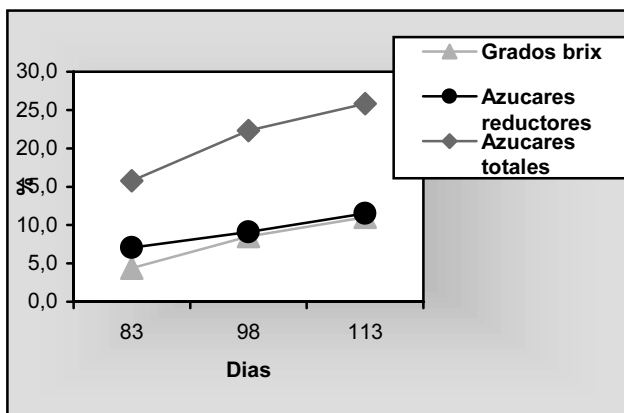
acidez titulable en el último muestreo ya que desciende de 0.14 % el día 98 a 0.09 % en ácido cítrico el día 113. Este descenso indica la degradación de ácidos orgánicos como el cítrico, málico y succínico hasta subproductos finales CO_2 , agua y calor. El incremento del pH es debido a la reducción del contenido de ácidos orgánicos, los cuales son utilizados como reserva del fruto (Kays, 1997).

Figura 3.5. Variaciones del pH y acidez



Grados Brix. Los sólidos solubles (figura 3.6) aumentan hasta 11 % al final de la maduración, 113 días después del cuajamiento o antesis. El desdoblamiento de polisacáridos de mayor peso molecular como almidones y hemicelulosa contribuyen al aumento de azúcares de menor peso molecular como glucosa, fructosa y sacarosa.

Figura 3.6. Variaciones de los grados brix, azúcares reductores y totales



Estos azúcares se encuentran en concentraciones bajas en las primeras etapas del crecimiento, y al iniciarse la maduración hay aumento de estos, como consecuencia del aporte de las reservas y la translocación de savia desde la planta madre, característica de los frutos no climatéricos (Wills, *et al.*, 1998).

Azúcares reductores y totales. Para los azúcares reductores representados por la glucosa y fructosa predominantemente, el valor inicial registrado fue de 7.1 % y el final 11.5% (Tabla 3.2 y Figura 3.6). Esta tendencia es característica de otras frutas tropicales; esto es, que en la fase de maduración se da la mayor degradación en la hidrólisis del almidón que conlleva a una mayor acumulación de azúcares reductores, como lo explican Seymour *et al.* (1993); Kays (1997).

Tabla 3.2 Variables químicas durante el desarrollo del maraco (*T. bicolor*)

Edad (días)	Acidez (% Ac.Cítrico)	PH	%BRIX	Azuc. Reduct.	Azuc. Tot.	I.M Brix/Acidez	I.M Az.Red/Acidez	VIT. C
83	0.1152	6.04	4.4	7.0647	15.7916	38.194	61.325	
98	0.1344	6.12	8.5	9.0895	22.3106	63.244	67.630	0.00016
113	0.1440	6.5	11	11.503	25.8333	110	288.215	0.0001

En el caso de los azúcares totales se encuentra que el máximo valor registrado durante la maduración del fruto de copoazú es de 25.8 % (Figura 3.6) en el día 113 de desarrollo del fruto, éste valor coincide con la madurez de consumo del fruto, en la cual alcanza el máximo incremento en longitud y diámetro, así como la máxima acumulación en materia seca. En frutos carnosos o bayas drupáceas, como es el caso del fruto de maraco, el contenido de carbohidratos es mayor, cuando se trata de tejido mucilaginoso (Chaftel, 1976).

Índice de madurez. En la tabla 3.2 se muestra la relación brix/acidez, la cual aumentó continuamente durante el desarrollo del fruto, llegando a un valor de 110 en el momento de la recolección el día 113. De igual forma se observa que la relación azúcares reductores/acidez, aumentó progresivamente, como consecuencia del incremento de azúcares y el bajo contenido de ácidos

Vitamina C. El día 98 de la fase reproductiva se registró un valor de 0.00016 mg/100 g y posteriormente se mantuvo el día 113 con 0.0001 mg/100 g (Tabla 3.2) lo que indica que el fruto de maraco posee escasos contenidos en vitamina C, lo cual coincide con su pH y su bajo contenido de acidez.

3.3.3 Maduración del fruto de maraco

Fisiología postcosecha

El tiempo de vida promedio del fruto de maraco puede estar entre una y dos semanas, dependiendo de las condiciones de almacenamiento. A temperatura de maduración 20°C y H.R 75% el fruto presenta una respiración promedio de 113.5 mgCO₂.kg.⁻¹h⁻¹, mientras que en temperatura de refrigeración el fruto presenta una menor actividad respiratoria que no supera los 50 mgCO₂.kg.⁻¹h⁻¹

Intensidad respiratoria (IR) y pérdida de peso. El fruto de maraco presenta una tasa respiratoria después de la recolección de 14.9 mgCO₂.kg.⁻¹h⁻¹ La tasa respiratoria promedio fue de 26.3 mgCO₂.kg.⁻¹h⁻¹ a temperatura ambiente, y de 17.3 mgCO₂.kg.⁻¹h⁻¹ a temperatura de refrigeración. La tendencia respiratoria del fruto a temperatura ambiente, muestra un incremento notable de 113.5 mgCO₂.kg.⁻¹h⁻¹ el día 6 después de la recolección, la cual desciende al final de su almacenamiento en el día 11. Por su parte, el fruto almacenado a 12°C alcanza a conservarse por 2 semanas, presenta intensidades respiratorias no mayores a 40 mgCO₂.kg.⁻¹h⁻¹ en el día 7 y desciende a 6.2 el día 14, para presentar un nuevo incremento entre los días 15 y 16 con una tasa menor (35.5 mgCO₂.kg.⁻¹h⁻¹). Este nuevo incremento puede ocurrir como consecuencia de la desorganización celular masiva y el desencadenamiento de la senescencia, tiempo después de alcanzar su madurez óptima de consumo (Yahia e Higuera, 1992).

En el noveno día, aproximadamente, se notó el desarrollo máximo de su aroma.

Cambios químicos en almacenamiento. Durante el proceso de maduración los °Brix varían entre tratamientos y días. El pH es afectado por los tratamientos, aunque en cada uno de ellos varió numéricamente en el tiempo. El % de acidez se mantiene uniforme en el tiempo, salvo en refrigeración donde varía sensiblemente. La inconsistencia de estas tendencias puede deberse a trastornos fisiológicos leves, provocados por el frío, el cual parece afectar de forma diferente el metabolismo de los frutos de maraco, en un mismo lote de fruta. No se descarta la diferencia de madurez de los frutos al momento de cosecha como responsable de dicho comportamiento.

3.4 COPOAZÚ (*Theobroma grandiflum*)

3.4.1 Crecimiento y Desarrollo del fruto

En la Tabla 3.3, Figura 3.7 (A) y (B), se presentan los datos de peso fresco total (PFT), peso seco total (PST), Diámetro longitudinal (DL), diámetro transversal (DT) y tasas de crecimiento relativo (R). Las fotos 3.5, 3.6 3.7 y 3.8 presentan los cambios morfológicos de la fruta.

Figura 3.7. Valores promedio de (A) peso fresco total, peso seco total y tasas relativas de crecimiento. (B) Longitud y diámetro transversal y tasas relativas de crecimiento del fruto de copoazú

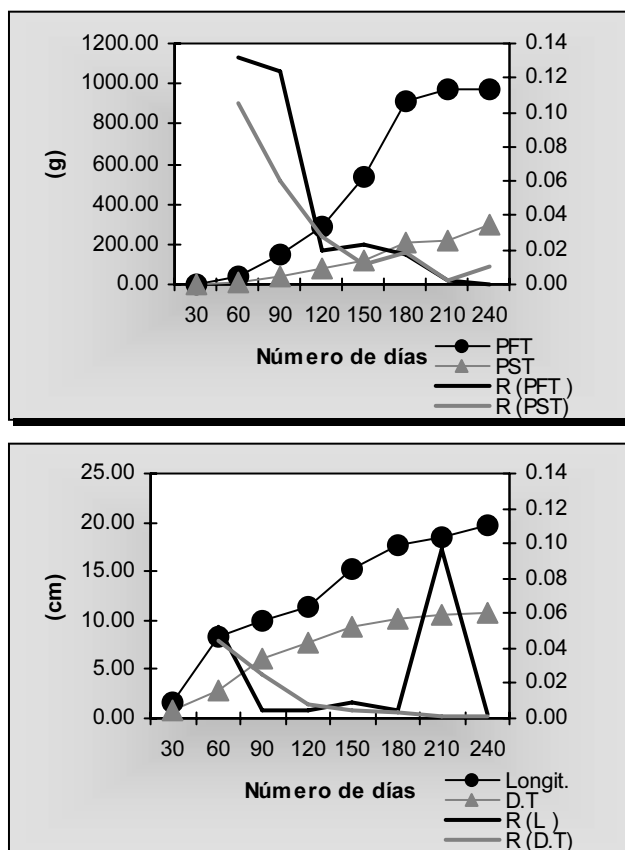


Tabla 3.3. Valores promedio de peso fresco y seco totales, diámetro polar y ecuatorial, y tasas relativas de crecimiento del fruto de copoazú

Días	PFT (g)	R	PST (g)	R	Diámetro polar (cm)	R	D.T (cm)	R
30	0,74	-	0,25	-	1,71	-	0,75	-
60	39,45	0,1320	5,90	0,105	8,34	0,0520	2,83	0,0440
90	145,15	0,1240	35,30	0,060	9,87	0,0050	6,02	0,0250
120	289,55	0,0200	83,66	0,028	11,40	0,0040	7,72	0,0080
150	533,10	0,0230	120,30	0,012	15,30	0,0090	9,25	0,0050
180	910,69	0,0170	208,95	0,018	17,65	0,0040	10,16	0,0030
210	967,75	0,0020	215,10	0,002	18,50	0,0970	10,48	0,0010
240	975,75	0,0002	298,50	0,010	19,71	0,0020	10,73	0,0010

Tasas de crecimiento relativo

Peso fresco y seco totales. La tasa de crecimiento relativo del peso fresco es decreciente entre los 60 y 120 días. Entre los 120 y 150 días el incremento no es significativo y decrece hasta el final del desarrollo. De manera semejante la tasa de crecimiento relativo del peso seco presenta una tendencia similar, coincidiendo con los máximos y mínimos de la tasa de aumento de peso fresco

Diámetro polar y Diámetro ecuatorial. La tasa de crecimiento relativo del diámetro longitudinal polar es decreciente con excepción de los intervalos comprendidos entre 120 y 150 días y entre 180 y 210, presentándose su mayor incremento en este último lapso.

Respecto al diámetro transversal, la tasa de crecimiento relativo es decreciente durante todo el período de crecimiento a excepción del tiempo comprendido desde la floración hasta los 60 días.

Teniendo en cuenta que esta tasa mide la proporcionalidad del crecimiento, según Wills *et al.*, 1998, un periodo crítico del desarrollo del fruto estaría comprendido entre el inicio y los 60 días y entre los 120 y los 150 cuando las tasas de crecimiento fueron positivas y en ellas se están dando la máxima acumulación de reservas y el máximo cambio metabólico.

Al finalizar el período de crecimiento se observa de nuevo un aumento en el peso seco.

Color y consistencia. Los cambios en la coloración de la corteza no se manifiestan sino hasta después de los 180 días del desarrollo del fruto. La síntesis de pigmentos es característica del proceso de maduración de frutos. El color de la cáscara se caracteriza por ser marrón oscuro, el cual cambia de tonalidad hacia marrón claro en la maduración

El fruto de 120 días presenta una pulpa blanca, con semillas de color crema y semillas de poca dureza. A partir de los 180 días del desarrollo, la tonalidad blanca de la pulpa comienza a disminuir, para presentarse al final del desarrollo, con una coloración amarillo crema y las semillas con testa dura y color marrón. Esta característica hace indispensable tener en cuenta las condiciones de despulpado para lograr el mayor rendimiento en la producción de pulpa y evitar el rompimiento de las semillas que lleva a la imposibilidad de su utilización en la producción de chocolate (Foto 3.8). Para el final de la maduración (150 días), la pulpa se separa completamente de la corteza fuertemente suberizada, con lo cual puede convertirse en un índice de recolección. La fenología del fruto de copoazú en las condiciones de la amazonia colombiana coinciden en su duración con los de copoazú en Brasil (Calzavara, *et al.* 1984).

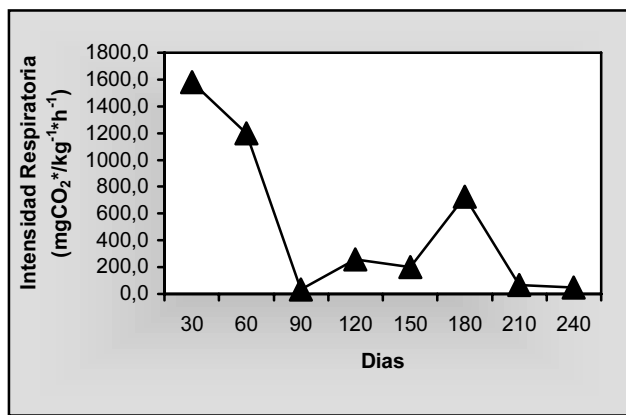
Características fisiológicas y químicas. De manera semejante al maracó, el fruto de copoazú presenta alta actividad respiratoria al inicio del desarrollo para luego disminuir.

Respiración. Durante los primeros 60 días la intensidad respiratoria es superior a $1200 \text{ mgCO}_2/\text{kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; sin embargo, como se observa en la Figura 3.8 y en la Tabla 3.4, esta va disminuyendo conforme el fruto crece. Este comportamiento es similar al de frutos como el mango, de las variedades Tommy atkins y Kent y de la naranja valencia (Lagos, 1990; Galvis, 1991).

Tabla 3.4. Variables fisiológicas y químicas medidas durante el desarrollo de frutos de copoazú.

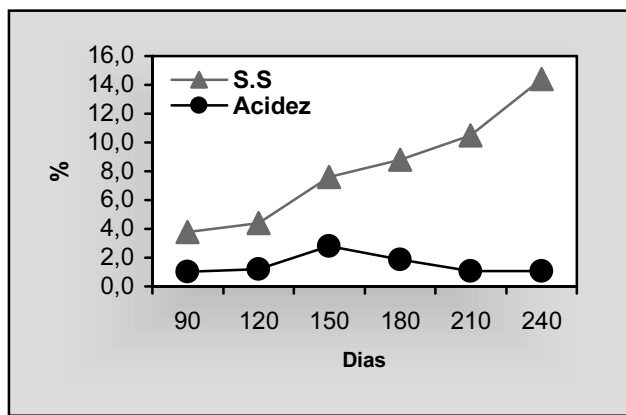
Días de desarrollo	Respiración mgCO ₂ /kg-h	S.S (%)	Acidez (%)	I.M (SS/Acidez)	A. Totales (mg glu/100g)
30	1580	-	-	-	-
60	1198,2	-	-	-	-
90	33,5	3,8	1,02	3,72	243,39
120	259,9	4,4	1,2	3,66	321,95
150	199,2	7,6	2,8	2,71	323,8
180	725	8,8	1,88	4,68	330
210	68,7	10,5	1,08	9,72	334,9
240	48,7	13	1,07	13,45	342,3

Figura 3.8 Actividad respiratoria durante el desarrollo del fruto del copozú



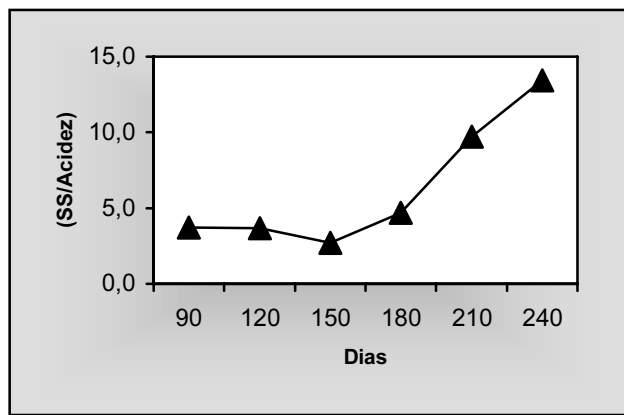
Cambios químicos. La Figura 3.9 presenta el comportamiento de los sólidos solubles y acidez y en la Figura 3.10 el índice de madurez mostrados por el fruto durante su crecimiento.

Figura 3.9. SS y Acidez durante el desarrollo del fruto del copozú



Sólidos solubles. El aumento en sólidos solubles es permanente; presentándose su mayor incremento entre el 7° y 8° mes (210 días y 240 días).

Figura 3.10. Índice de Madurez durante el desarrollo del fruto del copoazú



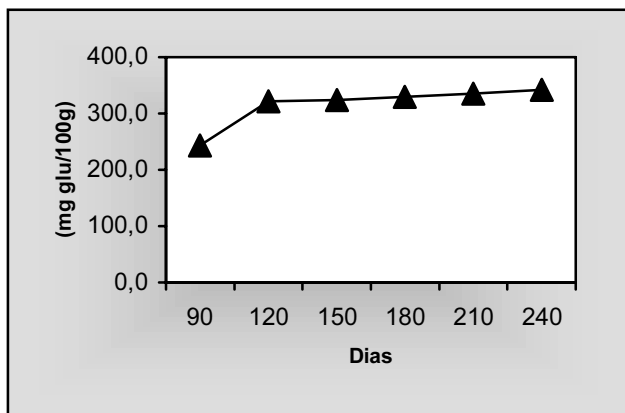
Acidez titulable y pH. La acidez titulable expresada como porcentaje de ácido cítrico, presenta un incremento durante los 150 primeros días, a partir del cual comienza a disminuir presentando al final del crecimiento valores muy próximos al 1 % (tabla 3.4). Este valor contrasta con el comportamiento del pH, el cual durante los primeros 150 días disminuye, pero a partir de allí presenta un aumento constante hasta el final. Este comportamiento coincide con el de varios frutos tropicales que presentan disminución durante el proceso de maduración en el contenido de ácidos orgánicos, los cuales inicialmente son reserva, pero posteriormente son respirados para proveer la energía requerida en el metabolismo (Kays, 1997 y Seymour *et al.*, 1993).

Índice de madurez. El comportamiento de la fruta respecto a la relación sólidos solubles/ Acidez (Tabla 3.4) aumenta a partir del día 150; a partir de allí comienza a incrementar, para presentar un valor alto al final del desarrollo 13.45, el cual resulta mayor que el reportado por Velho *et al.*, 1990. Esto como consecuencia de su alto contenido de sólidos en contraste con la baja presencia de ácidos. El contenido de almidón en la pulpa de copoazú es apreciable, algunos autores reportan niveles de 0.96% (Chaar, 1980)

Azúcares totales. Los azúcares totales presentaron siempre aumento durante el desarrollo, siendo el mayor incremento entre los 120 y los 150 días. La tendencia de aumento es característica de otros frutos tropicales. Al final del desarrollo los valores de azúcares totales (Figura 3.11) estuvieron alrededor de los 342 mg glucosa/100 g pulpa, valor alto teniendo en cuenta que el fruto presenta tendencia a ser ácido. Comparando los datos registrados de respira-

ción y contenido de azúcares reductores y totales, se observa que la tasa mínima de respiración coincide con los mayores valores de estos.

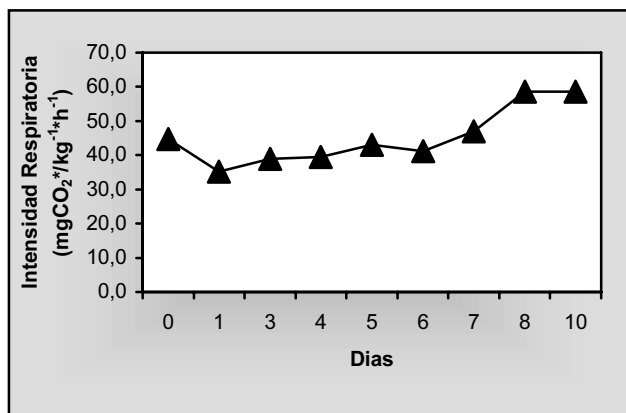
Figura 3.11. Azúcares totales durante el desarrollo del fruto del copoazú



3.4.2 Maduración del Fruto

Índice Respiratorio. El copoazú es un fruto no climatérico con máxima respiración de $60 \text{ mg CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{ hora}^{-1}$ (Figura 3.12) durante la maduración, lo cual coincide con el comportamiento del fruto de maraco. En frutos de cacao (*Theobroma cacao*) se reporta tener el mismo comportamiento fisiológico (Wills *et al.*, (1998). Coincide este comportamiento fisiológico con el reportado por De Carvalho *et al.*, (1999).

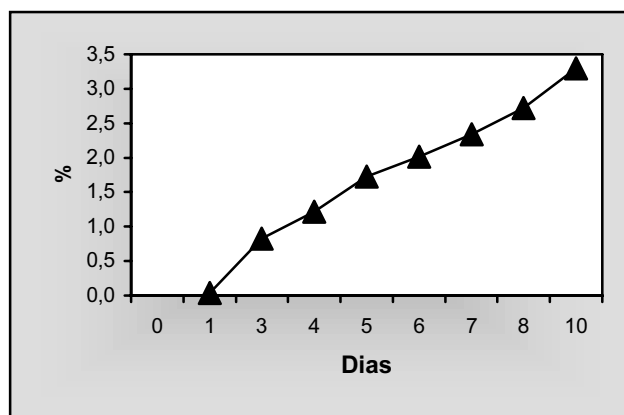
Figura 3.12. Índice respiratorio durante la maduración del fruto de copoazú



Transformaciones físicas

Porcentaje de Pérdida de Peso. Los frutos de copoazú madurados a 18°C y 70% H.R tienen pérdidas de peso menores al 5%, en un período de 11 días. Estas bajas pérdidas de peso son debidas a una baja intensidad respiratoria, que combinadas con una corteza gruesa de un espesor entre 50 y 80 mm reduce la actividad respiratoria. Además contribuye a esta baja intensidad respiratoria el volumen del fruto cuya actividad metabólica es bastante baja (Figura 3.13).

Figura 3.13. Pérdida de peso durante la maduración del fruto de copoazú



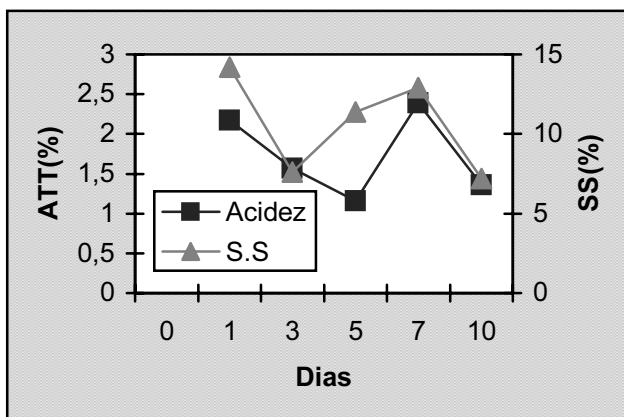
Transformaciones bioquímicas

Acidez. El contenido de acidez total titulable disminuye en la pulpa del fruto de copoazú, disminuye desde 2,17% en el momento de madurez fisiológica hasta 1,36% al final de la maduración en el día 11. En algunas ocasiones se pueden presentar concentraciones de ácidos orgánicos durante el proceso de senescencia, lo cual puede atribuirse a que se trata de frutos moderadamente ácidos (Figura 3.14).

Sólidos Solubles. Los sólidos solubles aumentaron ligeramente en el fruto de copoazú almacenado, característica típica de los frutos no climatéricos. Los contenidos finales son de 13% (tabla 3.4) y es un poco superior a lo reportado por Rogez *et al.* (2004); sin embargo al final descienden 17,8% como resultado del proceso de fermentación (Figura 3.14), lo cual puede estar asociado con las condiciones agroclimatológicas de la Amazonia

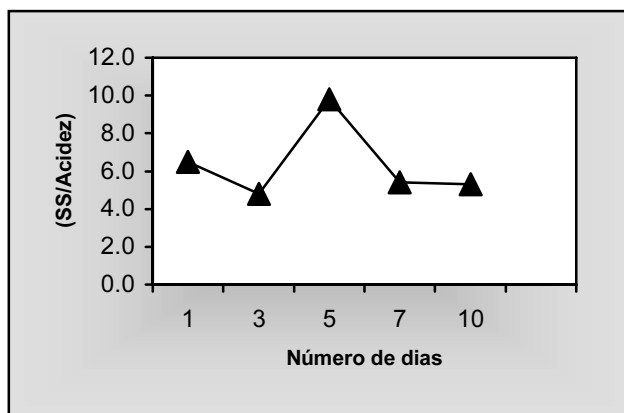
Colombiana. El contenido de sólidos solubles resulta bastante alto para frutos de copoazú, al igual que en el maraco, que insinúa un buen contenido de reservas de polisacáridos que se desdoblan durante la maduración.

Figura 3.14 Acidez y SS durante la maduración del fruto de copoazú



Índice de Madurez. El índice de madurez aumentó hasta valores cercanos a 10 (Figura 3.15), hacia el día 5, este valor coincide con el carácter ácido del fruto, el cual se mantiene hasta el final del desarrollo. Al compararlo con el fruto de maraco es un poco menor, dado al carácter poco ácido del fruto de maraco.

Figura 3.15 Índice de Madurez durante la maduración del fruto de copoazú



Los frutos de maraco y copoazú presentan períodos de desarrollo similares tras el cuajamiento, más de 32 semanas, que los sitúa entre el grupo de frutos de largo período de desarrollo, que difiere de otros frutos tropicales con períodos entre 16 y 20 semanas. Su actividad respiratoria los clasifica como frutos no climatéricos, que guarda igualmente una relación con la baja intensidad respiratoria.

pH. El pH mostró aumento durante el almacenamiento y alcanzó un valor de 3.80 un poco mayor al 3.40 que reportan Rogez *et al* (2004).

El pH y la acidez presentan comportamientos inversos durante la maduración de la mayoría de los frutos tropicales, y aunque no son la misma medida, resultan medidas complementarias ya que son la cuantificación del contenido de compuestos ácidos en la pulpa del fruto, en el caso de copoazú (Kader,1999).

Dado que el fruto de copoazú no presenta cambios en su apariencia durante el desarrollo, el aroma puede ser un buen indicador, ya que la producción de volátiles se aumenta durante este período. De Carvalho *et al* (1999) sugiere que ya que la maduración se produce desde el ápice hacia la base del fruto es posible iniciar la cosecha de aquellos frutos que emitan en su porción terminal el aroma característico. Dado que es difícil identificar el punto de recolección, los frutos se recolectan normalmente del suelo. En plantaciones comerciales, especialmente durante el período más álgido de la cosecha, la frecuencia de cosecha es diaria, con los consiguientes problemas de contaminación y daños si se retrasa el proceso.

Bibliografía

Barcello, J. C. Y Sabater, B. 1985. Fisiología Vegetal. 3º edición. Editorial Pirámide, Madrid. pp 813.

Bidwell, R. 1984. Fisiología Vegetal. AGT, Ontario. pp 410-482.

Calzavara, B.B.G.; Müller, C.H.; Kawage, O.de N.C. 1984. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro, cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. Belém: Embrapa-CPATU, Embrapa-CPATU. Documentos, 32. 181p.

Chaar, J.M. 1980. Composicao do cupuacu [*Theobroma grandiflorum* (Schum)] e conservacao do seu nectar por meios fisicos e quimicos. MS Thesis, UFRRJ, Rio de Janeiro, Brazil.

Chaftel, J. H. 1976. Introducción a la Bioquímica y tecnología de alimentos. Editorial Acribia. México. Vol. 2. pp. 404.

Coombe, B.G. 1976. The development of fleshy fruits. Ann. Rev. Plant Physiol. 27: 507-528

De Carvalho, J. E. Müller, C.H., Benchimol, R.L. Kate A Alves, R.M. 1.999. Copoazú [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spteng.) Shum.]: cultivo y utilización. Convenio FAO-RLAC. A.C. Impresores, Caracas, Venezuela. 142p

Duran, S. 1982. Frigoconservación de la fruta. Editorial Aedos, Barcelona. pp. 9 - 128.

Essau, K. 1977. Anatomía Vegetal. 2º edición. Ediciones Omega S.A. Casanova Barcelona. pp. 779.

Galvis, 1991. Análisis de crecimiento del fruto y determinación del momento óptimo de cosecha de la naranja variedad valencia cultivada en el Quindío. Tesis Agronomía. Universidad Nacional de Colombia 110 p

Galvis, J. 1992. Índices de cosecha. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA. En: Cursos Manejo Postcosecha de frutas y hortalizas. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C s/p.

Hernandez, V. 1980. Estudios Bioquímicos y Fisiológicos en Pre y Postcosecha de la Fruta de Tamarindo. Tesis de maestría, CONAFRUT. México. pp. 5-60.

Herrero, A. 1992. Conservación de frutas Manual Técnico. Editorial, Mundiprensa, Madrid. pp. 89-109.

Kays, S. 1997. Postharvest physiology of perishable plant products. Exon Press. Athens, G.A. USA 75-143 pp

Kader, A. 1999. Future research needs in postharvest biology and technology of fruits. En: Michalezuk, L. Int. Symp. On effect of pre and postharvest factors on storage of fruti. Leuven, Belgium Acta Hortrt 485:209-213

Lagos, E. 1990. Análisis de crecimiento del fruto y determinación del momento óptimo de cosecha para las variedades de mango TOMMY ATKINS y KENT y su comportamiento en maduración controlada. Tesis maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. pp. 16-19.

Rogez, H. Buxant, R., Mignolet, E., Souza, J., Silva, E., Larondelle, Y., 2004. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araca-boi (*Eugenia stipitata*), bacurí (*Platonia insignis*) and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). Eur. Food. Res. Technol. 218: 380-384.

Roth, I. 1977. Fruits of angiosperms. Gebruder Borntraeger. Berlin - Stuttgart. pp 675.

Seymour, G.B. Taylor, J.E. , Tucker, G.A. 1993. Biochemistry of fruit ripening. Chapman &Hall Plymouth U.K. pp 1-52.

Velho, C.C Whipkey, A. Juanick. (1990). Capuassu: a new benenae crof for Brazil. E: Janick., J., Simon, J.E (Eds) Advences in new creps. Timber pressm Portland. Oregon. Pág 372-377

Wills, R. McGlasson, B. Graham, D. Joyce, D. 1998. Postharvest, An introduction to the physiology and handling. UNSW Press. 262p. Adelaide. Australia.

Yahia, E.M & Higuera, I. 1992. Fisiología y tecnología poscosecha de productos hortícolas. Primera edición. Limusa, Grupo Noriega Editores México. 303 p



Foto 1. Fruto de Maraco una semana después de antesis.

Foto 2. Fruto de Maraco 4.5 semanas de desarrollo



Foto 3. Fruto de Maraco 9 semanas de desarrollo.

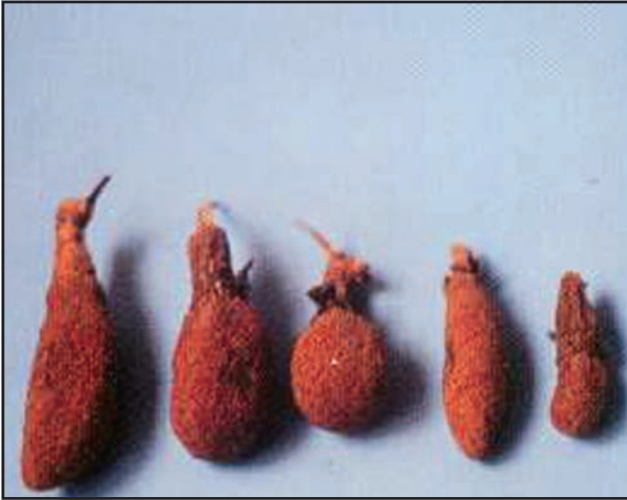


Foto 4. Frutos de Copozú 4 semanas de desarrollo.

Foto 5. Frutos de Copozú 8 semanas de desarrollo.



Foto 6. Frutos de Copozú 12 semanas de desarrollo.



Foto 7. Frutos de Copoazú 20 semanas de desarrollo.

Foto 8. Fruto de Copoazú 32 semanas de desarrollo. Máximo crecimiento.



Foto 9. Fruto de Copoazú maduro.

4. APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LAS ALMENDRAS DE LOS FRUTOS DE ESPECIES PROMISORIAS DEL GENERO *Theobroma* BAJO CONDICIONES DE LA AMAZONIA COLOMBIANA

Por: Jaime Alberto Barrera¹, María Soledad Hernández¹, Martha Cecilia Quicazan², Luz Marina Melgarejo², Claudia Hernández³, Amanda León², Jobana Parra³, Yurani Montealegre³

Introducción

Dentro de los recursos renovables más importantes para la región amazónica se encuentran las especies comestibles de origen vegetal debido a que pueden ser utilizados en la alimentación de los pobladores y con ello el aseguramiento alimentario, ya que también pueden llegar a constituir una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios como los aceites esenciales, pigmentos y metabolitos primarios como enzimas y proteínas, cuya extracción a nivel semiindustrial podrían constituir una alternativa para el sistema comercial de la región. Sin embargo, la mayoría de estos recursos se encuentran en etapas preliminares a su aprovechamiento inte-

¹ Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI

² Universidad Nacional de Colombia

³ Universidad de la Amazonia

gral, o en algunos casos su erosión genética es muy grande, como es el caso del Copoazú, en la cual su centro de diversidad está en una subregión del sur de Para (Brasil) donde la destrucción de su hábitat ha sido intensa.

Con un potencial reconocido y una creciente demanda, los resultados presentados en este capítulo acerca del aprovechamiento integral de las almendras de frutos de *T. grandiflorum* y *T. bicolor* abren posibilidades de industrialización y acceso a grandes mercados, y permite que colecciones de recursos de la floresta amazónica puedan ser utilizados para implementación en procesos productivos, con el fin de cumplir con otro de los objetivos de los programas de los recursos genéticos, el cual además de la conservación contempla el uso racional del recurso con el fin de mejorar la calidad de vida de los pobladores regionales.

4.1 La industria del chocolate

El chocolate es uno de los alimentos más populares a nivel mundial debido a su valor nutricional y a sus excelentes características sensoriales. Las semillas del cacao común (*Theobroma cacao*), constituyen la materia prima fundamental. En Colombia, los cultivos existentes principalmente en el eje cafetero abastecen la industria nacional, una de las más pujantes e importantes del sector manufacturero.

Los granos de cacao fermentados y secos son considerados por los industriales materia prima para la elaboración de subproductos y productos finales en la industria confitera, cosmética y farmacéutica; aunque principalmente el procesamiento del grano se concentra en la industria prensadora y del chocolate. En la industria prensadora se extrae manteca de cacao, torta de cacao y cacao en polvo a partir de la pasta o licor de cacao que salen de la molienda, los cuales sirven como materia prima para chocolatería, confitería y productos con base en cacao.

Es importante señalar que el consumo de cacao comienza con la molienda y a partir de allí se multiplica su uso. No obstante, los mayores productores no son los principales procesadores. Los países productores de cacao (tabla 4.1), generalmente, destinan para el consumo interno proporciones inferiores a las que exportan. Siendo éste orientado a satisfacer la demanda de la industria procesadora de semielaborados y productos finales, en

cada uno de los países. Sin embargo, algunos de estos productos procesados en el origen son exportados a otros países consumidores (Díaz, 2002).

Tabla 4.1 Cacao en grano y superficie cultivada en el mundo

	2000	2001	2002	2003	2004
Mundo (ex)	7,123,573	6,897,113	6,578,700	6,979,566	7,019,245
Brasil	705,965	665,809	582,315	589,428	591,740
Camerún	370,000	370,000	370,000	370,000	370,000
Colombia	93,492	93,048	98,938	100,003	100,000
Côte d'Ivoire	1,800,000	1,777,550	1,700,000	1,700,000	1,700,000
Ghana	1,500,000	1,350,000	1,195,000	1,500,000	1,500,000
Indonesia	470,000	470,000	480,000	490,000	500,000
Nigeria	966,000	966,000	1,030,000	1,100,000	1,100,000

Los países consumidores, llamados así a los grandes demandantes de cacao en grano, se caracterizan por ser sólo procesadores de cacao en todas sus formas. Estos países consumen una alta cantidad de cacao y chocolate dado su componente alimenticio y energético. Se ha determinado que el cacao y el chocolate son ricos en minerales, incluyendo el magnesio y el hierro, algunos ácidos orgánicos, estimulantes, antioxidantes y carbohidratos. También los países consumidores poseen un alto grado de industrialización, lo que les permite disponer de capacidad tecnológica y recursos económicos para la instalación de plantas procesadoras de cacao que brinden un mejor tratamiento al grano y un aprovechamiento a escala de las mismas. Por otro lado, los climas cálidos de los países tropicales ofrecen ventajas para la producción del grano (tabla 4.2), pero limitan la fabricación, almacenamiento y transporte de los productos finales (Díaz, 2002).

Tabla 4.2 Rendimiento de Cacao en grano en el mundo

Rendimiento (Kg/Ha)	Año				
	2000	2001	2002	2003	2004
Mundo (ex)	4,799	4,617	4,719	4,711	4,705
Brasil	2,788	2,789	3,002	2,877	2,995
Camerún	3,314	3,300	3,378	3,784	3,784
Colombia	4,764	4,696	4,844	5,369	5,100
Côte d'Ivoire	7,755	7,482	7,206	7,206	5,882
El Salvador	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Granada	10,050	10,118	10,096	10,096	10,096
Indonesia	9,909	8,104	9,375	8,694	8,600

El consumo mundial de cacao en grano se encuentra concentrado, como en el caso de la producción, por continentes o regiones. En 1998/99 Europa representaba aproximadamente el 46% del consumo mundial, América y el Caribe el 27%, Asia y Oceanía 13.5% y África 12.7%.

En América y el Caribe, Estados Unidos es el mayor consumidor de cacao en grano del mundo, representa el 15% del consumo mundial; las importaciones mundiales de este país representan el 17%, de las cuales consume el 76% y el resto es destinado a las reexportaciones. Brasil presenta capacidad de molienda aproximada del 60% de su producción; México consume 50% de su producción e importa aproximadamente el mismo porcentaje; Colombia consume más del 90% de su producción. Canadá representa el segundo mayor importador de la región (América y el Caribe).

El segundo mayor importador y consumidor mundial del grano es Alemania, importa el 13% de la producción mundial y reexporta el 60% de las mismas; Francia y los Países Bajos representan el 14% de las importaciones de Europa, Francia consume el 48% y los Países Bajos el 6% del total importado; el Reino Unido consume el 61% de sus importaciones, Bélgica, Rusia, España e Italia importan entre el 7 y 5% del cacao en grano en Europa y consumen más del 60% de sus importaciones, a excepción de Bélgica que reexporta el 92%. En el caso de la región conformada por Asia y Oceanía, Japón lidera las importaciones de cacao en grano, consumiendo cerca del 98% de las mismas (Díaz, 2002).

En los últimos años los países productores han aumentado su capacidad de molienda para incrementar el valor agregado de sus exportaciones, esto como consecuencia de la inestabilidad de los precios internacionales del cacao en grano, lo cual permite incrementar los ingresos por exportaciones y a su vez, estimula la industria interna para la participación en el mercado mundial. Ejemplo de este fenómeno es Brasil quien posee un tamaño de mercado con capacidad de absorber productos finales a partir del cacao, además de las posibilidades de sostener socios comerciales con los países de la región (Díaz, 2002). Los niveles más altos de consumo *per capita* anuales en el mundo, en promedio, se registran en Europa, alcanzando en 1997 un valor de 1.7 Kg. En la tabla 4.3 se presenta el consumo anual de chocolate por habitante.

Tabla 4.3. Consumo anual de chocolate por habitante y por país

País	Consumo (kg/persona/año)
Dinamarca	5
Estonia	4.7
Islandia	4.4
Francia	3.3
Noruega	2.8
Irlanda	2.5
Reino Unido	2.3
Suiza, Suecia, Bélgica, Austria, España	1-1.8
Estados Unidos	2
Canadá	1.8
Bermuda, Dominica, Grenada, San Vicente	1-2
Uruguay	2.1
Colombia	1.1
Ecuador	0.9
Venezuela	0.5
Japón	3.3
Kuwait y Malasia	2.4
Australia	2.4
Países africanos	0.5

Fuente: (Díaz, 2002)

El consumo de cacao en grano se encuentra estrechamente ligado al consumo de chocolates en todas sus formas; sin embargo, es importante resaltar que este se ubica en países con mayor nivel de ingresos. El valor agregado que se le otorga a la producción de chocolates, principalmente en Europa, hace de este un producto tipo gourmet, ya que estos países han convertido la elaboración de chocolates en un arte con recetas inéditas de altísima calidad y tradición, lo cual ha permitido dirigir la producción a mercados muy definidos (Díaz, 2002).

Norteamérica es un gran consumidor de grano para la molienda pero, a pesar de ser una región con un alto nivel de ingresos por habitante, el consumo de productos con base de cacao está más diversificado hacia la industria de confitería y chocolatería de consumo masivo y por tanto de menor precio y calidad. Por ello, el mercado para estos productos es de mayor alcance, permitiendo obtener nuevos mercados y así aumentar el consumo (Díaz, 2002).

Entre las principales empresas procesadoras de cacao en grano, subproductos y confitería se conocen: Nestlé, Rowtree, Hershey Foods y Mars, Jacobs Suchard, Cadbury Schweppes. Estas empresas controlan la demanda mundial del grano, consumen cacao de todas las regiones productoras. También, comercializan mundialmente materia prima, insumos y productos semielaborados.

4.2 El proceso de obtención de chocolate

La transformación del cacao en chocolate comprende diferentes etapas que se han estudiado muy bien en el cacao común. El proceso incluye operaciones que son críticas desde el punto de vista de las características organolépticas y demás atributos de calidad del producto. La fermentación y el secado se consideran el eje central del proceso, pues la primera da lugar al desarrollo de los precursores del sabor y del aroma del chocolate, si esta operación no se lleva a cabo adecuadamente, no es posible efectuar rectificaciones posteriormente.

En el secado sucede algo similar, ya que culminan las reacciones de síntesis de los precursores del sabor y del aroma, además elimina la humedad que constituye un medio apropiado para el crecimiento de microorganismos nocivos; un control deficiente en esta etapa puede dar lugar al desarrollo de mohos, los cuales generan un sabor desagradable, incluso aunque la fermentación haya sido correcta.

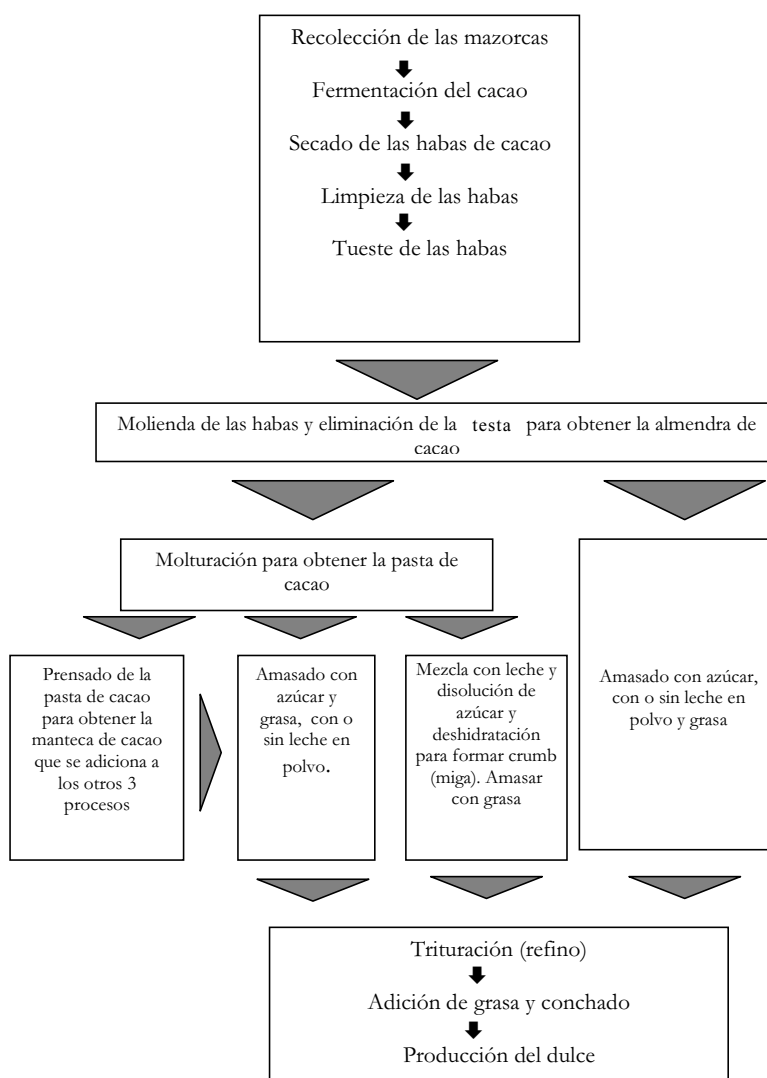
4.3 Procesamiento del cacao para la obtención de chocolate

El chocolate posee dos características fundamentales: su sabor y su textura. Aunque existen diferentes sabores de chocolate, todos ellos deben estar libres de sabores desagradables e incorporar por lo menos alguno de los agradables que el consumidor asociará al producto.

Una particularidad básica de la textura es que debe ser sólido a temperatura ambiente, de 20-25°C, y no obstante, fundir rápidamente en la boca a 37°C, produciendo un líquido que resulte suave al paladar.

El procesamiento del chocolate está relacionado con la adquisición de estas dos características, y tiene como objetivo desarrollar el sabor del producto y tratarlo de forma que se consiga la fluidez adecuada y esté libre de material áspero. Aunque existen varios métodos de fabricación de chocolate, los más tradicionales están basados en el proceso presentado en la figura 4.1.

Figura 4.1. Diagrama esquemático del proceso tradicional de elaboración del chocolate



Beneficio del cacao: El beneficio del cacao influye en gran medida en la calidad del chocolate, dado que comprende tres etapas relevantes: recolección y desgrane de la mazorca, fermentación y secado del grano. Para evitar el detrimento de la calidad de las habas y por tanto, del posterior chocolate, las mazorcas recolectadas se deben clasificar según su grado de madurez y sanidad, y fermentarlas de forma separada.

En el caso de los cacaos Amazónicos es necesario realizar adicionalmente despulpado, dado que este cacao posee más pulpa que el cacao forastero; por lo tanto se recomienda retirar parte de ésta y aprovecharla para la producción de jugos, mermeladas, dulces, etc.

El despulpado se puede hacer manualmente, con ayuda de unas tijeras, o con máquina despulpadora. El despulpado manual es realizado en las industrias caseras y sorbeteras. A pesar de ser una tarea dispendiosa, ésta trae consigo un beneficio importante para la región, ya que es ejecutado por mujeres, aumentando de esta manera la renta familiar. Es claro que cuando se trata de Copoazú sin semilla, el beneficio consiste apenas en quebrar el fruto y retirar la pulpa (Calzavara *et al.*, 1984).

Fermentación: El término fermentación es realmente incorrecto cuando se aplica al tratamiento del cacao bruto porque aunque existe una fermentación alcohólica y láctica típica de los azúcares de la pulpa en las fases iniciales del proceso, las reacciones que se producen en los cotiledones y originan el sabor y el aroma característicos del cacao, no pueden considerarse una fermentación propiamente dicha.

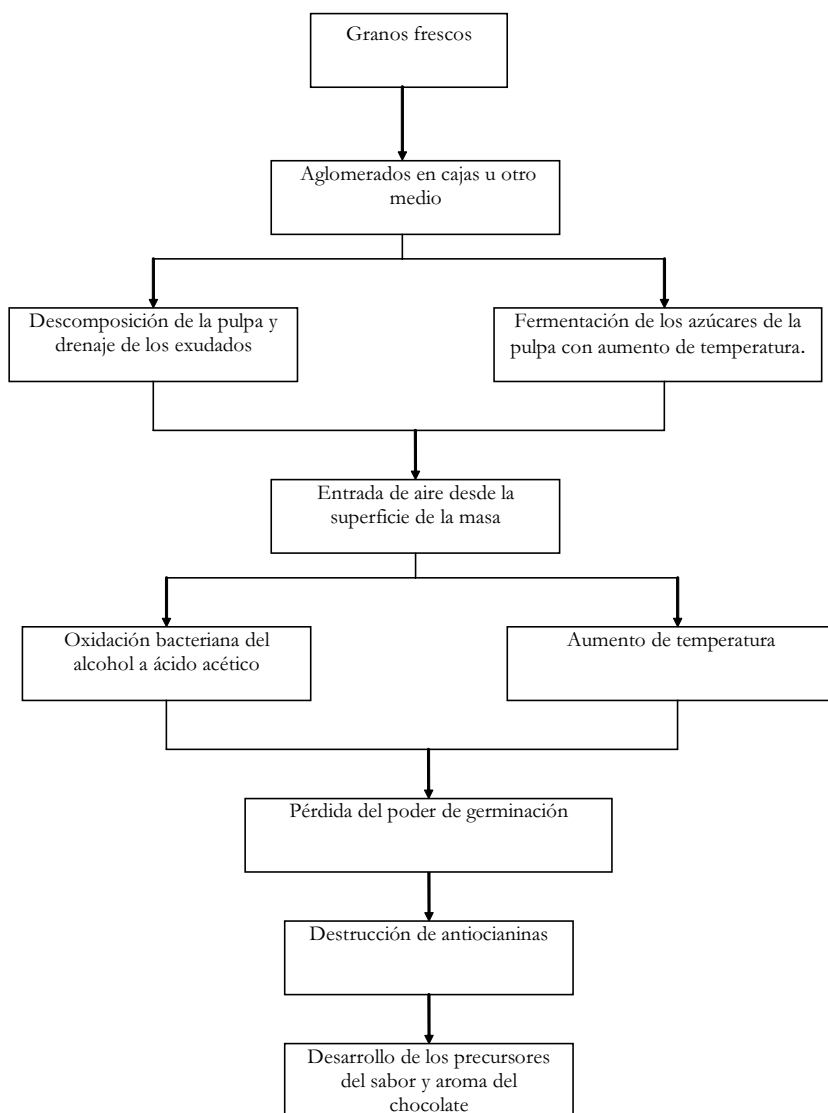
Los objetivos de la fermentación son:

- ◆ Matar el embrión para favorecer importantes procesos bioquímicos que producen cambios deseables del color, del sabor y de la consistencia del grano.
- ◆ Remover la pulpa para facilitar el secado.
- ◆ Separar la testa de los cotiledones, con el fin de que se desprenda fácilmente en el proceso de tostión.

Cambios fisicoquímicos que ocurren durante el proceso de fermentación

Pueden ser utilizados para el seguimiento del proceso y de esta forma permite identificar las condiciones adecuadas que dan como resultado habas de excelente calidad (figura 4.2).

Figura 4.2. Esquema simplificado de la fermentación del cacao



Cambios en la pulpa por actividad microbiana. En la tabla 4.4 se resumen los cambios que suceden por acción de microorganismos, así como los principales microorganismos que se han identificado en pruebas realizadas en diferentes países, principalmente en Trinidad y Tobago (Peñaranda y Bolaños, 1990)

Tabla 4.4 Acción de microorganismos durante la fermentación

Día de fermentación	Microorganismos	Acciones
1	Levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Hansenula anomala</i> y <i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	Producen etanol a partir de los azúcares de la pulpa, y degradan y separan la pulpa en condiciones anaerobias.
2	Bacterias acéticas (<i>Acetobacter rancens</i> , <i>Acetobacter melanogenum</i>). En menor medida bacterias lácticas.	Debido al desprendimiento de la pulpa, se facilita la aireación, con lo cual predominan las bacterias acéticas que transforman el etanol en ácido acético, y por acción de este y del calor generado, se da la muerte de las semillas.
3	Bacterias acéticas, levaduras aerófilas y bacilos aerófilos.	Se establece un equilibrio entre la flora presente, y los cotiledones permanecen en contacto con licor ácido a alta temperatura.

Fuente: Martín, D.W. *et al.* 1986.; Quesnel y Roberts. 1963

Cambio en la temperatura. Durante la fermentación se da un aumento progresivo en la temperatura de la masa. La temperatura máxima que se alcanza es de 45 a 50°C en los primeros 2 días de fermentación, después del quinto día la temperatura comienza a descender. Cuando se realizan los volteos de la masa se presenta un leve enfriamiento seguido de un rápido aumento en la temperatura (Roelofsen, 1958)

El aumento de temperatura de la masa es de gran importancia, dado que la muerte del embrión es debida en parte a este factor, y por lo tanto se inician reacciones enzimáticas que en últimas, significa, el desarrollo del sabor y aroma del chocolate. La temperatura óptima para alcanzar la muerte del embrión es de 45°C, ya que más alta podría inhibir la posterior acción de la enzima glicosidasa, que causa la degradación hidrolítica de las antocianinas. Cuando se cuenta con fermentaciones a gran escala, se da una diferencia entre la temperatura de la superficie y la del centro de la masa,

que coincide con el hecho que en la superficie se dan mejor las condiciones aerobias para la producción de ácido acético (Peñaranda y Bolaños, 1990).

Cambios en los cotiledones: La muerte del embrión, es decir, la pérdida del poder germinativo de las semillas es un cambio necesario para que se den las demás reacciones dentro del grano (fermentación enzimática), dado que una vez se pierde el poder germinativo, las paredes celulares se hacen permeables y las diferentes sustancias pueden difundirse libremente a través de los tejidos, originándose de esta forma el sabor y aroma en el grano (Roelofsen, 1958).

Cambio en los compuestos nitrogenados: el contenido total de nitrógeno presenta una disminución a lo largo de la fermentación, ocasionado por la pérdida de teobromina y la degradación de las proteínas en aminoácidos y péptidos por acción de las enzimas proteolíticas (Peñaranda y Bolaños, 1990).

Como la cantidad de nitrógeno soluble varía directamente con el grado de fermentación, se puede utilizar junto con la cantidad de nitrógeno total, como un parámetro indicador para seguir el curso de la fermentación. La relación entre éstos dos valores se denomina índice de nitrógeno.

El intervalo de valores de nitrógeno total permite fijar un tiempo de fermentación aproximado, ya que sólo relaciona la reacción de proteólisis de las proteínas en aminoácidos. Se afirma que el 90% de la proteólisis de la proteína se alcanza a las 24 horas siguientes a la muerte del embrión.

Cambio en los azúcares: los azúcares contenidos en el cotiledón juegan un rol muy importante en el desarrollo de los compuestos que dan el sabor y aroma característicos del chocolate. La principal transformación que sufren los azúcares totales es la hidrólisis, con lo cual se produce un incremento en los azúcares reductores como glucosa o fructosa (Peñaranda y Bolaños, 1990).

En etapas siguientes del procesamiento del cacao para la obtención del chocolate, se siguen dando ciertos cambios químicos, que dependen de lo ocurrido durante la fermentación. Ese es el caso de la tostión, en donde se da una reacción de degradación de aminoácidos, siendo los agentes degradadores los azúcares reductores. Por lo tanto un aumento considerable de éstos garantiza la degradación de los aminoácidos, y por tanto el desarrollo del aroma en la tostión (Rohan y Stewart, 1967).

Factores que intervienen en la fermentación

Son diversos los factores que influyen en el proceso de fermentación: clima, madurez de la mazorca, tiempo transcurrido desde la recolección del fruto hasta que se abre y se procede a fermentar los granos (tiempo de desgrane), tipo de cacao, cantidad de cacao, tiempo de fermentación, remoción y aireación de la masa a fermentar y el tipo de fermentador utilizado. Algunos de estos factores pueden modificarse dentro de límites amplios sin que se afecte apreciablemente las características del producto final, pero otros ejercen una considerable influencia cuando se alteran, como el tiempo de desgrane, cuyo valor debe ser de 24 horas si se desean mejores resultados (Peñaranda y Bolaños, 1990).

Métodos de fermentación

Existen diferentes métodos para realizar la fermentación de las semillas de cacao; los más utilizados en Colombia son:

- ◆ Tradicionales. Los cuales se diferencian principalmente en el grado de tecnificación. Los llamados tradicionales son: fermentación en montones, fermentación en canastas, fermentación en cajas.
- ◆ Fermentación en montones. Es el método más sencillo; los granos húmedos se colocan en hojas de plátano sobre madera, donde se amontonan las almendras frescas y se tapan para que se fermenten.
- ◆ Fermentación en canastas. Se construye de fibras vegetales. Su tamaño, el cubrimiento de la masa y el sitio donde se coloque la canasta influirá considerablemente en la calidad de las almendras.
- ◆ Fermentación en cajas. Las cajas se construyen de madera y con una serie de agujeros de dimensiones variables para la aireación, adaptándose a las posibilidades de recolección de cada finca cacaotera. Las cajas descansan sobre patas de modo que quedan separados del suelo por un espacio de 20 cm, con el fin de facilitar la salida del líquido que se produce durante la fermentación y evitar bajas temperaturas que pueda ocurrir en el fondo si queda en contacto directo con el suelo. Otra configuración que se realiza con

las cajas es la tipo escalera, donde los cajones de madera se colocan en diferentes niveles. El cacao fresco se deposita en el primer cajón que ocupa el nivel superior, donde se remueve la masa al cabo de 24 horas para facilitar la aireación. A las 48 horas se pasa al cajón intermedio, lo cual permite una nueva remoción; aquí el cacao permanece 48 horas, al cabo de las cuales se pasa al último cajón, donde permanece hasta terminar la fermentación (Gutiérrez, 1988).

Secado. Una vez se ha producido la fermentación externa, se somete el grano a un proceso de secado para que pueda continuar con una fermentación interna, disminuyendo el amargor y potenciándose al máximo el aroma.

Durante el secado la composición química sigue evolucionando, por ejemplo:

- ◆ Reducción del contenido de ácido acético por evaporación
- ◆ Oxidación de los polifenoles
- ◆ Síntesis de aldehídos

Se ha comprobado que durante el secado, antes que se reduzca la humedad del grano al 7 u 8%, todavía se presenta actividad bacteriana. Es por esto, que aunque la fermentación tenga deficiencias, estas se remedian hasta cierto punto en los primeros días de desecación (Hernández y León, 2003)

El secado del cacao es el proceso durante el cual las almendras terminan de perder el exceso de humedad que contienen. Al final de la fermentación el contenido de humedad de los granos de cacao es cercano al 55% y para poderse almacenar con seguridad debe ser del 7 al 8%.

Es durante la fase de secado del cacao cuando se desarrolla el color pardo característico del chocolate, ya que tienen lugar reacciones importantes de oxidación de los polifenoles, catalizadas por la enzima polifenoloxidasas. La muerte del haba, con la pérdida de la integridad de la membrana, permite que se produzcan reacciones enzimáticas que anteriormente estaban restringidas y dan como resultado la formación del color pardo (TCA, 1997).

La rapidez del secado varía mucho con el método que se utilice, aunque existen ciertos límites. Si el secado se hace demasiado lento existe el riesgo a que se desarrollen mohos en el exterior y que puedan penetrar en la testa, así como que se produzcan malos olores y sabores, debido a las altas concentraciones de grupos carbonilo. Si el calor es excesivo puede resultar inconveniente para la pérdida de ácidos volátiles como el ácido acético y por lo tanto es perjudicial para la calidad (TCA, 1997)

Si se observa una curva de secado para el cacao, se pueden identificar tres regiones, la primera es relativamente corta (representa menos del 5% del tiempo total de secado) y se caracteriza por una velocidad de secado constante, que es función de la temperatura y de la velocidad del aire. La segunda región presenta duración mayor a la primera, la temperatura del haba se incrementa lentamente y la velocidad de secado no se ve afectada por la velocidad del aire pero sí por la temperatura, además en esta etapa la humedad que está entre la testa y los cotiledones se difunde hacia la testa y es arrastrada por la corriente de aire. La tercera región depende exclusivamente de la temperatura del secado y afecta la difusión de la humedad del interior de los cotiledones, a través de los tejidos de éstos, y luego a través de la testa.

Métodos de secado

Los métodos de secado se dividen en secado natural o secado al sol y métodos artificiales. La utilización de un método en particular está sujeta a las condiciones climáticas de la región, así como a la cantidad de cacao que se desee secar.

- ♦ Secado natural. De acuerdo con la intensidad solar puede durar entre 4 y 6 días sobre pisos de madera o esteras de bambú. El procedimiento más empleado consiste en extender el cacao en el suelo, realizando surcos de máximo 10 cm de altura y con una distancia entre surcos de 20 a 50 cm, dependiendo del área disponible. Frecuentemente el grano es removido con la mano o utilizando rastrillo.
- ♦ Secado artificial. Se emplea en países donde las condiciones climáticas no permiten el secado natural. Se ha encontrado que los

granos de cacao secados artificialmente contienen mayor cantidad de ácido acético que los secados lentamente al sol, por lo que desarrolla un sabor diferente que puede llegar a ser corregido en etapas posteriores, especialmente en el conchado (Peñaranda y Bolaños, 1990). Un aspecto favorable del secado artificial es su gran economía en tiempo y espacio.

4.4 Otras etapas de la producción del chocolate

Tostión. Aunque las operaciones anteriores y posteriores a la tostión son importantes para el desarrollo del sabor, es la etapa de calentamiento controlado de alta temperatura del tueste lo que amplifica la interacción compleja entre los precursores del sabor y el aroma del chocolate resultante. Antes del tueste, las habas pueden presentar un sabor astringente, amargo, ácido, mohoso, sucio o avellanado. Después de la tostión, las habas poseen el aroma intenso del cacao, aunque sigan siendo desagradables al paladar.

La tostión es necesaria para la disminución de la humedad, liberación de las testas de las habas y el desarrollo de sabor a chocolate. Para lograr esto, se calientan las semillas entre 110 – 220°C dependiendo del tipo de cacao. La reacción que predomina durante la tostión es el pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard el cual favorece el desarrollo del sabor (Beckett, 1988).

Etapas de la reacción de Maillard (Beckett, 1988).

- ◆ Inicial. Los azúcares reductores y aminoácidos forman compuestos de adición los cuales a su vez forman glucosilaminas o fructosilaminas, según el azúcar reductor inicial. Las reacciones iniciales son importantes porque la mayor parte de las últimas reacciones no pueden tener lugar sin los productos finales de las mismas
- ◆ Intermedias. Implican las sustancias anteriores, así como la degradación de azúcares y aminoácidos. Son esenciales para el sabor apropiado de cualquier producto de cacao e implica interacciones de numerosas sustancias. Cuando se calientan, la mezcla de grupos carbonilos y aminoácidos pueden producir una variedad de

aromas entre los que se incluye el del chocolate. La última etapa de la fase intermedia incluye los aldehídos, cetonas y otros grupos carbonillo que reaccionan para formar pirazinas, furanos y otras sustancias que se encuentran en el chocolate.

- ♦ Final. Las reacciones de pardeamiento provienen de la etapa final. Solamente entonces pueden ser producidos los pigmentos insolubles pardo – oscuro llamados melanoidinas.

Reacciones de Pardeamiento

Los olores de mezcla de leucina y glucosa, treonina y glucosa, glutamina y glucosa cuando se calientan a 100°C se han descrito como chocolate dulce; el de valina y glucosa por calentamiento a 180°C se ha descrito como de chocolate penetrante. La producción de aldehídos a partir de aminoácidos juega un papel importante en el equilibrio de sabores en el chocolate acabado (Beckett, 1988).

Molienda. Al llegar a esta etapa se presenta el cacao en piezas discretas de varios milímetros de diámetro. El procesamiento siguiente puede adoptar varias formas, pero todas exigen que el cacao sólido, el azúcar y cualquier sólido de la leche, estén convenientemente triturados de forma que las partículas sean suficientemente pequeñas para no ser detectadas por la lengua. El tamaño real depende del tipo de chocolate y del mercado consumidor, pero por lo general, la inmensa mayoría de las partículas deben ser inferiores a 40 μm .

El método más corriente para conseguir este tamaño, es utilizar un refinador de cinco rodillos. Con el fin de conseguir que los ingredientes del chocolate pasen a través del refinador, es necesario hacer que estos adopten la forma de una pasta, lo cual puede lograrse de diversos modos.

Uno de los métodos más corrientes consiste en moler la almendra para formar la pasta de cacao, que es líquida a temperaturas por encima del punto de fusión de la manteca de cacao. Esto, por regla general, supone la aplicación de molinos de mazos, molinos de discos, molinos de bolas, refinadores de tres rodillos o una combinación de los cuatro. El azúcar se puede añadir entonces en forma granulada molida y se amasa con grasa extra (y leche en polvo si se ha de fabricar el chocolate con leche). El

amasado puede incluir algo de molturación y tradicionalmente se emplea para ello una bandeja mezcladora. Otro procedimiento, consiste en seguir un proceso de tipo mezclador para moler la almendra junto con los otros ingredientes.

Conchado. Aunque la fermentación, el secado y el tueste sean capaces de desarrollar los precursores del sabor del chocolate, están también presentes muchos compuestos químicos indeseables. Estos dan lugar a sabores ácidos y astringentes al paladar.

El objetivo de conchar es el de eliminar los sabores indeseables y continuar con los sabores agradables. Además, los procesos anteriores de trituration habrán creado muchas superficies nuevas, particularmente de azúcar, que no están cubiertas con grasa. Estas impiden que el chocolate fluya adecuadamente cuando la grasa es líquida. Debido a esto, el producto no puede utilizarse todavía en la confección de dulces y no presenta al paladar la textura normal del chocolate.

El proceso de conchado, por tanto, cubre estas nuevas superficies con grasa y desarrolla las propiedades de fluidez así como las de sabor. Este proceso se realiza normalmente agitando el chocolate durante un período prolongado en un depósito grande. Algunos fabricantes prefieren limitar el tiempo de conchado licuando el chocolate y tratando la pasta de cacao en una etapa anterior con el fin de eliminar algunos de los compuestos químicos indeseables (Beckett, 1988).

Típicamente el chocolate conchado se describe como madurado si se compara con el chocolate no conchado. Se reduce el amargor, quizás dando paso a otros matices de sabor que quedarán más pronunciados. La naturaleza del cambio de sabor durante el conchado no ha sido completamente explicada a nivel químico, incluso aunque se haya descubierto sobre concentraciones de volátiles totales, ácidos grasos libres, pirazinas y compuestos sulfurados.

La primera alteración química que se produce durante el conchado del chocolate es la pérdida de ácidos grasos volátiles de cadena corta. El ácido acético está presente por ser el producto final de la etapa de fermentación, aunque en menor grado también se encuentran otros diversos ácidos. Además, se ha observado una pérdida relativamente rápida de feno-

les durante el conchado. Está bien establecido que los polifenoles por oxidación y mecanismos enzimáticos forman complejos con aminoácidos, péptidos y proteínas. La disminución observada de fenoles durante el conchado puede ser debida a interacciones irreversibles proteína – fenol. Esto a su vez, reduciría la característica de astringencia de los fenoles, produciendo entonces el chocolate más suave después del conchado.

Los procesos que se iniciaron durante la fermentación y tosti3n se completan en el conchado. Si se produce alguna alteraci3n en el sabor, debido a un procesamiento incorrecto o al mal estado de las habas, este se puede arreglar en el conchado.

En el conchado el contenido de agua de la masa de chocolate desciende desde 1.6% a 0.6 – 0.8%. Al eliminarse progresivamente la humedad se lleva consigo muchas sustancias de sabor no deseado. De esta forma se volatiliza aproximadamente el 30% de 3cido ac3tico y hasta el 50% de aldehídos de bajo punto de ebullici3n; esta volatilizaci3n es favorecida considerablemente por medio del llamado <<conchado seco>> de la masa de chocolate con contenido graso relativamente bajo. Es necesaria la eliminaci3n parcial de estas sustancias 3cidas volatilizadas para dar al chocolate acabado el sabor pleno.

En el conchado se tiene lugar a la formaci3n significativa de 3cidos libres, lo cual est3 interrelacionado con el desarrollo de sabor en el chocolate. De hecho la cantidad de amino3cidos producidos en el conchado corresponde aproximadamente a una tercera parte o a la mitad que se form3 durante la tosti3n. Los amino3cidos libres junto con los azúcares reductores, son los precursores del sabor de los cuales se deriva la variedad de sabores durante el calentamiento, por medio de las reacciones de Maillard (Hernández y León, 2003)

Durante la tosti3n aproximadamente el 50% de los amino3cidos libres que se han formado son tambi3n destruidos. El resto queda disponible en la concha como precursores del sabor. La liberaci3n posterior de amino3cidos es lenta, debido a las bajas temperatura de la concha.

Fases de la operación de conchado

Existen tres fases en la operación de conchado, cada una de las cuales exige más o menos el mismo tiempo.

- ♦ Fase seca: comprende cizalladura, evaporación de humedad y eliminación de otras sustancias volátiles.
- ♦ Fase pastosa: desarrollo de sabor por medio de cizalladura y calentamiento, eliminación de humedad y homogenización.
- ♦ Fase líquida: homogenización por medio de agitaciones intensas y cizalladura.

4.5 Los cacaos amazónicos

La ubicación geográfica de Colombia y el hecho de contar con territorio perteneciente a la Amazonía favorecen su riqueza natural; la biodiversidad reinante en esa región ofrece otras variedades de cacao, entre las que se encuentra el copoazú (*Theobroma grandiflorum* Wild ex Spreng Schum) y el bacao (*Theobroma bicolor* H.B.K), cacaos amazónicos que son susceptibles de ser transformados en chocolate. En los últimos años se han efectuado algunos estudios tendientes a aprovechar el potencial de la semilla de copoazú; entre estos se pueden mencionar: cuantificación del contenido de aceite, determinación de sus propiedades físicas y mecánicas y recuperación de información acerca de su transformación en chocolate a nivel artesanal.

4.5.1 El Copoazú

El árbol de copoazú (*Theobroma grandiflorum* Will ex Spreng, Schum) es una planta, de la familia Sterculiaceae, típicamente amazónica, que se encuentra en estado silvestre en la parte sur y sureste de la Amazonía oriental y el noroeste del estado de Maranhão (Brasil) (Venturieri y López, 1988).

Dentro de la gran variedad de frutos que crecen en las selvas de la región amazónica, el copoazú es apetecido por el sabor típico de sus frutos, ya sea para consumirlo directamente o para emplear su pulpa en la fabricación de jugos, dulces, jaleas, compotas y helados, en virtud del sabor y aroma agradable que posee (Calzavara *et al.*, 1984)

Su fruto es el mayor entre los del género *Theobroma*, considerado como uno de los mejores de la flora amazónica, tiene gran aceptación en el mercado consumidor, lo cual se ve reflejado por el volumen de materia prima empleado en las industrias de la región, así como el comercializado en la central de abastecimiento y en los supermercados (Calzavara *et al.*, 1984).

La demanda del fruto se ha hecho cada vez mayor, lo que ha elevado su precio, resultado de la mayor utilización por parte de las industrias, el aumento poblacional y la inexistencia de cultivos racionalizados (Calzavara *et al.*, 1984).

El fruto es una baya drupácea, elipsoide u oblonga, con los extremos obtusos o redondeados, mide de 15 a 35 cm de longitud por 10 a 15 cm de diámetro y pesa en promedio 1500 g. Posee cáscara dura, leñosa, que se puede quebrar fácilmente, recubierta de vellosidades “ferruginosas” de aspecto aterciopelado, que al ser raspadas levemente dejan ver una capa verdosa clorofilada, esto para el fruto maduro, el cual se desprende en el punto de unión de éste con el pedúnculo (Calzavara *et al.*, 1984).

La composición porcentual del fruto de copoazú, calculada con relación al peso fresco, es:

Cáscara	46.47%
Pulpa	36.79%
Almendras	16.74% (Venturieri y Lopes, 1988).

La pulpa es abundante de coloración amarilla o blanquecina, es de sabor ácido y aroma fuerte; se encuentra envolviendo a las semillas (Calzavara *et al.*, 1984).

Las semillas presentan forma circular achatada, miden de 2 a 4 cm de largo por 0.9 a 1.5 cm de espesor. Están recubiertas por una fina testa, quebradiza cuando está seca. Las semillas contienen gran cantidad de grasa, representan de 16 a 20% del peso del fruto. Cada fruto contiene en promedio de 45 a 50 semillas (Lozano y Rozo, 1997).

Utilización: El mayor valor de la especie reside en el fruto, ya que posee abundante pulpa, la cual es empleada para preparar diferentes productos; la corteza es empleada en algunos lugares como abono orgánico, y las semillas se consideran sucedáneas del cacao tradicional, porque con ellas

es posible fabricar un chocolate blanco muy fino, el cual es considerado un alimento muy nutritivo por su contenido cercano al 48% de una grasa muy similar a la manteca de cacao y con constantes físicas y químicas similares (tabla 4.5) (Calzavara *et al.*, 1984)

Tabla 4.5 Constantes físicas y químicas de las grasas de semillas de copoazú y de cacao

CONSTANTE	COPOAZÚ	CACAO
pH	5.7	6.3
Punto de fusión (°C)	32.34	30.35
Densidad específica	0.9074	0.973
Índice de refracción	1.4583	1.4565 - 1.4570
Índice de acidez	4.2	1 - 4
Índice de Yodo	45.9	32 - 42
Índice de saponificación	174.6	192 - 198
Insaponificables (%)	0.6	0.3 - 0.8

Fuente: Calzavara, B. *et al.*, 1984

Sin embargo, no se ha reconocido el valor real de las semillas de Copoazú, pues la mayor parte de las veces son empleadas como abono o simplemente abandonadas como residuos, a pesar de poseer una grasa fina de alta digestibilidad. La tabla 4.6 muestra una comparación entre las grasas de cacao y copoazú (Venturieri y Lopes 1988). Como se puede observar la cantidad de ácido linoléico es mayor en la grasa del Copoazú (8.3%) que en la del cacao (1.1%). El ácido linoléico es un ácido graso esencial, necesario para la síntesis del ácido araquidónico, el precursor principal para la biosíntesis de las prostaglandinas, compuestos activos fisiológica y farmacológicamente (Martín *et al.*, 1986). Además mientras que la grasa de cacao posee 69.3% de ácidos grasos saturados, la grasa del Copoazú posee 48.9% (Venturieri y Lopes, 1988).

Tabla 4.6. Composición porcentual de la mezcla de ácidos grasos liberados de grasas de semillas de copoazú y cacao

ÁCIDOS GRASOS	COPOAZÚ	CACAO
Palmítico C 16/0	5.8	32.8
Esteárico C 18/0	38.3	35.5
Oleico C 18/1	42.8	29.6
Araquídico C 20/0	4.8	1.0
Linoléico C 18/2	8.3	1.1
Rendimiento de grasa en la semilla	58.0% (p.s.)	57.3% (p.s.)

Fuente: Venturieri y Lopes 1988

Tabla 4.7. Análisis bromatológico de la Pulpa del Copoazú

Criterio	Valor	
	Calzavara <i>et al.</i> ,1984	Cárdenas <i>et al.</i> , 2000
Acidez (%)	2.15	1.53
°Brix	10.80	10.6
pH	3.30	3.67
Aminoácidos (mg/% N)	21.90	-
Vitamina C (mg /100 g)	23.12	9.24
Pectina	0.39	-
Pulpa (%) 3000 rpm/10 min.	80.00	-
Residuo mineral fijo (%)	0.67	0.36
Fósforo (% P ₂ O ₅)	0.31	-
Calcio (% CaO)	0.04	0.0423
Extracto etéreo (%)	0.53	0.47
Sólidos totales (%)	11.00	-
Volátiles (%)	89.00	-
Azúcares reductores (%)	9.09	1.80
Azúcares totales (%)	-	2.27
Fibra (%)	-	2.50

Fuente: Calzavara *et al.* ,1984; Cárdenas *et al.*, 2000

En copoazú se estima una productividad media de 12 frutos por planta; si se asume que el peso medio de cada fruto es de 1 kg y que el rendimiento en pulpa es del 30%: se producen 3.6 kg de pulpa por fruto. Como en una hectárea son plantados 179 árboles de copoazú, se concluye que la productividad sería de 644.4 kg de pulpa por hectárea (Calzavara *et al.* ,1984).

Con respecto al fruto, si se tiene en cuenta que el rendimiento en semilla es del 21%, la productividad sería de 2.5 kg de semillas frescas por planta y 451 kg por hectárea (Calzavara *et al.* ,1984).

4.5.2 El Maraco

El fruto es voluminoso, oblongo, elipsoide, de 18 a 35 cm de largo, con diámetro central de 9 a 15 cm sin variar su forma, la cáscara tiene un espesor de 1.1 cm. De color claro en estado inmaduro y amarillo claro en la madurez, exocarpio duro, leñoso, con diez aristas longitudinales y reticulación leñosa entre las aristas, con pedúnculo de 3.5 cm de largo que se rompe haciendo que el fruto caiga al suelo cuando este alcanza su estado óptimo de madurez. El peso promedio de los frutos es de 1690 g del cual el 52% es cáscara (879 g), 28% es pulpa (473 g) y 20% es semilla (338 g).

Las semillas tienen forma elíptica, color crema y consistencia dura, la longitud en promedio es de 34.2 mm, el ancho 23.4 mm, espesor de 13.8 mm y 8.38 g de peso en promedio. La cantidad de semillas por fruto varía de 28 a 46 unidades (Rivas y Lozano, 2001). Las numerosas semillas están rodeadas por una pulpa blancuzca o amarillenta de olor fuerte y sabor agridulce. Los frutos maduros se recogen después del día 98 de desarrollo del fruto (Barrera, A. 1999).

Utilización

El contenido de grasa de las semillas de Maraco es de 25.48% significativamente menor al reportado en las semillas de cacao (42.86%) (Tabla 4.8). sin embargo las propiedades de su grasa son muy consistentes a la mantequilla de cacao y con constantes físicas y químicas similares.

Tabla 4.8. Caracterización de las grasas de *T. bicolor*

	Punto de fusión °C	Índice de refracción (20°C)	No. de saponificación mg de KOH. g grasa ¹	Índice de Yodo Método de Hanus (%)
<i>T. bicolor</i>	29.5	1.4579	188.2	42.9
<i>T. cacao</i>	25.7	1.4550	173.5	29.9

Fuente: Furlan y Bressani, 1999.

Tabla 4.9. Composición en ácidos grasos de semillas de especies del género *Theobroma*

Especies	Composición								
	C14:0	C16:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C22:0
	M	P	Po	S	O	L	Ln	A	B
<i>T. cacao</i>	tr	30.6	0.6	33.9	31.4	2.5	tr	0.9	tr
<i>T. bicolor</i>	nd	8.1	0.2	47.8	41.0	1.2	tr	1.6	tr
<i>T. grandiflorum</i>	tr	8.5	0.2	34.6	42.0	3.4	tr	9.9	1.3

Fuente: Gilabert Escrivá et al., 2002. M mirística; P palmitito; Po palmitoleico; S esteárico; O oleico; L linoleico, Ln linolénico; A araquidónico, B otros ácidos

En cuanto a los ácidos grasos de las semillas se observa en la tabla 4.9 que las almendras de los cacaos amazónicos son muy semejantes en cuanto a composición haciéndolos nutricionalmente muy atractivos para el consumo. Cabe resaltar los bajos contenidos de ácidos grasos saturados como el Palmítico considerado el principal ácido graso saturado de la dieta y el menos saludable pues es el que más aumenta los niveles de colesterol en la sangre, por lo que es el más aterogénico (Gilabert Escrivá *et al.*, 2002).

Producción

La cosecha principal se presenta en los meses de febrero a marzo y de septiembre a octubre. Crece bien en regiones con temperatura media anual entre 28 y 30°C. Las inflorescencias son axilares, en racimos de 3 a 5 flores, con estípulas persistentes en el pedúnculo, se abren solo dos botones y se forma un solo fruto. El color de la flor es púrpura con tres a ocho inflorescencias por rama en los últimos 50 cm de longitud. La flor es hermafrodita con cinco pétalos, cinco sépalos y cinco estambres con pubescencia y ovario súpero (Rivas y Lozano, 2001).

4.6 Obtención de licor de **COPOAZÚ** (*Theobroma grandiflorum* (Will ex Spreng) Schum) y **MARACO** (*Theobroma bicolor* H.B.K.)

De acuerdo con la Tabla 4.10, el peso promedio de los frutos de maraco es de 1947 g, el tamaño de los frutos es homogéneo, en donde el perímetro longitudinal y transversal promedio corresponde a 22 cm y 14 cm. Esta homogeneidad en el tamaño de los frutos manifiesta un estado de madurez uniforme entre los mismos.

Del total del peso del fruto, la corteza representa cerca del 50%, la pulpa aproximadamente el 30% y las semillas el 20%. Comparando estos resultados, con los reportados por la literatura para cacao corriente, se obtiene que el maraco y el copoazú poseen una mayor cantidad de semilla, menor cantidad de pulpa y la cantidad de corteza es similar. Lo anterior refleja que los frutos de Maraco y Copoazú tienden a producir mayor rendimiento en la fabricación de chocolate que el cacao corriente, gracias a su mayor proporción de semillas (Parra y Montenegro, 2005)

Tabla 4.10 Caracterización física de los frutos de Copoazú y Maraco

Variable	Valor promedio	
	Copoazú	Maraco
Largo (cm)	17.46	21.9
Diámetro(cm)	9.91	14.3
Peso (g)	767.53	1947.9

De otra parte el tamaño de los frutos de Copoazú producidos en la Amazonia Colombiana, es aun poco homogéneo, ya que no se tienen en cuenta las prácticas agronómicas necesarias, como en el caso de la recolección donde se cosechan frutos en diferentes estados de madurez, los cuales poseen diferente tamaño.

Los datos reportados en la Tabla 4.11 muestran diferencias entre los valores reportados para el contenido de grasa de pulpa de maraco. Los otros parámetros son muy similares indicando que la pulpa de Maraco es rica en proteína y carbohidratos. Las diferencias en el extracto etéreo pueden ser debidas a los solventes empleados durante la extracción. Estos análisis, junto a los rendimientos en pulpa reportados confirman que la pulpa de maraco constituye además una materia prima nutricionalmente importante para la industria de alimentos y para la generación de un mayor valor agregado en la región.

Tabla 4.11 Composición química de la pulpa de Maraco

Criterio	Valor	
	Furlan y Bressani, 1999	Hernandez y Barrera, 2004
Cenizas (%)	7.69	7.64
Extracto etéreo (%)	0.43	3.63
Fibra (%)	8.64	11.48
Proteína (%)	18.0	12.47
Humedad (%)	84.78	89.23
Carbohidratos (%)	65.24	64.8

Fuente: Gilbert Escriva et al., 2002; Hernandez y Barrera, 2004

En la tabla 4.12 se observan diferencias entre la composición química de las semillas del cacao corriente y la del maraco, siendo las mas representativas, las diferencias del extracto etéreo y proteína. El primero está relacionado con la palatabilidad del chocolate y el segundo interviene directamente en el proceso de fermentación. Igualmente se presentan diferencias entre la composición química del cacao corriente y la del copoazú, siendo las más importantes la proteína y los carbohidratos, que intervienen directamente en la fermentación, así como el extracto etéreo, aunque para el copoazú es un poco mayor el contenido de grasas saturadas.

Tabla 4.12 Composición química de las semillas de cacao corriente, Maraco y Copoazú

Componente	Cacao corriente*	Copoazú	Maraco
Humedad (%)	35	29.67	31,23
Extracto etéreo (%)	31.3	35.78	34,44
Fibra (%)	3.2	0.47	-
Proteína (%)	12.18	10.19	14,48
Carbohidratos (%)	15.72	21.31	-
Cenizas (%)	2.6	2.58	3,86

El rendimiento del despulpado Mecanizado de Maraco se encuentra reflejado en la Tabla 4.13, donde podemos observar que las pérdidas principalmente de semilla representan un 12.1%, valor aceptable, debido a que el despulpado manual no es rentable, pues el tiempo empleado es muy largo y los costos de mano de obra son muy altos. En la misma tabla se muestran los resultados de rendimiento en el despulpado para el Copoazú, datos que en su conjunto para ambas especies son obtenidos a partir de una despulpadora mecánica tipo vertical de 500 Kg.h⁻¹.

Tabla 4.13 Rendimientos de despulpado mecanizado de frutos de Copoazú y Maraco

Fruto	Pulpa (%)	Semilla (%)	Pérdidas (%)
Maraco	33.5	54.4	12.1
Copoazú	49.1	36.3	14.6

4.6.1 Fermentación, secado y tostión

Para determinar las características del proceso de fermentación se diseñó un sistema de fermentación en escalera (ver foto) con capacidad aproximada de 72 kg. En este sistema, se procesan lotes de semillas de Copoazú de 45 kg aproximadamente, con el siguiente esquema de fermentación: día 0 ➔ cajón 1, día 1 ➔ cajón 2, días 2 y 3 ➔ cajón 3, días 4 y 5 ➔ cajón 4. El mismo sistema aplicado al Maraco permite una capacidad de carga de cada cajón de 40 kg con el siguiente esquema de fermentación: día 0 ➔ cajón 1, día 1 ➔ cajón 2, día 2 ➔ cajón 3, día 3 ➔ cajón 4

El desplazamiento de las semillas de un cajón a otro se realiza removiendo el tabique frontal del cajón y empujando las semillas con una cuchara de

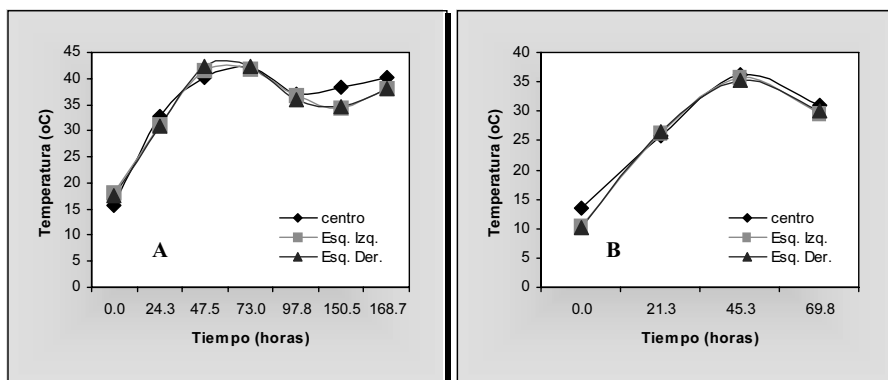
madera o con la mano. Con este desplazamiento de las semillas se logra la aireación de toda la masa de fermentación y por lo tanto un adecuado ambiente para que se den las reacciones químicas correspondientes a la síntesis de compuestos precursores de sabor y aroma de chocolate.

Al analizar los procesos que se presentan durante la fermentación se puede ver que con las cantidades ya establecidas se logra un buen producto final dado que se tiene asegurada la muerte del embrión de las semillas y por lo tanto las diferentes reacciones químicas que dan paso al desarrollo de los compuestos precursores de sabor y aroma del chocolate. El sistema de fermentación en escalera de 4 cajones es de mucha utilidad, dado que al pasar de un cajón a otro se remueve totalmente la masa de semillas y las semillas que se encontraban en el fondo del cajón pasan a estar en la superficie del siguiente cajón con lo cual se logra una excelente aireación de la masa y una duración del proceso de 6 días.

La mayor temperatura se alcanza el día 3 de fermentación con 44°C en el caso del Copozú; si se manejan niveles de carga de los cajones del fermentador que superen la capacidad del cajón una parte de las semillas quedará expuesta al ambiente lo que representa pérdidas de calor, mientras que con la carga adecuada se deja un espacio libre en la parte superior del fermentador donde se permitirá la acumulación del aire caliente y se logrará de esta forma mantener la temperatura un poco más alta.

Con las semillas de Maraco, se observa que durante las primeras 24 horas de fermentación la temperatura logró una elevación en 10 °C, indicando una fermentación activa, consecuencia de la acción de las levaduras sobre los azúcares de la pulpa para generar alcohol etílico. Después de la remoción de la masa, se genera una aireación que proporciona condiciones favorables para la oxidación del alcohol en ácido acético por acción bacteriana. Esta aireación puede provocar una leve disminución en la temperatura, pero es contrarrestada por la acción bacteriana. A las 48 horas la temperatura alcanza su máximo valor (42.20°C). Lo anterior consecuencia de la degradación y drenaje de la pulpa, de la generación de ácido láctico y de la oxidación activa de alcohol etílico en ácido acético. Durante los siguientes días se observa que la temperatura inicia su declive (figura 4.3), pues el drenaje de la pulpa desaparece como consecuencia de la degradación completa de la misma, ocasionando así que el aire pueda difundirse fácilmente por entre las habas y provoque la disminución en la temperatura.

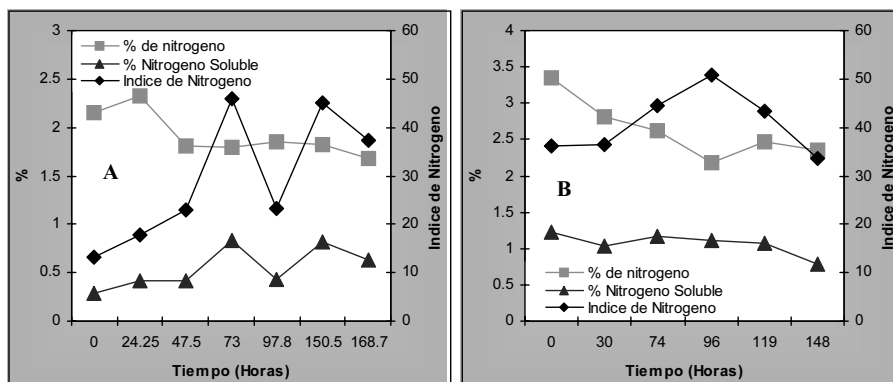
Figura 4.3 Perfil de temperatura de la masa fermentante de Copoazú (A) y Maraco (B)



Índice de Nitrógeno

La relación entre el contenido de nitrógeno soluble y el contenido de nitrógeno total constituye el índice de nitrógeno (figura 4.4) que da un indicativo del avance de la fermentación, ya que los aminoácidos y las proteínas presentes en el cotiledón sufren cambios químicos casi siempre de degradación para dar paso a la aparición de precursores de sabor y aroma (Hernández y León, 2002).

Figura 4.4 Comportamiento del Índice de nitrógeno, % Nitrógeno total y % Nitrógeno soluble en semillas de Copoazú (A) y Maraco (B) durante la fermentación.



El valor óptimo para el índice de nitrógeno considerado es de 50% (Hernández y León, 2002) ; como se aprecia el valor del índice de nitrógeno al final de la fermentación de semillas de Copoazú a las 170 horas es de 35.06 (figura 4.4) este valor indica que en la fermentación se dan los cambios necesarios para sintetizar los precursores de sabor y aroma del chocolate. En cuanto al nitrógeno total, oscila entre 2.33 y 1.68%, producto de las condiciones ambientales bajo las que se desarrolla la fermentación (Amazonia Occidental), consideradas adecuadas ya que además de lograrse una temperatura de fermentación alta, el índice de nitrógeno es cercano al óptimo.

En el caso del Maraco el índice de nitrógeno aumenta hasta el cuarto día (100 horas) , llegando al 49,61% (valor óptimo); después empieza a descender hasta 35.19% en el sexto día de fermentación, lo cual indica que el proceso de degradación de proteínas fue superado por el proceso de difusión. De lo anterior se determina que la fermentación adecuada debe detenerse al cuarto día, en el que se obtiene la mayor cantidad de precursores del sabor y aroma del chocolate.

En semillas de maraco el comportamiento del nitrógeno total en el método de fermentación por escalera presenta una disminución a lo largo de la fermentación, como se observa en la figura 4.4 Esta decadencia es ocasionada principalmente por dos factores: el primero es la pérdida de teobromina la cual se difunde en los tejidos y migra hacia la testa (esta pérdida de teobromina está asociada con la disminución del sabor amargo de los granos bien fermentados); y el segundo es por la degradación de las proteínas en aminoácidos y péptidos por acción de las enzimas proteolíticas.

En la figura 4.4 se observa que el contenido de nitrógeno soluble en las semillas de Maraco fermentadas por el método de escalera, permanece constante durante las primeras 24 horas, pues no se ha alcanzado la temperatura ni el nivel de acidez óptimo para conseguir la pérdida del poder germinativo del embrión y por lo tanto no han iniciado las reacciones de proteólisis y oxidación que conllevan a la generación de compuestos que afectan las características del sabor y aroma del chocolate (Hernández y León, 2003).

En Cupuazú después de las 24 horas se observa un incremento debido a la rápida degradación de las proteínas, en aminoácidos y péptidos (Hernández y León, 2003). El mayor contenido de nitrógeno soluble se encuentra

a las 73 horas de fermentación y coincide cuando el pH del cotiledón se encuentra alrededor de 5.4 y 5.8, pH favorable según la literatura para la reacción de proteólisis (Hernández y León, 2003). Estos compuestos empiezan a disminuir su concentración después del cuarto día dado que la velocidad de la reacción proteolítica es menor que la velocidad de difusión.

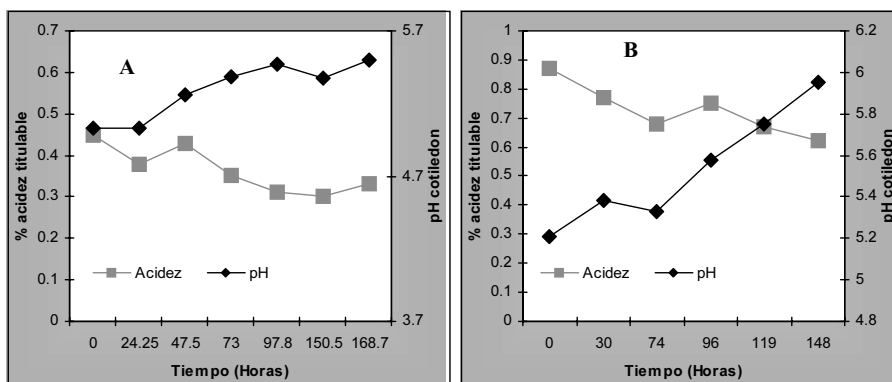
Las condiciones del proceso a tener en cuenta en la fermentación del Maraco y Copoazú son:

- ◆ Estado de madurez de los frutos: Madurez de consumo
- ◆ Cantidad de masa fermentante: 45 Kg para el Copoazú y 40 Kg para el Maraco
- ◆ Frecuencia de remoción: Según el esquema de fermentación
- ◆ Método de Fermentación: Fermentación en escalera
- ◆ Tiempo de fermentación: 4 días para el Maraco y 6 para el Copoazú

pH y Acidez Titulable

A medida que transcurre la fermentación en primer lugar se produce etanol, y luego se da una conversión de éste en ácido acético, por lo cual el pH disminuye y la acidez titulable aumenta, posteriormente se da una migración de compuestos entre la testa y el cotiledón de la semilla lo cual afecta el pH y la acidez titulable (Hernández y León, 2003). En la fermentación de almendras de Copoazú el valor del pH oscila entre 5.7 y 6.0 (figura 4.5) y la acidez titulable entre 0.30 y 0.45%.

Figura 4.5 pH y acidez titulable del cotiledón de las semillas durante la fermentación en Copoazú (A) y Maraco (B)



En el Maraco la acidez disminuye durante las primeras 72 horas y después tiende a permanecer constante. El aumento al comienzo de la fermentación factiblemente se debe a que el etanol y el ácido producido en la pulpa puede difundirse hacia el interior gracias a la muerte del cotiledón. Una vez difundido el etanol hacia el cotiledón continúa su oxidación en ácido acético, ocasionando un aumento en el grado de acidez. La posterior disminución del grado de acidez titulable del cotiledón se presenta posiblemente porque se registran pérdidas por difusión y/o por la oxidación de los ácidos en dióxido de carbono y agua. Después del quinto día de fermentación tiende a permanecer constante.

Humedad

El contenido de humedad de las semillas varía según la cantidad de semillas que sean fermentadas y la temperatura alcanzada, ya que se aumenta la permeabilidad de la testa de las semillas, lo cual hace migrar compuestos desde el exterior de las semillas al interior de las mismas para poder lograr un mayor volumen dentro de la semilla. Los porcentajes de humedad del Copoazú oscilan entre 43.33 y 55.19%, y del Maraco en 65.35%.

4.6.2 Secado y tostión

Examinando la curva de secado para las semillas fermentadas de copoazú se puede concluir que el tiempo de secado a 50°C son 13 horas, teniendo en cuenta que se hace un secado discontinuo, es decir, se seca durante 7 horas continuas y se detiene el proceso toda la noche y al siguiente día se sigue secando el tiempo restante.

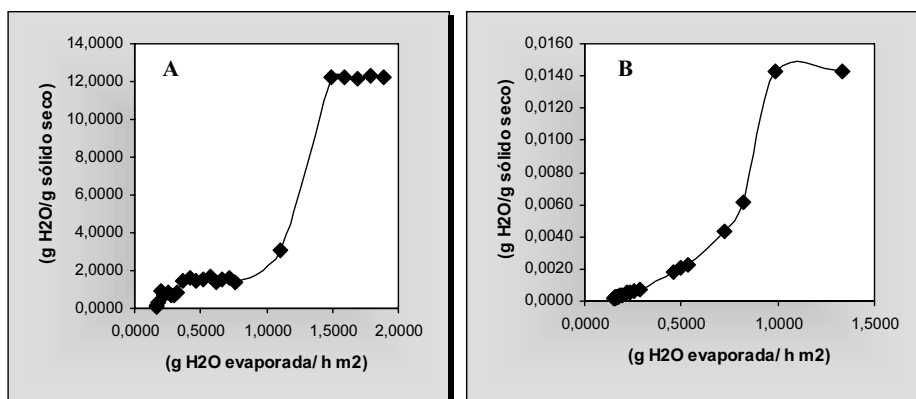
Estas pausas son recomendables ya que al disminuir la temperatura se da espacio para que el agua que está retenida en el centro del cotiledón migre hacia el exterior y se seque con mayor facilidad. Una vez finalizado el secado, las semillas tienen que tostarse o empacarse para evitar una ganancia de humedad dada las condiciones ambientales, antes de empacar es necesario dejar las semillas expuestas al ambiente hasta que su temperatura iguale la del medio ambiente.

Por ser la Amazonia, una región con alta humedad relativa, es aconsejable seguir procesando la semilla y no empacarla, por tanto se debe ser muy riguroso al secar hasta un valor de 6.

El rendimiento del secado es cercano al 44% considerando que la semilla fermentada de copoazú posee aproximadamente 57% de agua y que al final del secado el contenido de humedad es del 6%, lo cual implica una pérdida de masa considerable. El rango adecuado del contenido de humedad de las semillas secas debe estar entre 6 y 8%, de esta forma se puede asegurar una apropiada conservación de las semillas para evitar el ataque de hongos.

Para semillas de Maraco, con un secado directo a 60°C se llega a un contenido de humedad deseable en 20 horas mientras que a 50°C se requieren 24 horas (figura 4.6)

Figura 4.6 Cinética del secado de semillas fermentadas de Copoazú (A) y Maraco (B)



En las curvas de secado de semillas fermentadas de Maraco, se pueden identificar tres regiones. La primera se caracteriza por un periodo de velocidad constante, el cual es mas prolongado a 50°C, pero que prácticamente representa en los dos casos, menos del 5% del tiempo total de secado.

La segunda región es un periodo de velocidad decreciente, dado que a medida que el contenido de humedad disminuye, el acceso de agua desde el interior del haba a la superficie es más difícil, y por lo tanto la pérdida de humedad es más lenta.

En la tercera región, la velocidad de secado es más pequeña y comprende la mayor cantidad de tiempo, dado que la pérdida de agua es cada vez más

difícil al encontrarse ligada. Por lo anterior, la disminución del contenido de humedad, se realiza por difusión de esta, del interior de los cotiledones a través de los tejidos y luego a través de la testa.

Se ha establecido que la temperatura más adecuada para realizar el secado directo de las semillas de maraco fermentadas es 50°C. A pesar que a esta temperatura se requiera mayor cantidad de tiempo para alcanzar una humedad aceptable (aproximadamente 8%), lo que conlleva a incrementar gastos operacionales, es a 50°C donde se obtienen menores pérdidas de los precursores del aroma y el sabor del chocolate producido durante la fermentación.

50°C es un valor intermedio que produce un secado rápido, conserva las propiedades de la almendra y requiere un consumo aceptable de energía.

Condiciones del proceso de secado:

- ◆ Tipo de secado: Directo por aire caliente.
- ◆ Temperatura de secado: 50°C.
- ◆ Tiempo de secado: 13 horas para el Copoazú y 24 horas para el Maraco.

Analizando la evolución de la tostión se recomienda seleccionar un sistema, que posea un adecuado medio transmisor de calor que asegure una temperatura uniforme en toda la superficie del fondo del tostador, para que la temperatura de las semillas sea igualmente uniforme. Para alcanzar una temperatura cercana a los 105°C en las semillas, el tostador toma aproximadamente 30 minutos, y luego de esto las semillas se dejan tostar durante 75 minutos para el caso del Copoazú, y para el caso Maraco se tuesta a una temperatura de 110°C durante 30 minutos.

Durante la tostión se disminuye el contenido de humedad y se desarrollan los compuestos que le dan aroma al chocolate, como se observa en la tabla 4.15, se puede disminuir la humedad a valores entre 2% y 2.9%, lo cual es un buen índice para pasar a la etapa de molienda.

4.6.3 Escarificación, molienda, conchado y atemperado

Escarificación. En el escarificado de las semillas de copoazú se probó la conveniencia de pasar las semillas por el molino una vez terminada la tostación, es decir, con las semillas aún a alta temperatura; de esto se pudo observar que la testa se desprende con mayor facilidad y que por lo tanto se requiere recircular las semillas menor número de veces por un molino de martillos. El mayor inconveniente que se presenta en esta etapa es la formación de finos o partículas muy pequeñas de las semillas que se esparcen fácilmente, caen al piso y se convierten en pérdidas.

Para esta etapa se recomendaría contar con un ciclón que separe la testa de la almendra de las semillas de copoazú.

De acuerdo con los análisis de la tabla 4.14, durante el paso de las semillas tostadas de copoazú y maraco por el molino de martillos, las pérdidas por la formación de finos se estiman en promedio de 3%. Es así que el rendimiento final de cacao en almendra oscila entre un 50 y un 70% para Copoazú y Maraco respectivamente.

Tabla 4.14 Rendimientos de la escarificación para las semillas de Copoazú y Maraco

Fruto	Masa inicial (semilla) (kg)	Masa final (almendra) (kg)	Rendimiento (%)
Maraco	5.6	4.0	71.4
Copoazú	6.1	3.0	49.2

En este punto se puede llegar a calcular el rendimiento total del proceso desde que se tenían las semillas de copoazú y Maraco frescas hasta que se llega a la almendra, que se constituye en la materia prima para la elaboración de licor de cacao, chocolate de mesa y cobertura de chocolate.

En promedio el rendimiento sobre la producción de almendra de Copoazú es de 21.8% y de Maraco es de 23.25% sobre las semillas frescas que se cargan al fermentador; aunque el rendimiento es bajo, es necesario considerar que en la elaboración de los productos de chocolate se adicionan otros componentes con lo cual se vuelve a recuperar masa con un mayor valor agregado.

A la almendra obtenida en este punto se le hizo un análisis proximal que se muestra en la tabla 4.15, lo cual se utiliza para la formulación de los productos de chocolate.

Tabla 4.15 Análisis proximal de las almendras procesadas de Copoazú y Maraco

Muestra	Humedad	Cenizas	Proteína	Grasa	Fibra Cruda	Carbohidratos
Copoazú	2.08	2.35	11.84	51.51	10.60	23.70
Maraco	2.87	2.35	13.62	38.84	26.51	18.68

Molienda. En esta etapa la separación de los discos del molino determina un tamaño de partícula lo suficientemente fino como para producir un licor de cacao bien fluido para la elaboración de chocolate de mesa y cobertura de chocolate. Se debe alimentar el molino una vez los discos del molino estén calientes por la fricción entre ellos, dado que este aumento de temperatura ayuda a la fusión de la grasa del chocolate y por lo tanto a la producción de un licor de chocolate que posteriormente se pueda conchar y atemperar.

Conchado. Inmediatamente después de la molienda, el licor de cacao se tiene que conchar a 50°C, durante 1 hora, estas etapas tienen que ser continuas, ya que si se deja enfriar el licor de cacao que sale del molino de discos, además de solidificarse y de hacerse de difícil manipulación se necesitaría más energía para elevar nuevamente su temperatura hasta 50°C.

Durante el conchado se mezclan los otros componentes de los productos de chocolate. Para el caso del chocolate de mesa, se mezclan básicamente licor de Copoazú o Maraco, azúcar y lecitina. En la tabla 4.16 se muestran las formulaciones desarrolladas para este producto.

Tabla 4.16 Formulación del chocolate de mesa

Producto	Licor de Copoazú o Maraco (%)	Azúcar (%) de cacao (%)	Manteca	Lecitina (%)
Chocolate de mesa	50.0	50.0	-	-

Atemperado. Como el atemperado se hace a escala semiindustrial se utilizan dos baños, uno con agua fría para disminuir la temperatura de la cobertura y otro con agua caliente para aumentar la temperatura de la pasta. La curva de temperatura es: desde 50°C disminuir la temperatura hasta 29°C en 30 min, luego aumentar la temperatura hasta 33°C en 30 minutos

y posteriormente enfriar hasta 29°C en 30 min, por último calentar hasta 33°C para moldear y empaçar.

4.6.4 Condiciones de proceso y tiempos de duración de las operaciones

Luego de analizar los ensayos que se hicieron sobre las semillas de Copoazú y Maraco para la elaboración de chocolate se concluyen las condiciones de proceso más adecuadas para cada una de las etapas teniendo en cuenta los equipos que se tienen en la región occidental de la Amazonia Colombiana (tablas 4.17 y 4.18)

Tabla 4.17. Condiciones de proceso para la obtención de chocolate de Copoazú

ETAPA	CONDICIONES DE PROCESO	OBSERVACIONES
Fermentación	Tiempo de fermentación: 6 días. Remoción: día 1, día 2 y día 4. Masa de fermentación: 45 kg	Si se utiliza el sistema de fermentación de 4 cajones, la remoción se refiere a que se carga el cajón superior, a las 24 horas (día 1) se pasan las semillas al segundo cajón, a las 24 horas (día 2) se pasa al tercer cajón y a las 48 horas (día 4) se pasa al cuarto cajón donde se deja 48 horas. El cajón debe cubrirse con una lona para evitar pérdidas de calor y contaminación. Es recomendable ubicar el sistema de fermentación en un sitio cubierto y cerrado para evitar contaminación de la masa fermentante por insectos o roedores. El último día de fermentación debe verificarse un pardeamiento de todas las semillas, para poder pasar al secado.
Secado	Tiempo de secado: 13 horas Temperatura de secado: 50°C	El tiempo de secado no debe ser continuo, se debe dar una pausa durante el secado para permitir la migración del agua que se encuentra en el centro del cotiledón hacia el exterior. Es recomendable secar 8 horas, y dejar las semillas en las bandejas dentro del secador, y al día siguiente seguir con el secado las 5 horas restantes. El contenido de humedad final de las semillas después del secado debe ser de 6 a 8%.
Tostión	Temperatura de tostión: 105°C Tiempo de tostión: 75 minutos	Como la tostión se realiza en el escaldador y el medio de calentamiento es aceite térmico, la transferencia hacia las semillas es lenta y tarda aproximadamente 30 minutos para que las semillas alcancen los 105°C, por lo tanto, el tiempo de tostión debe tomarse a partir del momento en que las semillas alcancen 105°C. Sobre el fondo del escaldador, se debe cargar una sola capa de semillas de copoazú, para garantizar el contacto de todas las semillas con la superficie caliente. Se deben agitar las semillas cada 20 minutos para lograr una mejor distribución de calor en estas semillas. Al final de la tostión las semillas deben tener una apariencia muy reseca como cascajo.
Escarificado	Tiempo de escarificado, Rompimiento de la testa: 30 min Separación de la testa de la almendra de las semillas: 1 día (5kg y 1 operario).	El objeto de recircular las semillas por el molino de martillos es asegurar que la testa de todas las semillas se rompa, ya que al pasarlas una sola vez solo se quiebran algunas. Hay que tener especial cuidado al recoger las semillas que salen por la parte inferior del molino, ya que se debe colocar el recipiente de tal forma que no se pierdan muchos finos.

ETAPA	CONDICIONES DE PROCESO	OBSERVACIONES
	Al molino de martillos se cargan 3 kg de semillas aproximadamente y se recirculan 10 veces.	
Molienda	Tiempo de molienda: 30min (500g)	Las almendras de copoazú deben alimentarse lentamente en la tolva del molino de discos, ya que esta es muy pequeña y las almendras tienden a apelmazarse. Es importante que antes de cargar el molino los discos ya estén calientes, de esta forma se facilita el refinado del chocolate.
Conchado	Tiempo de conchado, Chocolate de mesa: 30 min. Temperatura de conchado: 50°C	En esta etapa también se mezclan los demás componentes del chocolate de mesa, es importante señalar que se debe seguir un orden para adicionar estos compuestos; en el caso de la cobertura, al licor se adiciona la lecitina y el azúcar poco a poco para facilitar la agitación.
Atemperado	Curva de atemperado: Enfriar hasta 29°C → 30 min Calentar hasta 33°C → 30 min Enfriar hasta 29°C → 30 min Calentar hasta 33°C	En el atemperado se enfría desde 50°C (temperatura de conchado) hasta 29°C y se sigue la curva de atemperado; al final se calienta hasta 33°C para moldear y empaclar. Para enfriar y calentar según sea el caso, se recomienda agua como método calefactor, por lo cual se utilizan baños de agua fría o agua caliente. En esta etapa también se debe agitar.

Tabla 4.18. Condiciones de proceso para la obtención de chocolate de Maraco

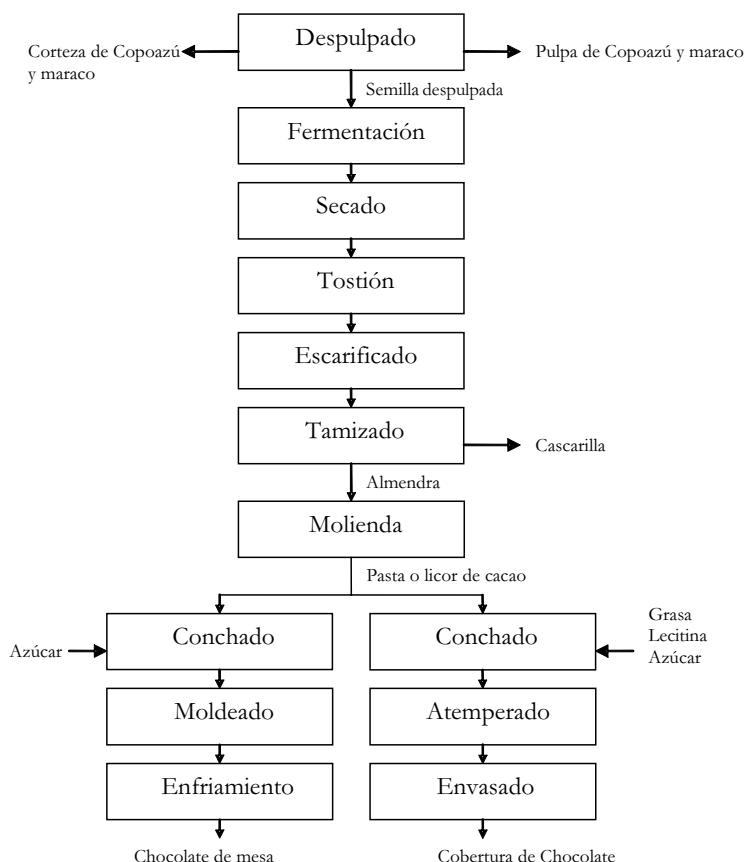
ETAPA	CONDICIONES	OBSERVACIONES
Despulpado	Tiempo: depende del operario.	Despulsar únicamente frutos maduros sanos. La semilla debe quedar completamente despulpada, si es necesario se recomienda pasarla dos veces por la despulpadora.
Fermentación	Masa: 41kg de semilla de maraco. Tiempo: 96 horas (4 días) Volteos (cambio de cajón): cada 24 horas	El proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente, cubriendo el cajón con una estopa limpia para disminuir las pérdidas de calor de la masa fermentante.
Secado	Tiempo: 20 horas interrumpidas Temperatura del aire: 50°C Masa: 35.5kg (Capacidad del secador : 50 kg)	Primer día de secado: 8 horas y 16 horas de reposo, luego 8 horas de secado el segundo día, y 16 horas más de reposo y finalmente 4 horas más de secado. La semilla después del secado no se debe empaclar caliente, se debe dejar enfriar completamente. La semilla seca se debe empaclar en bolsas gruesas para evitar que se rehidrate, o emplear doble bolsa. Es recomendable procesar inmediatamente la semilla después de seca, pues durante el almacenamiento puede ganar algo de humedad y perder parte de los componentes de sabor y aroma, si esto no es posible, entonces se debe empaclar en bolsas bien cerradas.
Tostión	Tiempo: 2 horas Temperatura: máximo 120°C Masa: 15 kg (la capacidad del escaldador es de 30 kg aproximadamente). Remoción: cada 20 minutos con un objeto de madera.	Se encienden 3 de los 5 quemadores del escaldador (los 2 de los extremos y el del centro). Se debe medir la temperatura de las semillas, pues no debe pasar de 120°C.

ETAPA	CONDICIONES	OBSERVACIONES
Escarificado	Número de repeticiones: 4 (o hasta que todas las semillas estén fracturadas). Tiempo: 1 hora para 14.4 kg de semillas.	El número de repeticiones en el molino debe ser tal que se fracturen todas las semillas, pero que no se generen demasiados finos.
Tamizado	-Tiempo: 15.7 horas para 14.4 kg semillas -Velocidad: 0.67kg almendra/hora/persona	Depende del operario.
Molienda	Tiempo (martillos): 4 minutos por kilo almendra. Tiempo (discos): 1 hora para 1 libra de almendra	La molienda en el sistema de discos es bastante demorada, pues el sistema de alimentación sólo permite alimentar pequeñas cantidades, que se deben ir empujando. Se obtienen mejores resultados si los discos ya se han calentado por fricción (encender con anticipación el equipo antes de moler).
Conchado	Tiempo: 30 minutos Temperatura: 50°C	Para este proceso se mezcla la pasta de maraco con azúcar, empleando 50% de cada uno. Se adiciona la lecitina. El azúcar se va añadiendo progresivamente. Se debe controlar permanentemente la temperatura.
Moldeado	Tiempo: 10 minutos por libra	Cuando se trata de una masa poco fluida y no se puede emplear empacadora, con una cuchara de madera se coloca en el molde y se golpea repetidas veces para eliminar las burbujas y homogenizar la distribución.
Enfriamiento	Tiempo: 3 horas Temperatura: 4°C	

4.6.5 Diagrama de proceso para la obtención de licor de cacao y chocolate de mesa a partir de almendras de copoazú y maraco

Los equipos que se tienen en la Planta de Frutales del instituto SINCHI en la Universidad de la Amazonía en Florencia Caquetá constituyen un punto de partida de los equipos disponibles en la región; teniendo en cuenta dicha infraestructura se hizo el diseño preliminar del diagrama de proceso en planta (figura 4.7).

Figura 4.7. Diagrama de proceso preliminar para la obtención de licor y chocolate de mesa de Copoazú y Maraco



4.7 Determinación de puntos críticos en el proceso de molienda, conchado y atemperado de Maraco y Copoazú

En este proceso se observó que al usar una cantidad considerable de masa fermentante se evita emplear un sistema de calefacción el cual proporcione calor al interior de la masa. Este punto crítico es muy importante desde el punto de vista del proceso y de la parte económica. Así mismo el grado de madurez de los frutos es determinante para la obtención de productos de buena calidad. La remoción de la masa fermentante al segundo día, la higiene del fermentador y la correcta aplicación de las prácticas de manufactura proporcionan resultados satisfactorios al final de la fermentación.

PUNTO CRITICO	Proceso	Económico	HACCP*
Alta cantidad de masa fermentante	+	+	
Madurez de los frutos	+	+	+
Remoción de la masa fermentante	+		
Remoción y temperatura de la masa al 2º día	+		
Higiene del fermentador	+	+	+
Manejo de la masa fermentante			+

* Sistema de análisis y control de puntos críticos de procesos

En el secado uno de los puntos críticos mas importantes es la temperatura, pues se debe aplicar una temperatura intermedia que no deteriore las propiedades del producto y que permita un secado rápido evitando la contaminación. De igual manera el tipo de secado y la higiene en el secado influyen en gran medida en el aspecto económico y en la calidad del producto.

PUNTO CRITICO	Proceso	Económico	HACCP
Temperatura de secado	+	+	+
Tipo de secado	+	+	
Contaminación microbiológica de semillas		+	+
Higiene del secador		+	+

En la fermentación del Maraco se considera como punto crítico la presencia de pulpa sobre la semilla. Desde el punto de vista del proceso dificulta el transcurso de la fermentación ya que por el rango del pH entre 4,6 y 5,0 facilita el ataque de microorganismos haciendo necesario fermentar en menor tiempo para evitar la descomposición de la semilla. Además la presencia de pulpa al fermentar hace que la almendra que se obtiene mas adelante tenga un olor desagradable.

Desde el punto de vista económico el obtener una semilla mal fermentada atacada por hongos y con mal olor hace que el precio descienda considerablemente o que sea imposible su comercialización. Desde el punto de vista de la calidad se debe eliminar del proceso cualquier fuente de contaminación del producto o cualquier condición que vaya en detrimento de la calidad del producto final.

En el secado de Maraco, desde el punto de vista del proceso la presencia de pulpa sobre la semilla dificulta la operación de secado ya que la pulpa al secarse se endurece formando una costra que impide que la almendra se seque lo suficiente, entorpeciendo a su vez los procesos de tostado, escari-

ficado y tamizado, y haciendo que la almendra tome mal olor y que sea necesario secarla después del tamizado ya que si es almacenada húmeda sufre invasión por hongos principalmente. Desde el punto de vista económico el secado de semilla que presenta pulpa en su superficie es mucho más lento haciendo que se incrementen los costos por consumo de combustible y energía eléctrica. Además es imposible comercializar semilla que presente más del 7% de humedad.

Desde el punto de vista de la calidad (HACCP), los procesos prolongados o adicionales causan daño a muchos componentes del producto en este caso sabor y aroma, además se debe procurar manipular al mínimo el producto para evitar su contaminación y por ende la disminución de su calidad.

MOLIENDA

PUNTO CRÍTICO	Proceso	Económico	HACCP
Tipo de molino	+	+	+
Higiene del molino	+	+	+

En la etapa de molienda el tipo de molino es un punto crítico, porque depende de la capacidad refinadora del molino, es decir se requiere el tamaño de partícula adecuado para las exigencias de los diferentes productos de chocolate y para realizar las siguientes etapas de conchado y atemperado. Desde el punto de vista HACCP, si no se obtiene un buen tamaño de partícula la calidad de los productos no va a ser buena conllevando a una reducción del precio de los productos.

La higiene es un punto crítico desde el punto de vista del proceso, de la parte económica y del HACCP ya que si no se limpia el molino correctamente se pueden contaminar las demás muestras que se procesen con lo cual disminuirá su calidad y por lo tanto su valor en el mercado.

CONCHADO

PUNTO CRÍTICO	Proceso	Económico	HACCP
Temperatura de conchado	+		+
Tiempo de conchado	+	+	+
Tipo de agitación	+		+

La temperatura de conchado es un punto crítico desde el punto de vista del proceso, ya que si se hace a una temperatura muy baja, no se eliminan algunas sustancias indeseables para el producto, por el contrario a una temperatura muy alta se puede quemar la pasta o licor de chocolate, estos factores hacen que se disminuya la calidad del producto según HACCP.

El tiempo de conchado es un punto crítico porque dependiendo del producto de chocolate que se quiera obtener este va a ser más largo o más corto, debido a que se busca que la grasa se distribuya de forma homogénea sobre la superficie de los sólidos de cacao y sobre la superficie del azúcar, lo cual implica obtener al final del proceso un muy buen producto, que represente calidad y mayor valor.

El tipo de agitación en el conchado es importante porque tienen que romperse glóbulos de grasa y redistribuirse sobre las demás superficies de los otros componentes del licor de chocolate, entonces si no se cuenta con un buen sistema de agitación, la grasa no se distribuye bien y el producto puede llegar a tener defectos que alteran su calidad.

ATEMPERADO

PUNTO CRITICO	Proceso	Económico	HACCP
Temperatura de atemperado	+	+	+
Tiempos de atemperado	+	+	+

Las temperaturas y tiempos de atemperado son puntos críticos ya que constituyen la curva que define la cristalización más estable de la grasa del chocolate, por lo tanto si se hace a temperaturas más altas o más bajas no se presentará la cristalización con lo cual no se va a obtener un buen producto con alto grado de calidad y que tenga mayor valor monetario.

Referencias

- Barrera, A. 1999. Determinación de algunas propiedades físico mecánicas de la semilla del Maraco (*Theobroma bicolor* H.B.K.) y Obtención del Baccalate. Tesis de Ingeniería de Alimentos. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Santafé de Bogotá. . Páginas 18 – 19.
- Beckett, S.T. 1988. Fabricación y utilización industrial del chocolate. Editorial Acirbia, Zaragoza,. España. Páginas 3 -4, 17 – 19, 121 – 141.
- Calzavara, B. Muller C. H. Da Costa, O. N. 1984. Fruticultura tropical: O cupuaçuzeiro. Cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. Belém, PA. p.p. 7-13, 59-62.
- Díaz, K. 2002. El consumo mundial del cacao. En: Memorias VIII Conferencia Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, La Habana, Cuba.
- Gutiérrez, C. 1988. El beneficio del cacao: folleto informativo. Gobernación de Antioquia, Colombia. 57 p.
- Hernández. M.S., Barrera, J.A. 2000. Manejo poscosecha y transformación de frutales nativos promisorios en la Amazonia Colombiana. Editorial Produmedios. Bogota. D.C. Colombia. Pp 46-59.
- Lozano, J.C., Rozo, L.A. 1997. Extracción y caracterización físico-química de los aceites contenidos en las semillas de copoazú y maraco y su posible utilización como fuentes alternativas en la industria de los aceites comestibles. Tesis Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Bogotá D.C. P. 14
- Martín, D.W. [*et al.*] 1986 .Bioquímica de Harper. Décima edición. México D.F: El Manual Moderno, S.A. de C.V.,. p.p. 224, 681, 682.
- Parra, J., Montenegro Y., 2005. Evaluación de las Etapas de Fermentación y Secado del Proceso de Beneficio de Semillas de Maraco (*Theobroma bicolor* H.B.K) Tesis de Ingeniería de Alimentos, Universidad de la Amazonia, Florencia. 89 p.

Peñaranda, L.E., Bolaños, R. 1990. Diseño de un reactor para la fermentación de cacao y estudio de las variables que influyen en el proceso. Tesis de grado. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. 142 p.

Rivas, E., Lozano, F. 2001. Especies Promisorias de la Amazonía. Conservación, Manejo y Utilización del Germoplasma. Editorial CORPOICA C.I. Macagual – Caquetá – Putumayo, Colombia, Páginas 72 – 74.

Roelofsen, P.A. 1958. Fermentation, drying and storage of cocoa beans. En: Advances in Food Research. Vol. 8. Pp 225-296

Rohan, T.A., Stewart, T. 1967. The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. J. Food. Sci. 32: 399 – 402.

TCA. 1997. Cultivo de frutales nativos amazónicos. Manual para el extensionista. Tratado de cooperación amazónica. Lima, Perú., p.p. 85-92.

Venturieri., López, J. 1988. Composição do chocolate caseiro de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd Ex Spreng Schum). Acta Amazónica 18 (1-2): 3-8



Foto 1. Frutos de Copoazú y Maraco en estado de madurez adecuada para procesamiento.

Foto 2. Separación de la masa pulpa-semilla de la corteza de frutos de Copoazú y Maraco

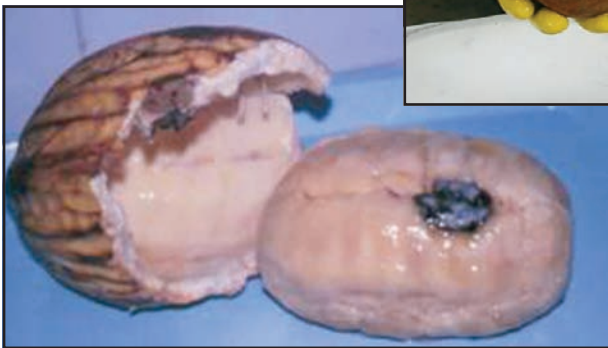
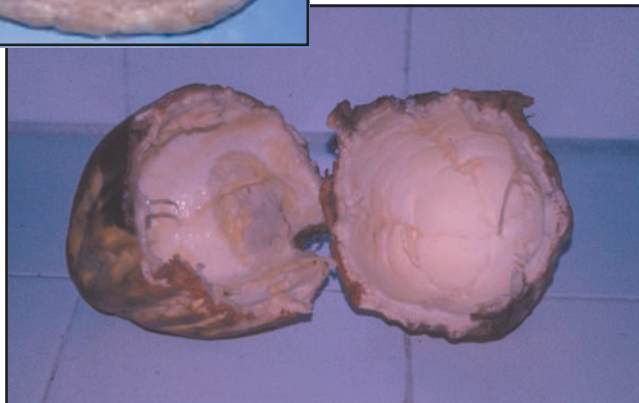


Foto 3. Proceso de selección de frutos de Copoazú y Maraco





Proceso de selección de frutos de Copoazú y Maraco

No 4. Despulpado de Copoazú y Maraco y obtención de semillas

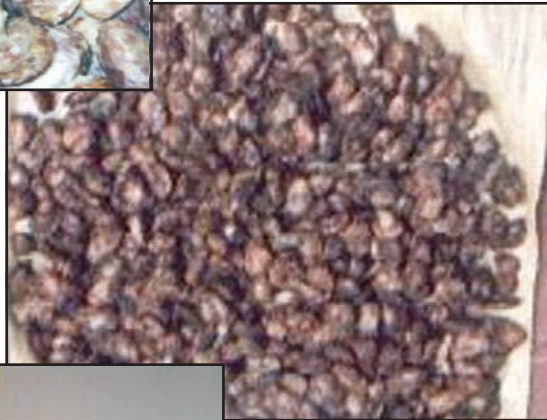


No 5. Semillas de Copoazú y Maraco despulpadas y listas para la fermentación





No 6. Semillas de Copoazú y Maraco durante el proceso de fermentación



No 7. Fermentador de escaleras.



No 8. Secado por aire caliente de semillas fermentadas.

No 9. Semillas secas de Maraco.



No 10. Licor
Obtenido a partir
de almendras de
Copoazú.

5. OTRAS APLICACIONES

Por: Marcela Piedad Carrillo¹, Jaime Alberto Barrera¹, María Soledad Hernández¹, Luz Marina Melgarejo², Marby Barón³, Wilber Andrés Villada³, Jimmy Edgardo Pérez³, Freddy Cruz³, Andrea Barrera⁴, Olga Rodríguez¹

5.1 Determinación de algunas propiedades fisicomecánicas de las almendras para su aplicación en otros procesos

5.1.1 Caracterización físico-mecánica de las almendras de copoazú

Propiedades físicas de las almendras

Características como la forma, tamaño, peso específico aparente, peso específico real y otras son de vital importancia para conocer algunas propiedades de las almendras como son el ángulo de reposo y el coeficiente de fricción; y así mismo para determinar las características de diseño de equipos de manejo, secado y almacenamiento de almendras y granos (Moshehin, 1970, citado por Barrera, 1999).

¹ Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI

² Universidad Nacional de Colombia

³ Universidad América

⁴ Universidad Jorge Tadeo Lozano

Forma y tamaño. Estas características son inseparables en un objeto físico, y ambas son generalmente necesarias si el objeto se va a describir satisfactoriamente. Además, en la definición de forma, algunos parámetros dimensionales deben ser medidos. Los granos y almendras son irregulares en forma, y una especificación completa de su forma, teóricamente requiere de un número infinito de medidas.

Desde un punto de vista práctico, la medida de algunos ejes, mutuamente perpendiculares, es suficiente. La relación forma y tamaño puede definirse así:

$$I = f(F, S)$$

donde:

I = índice

f = función de

F = forma

S = tamaño

La caracterización del tamaño experimentalmente se hace con base en tres dimensiones (Largo, ancho y espesor) medidas perpendicularmente entre si.

Por otra parte existen cartas estándar y criterios, para una determinación aproximada, semejando el producto a una forma geométricamente regular y de fácil determinación, útil para describir la forma de frutas y hortalizas (Moshenin, 1970. citado por Barrera, 1999).

Peso específico aparente. Es la relación que existe entre el peso de un producto y el volumen total ocupado por éste (Bayona, 1985, citado por Barrera, 1999). Para su determinación se utiliza un recipiente de volumen conocido, dentro del cual se depositan las almendras hasta completar todo su volumen y luego se procede a pesar toda la masa de almendra, determinándose el peso específico por medio de la siguiente relación:

$$Pa = \frac{\text{Peso (g)}}{\text{Volumen (cm}^3\text{)}}$$

Peso específico real. Es la relación que hay entre el peso del grano y su volumen, sin incluir los espacios vacíos intergranulares (Bayona, 1985, citado por Barrera, 1999). Su determinación se hace mediante la siguiente relación:

$$Pr = \frac{\text{Peso (g)}}{\text{Volumen real (cm}^3\text{)}}$$

donde:

$$Pr = \text{peso específico real (g/cm}^3\text{)}$$

Conociendo el peso específico aparente y el peso específico real del producto, se puede calcular la porosidad mediante la siguiente expresión:

$$n (\%) = [1 - (Pa/Pr)] \times 100$$

donde:

$$n = \text{porosidad}$$

$$Pa = \text{peso específico aparente (g/cm}^3\text{)}$$

$$Pr = \text{peso específico real (g/cm}^3\text{)}$$

En la tabla 5.1 se presentan los valores promedio de la caracterización física de la almendra de copoazú en las variables peso específico aparente, peso específico real, ángulo de reposo, porosidad y coeficiente de fricción.

Tabla 5.1 Características físicas de la almendra de Copoazú

VARIABLE	MEDIA
Peso específico aparente (g/cc)	0,49
Peso específico real en agua (g/cc)	0,90
Peso específico real en alcohol (g/cc)	0,77
Ángulo reposo (°G)	43,3
Porosidad a presión 25PSI (%)	41,0
Porosidad a presión 20PSI (%)	63,0
Coeficiente fricción en madera (n)	0,46
Coeficiente fricción en acero (n)	0,35
Coeficiente fricción en concreto (n)	0,53
Coeficiente fricción en almendra (n)	0,53

Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas pueden ser definidas como aquellas que tienen que ver con el comportamiento de un producto bajo fuerzas aplicadas. Son varias las propiedades mecánicas que se pueden determinar a un producto agrícola, buscando predecir su comportamiento en etapas como cosecha, transporte, tratamiento (secado, maquinado) y almacenamiento.

Coefficiente de fricción. El conocimiento del coeficiente de fricción es importante para determinar la energía que se pierde por rozamiento cuando el grano debe pasar por máquinas al ser beneficiado. Juega un papel fundamental en el diseño de estas máquinas y en todas aquellas estructuras que se requieren para el almacenamiento de granos (Moshenin, 1970.) citado por Barrera, 1999).

Cuando una masa de granos se presiona contra una superficie mediante una fuerza igual a su propio peso, W , la masa de grano no se desplazará en la dirección transversal hasta que la fuerza de fricción con la superficie sea vencida. Esta fuerza se denomina fuerza de fricción estática y es la necesaria para iniciar el movimiento. Para mantener el movimiento aparece la fuerza de fricción dinámica, cuyo valor es menor que la fuerza estática.

La relación entre la fuerza de fricción, F , y la fuerza normal a la superficie de contacto, W , se denomina coeficiente de fricción y está dado por la siguiente expresión:

$$f = \frac{F}{W}$$

donde:

$f = \text{coeficiente de fricción}$

Entre algunas consideraciones sobre F fuerza de fricción se tiene que:

- Las fuerzas de fricción están definidas como las fuerzas que actúan en un plano de contacto punto a punto, de tal manera que se resista al movimiento relativo de las superficies de contacto.
- La fuerza de fricción es directamente proporcional al área de contacto.
- La fuerza de fricción se considera formada por 2 componentes principales, una fuerza requerida para deformar y algunas veces para cortar las asperezas de la superficie de contacto y una fuerza requerida para vencer las fuerzas de cohesión y adhesión entre superficies.

- La fuerza de fricción depende de la velocidad de deslizamiento de las superficies de contacto a causa de los efectos de temperatura sobre los materiales en contacto.
- La fuerza de fricción es independiente de la rugosidad de la superficie excepto en situaciones extremas de superficies muy lisas o muy rugosas.

Teniendo en cuenta lo anterior se encontró que la superficie de la almendra del copoazú presenta un alto coeficiente de fricción con un valor promedio de 0,5306.

Efectos de las condiciones de humedad. Los productos orgánicos de tipo granular, son materiales altamente higroscópicos, por lo que un aumento en las condiciones de humedad afectan al grano, con el consecuente aumento o disminución del coeficiente de fricción del producto. Se ha notado que un aumento en el coeficiente de fricción estático de granos y otros productos cuando la humedad del material aumenta, afecta las propiedades de adhesión y cohesión.

Ángulo de reposo. El ángulo de reposo tiene aplicaciones importantes en el manejo de granos almacenados especialmente en: capacidad estática de los silos, descarga de los silos por gravedad, bandas transportadoras (Ospina, 1999). El tamaño, forma, contenido de humedad y orientación de los granos influye sobre el ángulo de reposo.

Los valores del ángulo de reposo son una función del contenido de humedad del material granular. Este se incrementa muy rápidamente cuando el contenido de humedad excede valores del 16 al 17%. El ángulo de reposo varía de acuerdo a los siguientes factores: tamaño y volumen del grano, superficie del grano especialmente rugosidad, contenido de humedad, materiales extraños: piedras, tierra, arena, etc., y esfericidad del grano.

Los datos medidos de este parámetro se encuentran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2 Ángulo de reposo almendra de Copoazú

Valores de °G	46	43	42	43	43	45	43	46	44	43	44	41	43	43	41	44	43	45	42	43
Promedio	43.35																			

El valor promedio del ángulo de reposo encontrado para la almendra de copoazú se encuentra dentro del rango de 41-46° similar a lo reportado por Moshenin (1970) para la almendra de cacao. Según Garzón y Trujillo, 1992, para la almendra de cacao los valores del ángulo de reposo a un contenido de humedad de 7.75% es de 35.62 que difiere con el valor promedio del ángulo de reposo encontrado para el copoazú de 43.35 con un valor de humedad de 7.02%; este valor para el copoazú se puede explicar debido a que en este parámetro influye de manera directamente proporcional la forma y tamaño del material granular lo que es evidente al observar que la almendra de copoazú presenta un tamaño ligeramente mayor al de la almendra de cacao.

5.1.2 Caracterización física de almendras de maraco

La semilla de Maraco es de forma circular achatada, de superficie rugosa y de color oscuro, entre las propiedades físicas y mecánicas realizadas a la semilla de maraco luego de fermentadas y secadas se tiene:

Longitud, espesor, ancho y peso (Tabla 5.3)

Tabla 5.6 Longitud, espesor, ancho y peso de las semillas de Maraco

Longitud (cm)	Espesor (cm)	Ancho (cm)	Peso (g)
3.03	1.52	1.84	3.33
2.91	1.10	1.95	3.19
3.14	1.23	1.92	3.31
3.09	1.23	1.91	2.97
3.09	1.27	1.90	2.97
3.18	1.19	1.95	3.10
3.06	1.20	1.84	2.93
3.29	1.11	2.03	3.56
3.53	1.15	2.14	3.83
3.24	1.17	1.95	3.49

Las características físicas como longitud, espesor, ancho y peso son similares a los reportados por Cruz, (1996) para las semillas del Copoazú. En cuanto al

peso específico real y aparente y la porosidad, los valores encontrados son muy similares a los reportados para Cacao y el Copoazú (Cruz, 1996).

Estos datos son importantes para los cálculos de las operaciones de manejo de éstos productos, como el empaque, el almacenamiento, el diseño de maquinaria adecuada para el procesamiento y para el control de procesos de estos granos.

Peso específico aparente. Es la relación que existe entre el peso de un producto y el volumen total ocupado por éste (Tabla 5.4)

Tabla 5.4 Peso específico aparente de las semillas de maraco

Peso semilla (g)	121.73	123.29	129.46	132.10	124.17
Peso específico aparente (g/cm ³)	0.49	0.49	0.52	0.53	0.50

Peso específico real. Es la relación que hay entre el peso del grano y su volumen sin incluir los espacios intergranulares (Tabla 5.5).

Tabla 5.5 Peso específico real de las semillas de Maraco

Peso semilla (g)	50	100	150	200	250
V. desplazado (cm ³)	100	140	160	275	350
Peso específico real (g/cm ³)	0.5	0.71	0.94	0.73	0.71

Porosidad. Es la cantidad en porcentaje de espacios vacíos que existe en una mezcla de granos (Tabla 5.6).

Tabla 5.6 Porosidad de las semillas de maraco

Presión 1 (PSI)	29.75	29.75	29	29	28
Presión 2 (PSI)	18	18	17	17	17
P	0.57	0.57	0.61	0.61	0.56
	P (%) = 58.4				

Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas pueden ser definidas como aquellas propiedades que tienen que ver con el comportamiento de un producto bajo fuerzas aplicadas. Las tablas 5.7, 5.8, 5.9 y 5.10 muestran los resultados del

coeficiente de fricción en diferentes superficies a las semillas de maraco.

La tabla 5.11 muestra los resultados del ángulo de reposo.

Coefficiente de fricción. Se utiliza para determinar la energía que se pierde por rozamiento cuando el grano debe pasar por máquinas al ser beneficiado.

Tabla 5.7 Coeficiente de fricción semilla de maraco vs madera

F (g)	2100	1400	1700	2300	2600
W (g)	2958.0	4771.0	4778.8	6652.8	8465.8
f	0.71	0.29	0.36	0.35	0.31
f = 0.40					

Tabla 5.8 Coeficiente de fricción semilla de maraco vs. acero

F (g)	1650	1200	1250	1675	1900
W (g)	2958.0	4771.0	4778.8	6591.8	8465.8
F	0.56	0.25	0.26	0.25	0.22
f = 0.31					

Tabla 5.9 Coeficiente de fricción semilla de maraco vs. concreto

F (g)	2400	2500	2570	3200	3550
W (g)	2958.0	4771.0	4778.8	6645.0	8465.8
f	0.81	0.52	0.54	0.48	0.42
f = 0.55					

Tabla 5.10 Coeficiente de fricción semilla de maraco vs semilla de maraco

F (g)	3100	5570	4450	5750	6950
W (g)	3495.9	5362.1	5369.9	7182.9	8465.8
f	0.89	0.52	0.83	0.80	0.82
f = 0.55					

Ángulo de reposo. Es el ángulo formado con la horizontal, en el cual el material granular no se desliza cuando es aplicado.

Tabla 5.11 Ángulo de reposo de las semillas de maraco

Ángulo de Reposo (°)	35	35	38	36	37
Ángulo de reposo (°) = 36.2					

En las propiedades mecánicas se observa que el coeficiente de fricción, teniendo como superficie el mismo grano es el más alto lo cual ayuda a encontrar el ángulo de fricción interna. Este comportamiento determina

las posibles pérdidas de energía por rozamiento que se presentan durante el beneficio del grano. La superficie menos friccionante es la del acero, permitiendo que el desplazamiento del grano sobre esta superficie sea mucho más fácil que en otra, lo cual reduce el daño mecánico de la semilla. El coeficiente de fricción del grano es fundamental para determinar las pérdidas de potencia debidas a la fricción de equipos de transporte y para el acondicionamiento de la semilla en procesos industriales.

El ángulo de reposo del Maraco (36.2) con respecto al Cacao (31.9) y al Copoazú (43.31) difieren un poco por la forma de la semilla, siendo más difícil el deslizamiento de la semilla de Copoazú; entre menor sea el ángulo de reposo más fácil se desliza el grano, sin riesgo de impacto. El ángulo de reposo es un indicador de la fluidez que tiene la semilla en operaciones de cargue y descargue.

Estas propiedades son fundamentales en situaciones donde se aplican pesos que pueden causar deformaciones durante la manipulación, empaque y transporte.

5.2 Diseño de un prototipo para la extracción de grasas a partir de almendras de Copoazú y Maraco

5.2.1 Extracción de la grasa (manteca) de cacao para producción de chocolate

Partiendo de la pasta de cacao o licor de cacao, tostada previamente o no, se realiza la extracción de la manteca de cacao, ya sea que se necesite para chocolate en polvo, con bajo contenido en grasa, para coberturas y confitería o solamente como manteca. El haba contiene aproximadamente 55% de manteca de cacao en peso.

La manteca de mayor calidad se obtiene mediante el prensado mecánico del licor de cacao, en prensas de tipo hidráulico, cuyo proceso se conoce como discontinuo, o en prensas de tipo expeller, conocido como proceso continuo. En prensas hidráulicas entra el licor de cacao finamente molido y caliente a una temperatura entre los 90 y 100° C y se realiza el prensado mediante cilindros hidráulicos, haciendo que la manteca fluya a través de

unos tamices ubicados en la base del compartimento. En el compartimento queda un material sólido llamado torta de cacao y queda 10 a 20% de grasa residual. La torta es pasada nuevamente a otro molino para reducir aun más el tamaño de partícula.

La prensa de tipo expeller da un proceso de tipo continuo similar al que se utiliza para la extrusión de alimentos, con la diferencia que se usan mayores presiones. El proceso expeller, es un proceso que se usa cuando se desea extraer la mayor cantidad posible de manteca, por lo que se introduce a la prensa las habas incluso con testa. Durante el proceso expeller se reduce a menos del 10% de grasa residual en la torta.

Otra forma de obtener la grasa del cacao, es mediante procesos de extracción por medio de solventes orgánicos. Este método es usado para el procesamiento de productos de consumo humano, sin embargo presenta inconveniente en costos de montaje de la planta, y por ser un producto de extracción química no se puede comercializar como producto natural orgánico. Esta metodología de extracción la usan algunas industrias para sacar el residuo de grasa que queda en la torta después que se le ha realizado una extracción de forma mecánica, para venderlo como aceite secundario de baja calidad.

5.2.2 Consideraciones para el diseño

Como la importancia de cada uno de los aspectos a considerar en un diseño es diferente, se asigna una ponderación para estos de la siguiente forma:

Capacidad:	10%
Condiciones de operación:	15%
Costo del equipo:	10%
Tecnificación para el mantenimiento y operación:	15%
Tamaño del sistema:	10%
Versatilidad del equipo:	20%
Aspectos ambientales y de manejo de alimentos:	20%

De acuerdo con una clasificación general de alimentos, dada por George D. Hayes, (citado por Pérez, 2004) las semillas, pastas y tortas de cacao tienen las siguientes características: Tamaño de partícula que pasa por un

cedazo menor al número 40, flujo medio y poco abrasivo. Otras características de los materiales necesarias para el diseño son:

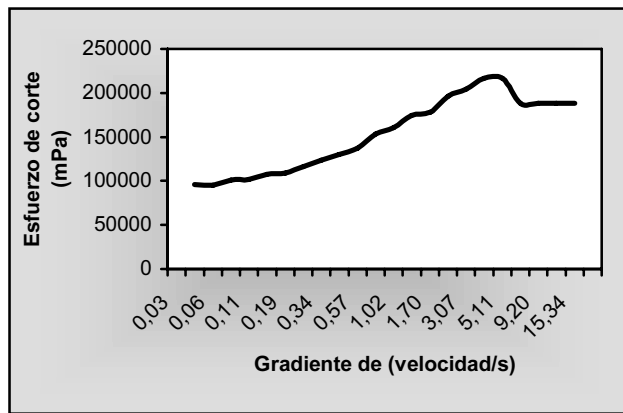
Densidad. Para hallar el valor de la densidad, se toma una muestra de la masa y se deposita en un recipiente aforado de 15 ml. Se procede a pesar el recipiente por separado y la copa con la masa de Copoazú y de Maraco, obteniendo:

$$\begin{aligned}\text{Maraco} &= 1810 \text{ kg/m}^3 \\ \text{Copoazú} &= 1740 \text{ kg/m}^3\end{aligned}$$

Magnitudes Reológicas. Analizando las Figuras 5.1 y 5.2 se puede observar que el comportamiento del esfuerzo de corte respecto al gradiente de velocidad o cizallamiento es típico de un fluido pseudo plástico, en que al aumentar la velocidad de corte la viscosidad aparente disminuye.

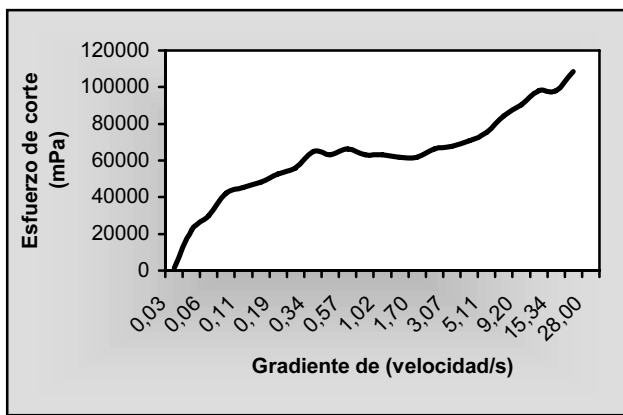
El Maraco tiene un esfuerzo de corte máximo de 216800 MPa que comparado con el del Copoazú de 108500 MPa, hace ver que la viscosidad aparente del Maraco es mayor que la del Copoazú.

Figura 5.1 Esfuerzo de corte vs. Gradiente de velocidad para el Maraco



Las pastas de Copoazú y de Maraco se comportan como fluidos pseudo-plásticos, luego el diseño de la extrusora debe basarse en las características del Maraco, ya que es el que mayor esfuerzo requerirá para su proceso. Por otro lado se debe contemplar la opción de graduar el sistema para el procesamiento del Copoazú.

Figura 5.2 Esfuerzo de corte vs. Gradiente de velocidad para el Copozú



5.2.3 Diseño del sistema

Extrusora de tornillo. Las extrusoras de fricción viscosa pueden ser de uno o de múltiples tornillos, las extrusoras de un solo tornillo son las más usadas por su simplicidad en el diseño, y bajos costos en la fabricación y mantenimiento. Se construyen con diámetros que van desde 18 mm para uso de laboratorio hasta incluso los 900 mm para uso industrial.

Fundamentalmente la máquina de extrusión posee un motor de velocidad variable; un mecanismo reductor y de transmisión de potencia, que permite hacer girar el tornillo; un conjunto de rodamientos para absorber el empuje del tornillo hacia atrás; un tornillo que gira dentro de un cilindro o camisa; y una boquilla de abertura variable para el control de la presión interna del cilindro.

Para garantizar un buen aprovechamiento de la potencia disponible, se prefiere usar transmisiones de engranajes helicoidales, rodamientos de bolas para el eje principal con un sistema de lubricación independiente y así reducir las pérdidas por potencia en casi un 10%. Los cilindros son revestidos con superficies endurecidas al igual que el tornillo.

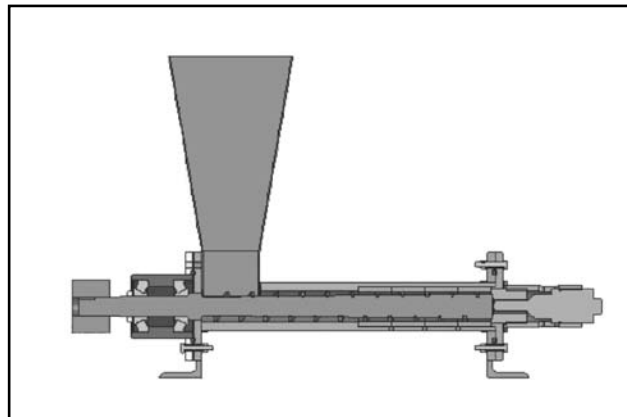
Funcionamiento de una extrusora. Una extrusora de tornillo tiene como funcionamiento general el siguiente: La masa que se desea extruir se pone en la tolva, que por acción de rotación del tornillo entra dentro del cilindro, que tiene un recubrimiento superficial endurecido y rugoso. El torni-

llo gira accionado por el motor reductor, donde la masa va avanzando por la longitud del tornillo y poco a poco se ve sometido a menor espacio, por tanto va aumentando la presión, ya que el volumen del canal formado por las espiras y el cilindro se va haciendo cada vez menor.

En la parte final se encuentra la boquilla con el cono variable o un mecanismo distinto que proporcione la posibilidad de variar la sección de salida de la torta. Debido a la obstrucción que realiza la boquilla, la presión aumenta aún más haciendo que la grasa que se encuentra en las células de las semillas tenga que salir de la masa y posteriormente por los orificios que están dispuestos en la periferia del cilindro. La masa que se encuentra ya exprimida, sale por la abertura que está al final del cilindro, para ser recogida por una bandeja. La grasa extraída igualmente es recogida en un depósito que se encuentra en la parte baja de la extrusora, de donde posteriormente se le recoge, para ser filtrada de partículas menores.

Las partes de la prensa extrusora se pueden observar en la Figura 5.3.

Figura 5.3 Prototipo de prensa extrusora para grasas de Theobroma



5.3 Evaluación del posible uso de grasas a partir de almendra de *T. grandiflorum*

En el sector agrícola, las enfermedades producidas por los hongos causan anualmente considerables pérdidas en la productividad que se ven reflejadas a nivel económico (Rivera y Cruz, 1997). Por esta razón es fundamental la búsqueda de antifúngicos y antimicrobianos que contribuyan a solucionar dicho problema y que no aumenten la contaminación ambiental, hecho que comúnmente está asociado a los agentes utilizados tradicionalmente para dicho fin (Guevara et al. 2000).

Por encima del 30% de las pérdidas en la producción mundial del cacao se deben a enfermedades fúngicas ocasionadas principalmente por fitopatógenos tales como (Meléndez, 1999):

- *Phytophthora spp*: Pudrición negra.
- *Moniliophthora roreri*: Responsable de un 90% de las pérdidas de los frutos de algunos países de América Tropical.
- *Crinipellis pernicioso*: Causa cerca del 90% de las pérdidas de los cultivos, atacando tejidos meristemáticos y pudrición joven. Escoba de cojín.

Estudios han demostrado que componentes presentes en plantas superiores pueden ser activas contra hongos y bacterias patógenos tanto de plantas como animales y el hombre (Rivera & Cruz, 1997); por tal razón, es de gran interés evaluar el posible efecto microbicida de grasas totales de semillas de *Theobroma* sobre ciertas bacterias y hongos.

En el estudio de la actividad antifúngica de la grasa (previamente disuelta en dimetil sulfóxido DMSO) de *Theobroma bicolor* y *Theobroma grandiflorum*, se evidenció ausente efecto antifúngico con respecto a los hongos *Pestalotia sp*, *Botrytis sp*, *Curvularia sp*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Nigrospora sp* y *Penicillium sp*.

Con respecto a la actividad antibacteriana el método de sensibilidad por difusión en disco (previamente disuelta en DMSO) y una batería mínima de cepas de microorganismos que incluyó *Staphylococcus aureus* como bacteria grampositiva, *Escherichia coli* como gramnegativa y 3 bacterias fitopató-

genas que incluyeron *P. fluorescens*, *Erwinia sp* y *Xanthomonas sp*, se evidencia una leve actividad antibacteriana como se presenta en las figuras 5.1-5.3 y en la tabla 5.12 excepto una mínima actividad inhibitoria de la grasa de *T. bicolor* frente a *P. fluorescens*. Se concluyó que las grasas frecuentes de semillas de *T. grandiflorum* y *T. bicolor* no presentan actividad microbicida.

Tabla 5.12 Efecto inhibitorio de la grasa de semillas de *Theobroma grandiflorum* y *T. bicolor*

Microorganismo	MUESTRA			
	<i>T. bicolor</i>	<i>T. grandiflorum</i>	<i>T. grandiflorum</i>	<i>T. bicolor</i>
EXTRACTO PURO				
<i>E. coli</i>	N.A	N.A	N.A	N.A
<i>S. aureus</i>	N.A	N.A	N.A	N.A
<i>P. fluorescens</i>	N.A	N.A	N.A	N.A
<i>Erwinia sp</i>	N.A	N.A	N.A	N.A
<i>Xanthomonas sp</i>	N.A	N.A	N.A	N.A
EXTRACTO DISUELTO EN DMS (Cf: 10mg/mL)				
<i>E. coli</i>	N.A	1 mm	N.A	N.A
<i>S. aureus</i>	N.A	N.A	N.A	N.A
<i>P. fluorescens</i>	2 mm	N.A	N.A	1 mm
<i>Erwinia sp</i>	N.A	1 mm	N.A	N.A
<i>Xanthomonas sp</i>	N.A	N.A	N.A	N.A

N.A: No presentó Actividad

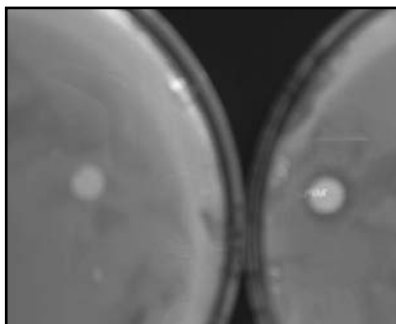
Foto 5.1 *E. coli* en agar Mueller-Hinton (izquierda, control-DMSO; derecha, *E. coli*+grasa disuelta de *T. grandiflorum* 10mg/ml)



Foto 5.2 *Erwinia sp* en agar Mueller-Hinton en presencia de grasa disuelta proveniente de semillas de *T. grandiflorum* 10mg/ml)



Foto 5.3 *P. fluorescens* en agar Mueller-Hinton en presencia de grasa disuelta proveniente de semilla de *T. bicolor* 10mg/ml.



5.4 Aprovechamiento bioenergético de las cáscaras de Copoazú y Maraco

Como resultado del creciente proceso productivo de la industria alimenticia se han presentado cantidades importantes de residuos que debido a su procedencia poseen características para ser aprovechados en otro tipo de procesos que contribuyan al sostenimiento económico de la industria. Las cáscaras provenientes del copoazú y maraco presentan una cantidad significativa de material no aprovechado durante su transformación en productos de mayor valor agregado; esta cáscara representa el 46.47% del fruto, con una cantidad total de producción por cosecha de 144000 kg fruto/cosecha en 20 hectáreas de plantación, es decir, 44160 (kg cáscara/cosecha), que son desaprovechados.

Por sus características fisicoquímicas (Tabla 5.13), se ha explorado el aprovechamiento energético de la biomasa proveniente de las cáscaras de copoazú y maraco, para el proceso de gasificación. El bajo contenido de volátiles de estas cáscaras es favorable porque facilita el control operacional y la economía de costos en el proceso de gasificación; los porcentajes de carbón fijo obtenidos indican que ambos materiales pueden ser utilizados en la fabricación de carbón activado debido a su alto contenido de carbono.

El poder calorífico de ambos es muy cercano al del carbón (5800 cal/g), en el copoazú es de 4912 cal/g en base seca y en el maraco de 4753 cal/g en base seca lo cual sugiere que pueden ser utilizados como combustibles. Los bajos niveles en el contenido de azufre en comparación con otros combustibles que poseen elevados niveles de este elemento, principal causante de la contaminación, es una innegable ventaja comparativa en pro de

la conservación del medio ambiente. Así mismo tanto el copoazú como el maraco presentan porcentajes elevados de contenido de carbono, bajo contenido de nitrógeno y un porcentaje de oxígeno de 37.75 % y 38.26 % respectivamente, lo que podría favorecer la presencia de reacciones de descomposición del material sólido en gases con considerable contenido energético.

Tabla 5.13 Análisis proximal y elemental de las cáscaras de Copoazú y Maraco

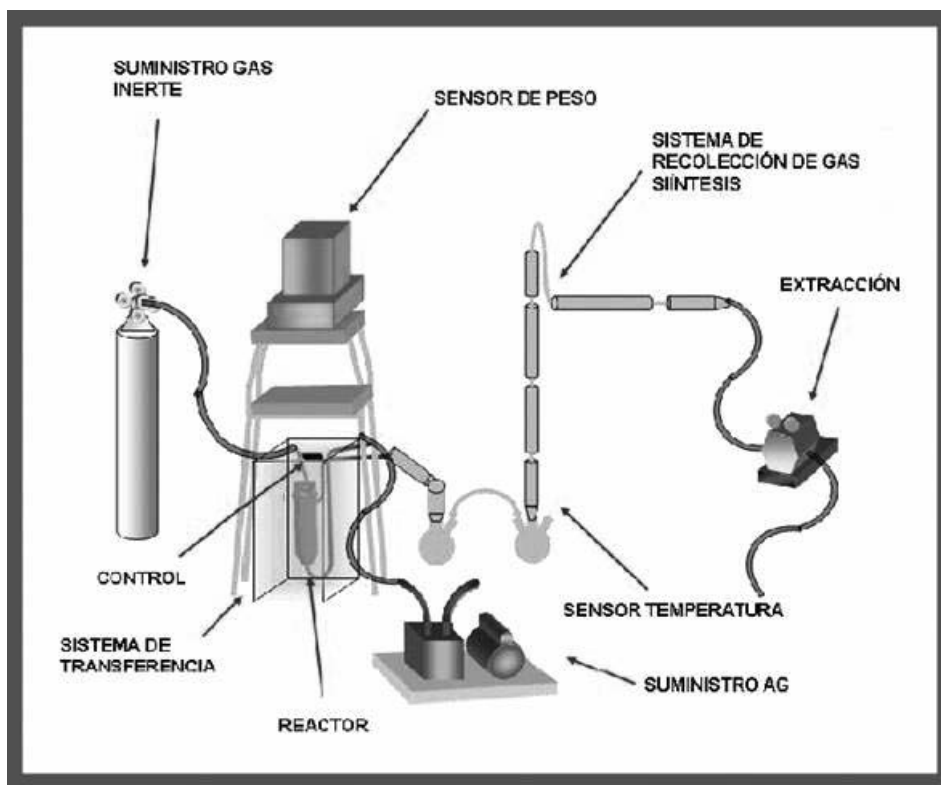
MATERIAL	ANÁLISIS		
		Base húmeda	Base seca
Copoazú	Análisis Próximo		
	Humedad residual % en peso	6.23	-
	Cenizas % en peso	2.01	2.14
	Material volátil % en peso	40.60	43.30
	Carbón fijo % en peso	51.16	54.56
	Análisis Elemental	Base húmeda	Base seca
	Azufre % en peso	0.08	0.09
	Carbono % en peso	50.40	53.75
	Hidrógeno % en peso	6.27	5.94
	Nitrógeno % en peso	0.31	0.33
	Oxígeno (calculado) %en Peso	40.93	37.75
Poder calorífico cal/g	4606	4912	
Maraco	Análisis Próximo		
	Humedad residual % en peso	4.43	-
	Cenizas % en peso	2.50	2.62
	Material volátil % en peso	39.96	41.81
	Carbón fijo % en peso	53.11	55.57
	Análisis Elemental	Base húmeda	Base seca
	Azufre % en peso	0.10	0.10
	Carbono % en peso	50.40	52.74
	Hidrógeno % en peso	6.08	5.84
	Nitrógeno % en peso	0.42	0.44
	Oxígeno (calculado) %en Peso	40.50	38.26
Poder calorífico cal/g	4542	4753	

La gasificación, es un proceso de descomposición térmica a temperaturas superiores a los 800°C mediante el cual, el material combustible sólido se transforma en una mezcla gaseosa de mayor potencial energético que contiene hidrógeno, dióxido de carbono, monóxido de carbono, vapor de agua y metano entre otros. El proceso es llevado a cabo en presencia de un agente gasificante que puede ser vapor de agua, aire, dióxido de carbono u oxígeno (Gómez, 2002, citado por Barón y Villada, 2005).

En un montaje a nivel laboratorio de un reactor de lecho fijo en contracorriente (Figura 5.4) se estudió el efecto de los diferentes factores que afectan la producción del gas de síntesis (producto de las reacciones ocurridas en el proceso) tales como la altura del lecho (altura del material dentro del reactor), el diámetro de partícula (tamaño de las partículas de la biomasa)

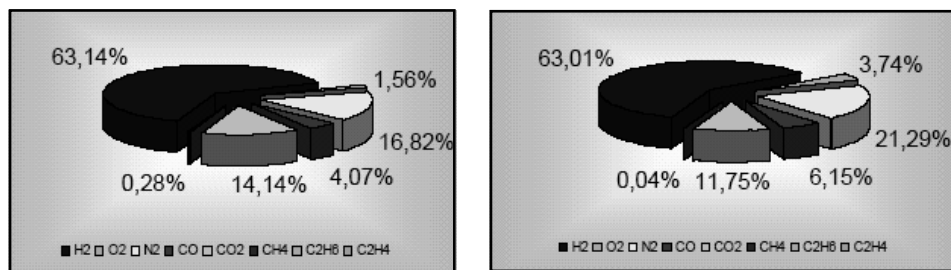
y el tipo de agente gasificante (composición de la atmósfera que rodea el producto y con el cual se produce la reacción), tipo de material (diferencias entre los procesos de Copozú y maraco) en un proceso de gasificación.

Figura 5.4 Componentes del equipo de gasificación



El estudio de la incidencia de estos factores permitió obtener una mezcla combustible con un alto contenido de hidrógeno (63%) elemento que contribuye ostensiblemente al poder calorífico de la mezcla obtenida, también se presentan cantidades importantes de monóxido de carbono (6%), dióxido de carbono (14%), nitrógeno, oxígeno y cantidades pequeñas de hidrocarburos ligeros como metano, etano y etileno. (Figura 5.5)

Figura 5.5 Composición en volumen de la mezcla de gases obtenida



Los datos obtenidos permitieron deducir que la gasificación de cáscaras de copoazú y maraco son resultados positivos para la producción de un biocombustible gaseoso compuesto en su mayoría por hidrógeno, el cual podría ser utilizado para la generación de energía eléctrica o calórica en la región de la amazonia colombiana.

5.5 Aprovechamiento de la pulpa extraída de los frutos de especies promisorias del género *Theobroma* en la Amazonia colombiana

5.5.1 Características de los jugos y pulpas

Las pulpas y los jugos se caracterizan por poseer una variada gama de compuestos nutricionales que les confieren un atractivo especial a los consumidores. Están compuestas de agua en un 70 a 95% pero su mayor importancia desde el punto de vista nutricional es su aporte a la dieta de vitaminas, minerales, aminoácidos, enzimas, carbohidratos y fibra. En particular cada especie de pulpa posee compuestos que la hacen diferente en sus características fisicoquímicas, gustativas y en sus rendimientos (Camacho, 1994).

Las características de las pulpas y jugos tenidas en cuenta en la legislación Colombiana son las organolépticas, las fisicoquímicas y las microbiológicas. Las características organolépticas son las que se refieren a las propiedades detectables por los órganos de los sentidos, es decir, la apariencia, color, aroma, sabor y consistencia. La apariencia de los jugos o pulpas debe estar libre de materias extrañas, admitiéndose una separación en fases y la presencia mínima de trozos y partículas oscuras propias de la fruta utilizada. La mayor separación de fases se produce por el tamaño grande de las partículas que componen la pulpa, que a su vez depende del diáme-

tro del orificio del tamiz que se empleó para la separación de las semillas durante el despulpado (Camacho, 1994).

Igualmente se presenta separación de fases al dejar las pulpas en estado crudo, es decir, sin aplicar ningún tratamiento térmico que inactive las enzimas, causantes de la hidrólisis de pectinas y posterior formación de sales que precipitan. Esta precipitación es la que produce un líquido de apariencia mas transparente en la parte superior y opaca en la inferior.

La presencia de partículas oscuras en la pulpa se puede deber a la ruptura de semillas de color oscuro durante el despulpado, un caso típico se presenta en el Maraco. También es debido a la presencia de manchas oscuras en la piel de la fruta que pueden pasar a la pulpa, este caso puede presentarse en el Copoazú. El color y olor deben ser semejantes a los de la fruta fresca de la cual se ha extraído. El producto puede tener un ligero cambio de color, pero no un color extraño debido a una alteración o elaboración defectuosa.

Otras características exigidas para las pulpas son las fisicoquímicas. La legislación Colombiana establece condiciones de acidez y de sólidos solubles para las pulpas de frutas más comunes en el mercado nacional. En el caso de las pulpas de Copoazú y Maraco el instituto SINCHI en convenio con el ICTA de la Universidad Nacional y La Universidad de la Amazonia en Florencia, Caquetá, han propuesto algunas condiciones de acidez y sólidos solubles para estas pulpas (tabla 5.14).

Tabla 5.14 Características de los productos obtenidos a partir de Copoazú y Maraco

PRODUCTO/ CONDICIONES FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLOGICAS	COPOAZÚ					MARACO				
	pH	Acidez (%)	SST	Mesófilos Ufc/g	Hongos y	pH	Acidez (%)	SST	Mesófilos Ufc/g	Hongos y
					Levaduras Ufc/g					Levaduras Uffc/g
PULPAS	3.30	2.10	6.90	100	400	7.72	0.0299	11.1	234X10 ³	3.7X10 ³
NÉCTAR	3.20	0.79	14.0	940	<10	3.73	0.24	11	<10	40
MERMELADA	3.30	0.74	65	-	-	3.0	2.05	68	<10	<3
DULCE	3.30	0.78	80	-	-	-	-	-	-	-
SALSA	-	-	-	-	-	3.00	1.35	55	<10	10-

Fuente: Hernández y Barrera, 2004

En el caso de acidez titulable establece los niveles mínimos de ácido que debe poseer una pulpa, expresados en porcentaje masa/masa de ácido cítrico anhidro. Con esta medida se puede deducir el grado de madurez de la fruta que se empleó o si la pulpa ha sido diluida. En otros países se solicita la presencia de iones (cationes y aniones) propios de determinada fruta, el contenido de proteína, y algunos aminoácidos que se encuentren en ciertas pulpas. También se exige un nivel mínimo de sólidos disueltos o solubles determinados por la lectura refractométrica a 20C° o grados Brix, el valor de este parámetro permite igualmente deducir el grado de madurez de la fruta o si ha sido diluida (Camacho, 1994)

Las características microbiológicas de las pulpas también están normatizadas. Se aceptan ciertos niveles de contaminación por algunos microorganismos que comúnmente pueden desarrollarse en este tipo de alimento. Las determinaciones más usuales son las de mesófilos, coliformes, esporas de clostridium sulfito reductor, hongos y levaduras. El nivel de estos microorganismos permitidos en las pulpas dependerá del tipo de proceso de conservación a que se haya sometido la pulpa.

Cuando la pulpa ha sido simplemente congelada después de su obtención, se le denomina pulpa cruda congelada. Los niveles de recuentos de microorganismos aceptados por la norma colombiana son los siguientes:

	Buena (*)	Aceptable
Mesófilos	20000	50000
Coliformes totales/g	9	< 9
Coliformes fecales/g	<3	<3
Esporas clostridium sulfito reductor/g	<10	<10
Hongos levaduras/g	1000	3000

(*) Índice máximo permisible para identificar el nivel de calidad

Cuando las pulpas o jugos han sido pasteurizados, los niveles de recuentos de microorganismos aceptados son los siguientes:

	Buena (*)	aceptable
Mesófilos	1000	3000
Coliformes totales/g		
Coliformes fecales/g	<3	
Esporas clostridium		
sulfito reductor/g	<10	
Hongos levaduras/g	100	200

De acuerdo con Camacho (1994) y con relación a los ingredientes aditivos que pueden emplearse en los jugos están:

- a. Los edulcorantes naturales tales como la sacarosa, dextrosa, jara-be de glucosa y glucosa en cantidad máxima del 5%.
- b. Antioxidantes como el ácido ascórbico limitado por las buenas prácticas de manufactura (BPM).
- c. Colorantes, según la lista de los permitidos en Colombia para alimentos.
- d. Conservantes, como el ácido benzoico y sus sales de calcio, potasio y sodio en cantidad máxima de 1 gramo (1000 mg) por kilo-gramo, expresado como ácido benzoico e igual para ácido sórbico. Cuando se empleen mezclas de estos, su suma no deberá exceder los 1250 mg/kg. Anhidrido sulfuroso en cantidad máxima de 60 mg/kg en productos elaborados a partir de concentrados.
- e. Acidulantes como el ácido cítrico, málico, tartárico o fumárico, también limitado por las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).
- f. Enzimas grado alimentario, de acuerdo con las permitidas en el Codex Alimentarius.

En cuanto al contenido máximo de metales pesados en mg/kg se norma-tiza así:

Cobre 5, Plomo 0.2, Arsénico 0.1 y estaño 150; este último presente en las latas que sirven de empaque.

Las condiciones de las pulpas de Copoazú y Maraco obtenidas para el concepto de Buenas Prácticas de Manufactura se muestran en la Tabla 5.14.

5.5.2 Mermeladas

La mermelada de fruta es un producto pastoso obtenido por la cocción y la concentración de una o más frutas, adecuadamente preparado con edulcorantes, sustancias gelificantes y acidificantes naturales, hasta obtener una consistencia característica. Desde el punto de vista tecnológico es recomendable que este producto tenga un mínimo de 65% de sólidos solubles para asegurar su conservación. Las diferentes legislaciones de los mercados internacionales establecen los porcentajes mínimos de frutas que deben contener los distintos tipos de productos (Camacho, 1994).

En Colombia la norma 285 de ICONTEC establece rangos que van de 40 al 20% para cierto grupo de frutas con las cuales se preparan las mermeladas de mayor consumo en nuestro país. Así mismo especifica sobre los tipos de sustancias gelificantes, acidificantes, edulcorantes y conservantes que pueden emplearse para la elaboración de mermeladas.

La conservación de este producto se basa en las características de la materia prima que se empleen y los varios efectos que se ejercen sobre los microorganismos potencialmente deteriorantes de las mermeladas.

En primer lugar la materia prima empleada son las frutas, y estas en su mayoría se caracterizan por ser ácidas con un valor de pH que oscila entre 2.8 a .8. Esta propiedad limita el desarrollo de microorganismos (MO) patógenos.

En segundo lugar, el tratamiento de concentración se hace a temperaturas que pueden variar entre 85 y 96°C bajo condiciones de Bogotá y durante periodos de mínimo 15 a 30 minutos. Este tratamiento térmico elimina formas vegetativas de MO y de esporas.

Un tercer efecto conservante es la alta concentración de sólidos solubles que alcanza el producto final. La alta presión osmótica que presenta un producto con 65 a 68 % de sólidos solubles a grados Brix, impide el desarrollo de MO. Aquellos microorganismos en contacto con la masa con-

centrada sufrirán una deshidratación por ósmosis. Esto se debe a la menor concentración de sólidos presente en el interior de las células microbianas, las cuales no podrán impedir la salida de su agua que tratará de diluir la solución exterior, en el presente caso, la mermelada.

Los ingredientes que se incluyen comúnmente en la elaboración de mermeladas son frutas, agentes edulcorantes, gelificantes y otros aditivos que permite la legislación en cuanto a calidad y cantidad. Las características de formulación de las mermeladas de Copoazú y Maraco se detallan en la Tabla 5.14

5.5.3 Salsas y dulces

El dulce de fruta tipo bocadillo es una pasta sólida obtenida por cocción de una mezcla de pulpa de fruta(s) y azúcares. Tradicionalmente en Colombia se prepara el de guayaba, aunque tecnológicamente se puede preparar a partir de cualquier fruta. El dulce puede estar moldeado en capas definidas de producto. Debe tener aroma, sabor y color característico y una consistencia que permita cortarse sin perder la forma y textura. No debe contener materias extrañas ni mostrar señales de revenimiento y su contenido en sólidos solubles totales debe ser 75°Brix (Camacho, 1994).

La estabilidad de este producto se debe fundamentalmente al pH ácido de la pulpa, al proceso térmico y a la alta concentración de sólidos que posee luego de su preparación. La pulpa de Copoazú tiene carácter ácido con pH de 3.7 - 4.0 lo que previene el desarrollo de bacterias patógenas en sus productos; durante el proceso de concentración se le calienta a temperaturas superiores a 90°C por un tiempo de 15 o más minutos y se alcanza un contenido de sólidos solubles totales de 75°Brix, lo que lo convierte en un producto estable y que puede considerarse como un alimento de humedad intermedia (IMF).

Los ingredientes básicos del dulce son pulpa de fruta y azúcares. Eventualmente se puede agregar acidulantes para ajustar el pH necesario para gelificación. La pulpa debe provenir de variedades de frutas cuyas características fisicoquímicas aporten un adecuado contenido en pectinas y sustancias aromáticas apropiadas; el estado de madurez de la fruta determinará el contenido de estas sustancias. El tamaño de partícula obtenido en la pulpa influirá en la textura y apariencia del bocadillo, el grano fino

permitirá obtener un producto de color uniforme y textura suave, el grano grueso dará un bocadillo con puntos negros y textura áspera.

Las Salsas son productos formulados a base de una gran gama de ingredientes que se mezclan en proporciones que dependerán del gusto de los procesadores y la apreciación sobre la demanda de los consumidores. Los ingredientes son básicamente los empleados en las mermeladas, sólo que su concentración de sólidos solubles es menor (30 a 60%). Se utilizan como aderezo, acompañamiento de platos y aportadores de sabor y aroma (López, 1975).

Las salsas obtenidas a partir de pulpa de frutas a las que se les agrega agentes edulcorantes, espesantes y conservantes. El producto es adicionado a derivados lácteos como helados o yogur y en cantidades adecuadas, comunican sabores y colores atractivos, disminuyen el grado de oxidación de superficies expuestas y disminuyen el punto de congelación en los helados favoreciendo la formación de pequeños cristales de hielo, en virtud de su alta concentración de sólidos solubles (Camacho, 1994).

Por su naturaleza no son autoconservantes, pues su cantidad de agua es muy alta para conservación y requieren, entonces, de un tratamiento térmico y un envase hermético para su conservación por períodos de 1 a 2 años (FAO-TCA, 1995). Se pueden preparar de cualquier fruta, prefiriéndose aquellas que brindan colores, aromas y sabores atractivos, como es el caso de la mora, el maracuyá, la piña y la fresa.

Entre los agentes espesantes se prefieren los almidones, que al enfriar son fluidos, transparentes y estables en medio ácido. Las gomas son menos estables a pH ácido. Unos espesantes gelifican, otros estabilizan las suspensiones como en los néctares. Las pectinas, por su parte, son espesantes naturales en las frutas. Las características de las salsas obtenidas a partir de pulpas de Copoazú y Maraco se muestran en la Tabla 5.14.

5.6 Extracción y caracterización fisicoquímica de los aceites contenidos en las semillas de Copoazú y Maraco y su posible utilización como fuentes alternativas en la industria alimenticia

Los aceites y grasas han sido reconocidos como nutrientes esenciales tanto en las dietas animales como en la humana. Constituyen fuente de energía, aportan ácidos grasos esenciales (precursores de importantes hormonas, las prostaglandinas), influyen en gran medida sobre la sensación de saciedad tras la comida, transportan vitaminas liposolubles y hacen los alimentos mas apetitosos (Ziller, 1996).

Dado que las características de las diferentes fuentes de grasas y aceites son muy variadas, se ha puesto gran interés en el desarrollo de los procesos de extracción cuyo principal objetivo es el de obtener la grasa o el aceite de tal forma que estos no se vean alterados significativamente y en lo posible libres de cualquier impureza indeseable.

Generalmente las grasas vegetales se obtienen extrayendo el aceite con solventes o exprimiendo la semilla oleaginosa mediante prensado. Las almendras de copoazú y maraco una vez fermentadas, secas y molidas se les extrae el aceite con un solvente tipo hexano, el cual posteriormente es desgomado, refinado, blanqueado y desodorizado. Al producto aquí obtenido se le realiza las pruebas fisicoquímicas que se presentan en la Tabla 5.15 (Lozano y Rozo, 1997).

Tabla 5.15 Comparación de las propiedades fisicoquímicas de los aceites de maraco y copoazú con algunos aceites comerciales

PRUEBA	Maraco	Copoazú	Cacao	Mantequilla Shea	Aceite de palma	Aceite de Soja
G	0,8907	0,8887	0,8600	-	0,930	0,920
n (40°C)	1,4521	1,4581	1,4055	-	1,451	1,474
P.f	36,500	33,600	28,000	37,00	3,000	9,000
Viscosidad	0,0461	0,0455	-	-	-	-
I.A	7,1000	0,8900	1-4	-	0,300	0,300
I.I	27,380	36,200	37,000	58,00	15,00	130,0
I.S	196,12	193,57	195,00	185,0	250,0	197,0
M.I	1,1200	1,3900	>1	3-10	0,800	1,500

G: gravedad específica a 50°C. n: índice de refracción. P.f: punto de fusión °C. Viscosidad en Pa*s. I.A: índice de acidez (mg KOH*g⁻¹). I.I: índice de yodo (% en peso de yodo absorbido). I.S: índice de saponificación (mg KOH*g⁻¹ de muestra). M.I: materia insaponificable.

FUENTE: Lozano y Rozo, 1997.

Teniendo en cuenta los resultados se encuentra que los aceites obtenidos de copoazú y maraco presentan características semejantes a los de la manteca de cacao.

Los elevados valores del índice de acidez para ambas muestras son el resultado de la naturaleza de cada una de las especies, aunque en general este índice aumenta posterior a la operación de desgomado y/o desodorización producto de las altas temperaturas a las cuales se lleva a cabo estas operaciones (85°C y 200°C respectivamente). Este índice puede ser corregido optimizando las diferentes etapas de procesamiento.

5.7 Estudio preliminar del establecimiento *In vitro* de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) como alternativa de conservación y recuperación de materiales promisorios con potencial económico

El copoazú se caracteriza por presentar alta variabilidad, alta incidencia de plagas, enfermedades, ausencia de programas de mejoramiento y semillas recalcitrantes. En este contexto el cultivo de tejidos y en particular la propagación *in vitro* se presenta como una herramienta para la recuperación de materiales de importancia económica y para la conservación de germoplasma.

Los estudios de micropopagación en estas especies son escasos, las investigaciones en el género *Theobroma* han estado orientadas principalmente a *Theobroma cacao*; sin embargo, en Brasil se han desarrollado varias investigaciones en las cuales se ha mostrado la capacidad de diferentes explantes de Copoazú en formar callos y en la diferenciación de estructuras embriogénicas; Janick y Whipkey en 1988 lograron embriogénesis indirecta a partir de embriones inmaduros.

Ferreira *et al* (2001 y 2002) evaluaron diferentes concentraciones de auxina y medio líquido para la inducción de callos en tejidos embrionarios. Así como el efecto de la concentración de sales y sacarosa y la renovación del medio de cultivo en ejes embrionarios como una alternativa para la propagación de la especie.

Ledo et al (2002) evaluaron diferentes explantes y diferentes condiciones de cultivo para la inducción de embriones somáticos. Ferreira (2004) realizaron un estudio para la introducción de los genes reporteros C1 y R' que sintetizan antocianina en segmentos de hoja de Copoazú.

El presente trabajo se realizó con el fin de desarrollar ensayos preliminares para el establecimiento *in vitro* de las accesiones más promisorias del banco de germoplasma. La investigación se orientó a la obtención de protocolos reproducibles para el establecimiento *in vitro* de *Theobroma grandiflorum* usando para ello diferentes explantes, medios de cultivo y condiciones de incubación. Se usaron como fuente de explante: embriones cigóticos, yemas de segmentos nodales de plántulas y hojas.

Los árboles seleccionados como fuente de material fueron los que presentaron buenas características de crecimiento y desarrollo y buen estado fitosanitario. Se estableció el protocolo de desinfección de semillas para luego con las plántulas obtenidas realizar los ensayos para la inducción de embriones somáticos.

Los estudios para el establecimiento *in vitro* se realizaron con plántulas porque en esta especie no se han obtenido resultados positivos con el uso de estacas y de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* a partir de plantas adultas.

Desinfección de semillas de *T. grandiflorum*

La estandarización del protocolo de desinfección es uno de los pasos más complejos en el establecimiento *in vitro* por la ocurrencia de microorganismos en la superficie de los tejidos o en su interior, o en ambas partes. Los procesos para su eliminación normalmente se establecen empíricamente y se deben ajustar para cada especie y para cada caso en particular, porque puede depender de: i) la fuente de explante, ii) forma como se colectó, transportó y manipuló el material vegetal, y iii) ubicación del explante en la planta entre otros. A continuación se describe el protocolo estandarizado para las semillas de *T. grandiflorum*:

Se colectan frutos maduros de *T. grandiflorum* y se extraen las semillas las cuales se deben empacar en bolsas plásticas con aserrín para evitar la desecación, no se deben refrigerar para evitar daños en los embriones, ni exponer a altas temperaturas porque se produce fermentación.

En el laboratorio las semillas se lavan con agua corriente, se retiran los restos de pulpa y se sumergen en una solución de Pursue 10ml/L durante 1 hora, luego se colocan en alcohol antiséptico (Etanol 70%) por 5 minutos y a continuación en hipoclorito de sodio (NaClO 5.25%) 1 hora.

Después de la aplicación de cada uno de los agentes desinfectantes se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril por 5 min. con el propósito de eliminar los residuos; todo el proceso se realiza en agitación constante (100 rpm). Posteriormente, se llevan a la cámara de flujo laminar para sembrar una semilla por contenedor en el medio de cultivo Murashige & Skoog (M&S) que contiene 30 g/L de azúcar, Gelrite 2.2 g/L y pH 5.8. Las semillas se incuban en oscuridad a una temperatura de 26°C en cámara de crecimiento.

Entre el día 8 y 13 después de la siembra se observa la aparición de la radícula que rompe el tegumento en la porción basal de la semilla, a los 23 días de siembra la raíz alcanza de 7 a 10 cm. de longitud y la presencia de raíces secundarias. Las siguientes fases se caracterizan por la presencia de nudos cotiledonales, desarrollo de gancho epicotiledonar y del epicótilo y la apertura del primer par de hojas verdaderas, la germinación es hipógea (Foto 5.1). Estos datos son similares a los descritos en el manual técnico del Copozú (FAO, 1999) y Müller y Carvalo (1997) reportan que el mayor porcentaje de germinación se registra entre los días 13 y 30.

Inducción de embriogénesis somática en *Theobroma grandiflorum*

La embriogénesis somática es un proceso morfogénico que conlleva al desarrollo de embriones somáticos, los cuales presentan las mismas etapas de desarrollo de los embriones zigóticos (globular, corazón, torpedo, cotiledonar), sin fecundación (Tran Thanh Van, 1980; Ammirato, 1983; Hartmann *et al.*, 1997). Los embriones somáticos al igual que los zigóticos presentan bipolaridad, es decir el desarrollo de un meristemo apical de tallo y un meristemo apical de raíz. En el caso de la propagación *in vitro* de especies leñosas las cuales no desarrollan raíces pivotantes cuando se propagan a través de organogénesis o cultivo de yemas caulinares, la embriogénesis se convierte en una alternativa para la solución de este problema.

Ensayos en segmentos caulinares

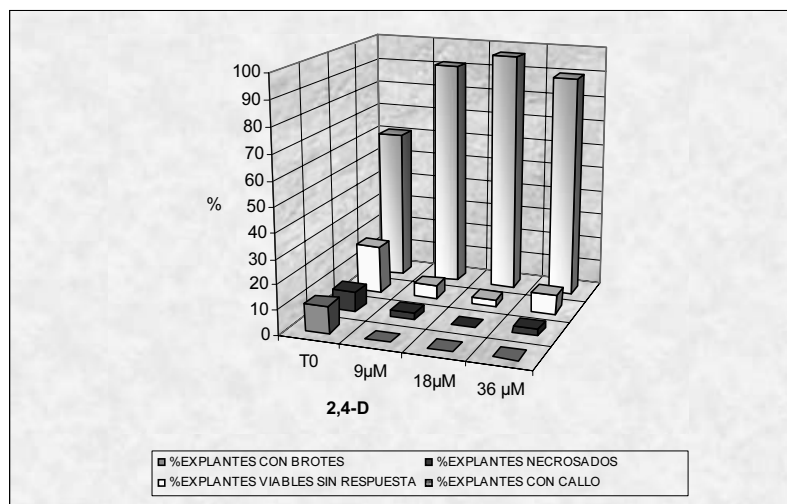
En estos tratamientos se usaron plántulas germinadas *in vitro* de aproxima-

damente 45 días de siembra cuando tenían completamente desarrollado el primer par de hojas. En cámara de flujo laminar se cortaron los segmentos caulinares en cinco fragmentos de aproximadamente 3 cm., se sembraron en forma horizontal sobre el medio de cultivo dejando la mitad del segmento de tallo en contacto con el medio de cultivo, se incubaron en oscuridad a una temperatura promedio de 28° C.

El medio de cultivo utilizado fue M&S con adición de Polyvinylpirrolidona (PVP 40) 2.5 g/L, caseína hidrolizada 100mg/L, gelrite 2,4 g/L y pH 5.8. Se evaluó el efecto del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4 D) en concentraciones de 9, 18 y 36 M.

En la Figura 5.6 se muestran los resultados obtenidos a los 90 días de cultivo. En el tratamiento control en un 11.1 % del total de los explantes se observó el desarrollo de las yemas del área basal del tallo (Foto 5.5 A). En todos los tratamientos incluidos el control se presentó la formación de callo, siendo el tratamiento 2 (2,4-D, 18 M) el que presentó el porcentaje más alto (97%). En todos los tratamientos se evidenció una alta viabilidad la cual disminuyó sensiblemente en el tratamiento 3 en el cual se usó la concentración más alta de la hormona (2,4-D 36 M).

Figura 5.6 Resultados tratamiento de inducción de embriogénesis somática en segmento caulinar de *Theobroma grandiflorum* a los 90 días de cultivo. (To: Control; T1: 9 µM 2,4-D; T2: 18 µM de 2,4-D y T3: 36 µM de 2,4-D



La formación de los callos en su mayoría se iniciaron en el área de corte y se extendieron hacia el centro del tallo, sin embargo en algunos se pueden observar pequeñas masas de callo distribuidas a lo largo de los mismos. En cuanto a la coloración de los callos algunos presentan color amarillo y tienen un aspecto gelatinoso y forma globular, otros son de color blanco y tiene aspecto granular, en otros en menor proporción se observan algunos puntos de color verde, es probable que estos últimos correspondan a callos embriogénicos; resultados similares fueron obtenidos por Hall y Collin (1974) en ramas ortotrópicas de *T. cacao*. En los segmentos que presentan los callos de mayor tamaño se presentó oxidación, este proceso es observado principalmente en el tratamiento de 2,4-D 36 M (Foto 5.5D).

Los resultados muestran claramente la alta frecuencia de formación de callos en este tipo de explante, esto se debe a que los segmentos caulinares son explantes con una alta capacidad morfogenética tanto en la formación de callos como de raíces, esto también se ha observado en otras especies como *Annona squamosa* en la cual en los estudios realizados con hipocótilos arrojaron resultados similares (Nagori y Purohit, 2004). De igual forma se pudo ver una respuesta diferencial de los explantes teniendo en cuenta si eran segmentos basales o distales; en los segmentos más cercanos a la raíz se inició la formación de callo de una forma más rápida y los callos alcanzaron un mayor tamaño, esta respuesta puede deberse a la variación de la concentración de auxina en las diferentes regiones del tallo. Un gradiente de respuesta también ha sido observado en epicótilos de Citrus, *Malus domestica* (Lemos y Blake) 1996 y *A. squamosa* (Nagori y Purohit, 2004).

Se pudo comprobar el efecto del 2,4-D en la inducción de callo en los segmentos caulinares los cuales se extendieron por toda la superficie del explante, siendo 18 M la dosis que mejores resultados arrojó, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ledo *et al*, (2002) y Ferreira (2001) los cuales usaron ejes embrionarios de Copoazú para la inducción de embriogénesis somática y obtuvieron la formación de callos y altos porcentajes de oxidación que afectaron la producción de embriones somáticos.

En los ensayos realizados se observaron altos porcentajes de oxidación después de 90 días de cultivo en presencia de la hormona. Algunos autores como Janick y Whikey (1988) afirman que altas concentraciones de 2,4-D pueden estimular la producción de callos, aumentar la producción de polifenoles e inhibir la formación de embriones.

La oxidación ocurre por la producción y liberación de compuestos fenólicos por parte de los tejidos, por la alta concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo y por la oxidación de polifenoles y quinonas (Pious y Ravindra, 1997, reportado por Ledo *et al*, 2002). A pesar de haber usado compuestos como el PVP 40 en el medio de cultivo este proceso se presentó particularmente en los callos de más de 60 días de cultivo.

Ensayo en Hojas

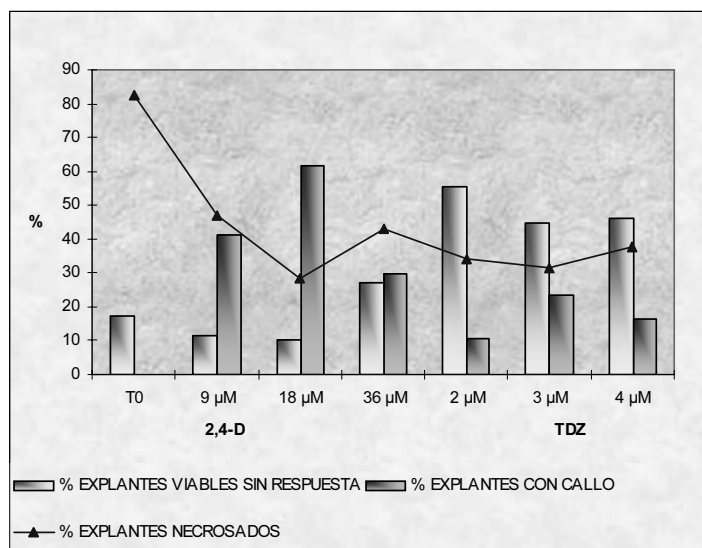
Se utilizó el primer par de hojas verdaderas (hojas completamente expandidas) de las plántulas germinadas en condiciones *in vitro*. Se sembraron discos de hoja de un diámetro de 1 cm se tuvo en cuenta que cada explante tuviera un segmento de la vena central de la hoja, se eliminaron los bordes, el ápice y la base de la hoja, se colocaron los fragmentos teniendo en cuenta que la parte abaxial quedara en contacto con el medio de cultivo.

Se utilizó el medio M&S con adición de PVP-40 2.5 g/L, caseína hidrolizada 100mg/L, gelrite 2,4 g/L y pH 5.8. Se realizaron seis tratamientos y el control en los cuales se evaluó el efecto del 2,4 D en concentraciones de 9, 18 y 36 M y el Thidiazuron (TDZ) en concentraciones de 2, 3 y 4 M.

En los tratamientos en los cuales se evaluó el efecto del 2,4-D se pudo evidenciar la formación de callo a los 30 días de cultivo; se presentaron dos tipos de callos unos de color blanco traslúcido de aspecto esponjoso y no friable y otros de color amarillo con masas celulares de aspecto globular; la formación de callo se inició principalmente en los bordes en donde se realizaron los cortes de las hojas y en las nervaduras centrales y secundarias de las hojas tanto en la parte abaxial como adaxial.

En la figura 5.7 se presenta que el tratamiento control To, no desarrolló callo en ninguno de los segmentos de hoja sembrados, sin embargo en los tratamientos con 2,4-D se logró inducir la formación de masas de callos siendo el tratamiento 2 (2,4-D, 18 M) el que registró el mayor porcentaje de formación de callo (61.5%), en el tratamiento 3 que corresponde al doble de la concentración del tratamiento 2 se disminuyó esta respuesta; si se comparan los resultados de estos tratamientos con los tratamientos 4, 5 y 6 en los cuales se evaluó el efecto de TDZ se obtuvieron porcentajes menores al 25 % en la formación de callo. Siendo el mejor tratamiento el 5 en el cual se usó una concentración de TDZ de 3 M.

Figura 5.7 Resultados tratamiento de inducción de embriogénesis somática en segmento de hoja en *Theobroma grandiflorum* a los 90 días de cultivo. (To: Control; T1: 9 μM de 2,4-D; T2: 18 μM de 2,4-D; T3: 36 μM de 2,4-D; T4: 2 μM de TDZ; T5: 3 μM de TDZ y T6: 4 μM de TDZ)



Los callos que se desarrollaron en los segmentos de hoja también presentaron diferencias en cuanto a la forma y estructura, la mayoría son de aspecto globoso y de color amarillo, otros son de color blanco de aspecto granular y por último se presentaron unos con puntos de color verde que podrían corresponder a los embriogénicos (Foto 5.6).

En los segmentos de hoja se pudo establecer que para la inducción de callos se requiere de la aplicación exógena de hormonas, como el 2,4-D ó TDZ; no obstante la formación de callo se logró en menor tiempo y en mayor porcentaje en explantes en los tratamientos en los cuales se usó 2,4-D. El 2,4-D induce divisiones celulares de forma desorganizada (Callos).

Aunque con los ensayos realizados no se logró la recuperación de embriones somáticos a partir de segmentos caulinares y hojas, se recomienda llevar a cabo nuevos ensayos en los cuales se incluyan otros reguladores de crecimiento que permitan el desarrollo y recuperación de embriones somáticos.

Siembra de ápices meristemáticos de plantas de *T. grandiflorum*

Se colocaron 30 ápices de aproximadamente 1 cm. de longitud con una o dos hojas y se sembraron en el medio de cultivo propuesto por Ferreira *et al* (2002) que corresponde a M&S adicionado con BAP 0.3 mg/L y ANA 0.5 mg/L.

De los 30 ápices sembrados se observó que después de 90 días de cultivo, el 33.33% presentaron oxidación y necrosis de los tejidos, el 66.67% de los explantes se encontraban viables, la coloración de las hojas fue normal; en un 33.33% de los explantes se desarrollaron pequeñas masas de callos en los puntos de corte o en el área donde entra en contacto la planta con el medio de cultivo.

El medio de cultivo y la concentración de hormonas probada para esta especie hasta la fecha ha mostrado ser efectiva para inducir el crecimiento y desarrollo de las plántulas de *T. grandiflorum* similar a los resultados obtenidos por Ferreira *et al.*, (2002) (Foto 5.7).

Foto 5.4 Plántula de *Theobroma grandiflorum* 30 días de cultivo

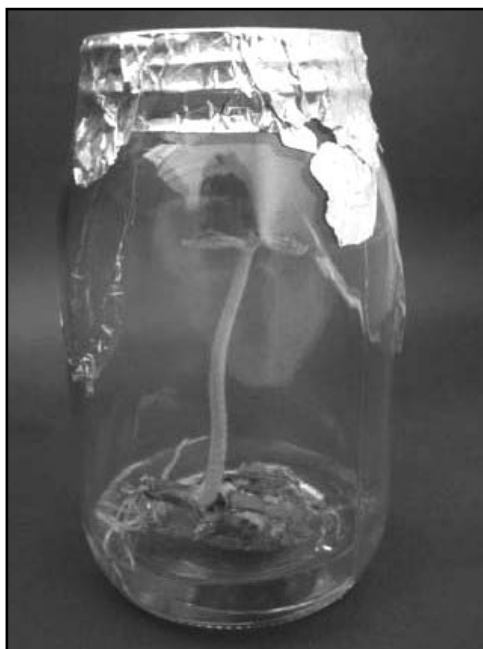


Foto 5.5 Resultados de inducción de embriogénesis somática en *T. grandiflorum* en segmento caulinar A) yemas laterales desarrolladas tratamiento 0 a los 90 días de cultivo; B) Inicio de la callo con 2,4 D 18 M, 60 días; C) formación de raíces y callos 2,4D 9 M, 90 días; D) Callo en tratamiento 2,4 D 36 M a los 90 días, se pueden observar áreas oxidadas.

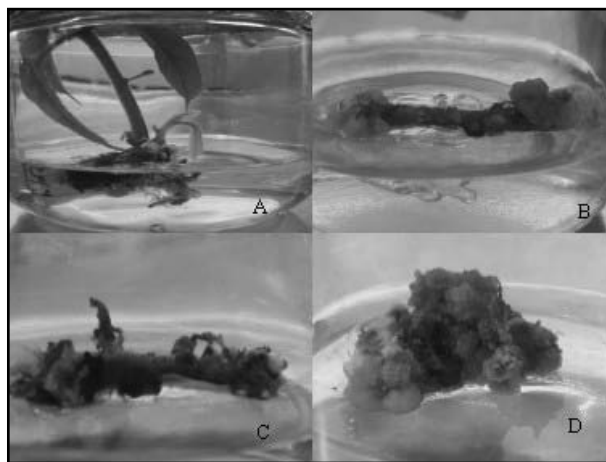


Foto 5.6 Resultados de inducción de embriogénesis somática en *T. grandiflorum* en segmento de hoja A) Segmento de hoja en el tratamiento control a los 90 días de cultivo, no hay ningún tipo de respuesta; B) Callo formado en el borde de la hoja tratamiento 2,4 D 4ppm; C) Callo formado en la nervadura central tratamiento TDZ 3ppm; D) Callo en tratamiento 2,4 D 8 ppm a los 90 días, se pueden observar áreas de color verde

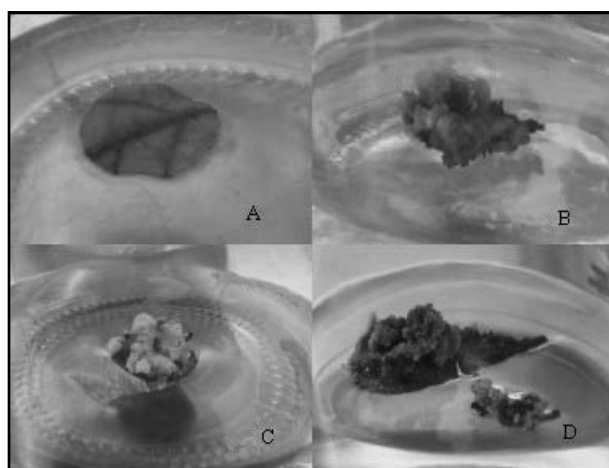


Foto 5.7 Apices meristemáticos de *T. grandiflorum* en medio de cultivo M&S adicionado con BAP 0.3 mg/L y ANA 0.5 mg/L



Referencias

Ammirato, P. V. 1983. Embryogenesis. En Evans, D. A. Sharp, W.R. Ammirato, P.V. y Yamada, Y. (eds) Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. V. 1p p 82-123

Barrera, A. 1999. Determinación de algunas propiedades fisicomecánicas de la semilla del maraco (*Theobroma bicolor* H.B.K) y obtención de bacalate. Tesis de Ingeniería de Alimentos. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Santa fe de Bogotá. 124 p.

Barón, M., Villada, W. A. 2005. Estudio de viabilidad técnica para la obtención de un biocombustible mediante la gasificación de cáscara copoazú y maraco a nivel laboratorio. Trabajo de grado. Universidad de América. Bogotá.

Camacho, G. 1994. Fundamentos de la Obtención de Conservas de Frutas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. P 3-25

Cruz, F. A. 1996. Determinación de algunas propiedades fisicomecánicas de la semilla del copoazú (*Theobroma grandiflorum* Wld Ex Spreng Schum) y obtención de pasta de copoazú. Tesis Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía, Bogotá.

FAO - TCA, 1995. COPOAZÚ (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spteng) Schum) cultivo y utilización, Manual técnico. A, & C Impresores, p 142.

Ferreira. M. das G. R., 2001. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal. 23 (3): 473-476.

Ferreira. M. das G.R., 2002. Resposta de eixos embrionarios de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) á concentração de sais, de sacarose e renovação do meio de cultivo. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal SP, 24 (1): 246-248.

Ferreira. M. das G.R., 2004. Introdução de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) usando biobalística. Revista Ciencia Rural, Santa María, 34 (1): 279-280.

Guevara, Y., Maselli, A., Sánchez, M. C. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre bacterias fitopatógenas. Informe de investigación. Manejo integrado de plagas. Venezuela.

Hartmann, H., D. Kester, F. Davies, and R. Geneve. 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. Sexta ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, USA. 770 pp.

Hernández, M. S. Barrera, J. A. 2004. Bases técnicas para el aprovechamiento agroindustrial de Especies Nativas de la Amazonia. Ed. Guadalupe Ltda. Bogotá. pp 70-92.

Janick, j.; Whikey, A.. 1988. Somatic embryogenesis in *Theobroma grandiflorum*. HortScience, Alexandria, Virginia, Horsci. 23: 807.

Ledo A.da S. y colaboradores. 2002. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura in vitro . Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal SP, 24 (3): 604-607.

Lemos, E.E.P. y Blake, J., 1996. Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamosa*. Plant Cell Tiss. Org.Cult. 46: 77-79.

Lozano, J. C., Rozo, L. A. 1997. Extracción y caracterización fisicoquímica de los aceites contenidos en las semillas de copoazú y maraco, y su posible utilización como fuentes alternativas en la industria de los aceites comestibles. SINCHI-ICTA-UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Santa fe de Bogotá

Meléndez, L. 1999. Microambiente, cantidad de esporas en el aire e incidencia del hongo *Moniliophthora roreri* bajo tres sistemas de manejo de sombra leguminosa en cacao (*Theobroma cacao*). Agrof. en las Améric. 6 (23).

Moshenin, N.N. 1970. Physical Properties of Plant and Animal Materials. Gordon and Beach Science Publishing USA.

Müller, C. H. Y Carvalho, J. E. U. de. 1997. Sistemas de propagação e técnicas de cultivo do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). In: Belém. Anais...Belém: Embrapa Amazônia Oriental/JICA, p. 57-75 (EMBRAPA Amazônia Oriental. Documentos, 89).

Nagori R. Y S. D. Purohit 2004. In vitro plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. *Scientia Horticulturae* 99: 89-98

Ospina, J. E. 1986. Propiedades Físicas, Mecánicas y Térmicas de Granos y Semillas. En: *Revista Latinoamericana ACOGRANOS*. Año 2, No. 2. Santa fe de Bogotá.

Pérez, J. E. 2004. Diseño de un Prototipo para la Extracción de Grasas de Almendras de Frutos del Género Theobroma. Tesis de pregrado. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Rivera, C. M. Cruz, A. G. 1997. Evaluación de la actividad antifúngica y antibacteriana de aceites esenciales de plantas superiores Colombianas. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Tran Thanh Van, K 1980. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. En Vasil I.K. (Ed) *Perspectives in plant tissue culture*. University of Calgary Press, Canada. P-37-48

Ziller, S. 1996. Grasas y aceites alimentarios. Zaragoza, España. Ed. Acribia. Pp 1-65.

