



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Perfil Aromático de Cacao Fino de Aroma Ecuatoriano

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Benítez Campoverde, Jonathan Andrés.

DIRECTOR: Figueroa Hurtado, Jorge Geovanny, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2015



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister

Jorge Geovanny Figueroa Hurtado.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Perfil Aromático de Cacao Fino de Aroma Ecuatoriano”, realizado por Jonathan Andrés Benítez Campoverde, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, tanto en el aspecto de forma y contenido, por cuanto se aprueba su presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2015

f).....

Mgtr. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado.

C.I

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Jonathan Andrés Benítez Campoverde declaro ser autor del presente trabajo de titulación: “Perfil Aromático de Cacao Fino de Aroma Ecuatoriano”, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo el Mgtr. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Benítez Campoverde Jonathan Andrés

C.I. 1105154940

DEDICATORIA

*El presente trabajo lo dedico a Dios, a mis abuelitos, en especial a mi abuelita **Celina** por ser una persona llena de valores y virtudes los cuales fueron inculcados en el diario vivir, a pesar de que ya no se encuentre con nosotros, siempre será el modelo a seguir de nuestra familia entera.*

A mis padres German Benítez y Silvia Campoverde, mi hermano Oscar y a mi tía Luz América por ser un ejemplo de lucha y ayuda constante ante las adversidades que se presentaron durante toda mi vida

A mi familia, amigos y compañeros que creyeron en mi capacidad, para poder salir adelante con esta carrera universitaria.

M.C.

D.E.C

Jonathan Benítez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y a mi familia por ayudarme en los momentos más difíciles de mi carrera, también a Yadi González, por su apoyo incondicional.

Expreso también mi agradecimiento al Mgtr. Jorge Geovanny Figueroa Hurtado, por haber compartido sus conocimientos para llevar a cabo presente trabajo de investigación y por la paciencia brindada.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por el financiamiento otorgado.

A los miembros del jurado Miguel Meneses y María del Cisne por su colaboración para culminar el presente trabajo.

Agradezco al Departamento de Industrias agropecuarias y de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, personal técnico J. Calva, A. Benítez por haber brindado las facilidades necesarias para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Jonathan Benítez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS:	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	4
1.1. Cacao.....	5
1.1.1. Historia del cacao.....	5
1.1.2. Variedad de cacao	6
1.1.3. Cultivo de cacao.....	6
1.2. Producción de cacao.....	6
1.2.1. Producción de cacao en Ecuador	7
1.3. Composición de cacao	8
1.4. Aroma de cacao	8
1.4.1. Compuestos volátiles	8
1.5. Compuestos volátiles del cacao	9
1.6. Tipos de extracción de compuestos volátiles.....	10
1.6.1. Microextracción en fase sólida	11
1.6.2. Microextracción en fase sólida estático	11
1.6.3. Microextracción en fase sólida dinámico	12
1.7. Cromatografía	13
1.7.1. Principio de la cromatografía	13
1.8. Cromatografía de gases y espectrometría de masas	14
1.9. Identificación de compuestos	14
CAPÍTULO II.....	16
2.1. Objetivo general	17

2.2. Objetivo específico	17
CAPÍTULO III.....	18
3.1. Muestras	19
3.1.1. Recolección de muestras	19
3.2. Microextracción en fase sólida	20
3.3. Método cromatográfico.....	21
3.4. Identificación de compuestos	21
3.4.1. Índice de Kovats.....	22
3.4.2. Índice de Similitud	22
3.5. Análisis estadístico.....	22
CAPÍTULO IV	23
4.1. Maduración de cacao	24
4.2. Concentración de compuestos de cacao.....	28
4.2.1. Concentración de alcoholes	28
4.2.2. Concentración de aldehídos y cetonas.....	29
4.2.3. Concentración de ácidos.....	29
4.2.4. Concentración de ésteres.....	29
4.2.5. Otros compuestos	30
4.3. Compuestos claves en cacao.....	30
CONCLUSIONES	34
RECOMENDACIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica del cacao	5
Tabla 2. Producción mundial de cacao	7
Tabla 3. Características físicas del cacao	19
Tabla 4. Compuestos volátiles de cacao.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de cacao en Ecuador	8
Figura 2. Proceso general de SPME estático.....	12
Figura 3. Fibra para microextracción en fase sólida.....	20
Figura 4. Microextracción en fase sólida estática.....	21
Figura 5. SPME-CG-MS	21
Figura 6. Compuestos volátiles identificados	27
Figura 7. Concentración de compuestos por grupos químicos.....	28
Figura 8. Concentración de limoneno	31
Figura 9. Concentración de 1-butanol-3-metil	31
Figura 10. Concentración de linalol.....	32
Figura 11. Concentración de butanal 3-metil.....	33
Figura 12. Concentración de 2-butanone-3-hidroxi	33

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Muestras procesadas de cacao	42
Anexo 2. Cálculo del índice de retención	42
Anexo 3. Compuestos volátiles de cacao.....	43
Anexo 4. Compuestos claves de cacao	47
Anexo 5. Cromatogramas de cacao.....	48
Anexo 6. Análisis estadístico de compuestos claves de cacao	49

LISTA DE ABREVIATURAS:

CG:	Cromatografía de gases
MS:	Espectrometría de masas
SPME:	Microextracción en fase sólida
Tr:	Tiempo de Retención
QM:	Índice de Similitud
min:	Minutos
DVB/CAR/PDMS:	Divinil benceno/carboxeno/polidimetil-siloxano
I-1:	Inmaduro 1
I-2:	Inmaduro 2
M-1:	Maduro 1
M-2:	Maduro 2
SM-1:	Sobre maduro 1
SM-2:	Sobre maduro 2
SM-3:	Sobre maduro 3
u.a:	Unidades de área
IK:	Índice de Kovats
IK':	Índice de Kovats referencial

RESUMEN

Se realizó el análisis del perfil aromático de cacao proveniente del cantón Pangui, provincia de Zamora, en diferentes estados de maduración (inmaduro, maduro y sobre maduro) mediante microextracción en fase sólida (SPME) y análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, usando una columna capilar DB-5ms. Se identificaron veinte y nueve compuestos a partir de siete muestras de cacao: diez alcoholes, ocho aldehídos-cetonas, cinco hidrocarburos, cuatro ésteres, un fenol y un ácido. Los compuestos 1-butanol-3-metil, limoneno estuvieron presentes en todos los estados de maduración. Compuestos aromáticos claves como: 3-metil-butanal, linalol, 2-butanone-3-hidroxi también fueron identificados. Aldehído-cetona fue el grupo químico con mayor concentración en estados inmaduros y maduros. El grupo alcohol fue el más abundante en el estado de sobre maduración.

Palabras clave: cromatografía de gases, espectrometría de masas, microextracción en fase sólida, cacao, maduración, SPME.

ABSTRACT

The aromatic profile analysis of cocoa in different stages of maturation (immature, mature and over –mature) from canton Pangui, province Zamora by solid phase micro extraction (SPME) and analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry using a capillary column DB -5ms . Twenty nine compounds were identified from 7 cocoa samples: ten alcohols, eight aldehydes ketone, five hydrocarbons, four esters, one phenol and one acid. Compounds 3-methyl-1-butanol, limonene were present in all stages of maturation. Aromatics keys compounds as: 3-methyl-butanal, linalool, 2-butanone-3-hidroxy were also identified. Ketone-aldehyde chemical group had the highest concentration in mature and mature stages. Alcohol was the most abundant group in the over mature stage.

Keywords: gas chromatography, mass spectrometry, solid phase microextraction, cocoa, maturation, SPME.

INTRODUCCIÓN

Ecuador ocupa el séptimo lugar en la producción a nivel mundial de cacao, pero es el primer exportador de cacao fino de aroma a nivel mundial, ocupando el 63 % de la producción (ANECACAO, 2015). La industria a nivel mundial es muy exigente, por lo que existen perspectivas a nivel internacional acerca de la categorización de *Theobroma cacao* L. estas son 'superior', 'ordinario' y 'fino de aroma' (Sukha *et al.*, 2008), por tal motivo es necesario conocer su perfil aromático, debido a que el mismo puede variar de acuerdo al genotipo, tipo de siembra, post-cosecha, fermentación. En Ecuador existen muchos sembríos de cacao, el aroma y sabor de la fruta varía de acuerdo a lugar donde es cultivado (ANECACAO, 2015; Belitz *et al.*, 2009). El linalol es un compuesto clave que ha sido encontrado en mayor proporción en el cacao fino de aroma ecuatoriano a diferencia de cacao proveniente de otros países (Ghana, Brasil, Costa de Marfil), le confiere un aroma floral (Portillo *et al.*, 2009).

El análisis de perfil aromático es muy complejo el cual necesita técnicas de extracción adecuadas, donde no haya una influencia directa en la forma de extracción sobre el contenido total de compuestos orgánicos volátiles, para lo cual la extracción de compuestos se la realizó mediante una técnica denominada SPME (microextracción en fase sólida por espacio de cabeza estático) acoplado a CG-MS.

En base a información bibliográfica y reportes de literatura se decidió analizar *Theobroma cacao* L. en diferentes estados de maduración, ya que existen reportes muy limitados acerca de componentes volátiles en estados de maduración de cacao (Portillo *et al.*, 2009).

El Departamento de Ciencias Agropecuarias y Alimentos busca definir el análisis de perfil aromático en cacao para la evaluación de los principales componentes químicos volátiles que definan la calidad nutricional y organoléptica.

CAPÍTULO I

1.1. Cacao

El término cacao proviene de las lenguas mayas o aztecas “cacahuatl”, son árboles donde su altura puede llegar hasta 15 metros, de hojas perennes, largas ligeramente gruesas que miden aproximadamente 20 cm, los frutos logran tener una longitud de 15 a 20 cm y un grosor de 7 a 10 cm, su peso es de hasta 500 g, la pared del fruto es gruesa, dura o suave, su color es verde cuando esta inmaduro, con la madurez su color cambia a rojo, amarillo o pardusco proporciona 50 semillas recubiertas de una masa mucilaginoso (pulpa), son ovaladas, aproximadamente 2 cm largo y 1 cm de ancho cada semilla presenta una cantidad considerable de grasa, el componente más activo es la teobromina, sus flores blancas son pequeñas, se producen en racimos pequeños (Moreno, 2012; Ramírez, 2013; Siedentopp, 2009), la clasificación botánica se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación botánica del cacao

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novak ex Takht
Superorden	Rosanae Takht
Orden	Malvales Juss
Familia	Sterculiaceae Vent.
Género	<i>Theobroma</i> L.

Fuente: TROPICOS (2015)

1.1.1. Historia del cacao

El cacao presenta una historia muy interesante, el uso del mismo se comenzó a dar alrededor del año 1100 a.C, probablemente para elaborar una bebida alcohólica, en el siglo XVII Car von Linneo le otorgó un nombre muy particular *Teobroma*, ‘Alimento de los Dioses’, es originaria de las selvas tropicales de Centro y Suramérica, con la cultura se ha extendido a las zonas ecuatoriales de África y Asia, estudios genéticos han determinado que el origen exacto del cacao es la Amazonía Brasileira. El cacao fue utilizado como calmante, estimulante y como moneda de cambio por los aztecas, en el siglo XIX fue introducido por Hernán Cortés al continente africano, que en la actualidad es el mayor productor de cacao a nivel mundial (Moreno, 2012; Ramírez, 2013).

1.1.2. Variedad de cacao

El origen histórico, fenotipo, lugar de cultivo, genotipo es relevante para poder clasificar al cacao. Los grupos genéticos principales son el criollo, forastero y trinitario (Motamayor *et al.*, 2008; Ramírez, 2013).

Cacao criollo de vainas largas y verdes en etapa de inmadurez, mientras que en la madurez su color es amarillo, rojo, o verde tilo con surcos profundos y grandes verrugas, sus semillas son color crema, redondas, 3.4 cm de largo y 0.7 cm de ancho, presenta tres tipos: criollo porcelana, criollo andino (frutos rojos y verdes), criollo pentágono (con cinco bordes prominentes en su fruto); el cacao forastero las vainas son cortas, sin verrugas, de color amarillo y lisas en la madurez, proveniente de la cuenca del Amazonas, su calidad es menor en comparación con el cacao criollo, por la presencia de taninos, sus semillas son púrpura, aplanadas, 2 cm de longitud y 0.7 cm de ancho, poca presencia de aroma, se produce mayoritariamente en Asia y África; finalmente el cacao trinitario un híbrido originario de las Islas Trinidad y se obtuvo del cruce (criollo x forastero), de cultivos altamente resistentes, sus vainas pueden ser largas o pequeñas, rojas o amarillas, su calidad es aceptable (ANECACAO, 2015; Motamayor *et al.*, 2008; Ramírez, 2013).

En Ecuador las variedades más representativas son: sabor arriba y CCN51 (clon del cacao criollo); el primero se caracteriza por sus fragancias y sabores frutales o florales, mientras que el segundo por la cantidad de grasa, caracterizado por su capacidad productivas que es cuatro veces mayor a las producciones normales (ANECACAO, 2015) .

1.1.3. Cultivo de cacao

El cultivo de cacao ha tenido un desarrollo tecnológico lento, por ciertas características de incompatibilidad genéticas y de cultivo que no permite el desarrollo del mismo en cualquier lugar del mundo ya sea por condiciones geográficas o climáticas. Estas condiciones son: la sensibilidad de la planta a la sequía, la necesidad de agua que oscila entre 1.500 y 2.500 mm en las zonas cálidas y 1.200-1.500 mm en las zonas más frescas; una temperatura apta para su desarrollo de 23° C mínima y una máxima de 32° C; en nuestro país se desarrolla con normalidad a una altitud de 1.000-1.400 m.s.n.m; finalmente el cultivo debe cumplir con características de sombreado y luminosidad (Ramírez, 2013).

1.2. Producción de cacao

La producción mundial de cacao ha ido incrementando últimamente, debido a las ganancias que puede generar el mismo, y ser una fuente principal de exportación, como producto elaborado o como fruto, como se conoce la variedad del cacao es muy significativa en el momento de exportarlo, la producción mundial de cacao según el tipo es la siguiente: Cacao

forastero 80 %; criollo 5-10 %, trinitario 10-15 % de la producción de cacao. Los principales productores de cacao son Costa de Marfil, Ghana, Nigeria, Indonesia, Brasil, Camerún, Ecuador y Malasia (ANECACAO, 2015; FAO, 2015; Ramírez, 2013), ver Tabla 2.

Tabla 2. Producción mundial de cacao

PRODUCCIÓN DE CACAO EN GRANO (Miles de Toneladas)				
CONTINENTES	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14
ÁFRICA	3224.2	2929.4	2833.0	3173.8
AMÉRICA	558.4	655.2	622.1	661.1
ASIA Y OCEANÍA	526.4	510.9	486.7	505.1
TOTAL	4309.0	4095.5	3941.8	4345.0

Fuente: FEDECACAO (2013)

1.2.1. Producción de cacao en Ecuador

Ecuador es considerado uno de los países megadiversos del planeta presenta una diversidad cultural y biológica muy importante, en comparación con otros países se lo puede considerar como el más biodiverso del mundo (BIOCOMERCIO, 2014). Ecuador por sus condiciones geográficas, climáticas y riqueza biológica, es el productor por excelencia de cacao fino de aroma (63 % de la población mundial), aunque la producción del mismo únicamente represente el 5 % a nivel mundial, la exportación del cacao en nuestro país se lo realiza de tres formas: granos, semielaborados y elaborados (ANECACAO, 2015). La pureza del cacao fino de aroma Ecuatoriano es del 75%, situándolo como el mejor cacao del mundo. Hasta el año 2014 en Ecuador se produjeron estimadamente 220.000 toneladas de cacao (FORBES, 2012; Quiroz y Amores, 2002). Este producto ha tenido además importantes contribuciones para la economía nacional: siendo uno de los principales productos de exportación (tercer producto agrícola exportado) (ANECACAO, 2015; Quingaísa y Riveros, 2007), ver Figura 1.

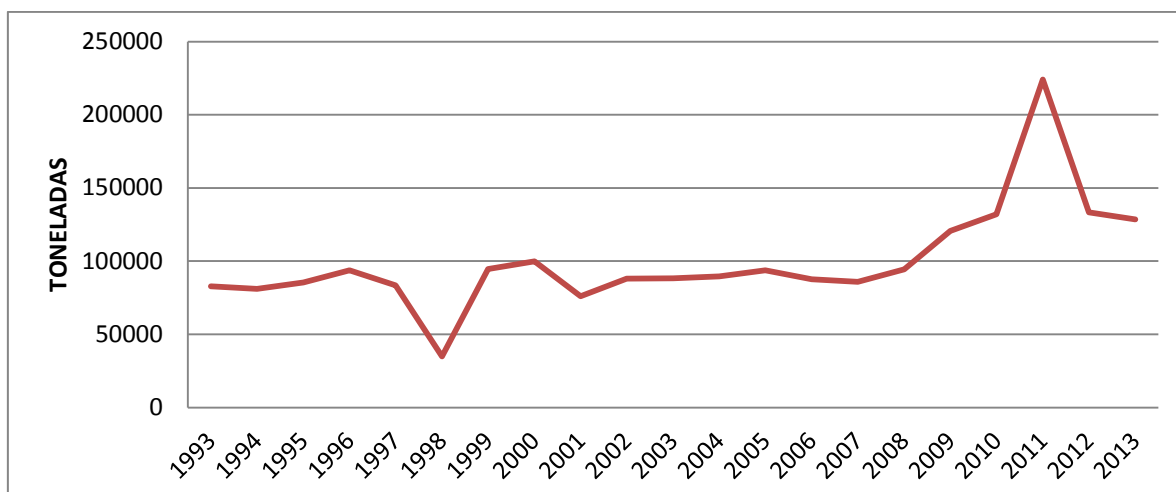


Figura 1. Producción de cacao en Ecuador

Fuente: FAO (2015)

1.3. Composición de cacao

La composición de cacao es muy variada, presenta proteínas, alcaloides, grasa, compuestos fenólicos. Las proteínas representan alrededor del 60 % del nitrógeno total, el nitrógeno no proteico se encuentra en porcentajes muy bajos alrededor de 0.03 % como amidas, 0.02 % amoniaco. Alcaloides como **teobromina** por lo general representa el 2.5 % del contenido total de granos secos, **cafeína** el 0.2 % y **teofilina**. El carbohidrato predominante es el almidón, los lípidos son muy abundantes, e importantes en el grano de cacao. Tres grupos principales de compuestos fenólicos como catequinas (37 %), antocianinas (4%) y leucoantocianinas (58 %) se encuentran en el cacao, y también existe la presencia de ácidos orgánicos (Belitz *et al.*, 2009).

1.4. Aroma de cacao

1.4.1. Compuestos volátiles

Son moléculas con puntos de ebullición bajos, su peso molecular se encuentra en rangos de 250-300 Da, pueden presentar varios grupos funcionales (aldehído, cetona, alcohol, amino) generalmente se encuentran en fase de vapor a temperatura ambiente, su polaridad es variable, la concentración de compuestos volátiles orgánicos fluctúa entre el tiempo y el espacio; en alimentos hay compuestos volátiles responsables del sabor y aroma, cuando son sometidos a procesos térmicos o de fermentación se han encontrado más de 800 compuestos volátiles, existen compuestos que son responsables de aromas característicos, estos son llamados “compuestos aromáticos claves”. Entre algunos de los compuestos

aromáticos claves se encuentran los siguientes: limoneno, benzaldehído, geranial, (R)-(-)-1-Octen-3-ol, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanone, 2-Acetil-1-pirrolina (Belitz *et al.*, 2009; Sampietro *et al.*, 2009; Elena Stashenko y Martínez, 2011).

1.5. Compuestos volátiles del cacao

El marketing internacional del cacao es muy importante a la hora de aceptarlo o rechazarlo, los granos de cacao se clasifican como: mayor, ordinario, fino de aroma (Sukha *et al.*, 2008). Al menos 500 compuestos están presentes en la fracción volátil del cacao lo que hace imposible duplicar el sabor y obtener un aroma similar, grupos químicos como: aldehídos, pirazinas, furanos, pirroles, fenoles terpenos, ésteres, ácidos, alcoholes terpénicos constituyen el aroma de cacao (Crafack *et al.*, 2014; Ducki *et al.*, 2008).

El genotipo del cacao, condiciones de crecimiento, proceso de fermentación contribuyen a la formación de compuestos volátiles, al momento de la extracción de estos compuestos se presentan problemas como: reacciones enzimáticas (hidrogenación de aldehídos, hidrólisis de éster, escisión oxidativa de ácidos grasos), reacciones no enzimáticas (reacciones de Maillard, hidrólisis de glucósidos, reacciones de tioles, aminas y aldehídos, deshidratación – reorganización de alcoholes), para evitar estas interferencias se deben realizar una preparación rápida de la muestra (Belitz *et al.*, 2009; Moreno, 2012).

La fermentación es un proceso crucial para la formación de compuestos volátiles, donde el grano fresco puede sufrir transformaciones como degradación de aminoácidos a péptidos, la metabolización de azúcares de la pulpa para producir ácidos volátiles y ácidos no volátiles, transformación o-quinonas por oxidación de polifenoles, hidrólisis de glucósidos (Bonvehí, 2005). Es fundamental el proceso de fermentación para que se puedan liberar precursores de sabor que ayudan a la formación de compuestos aromáticos (ácidos, alcoholes, ésteres y cetonas), el sabor y olor fermentativo se da por levaduras, bacterias de ácido láctico y bacterias del ácido acético; compuestos como isopropil acetato, etil acetato, 1-propanol, alcohol isoamílico, 2,3-butanediol, 2-feniletanol, dietil succinato son producidas gracias a microorganismos (*Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *Chevalieri*), el ácido butírico, isovalerico y propionico también se producen en este proceso (Bonvehí, 2005; Crafack *et al.*, 2014; Rodríguez-Campos *et al.*, 2012).

El tostado es una fase importante para generar aldehídos y pirazinas mediante la reacción de Maillard, también para la posible formación de DKPs (Dicetopiperazinas), síntesis de compuestos heterocíclicos, para disminuir la acidez acética y eliminar algunos compuestos volátiles no deseables en cacao (Afoakwa *et al.*, 2009; Bonvehí, 2005). Existen varios compuestos aromáticos clave en cacao que presenta una alta actividad aromática pertenecientes a grupos como aldehídos, pirazinas o ácidos, estos son 3-metilbutanal,

hexanal, etil 2-metilbutanoato, 2-isopropil-3 metoxi pirazina, 2-etil,3-5 dimetil pirazina, ácido 2-3 metil butanoico, ácido acético y fenil acetaldehído (Frauendorfer y Schieberle, 2008; Schnermann y Schieberle, 1997). Pirazinas como: 2-3 dietil -5-metilpirazina, trimetilpirazina, tetrametilpirazina, 2-3 etil-3,5–dimetilpirazina también contribuyen de manera notable al aroma del cacao (Moreno, 2012; Rodríguez-Campos *et al.*, 2012).

En el secado de cacao, los compuestos con altos niveles encontrados fueron: ácido acético e isobutírico, 3 metil-1-butanol-acetato, pentanal, 2,3 pentanodiona, 1,3 butanediol y 2,3 butanediol (Bonvehí, 2005). Otros compuestos que le dan a este fruto aromas florales, dulces, miel son: linalol, 2-fenil etanol, pirrol, 2-acetil pirrol, furfural, 3-fenil furano (Belitz *et al.*, 2009; Moreno, 2012).

En estudios realizados en cacao proveniente del este Africano se identificaron 42 compuestos: 9 aldehídos, 14 compuestos heterocíclicos, 5 cetonas, 4 alcoholes, 2 ésteres, 5 ácidos y 3 terpenos (Ducki *et al.*, 2008). También se han identificado metilpirazinas (2 metilpirazina, 2-3 dimetilpirazina, 2-6 dimetilpirazina, 2-5 dimetilpirazina, 2-3-5 dimetilpirazina) en cacao proveniente de Ghana y Ecuador (Perego *et al.*, 2004). En cacao tostado y sin tostar de Nigeria/Ghana se encontraron 9 compuestos volátiles los más sobresalientes fueron los ácidos (pentanoico, hexoico, benzoico, isopentanoico) y 83 compuestos volátiles básicos (metilpirazinas) (Carlin *et al.*, 1986).

La cantidad de compuestos volátiles en cacao fresco fue evaluada por Gill *et al.* (1984) obteniendo una baja cantidad de compuestos (17 compuestos), siendo el Estireno compuesto aromático que se encontraba en mayor concentración 68.8 %.

1.6. Tipos de extracción de compuestos volátiles

Existen varios tipos de técnicas para la extracción de compuestos volátiles como la destilación en vapor (**SD**) utilizada por Bonvehí (2005) para el de análisis de 31 muestras de cacao tostado y sin tostar de diferentes orígenes geográficos (Ghana, Camerún, Costa de Marfil, Ecuador y Brasil), Schmarr y Engel (2012) usaron la destilación-extracción simultánea con solvente (**SDE**) para el estudio de la estéreo-diferenciación del Linalol, evitando el riesgo de racemización de este compuesto, de igual manera Jinap *et al.* (1998) utilizaron esta técnica de extracción de compuestos volátiles para el analizar el efecto del tiempo y la temperatura de tostado en el cacao en el perfil aromático. Otra de las técnicas desarrolladas es la extracción asistida por radiación de microondas (**MWAE**), se utilizó para la determinación de teobromina y cafeína, con el fin de obtener un mejor rendimiento de los compuestos y su posterior identificación mediante HPLC(técnica instrumental más utilizada para el análisis de dichos compuestos) (González-Nuñez y Cañizares-Macías, 2011). La

extracción en fase sólida fue utilizada por Brunetto et al. (2007) para extraer y separar tres compuestos del cacao forastero, trinitario y criollo: la teobromina, teofilina y cafeína; también se encuentra otra técnica denominada **SPME (microextracción en fase sólida)**.

Hay que tener en cuenta que los compuestos volátiles presentan mezclas complejas, los mismos que se encuentran en concentraciones diferentes que puede ir de ppt a ppm, y cada compuesto presenta una naturaleza química diferente (Elena Stashenko y Martínez, 2011), y es necesario el uso de técnicas reproducibles y que nos permitan minimizar errores para una buena extracción e identificación, de compuestos volátiles, preferentemente evitando el uso de solventes.

1.6.1. Microextracción en fase sólida

El aroma contiene una alta diversidad de compuestos, algunos de ellos son altamente reactivos y están presentes en los alimentos en condiciones extremadamente bajas, las dificultades en los análisis muchas de las veces se deben a estas características, una de las técnicas más adecuada, usadas en el campo de alimentos para evitar posibles contaminaciones con el sistema de espacio de cabeza con componentes no volátiles y poder para determinar compuestos volátiles es la microextracción en fase sólida, este tipo de extracción presenta dos modificaciones: SPME estático y SPME dinámico (Belitz *et al.*, 2009; Sampietro *et al.*, 2009; Elena Stashenko y Martínez, 2011).

1.6.2. Microextracción en fase sólida estático

SPME estático ha sido utilizado en el presente trabajo de investigación, es una técnica relativamente barata, sin la utilización de solventes, y altamente reproducible, se puede resumir en dos pasos: la muestra es puesta en un vial cerrado donde existirá enriquecimiento de los compuestos volátiles a una temperatura de horno adecuada con un tiempo establecido, permitiendo así que los compuestos alcancen el equilibrio con la fase de gas (Sarker *et al.*, 2005; Elena Stashenko y Martínez, 2011), ver Figura 2. Se toma una alícuota del gas en equilibrio a través de la fibra, para pasar al proceso de desorción térmica mediante la inyección en el CG, un problema característico en el cacao o chocolate se basa en su inestabilidad térmica y puede dar lugar a la generación de artefactos. El coeficiente de distribución es necesario para conocer las concentraciones relativas de los analitos en las dos fases (sólida-gas) (Ducki *et al.*, 2008; Elena Stashenko y Martínez, 2011).

La selección de la fibra juega un papel muy importante para la extracción de compuestos, debido a la mezcla compleja que presentan las muestras, van desde compuestos de alta ebullición o semi-volátiles a compuestos orgánicos volátiles y polaridad muy variable. Una

rápida difusión y liberación de compuestos semi-volátiles se da con fibras delgadas, en comparación con las fibras gruesas que pueden retener compuestos altamente volátiles hasta su desorción. Una pobre afinidad de compuestos polares se da con fibras tradicionales PDMS (poli-dimetilsiloxano) y PA (poliacrilato), pero fibras de tipo mixto como divinil benceno (DVB), PDMS y CAR (carboxeno) o CARBOWAX presentan mayor sensibilidad que las fibras tradicionales debido a un efecto sinérgico en la absorción y distribución de la fase estacionaria (Sampietro *et al.*, 2009).

Los problemas de esta técnica se basan en el tiempo y la temperatura utilizada, tiempos prolongados a temperaturas altas dan como resultado descomposición de la fibra y por lo tanto incapacidad de absorber analitos, por tal motivo se debe usar una temperatura adecuada asegurando que el revestimiento de la fibra se mantenga frío mientras se procesa la muestra, el espacio de cabeza también influye en la cantidad de analito absorbido, un volumen alto de espacio de cabeza disminuye la cantidad de analitos absorbidos, entre más pequeño sea el espacio de cabeza se obtendrá una buena sensibilidad. El coeficiente de partición al ser dependiente de la temperatura, la concentración de analitos puede ser optimizada por calentamiento (Arthur y Pawliszyn, 1990; Belitz *et al.*, 2009; Iijima, 2014; Sampietro *et al.*, 2009). Entre las ventajas de esta técnica tenemos la detección sensitiva de una mayor cantidad de compuestos Volátiles o moléculas muy pequeñas, evitando la pérdida de los mismos, de igual manera se puede reducir el daño de los filamentos de CG-MS, y evitar el uso de solventes, (Iijima, 2014; Kolb y Ettre, 2006).

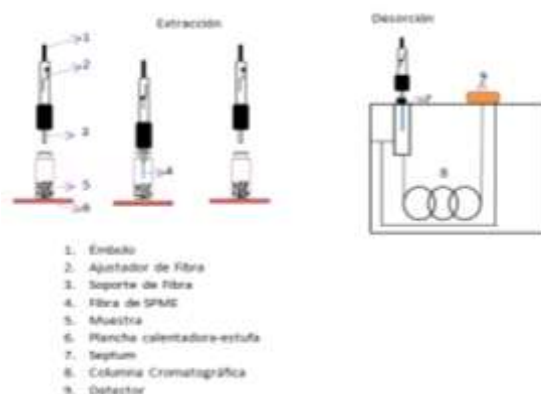


Figura 2. Proceso general de SPME estático

Fuente: Autor

1.6.3. Microextracción en fase sólida dinámico

Es un método continuo, los compuestos volátiles son recolectados a través de barrido o por purga, la muestra puede ser líquida o sólida. En una cámara de arrastre se encuentra la

muestra, ahí se hace burbujear un gas inerte (He, N₂), los compuestos son llevados por el gas de arrastre hacia una trampa sólida (Tenax, Poropax), los analitos se absorben y son pre-concentrados para su posterior análisis, el fin de esta técnica es que todos los analitos sean separados de la muestra, la desorción puede darse con una pequeña cantidad de solvente previamente a su análisis en el cromatógrafo de gases, se pueden producir inconvenientes como: problemas con la formación de agua, por lo general cuando se trabaja con muestras líquidas; el flujo de gas debido a que puede ser muy alto como para ser usado como gas portador, una desorción lenta de compuestos atrapados en la trampa (Brčić Karačonji y Skender, 2007; Kolb y Ettre, 2006; Sampietro *et al.*, 2009).

Sus ventajas radican en la forma de obtención de compuestos volátiles la misma que puede llevarse a cabo bajo condiciones ambientales para evitar los cambios en composición de oxígeno y dióxido de carbono; experimentos a largo plazo se pueden realizar mediante esta técnica, generalmente se la usa para elucidar compuestos volátiles directamente afectados por condiciones ambientales (Iijima, 2014).

1.7. Cromatografía

1.7.1. Principio de la cromatografía

La cromatografía, es un método físico muy empleado para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas, los componentes de la mezcla se mueven a través de la fase estacionaria mediante el flujo de la fase móvil (Skoog D., 2003). Dando como resultado repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria, alcanzando la separación de analitos con respecto al coeficiente de distribución. La información proporcionada a través de la cromatografía como técnica analítica puede ser cualitativa como cuantitativa (Gutiérrez y Droguet, 2002; Elena Stashenko y Martínez, 2011)

1.7.2. Tipos de cromatografía

Existen varios tipos de cromatografía si se hace referencia a la función del mecanismo de interacción de la fase estacionaria con el soluto, entre ellas se encuentra la cromatografía de absorción, de intercambio iónico, de exclusión molecular, de afinidad y finalmente la cromatografía que se usó en este trabajo de investigación denominada 'cromatografía de reparto', este tipo de cromatografía utiliza una fase estacionaria líquida en forma de una película fina con alto punto de ebullición sobre la superficie de un soporte sólido (cara interna de la columna cromatográfica), por lo tanto hay un equilibrio del soluto entre la fase móvil (gas) y el líquido estacionario (Harris *et al.*, 2006).

1.8. Cromatografía de gases y espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica analítica, donde se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna, el cual es arrastrado por un gas inerte por lo general Helio (fase móvil), la cromatografía de gases permite comprobar la ausencia o presencia de un compuesto, aunque también se la utiliza para establecer las cantidad de componentes individuales de una mezcla, para ello se emplean diferentes detectores basados en las propiedades físicas de los componentes a analizar, mientras que la espectrometría de masas se la considera como una de las técnicas analíticas más completas que existen, por lo general proporciona información estructural de la molécula, capacidad de identificación de forma inequívoca, gran sensibilidad, es muy rápida, y permite medir la concentración de algunas sustancias. La CG-MS, da lugar a una técnica combinada que permite separar e identificar compuestos de mezclas complejas (Gutiérrez y Droguet, 2002; Harris *et al.*, 2006).

1.8.1. Componentes y procesos de la CG-MS

En cromatografía de gases-MS, la muestra se inyecta en la fase móvil que es un gas inerte (He, N₂, H₂), los distintos componentes de la muestra pasaran a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada a una columna; la columna cromatográfica es fundamental en el análisis de mezclas multicomponentes, la misma que se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura, la velocidad de migración de cada compuesto depende de la distribución entre la fase estacionaria y la fase móvil; la preparación de la muestra, el tipo de inyección, la capacidad de la columna para separar compuestos, y la sensibilidad del sistema de detección influyen en la cantidad de analitos de una muestra, cada analito presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria lo que permite la separación. (Gutiérrez y Droguet, 2002; Harris *et al.*, 2006; Sampietro *et al.*, 2009; Sarker *et al.*, 2005; Elena Stashenko y Martínez, 2011).

Una muestra puede ser inyectada de tres maneras split, split-less y on colum; el sistema Split envía solo una pequeña fracción de muestra a la columna, la mayor parte es desviada fuera del sistema cromatográfico, el sistema Split-less envía toda la muestra a la columna, mientras que el tipo de inyección on colum no presenta etapa de evaporización para evitar la descomposición de compuestos termolábiles. (Gutiérrez y Droguet, 2002; Elena Stashenko y Martínez, 2011).

1.9. Identificación de compuestos

La identificación presuntiva de los analitos se basa en los índices de retención lineales y en los espectros de masa (Harris *et al.*, 2006; Elena Stashenko y Martínez, 2010). El índice de

retención de Kovats ha sido utilizado en el presente trabajo para poder identificar los compuestos, el mismo que nos proporciona una solución a la identidad de los tiempos de retención (el tiempo que pasa desde la inyección de la muestra en la columna hasta su llegada al detector), teniendo en cuenta que en condiciones isotérmicas los alcanos normales aumentan en forma logarítmica (Harris *et al.*, 2006; Harvey *et al.*, 2002). El índice de retención es 100 veces el número de átomos de carbono, para determinar este índice de retención se mide el tiempo de retención ajustado en relación con el de los alcanos conocidos que eluyen antes y después (Harvey *et al.*, 2002), para ello se utiliza la siguiente ecuación 1:

$$I = 100 \left[n + (N - n) \frac{\text{Log } t_{r}(\text{desconocido}) - \text{Log } t_{r}(\text{Alcano corto})}{\text{Log } t_{r}(\text{Alcano largo}) - \text{Log } t_{r}(\text{Alcano corto})} \right]$$

Dónde:

n= número de carbonos del alcano más corto

N= números de átomos de carbono del alcano más largo

t'_r(n)= tiempo de retención ajustado del alcano más corto

t'_r(N)= tiempo de retención del alcano más largo

t'_r(Desconocido)= tiempo de retención del compuesto desconocido

En el trabajo de investigación se ha utilizado la biblioteca Willey, y Nist (Natural Insitute of Standards and Technology) donde los espectros de masa e índices de retención han sido reportados por otros autores.

CAPÍTULO II

2.1. Objetivo general

- Identificar los principales compuestos volátiles de cacao fino de aroma

2.2. Objetivo específico

- Extraer e identificar los compuestos volátiles de cacao en estados de maduración mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

CAPÍTULO III

3.1. Muestras




3.1.1. Recolección de muestras

Las muestras de cacao (*Theobroma cacao* L.), con diferentes estados de maduración (inmaduro, maduro, sobre maduro) fueron recolectadas en el cantón Pangui, ubicada en la provincia de Zamora Chinchipe al sur del Ecuador, en las siguientes coordenadas 3°37'30"S 78°35'14"O.

El estado de madurez del cacao se clasificó en función del color de la corteza, utilizando la carta de colores de la Royal Horticultural Society (RHS) de Inglaterra, los mismos que se pueden apreciar en la Tabla 3. Como información complementaria se determinó la masa del fruto mediante una balanza OHAUS Analytical Plus AP250D. Luego de extraer los granos se trituró mediante un molino manual para su posterior análisis, ver Anexo 1.

Tabla 3. Características físicas del cacao

Nombre	Peso	Diámetro	Color	
Inmaduro 1	748.78	9.11 cm	Yellow Green group 153 (D) Green group 136 (C) Yellow green group 146 (C) y 148 (B)	
Inmaduro 2	848.23	9.31 cm	Yellow Green group 148 y 147 (C); 152 (D)	
Maduro 1	418.54	8.86 cm	Yellow orange group 17 (A) Yellow group Yellow orange group 23 (A)	
Maduro 2	635.23	8.45 cm	Orange group 26 (A) Red group 44 (A) Orange Red group N30 (B) Red Group (4C)	

Sobre maduro 1	487.55	7.91 cm	Yellow orange group 22 (A) Yellow orange group 21 (A) Yellow orange group 26 (A) Yellow orange group 23 (A)	
Sobre maduro 2	313.98	6.94 cm	Orange group 25 (A) Orange group N25 (A) Yellow orange 15 (B) Orange red group 30 (B)	
Sobre maduro 3	548.47	8.03 cm	Yellow group 2 (A) Yellow orange group 23 (B) Green Yellow group 1 (A) Yellow orange group 14 (B)	

3.2. Microextracción en fase sólida

Los compuestos volátiles fueron extraídos usando un tipo de fibra: 50/30 μm divinil benceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de SUPELCO, ver Figura 3. Antes de cada extracción se realizó una limpieza de la fibra en el puerto de inyección a 250 °C durante 5 min.



Figura 3. Fibra para microextracción en fase sólida

Fuente: Autor

Se pesó 2 g de cacao en un vial ámbar de 10 mL y se calentó a 60°C en una estufa COLE PARMER 2 por 10 min, la fibra fue expuesta en el espacio de cabeza para extraer los compuestos volátiles pre-enriquecidos por 15 min a una temperatura de 60 °C, ver Figura 4. La desorción se la realizó en el puerto del inyector cromatográfico por 5 min a una temperatura de 250 °C (Ducki *et al.*, 2008).



Figura 4. Microextracción en fase sólida estática

Fuente: Autor

3.3. Método cromatográfico

Se implementó el método descrito por Ducki et al. (2008), para extracción de compuestos volátiles, el equipo que se utilizó fue un cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado al espectrómetro de masas 5973, ver Figura 5. Se utilizó una columna capilar de polímero de fenil arileno equivalente a (5% fenil)-polidimetilsiloxano DB-5ms con las siguientes dimensiones (0.1 mm * 30 m * 0.1 μ m de la casa comercial Agilent Technologies, el gas empleado fue Helio (99,999%) adquirido a Indura S.A. El puerto de inyección fue adecuado con un liner de inyección directa, sin ensamblaje en modo split-less. Al horno del cromatógrafo se le programó una rampa de temperatura de 30 °C (5 min)-(10 °C/min)-200° - (25°C/min) - 80°C (5 min). El flujo de gas de arrastre fue 1mL/min. Se realizaron 2 extracciones y 2 análisis por cada muestra.



Figura 5. SPME-CG-MS

Fuente: Autor

3.4. Identificación de compuestos

Para identificar los compuestos se utilizó los Índices de Kovats y de Similitud.

3.4.1. Índice de Kovats

Denominado también índice de retención, en este método se utilizó como patrón una mezcla de n-alcános (ver Anexo 2), donde se da una comparación en cuanto al tiempo de retención de los hidrocarburos con relación al tiempo de retención de los compuestos a analizar, el mismo que se obtuvo mediante ecuación 1.

Se consideró como identificado cuando el índice de Kovats no varía en ± 20 con el valor de bibliografía NIST (Natural Insitute of Standards and Technology), y artículos científicos.

3.4.2. Índice de Similitud

Cada uno de los compuestos fueron identificados por comparación con la biblioteca Wiley7n que dispone de 390000 espectros y 316934 compuestos, se consideró identificado cuando el índice de similitud (QM) sea igual o mayor a 80, el programa usado fue MSD ChemStation Build 26th Ag 2003 de Copyright © Agilent Technologies 1989-2003.

3.5. Análisis estadístico

Para determinar si existió diferencia significativa entre la concentración de compuestos y los diferentes estados de maduración, se realizó el análisis de varianza ANOVA y un test de rango múltiple (Tukey), con nivel de confianza del 95% a través del programa Minitab16

CAPÍTULO IV

4.1. Maduración de cacao

En las distintas etapas de maduración de cacao un total de treinta y dos compuestos fueron detectados, de los cuales tres no fueron identificados, veinte y tres fueron identificados por Índice de Kovats e Índice de similitud, tres compuestos fueron identificados únicamente por Índice de Kovats y tres compuestos únicamente por Índice de similitud, ver Tabla 4.

Los estados de fermentación natural SM-1 y SM-2 tuvieron mayor presencia de compuestos en comparación con los demás estados inmaduros y maduros. Una baja cantidad de compuestos volátiles (2-pentanol, 2-heptanol) considerados como marcadores negativos de aroma se encontraron en los diferentes estados de maduración, ver Figura 6. Compuestos encargados de producir notas agradables en cuanto al aroma de cacao fueron identificados: Butanal 3-metil, bencenacetaldehido, linalol, bencenetanol, 2-butanone-3-hidroxi, estos pueden mostrar una alta concentración de olor a diferencia de los demás compuestos (Frauendorfer y Schieberle, 2008). En el estado I-1 el grupo alcohol fue aproximadamente 2 veces mayor al grupo aldehído-cetona, en el estado I-2 el grupo alcohol fue 3 veces menor al grupo aldehído-cetona. En el estado M-1 la concentración de alcoholes es aproximadamente 4 veces menor con respecto a la concentración de aldehídos y cetonas, mientras que para el estado M-2 la concentración de alcoholes es aproximadamente dos veces menor con respecto a aldehídos y cetonas. En el estado sobre maduro el grupo aldehído-cetona bajo su concentración, pero existe aumento notable del grupo alcohol $>2 \cdot 10^6$ u.a. En los estados inmaduros se identificaron: tres alcoholes, cuatro aldehídos-cetonas, dos hidrocarburos, un éster, un fenol y un ácido. En los estados maduros se identificaron seis alcoholes, cinco aldehídos-cetonas, un éster, un hidrocarburo, un fenol. En los estados sobre maduros se identificaron ocho alcoholes, ocho aldehídos-cetonas, un fenol, cuatro ésteres, cuatro hidrocarburos y un ácido, ver Anexo 3.

Portillo *et al.* (2009) identificó 92 compuestos volátiles en cacao maduro, los grupos más representativos fueron el grupo alcohol (quince compuestos), éster (veinte y dos compuestos) y ácidos (catorce compuestos) en comparación con otros grupos químicos; mientras que Rodríguez-Campos *et al.* (2012) encontró únicamente 8 compuestos pertenecientes a tres grupos químicos ácidos (un compuesto), alcoholes (dos compuestos), aldehídos y cetonas (cinco compuestos). En otro estudio similar realizado por Gill *et al.* (1984) identificó 17 compuestos volátiles en cacao maduro. En el presente trabajo se identificaron diez alcoholes, ocho aldehídos-cetonas, cinco hidrocarburos, cuatro ésteres, un fenol y un ácido en las distintas etapas de maduración. Los cuatros compuestos restantes un éster (ácido acético etil éster), dos alcoholes (1-butanol-2-metil, 1-pentanol) no fueron identificados.

Tabla 4. Compuestos volátiles de cacao

Nº	Nombre Compuesto	Descripción de Olor	I-1		I-2		M-1		M-2		SM 1		SM 2		SM 3		IK'	Referencia para IK'
			IK	QM	IK	QM	IK	QM	IK	QM	IK	QM	IK	QM	IK	QM		
Ácidos																		
1	Ácido acético ^a	Vinagre, amargo ^{1,2,3}	659	72							659	80					658	Fadel, Mageed, et al., 2006, 2
Alcohol																		
2	3-Buten-2-ol, 2-metil ^b										668	80					620	Píno, Marbot, et al., 2004
4	1-Propanol 2-metil ^b	Vino ⁶			679	94	679	84	677	86	675	94	676	80	676	90	629	Pino, Marbot, et al., 2003
8	2-Pentanol ^{a,b}	Verde leve (vegetal) ³					736	82	733	80	734	83	734	90			717	Moio and Addeo, 1998
10	1-Butanol-3-metil ^{a,b}	Malta, Chocolate ^{1,2}	768	83	768	88	769	86	769	90	768	90	765	90	764	90	750	Komárek, Richter, et al., 1998
11	1-Butanol-2-metil				772	73	772	70	762	72	767	75	769	79	768	77	740	Moio, Piombino, et al., 2000
13	1-Pentanol								792	70	791	78					766	Dreher, Rouseff, et al., 2003
12	2,3 Butanediol ^{a,b}	Dulce, floral ⁶			812	82	822	83									790	Meynier, Novelli, et al., 1999
16	1-Hexanol ^b	Fruta verde ³							890	86							861	Moio and Addeo, 1998
20	2-Heptanol ^{a,b}	Tierra, aceite ^{3,2}							917	78			916	86			901	Moio and Addeo, 1998
29	Trans Linalol oxido ^{a,b}	Floral, dulce ³									1079	90	1079	90			1075	Sabulal, Dan, et al., 2007
31	Linalol ^{a,b}	Floral, frutal (bajo) ⁵									1101	91	1102	95	1102	97	1110	Merle, Morón, et al., 2004
32	Bencenetanol ^{a,b}	Miel, Frutal ⁵											1127	93	1127	95	1120	Xu, Fan, et al., 2007
Aldehídos y Cetonas																		
7	2-Pentanona ^{a,b}										714	80	717	86			695	Bylaite and Meyer, 2006
9	2-Butanone-3-hidroxi ^{a,b}	Manteca, Crema ²	744	90	744	86	740	90	742	86	739	86					720	Moio, Piombino, et al., 2000
15	Hexanal ^{a,b}	Verde (inmaduro) ⁶							823	93	821	78					805	bin Jantan, Yalvema, et al., 2005
5	Butanal-3-metil ^{a,b}	Malta, Chocolate ¹	695	81	695	90	695	91	693	91	691	72					686	Whetstine, Cadwallader, et al., 2005
6	Butanal-2-metil ^{a,b}		700	80	700	86	700	82	699	80	697	79					680	Martin and Ames, 2001, 2

18	2-Heptanona ^{a,b}	Frutal, Floral ¹												904	91			890	Pino, Marbot, et al., 2003
21	Benzaldehido ^a	Almendra verde, nuez ⁶	977	74	977	73	977	74	977	76	976	75	977	78	976	72		971	Methven L., Tsoukka M., et al., 2007
30	2-Nonanona ^{a,b}	Floral, grasa ⁶												1091	91			1091	Adams, 2000, 2
Éster																			
3	Ácido acético etil éster		670	72			670	70						666	74	660	73	608	Isidorov, Purzynska, et al., 2006
14	Ácido acético metil propil éster ^a													795	72			779	Komárek, Richter, et al., 1998
17	1-Butanol, 3-metil acetato ^{a,b}	Frutal, Banana ⁴	893	78								891	89	893	94	892	86	876	Moio and Addeo, 1998
23	Ácido hexanoico etil éster ^{a,b}						996	70	995	90	995	91						996	Whetstine, Cadwallader, et al., 2005
24	Ácido etil hexil éster ^{a,b}	Frutal, manzana, banana ³												1008	86			1011	Brat, Rega, et al., 2003
Fenol																			
28	Bencenacetaldhido ^{a,b}	Miel, floral ⁵	1054	80	1054	84	1055	87	1054	79	1055	80	1055	80				1050	Mahattanatawee K., Perez-Cacho P.R., et al., 2007
Hidrocarburo																			
19	Estireno ^{a,b}															910	91	915	Bylaite and Meyer, 2006
22	Mirceno ^{a,b}	Floral ^{5,6}							991	87	990	91	991	94	992	93		995	Flamini, Cioni, et al., 2007
25	Limoneno ^{a,b}	Floral ^{5,6}	1039	94	1038	98	1038	95	1038	97	1038	93	1036	96	1037	96		1033	Lucero, Fredrickson, et al., 2006
26	Ocimeno ^{a,b}														1049	94		1050	Adams, Morris, et al., 2005
27	Benceno-1,2 dicloro ^{a,b}		1027	86														1022	Xu, van Stee, et al., 2003
<p>Descripción del olor: ¹ Rodriguez-Campos et al. (2012), ²Frauendorfer and Schierberle (2008), ³ Bonvehí (2005), ⁴Jonfia-Essien et al (2007), ⁵Afoakwa et al. (2009), ⁶ Crafack et al. (2014)</p> <p>Identificación de Compuestos: ^a Compuesto Identificado por IK-MS± 20 literatura, ^b Compuesto Identificado por QM ≥ 80</p>																			

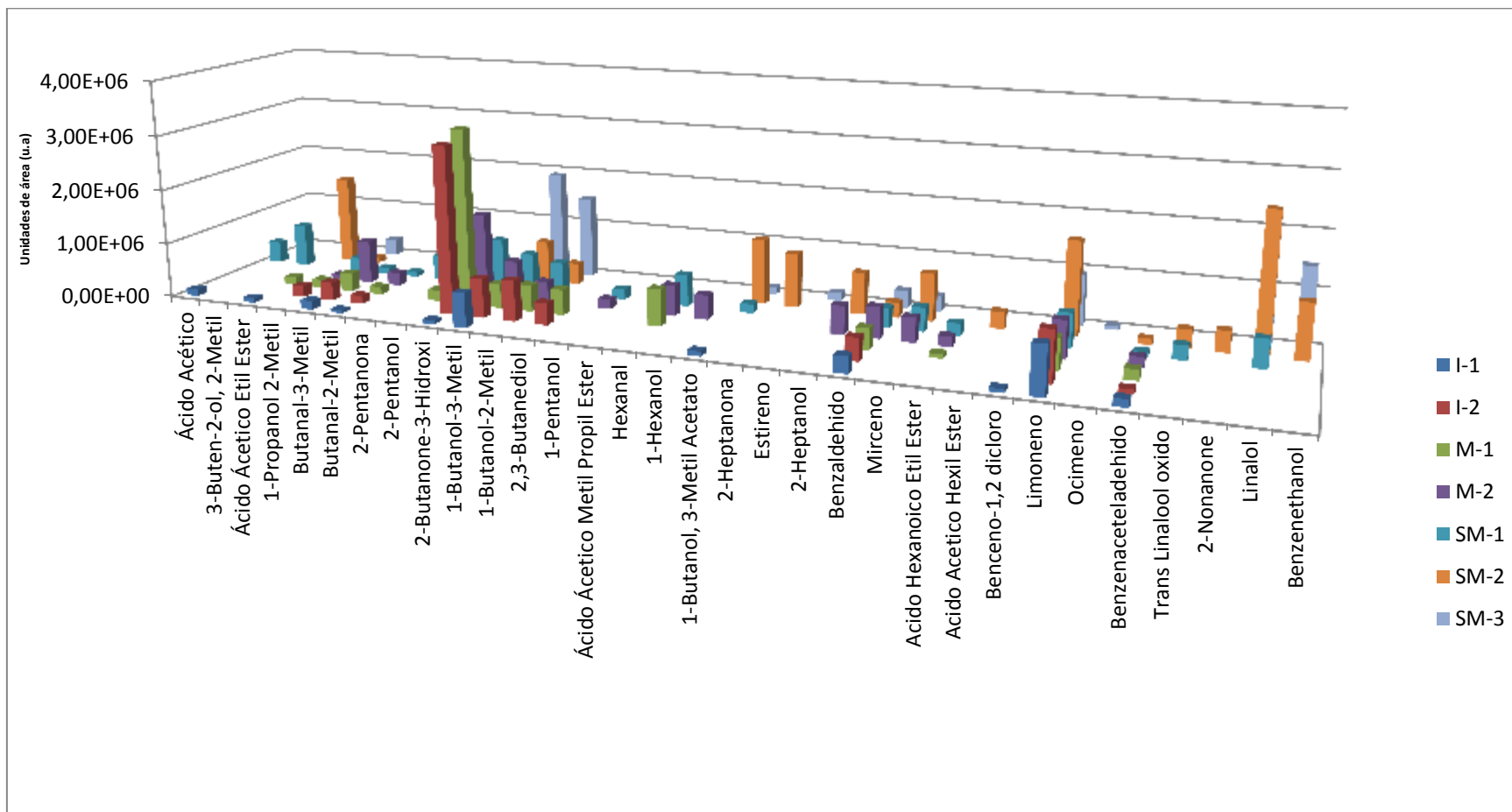


Figura 6. Compuestos volátiles identificados

Fuente: Autor

4.2. Concentración de compuestos de cacao

Se identificaron seis grupos químicos, siguiendo un orden decreciente con relación a su concentración: alcohol, aldehído-cetona, hidrocarburo, éster, fenol y ácido. En la Figura 7 se muestran las concentraciones de los diferentes grupos químicos en distintos estados de maduración. Según Rodríguez-Campos *et al.* (2012) la concentración de alcoholes, aldehídos-cetonas es mayor en cacao maduro, de igual manera en este estudio se pudo evidenciar una mayor concentración alcoholes, aldehídos-cetonas. Muestras con semillas poco desarrolladas presentaron una baja concentración de compuestos la cual aumenta considerablemente en estados de maduración y sobre maduración.

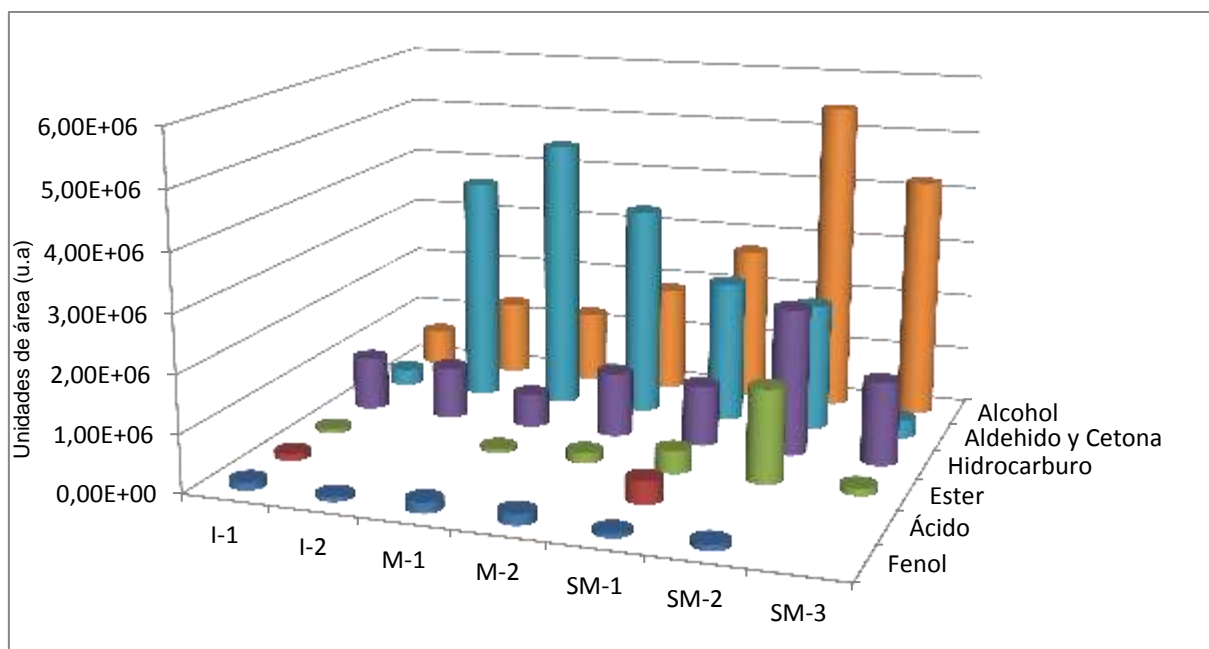


Figura 7. Concentración de compuestos por grupos químicos

Fuente: Autor

4.2.1. Concentración de alcoholes

La producción de un aroma agradable del cacao se debe a la presencia de ciertos alcoholes (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012), en nuestro trabajo se identificaron diez alcoholes: 3-buten-2-ol, 2-metil, 1-propanol 2-metil, 2-pentanol, 1-butanol-3 metil, 2,3-butanediol, 1-hexanol, 2-heptanol, trans linalol óxido, linalol, bencenetanol.

Únicamente dos compuestos pertenecientes a este grupo fueron identificados en estados inmaduros frente a seis y ocho compuestos pertenecientes a estados maduros y sobre maduros. Los alcoholes más representativos fueron 1-butanol-3-metil y linalol. Según Rodríguez-Campos *et al.* (2012) en cacao maduro la concentración de alcoholes es menor

frente al grupo químico aldehídos-cetonas, la misma tendencia se evidenció en este estudio en el cual la concentración de alcoholes es aproximadamente 4 veces menor con respecto a la concentración de aldehídos y cetonas, para el estado M-1, mientras que para el estado M-2 la concentración de alcoholes es aproximadamente dos veces menor con respecto a aldehídos y cetonas, se evidenció una mayor abundancia de este grupo químico en estados sobre maduros $>4 \cdot 10^6$ u.a, estas muestras ya presentaron un estado de fermentación natural.

El alcohol 2-metil-1-propanol es considerado como marcador positivo, responsable de un sabor agradable Bonvehí (2005). Otro alcohol identificado fue: 2,3-butanediol que confiere un aroma desagradable (Toci y Farah, 2008).

4.2.2. Concentración de aldehídos y cetonas

Se identificaron un total de 8 compuestos pertenecientes a este grupo químico: 2-pentanona, 2-butanone-3-hidroxi, hexanal, butanal-3-metil, butanal-2-metil, 2-heptanone, benzaldehído, 2-nonanone. Cuatro compuestos fueron identificados en estados inmaduros frente a cinco compuestos del estado maduro y ocho del estado de sobre maduración. Los compuestos más representativos fueron: 2-butanone-3-hidroxi (acetoína) y butanal 3 metil.

Una concentración alta de estos compuestos es favorable, aporta con olores dulces, florales y frutales (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012).

4.2.3. Concentración de ácidos

El ácido acético fue el único ácido identificado, el mismo que estuvo presente únicamente en el estado I-1 y SM-1. La concentración de este ácido es $<1 \cdot 10^6$ u.a muy baja en comparación con los otros grupos químicos.

Al ser semillas frescas no han sido sometidas a procesos exotérmicos, este compuesto está asociado a un olor a vinagre, en concentraciones altas puede afectar al aroma final del cacao, aunque es considerado un componente de olor activo (Owusu *et al.*, 2012).

4.2.4. Concentración de ésteres

Se han identificado 4 ésteres el ácido etil hexil éster, ácido hexanoico etil éster, 1-butanol, 3-metil acetato, ácido acético metil propil éster. Las concentraciones de ésteres fueron demasiado bajas en comparación con otros grupos químicos, la concentración aumenta en el estado de SM-2 mayor a $1 \cdot 10^6$ u.a, Es el segundo grupo funcional más importante después de las pirazinas debido a que confieren aromas frutales o florales al cacao (Jonfia-Essien *et al.*, 2007).

4.2.5. Otros compuestos

Compuestos como: estireno, mirceno, limoneno, ocimeno, benceno-1,2 dicloro han sido identificados en diferentes estados de maduración. Limoneno fue el único compuesto perteneciente a este grupo químico que estuvo presente en todos los estados de maduración de cacao. Este grupo químico es uno de los más representativos al igual que alcoholes, aldehídos-cetonas. La concentración de hidrocarburos es más alta en estados de madurez y sobre madurez, a diferencia del estado inmaduro. Todos estos compuestos le dan un aroma agradable al cacao.

Se identificó un compuesto fenólico denominado bencenacetaldehído en concentraciones bajas $<1 \cdot 10^6$ u.a., considerado como un compuesto de olor activo, que presenta un gran impacto y aporte positivo al aroma (Counet *et al.*, 2002)

4.3. Compuestos claves en cacao

Los compuestos 1-butanol-3-metil y limoneno se encontraron presentes en todas las etapas de maduración, compuestos como 3-metil butanal y 2-butanone-3-hidroxi se encuentran en los 5 primeros estados de maduración. El linalol se encontró en estados sobre maduros. Los tiempos de retención y cromatogramas se detallan en el Anexo 4 y Anexo 5. El análisis estadístico se especifica en el Anexo 6.

Según Crafaek *et al.* (2014) el limoneno es un compuesto que le confiere un olor cítrico agradable al cacao, la concentración de limoneno puede aumentar en procesos térmicos, este compuesto ha sido reportado en estudios donde las semillas de cacao han sido inducidas a fermentación o tostado. Li *et al.* (2012) en su trabajo de investigación demostró que el limoneno, ciertos ácidos y alcoholes son compuestos mayoritarios en cacao, en este estudio el compuesto su concentración fue alta en relación a los demás compuestos del mismo grupo químico, estuvo presente en todas las etapas de maduración con un tiempo de retención promedio de $16.70 \pm 0,010$ min. El Test de Tukey indicó que su concentración es variable en los diferentes estados de maduración, además mostro que los estados M-1, M-2, SM-1 no presentan diferencias significativas en sus concentraciones, su aumento es notable para el estado SM-2 y comienza a disminuir en el estado SM-3, ver Figura 8.

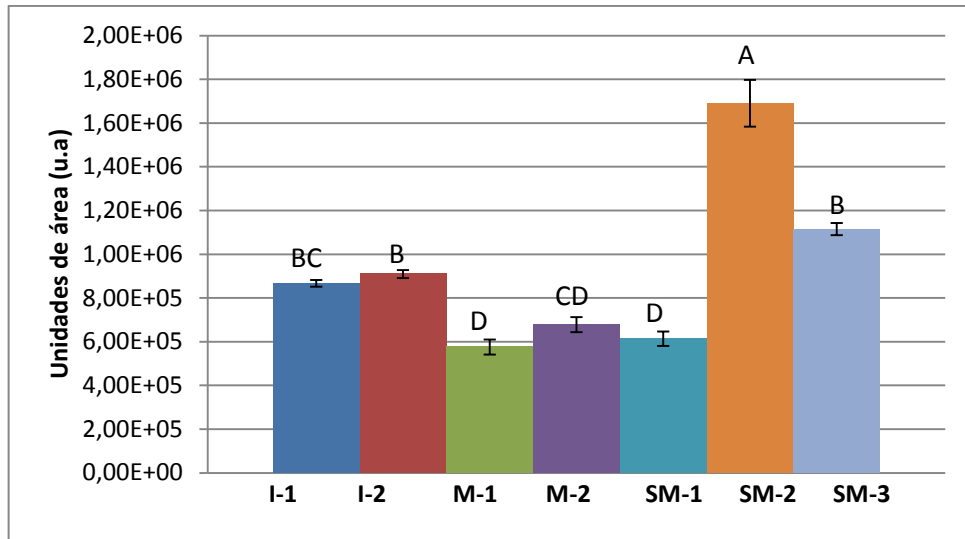


Figura 8. Concentración de limoneno

Fuente: Autor

El 1-butanol-3-metil se encuentra en todos los estados de maduración, responsable de dar un aroma a chocolate y malta, su concentración es variable. Según Frauendorfer y Schieberle (2008) está considerado como un compuesto aromático clave, alcanza una concentración alta en el estado SM-3 ($>1,5 \cdot 10^6$ u.a), en comparación con los demás estados de maduración, presentó un tiempo de retención de $9,90 \pm 0,06$ min. El Test de Tukey indicó que su concentración es variable en los diferentes estados de maduración, además mostró que este compuesto comparte concentraciones similares en el estado I-2, M-2 y SM-1, conforme avanza el estado de maduración su concentración no presenta similitud, la concentración es alta en el estado SM-3 probablemente puede deberse a la fermentación natural que se estaba produciendo en la muestra, ver Figura 9.

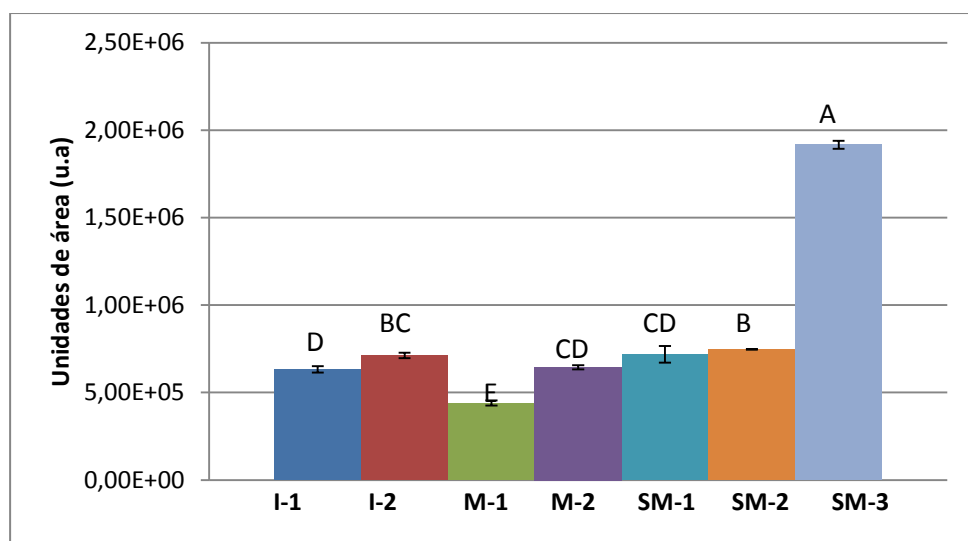


Figura 9. Concentración de 1-butanol-3-metil

Fuente: Autor

Compuestos como el linalol le atribuyen olores florales al cacao (Quijano *et al.*, 2007), el mismo que fue identificado únicamente en estados de sobre maduración; los resultados no coinciden con los de Crafacck *et al.* (2014) el cual demostró que la fermentación participa en la disminución de este compuesto, de la concentración de Linalol, y con acción de procesos térmicos se pueden generar derivados del mismo. El Test de Tukey indicó que el estado SM-1 y SM-3 comparten concentraciones similares con diferencia al estado SM-2, su tiempo de retención promedio fue de $17,86 \pm 0,08$ min, ver Figura 10.

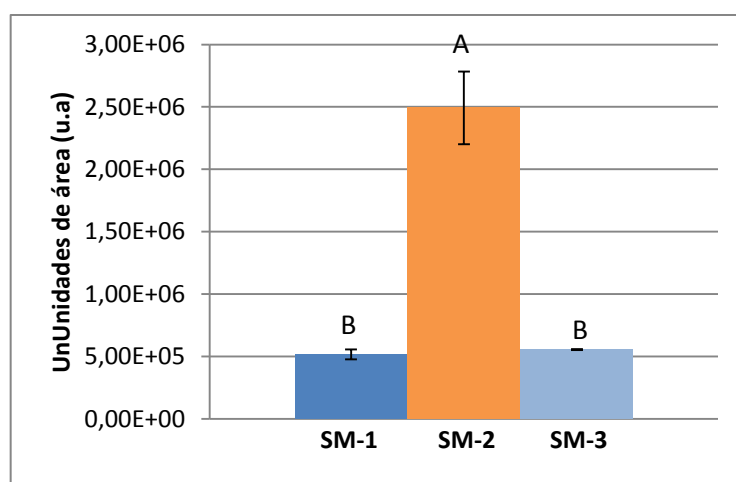


Figura 10. Concentración de linalol

Fuente: Autor

La concentración de aldehídos y cetonas es favorable para la calidad del cacao, el 3-metil butanal es un compuesto de olor activo (Counet *et al.*, 2002). Estuvo presente en 5 de 7 estados de maduración en comparación con otros compuestos claves. El test de Tukey indica que el compuesto es variable en los estados de maduración excepción del estado I-2 y M-1, su concentración aumenta para el estado M-2 y disminuye notablemente en el estado SM-1. El tiempo de retención promedio de este compuesto fue $7,72 \pm 0,07$ min, ver Figura 11.

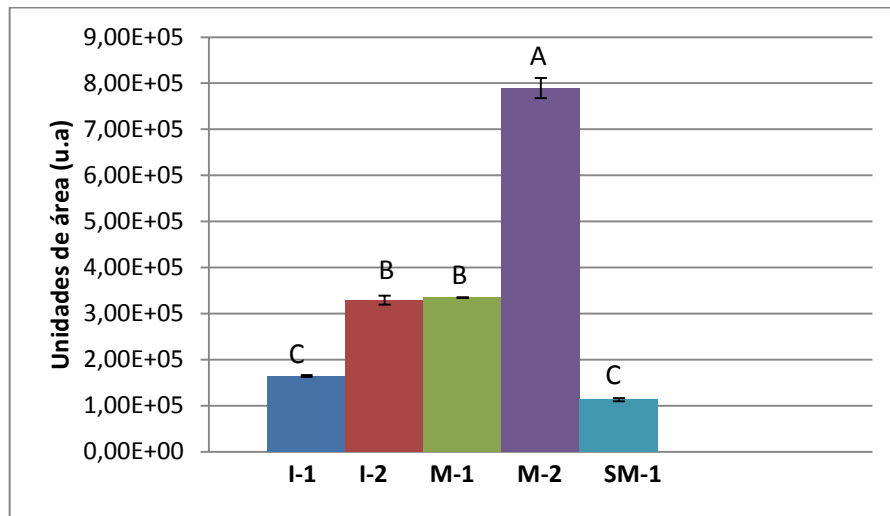


Figura 11. Concentración de butanal 3-metil

Fuente: Autor

El 2-butanone-3-hidroxi es un compuesto responsable de olor a crema y mantequilla, este compuesto es importante por ser un precursor de las tetra-metilpirazina (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012). Estuvo presente en 5 estados de maduración de cacao, presento bajas concentraciones en el estado I-1 en comparación con los demás estados de maduración, el test de Tukey indicó que el estado I-2 y M-1 no presentan diferencias entre las concentraciones, a partir del estado M-2 su concentración comienza a bajar conforme avanza la maduración del fruto hasta estados sobre-maduros. El tiempo de retención promedio fue de $9,14 \pm 0,059$ min, ver Figura 12.

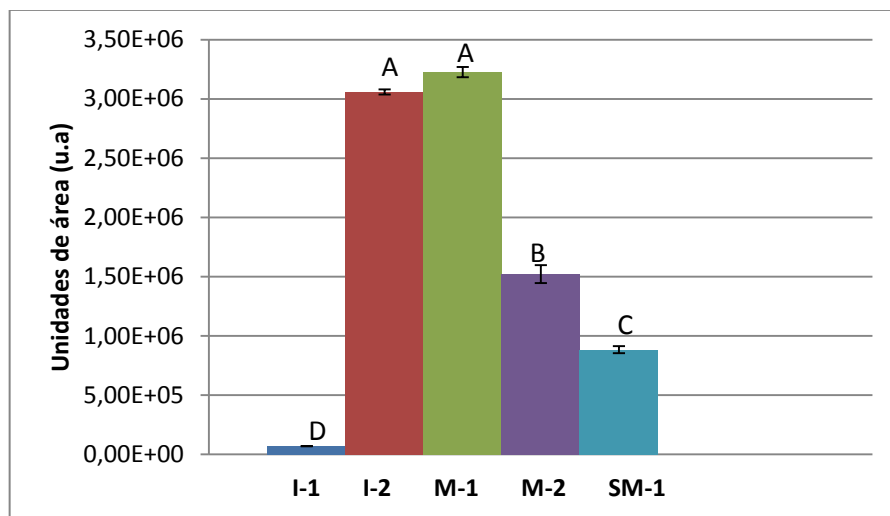


Figura 12. Concentración de 2-butanone-3-hidroxi

Fuente: Autor

CONCLUSIONES

- Se logró identificar veinte y nueve compuestos volátiles en los distintos estados de maduración, compuestos como el limoneno y 1-butanol-3-metil estuvieron presentes en todos los estados de maduración de cacao. Se obtuvo mayor cantidad de compuestos en el estado de sobre maduración 1, con un total de dieciocho compuestos.
- En los estados inmaduros y maduros los grupos más abundantes fueron: aldehídos, alcoholes seguido de hidrocarburos, en el estado de sobre maduración el grupo aldehído baja su concentración, pero existe un aumento notable del grupo alcohol.
- Linalol estuvo presente únicamente en estados de sobre maduración, el análisis estadístico indicó que las concentraciones en los estados SM-1 y SM-3 no presentan diferencias significativas entre sus concentraciones.
- Se encontró en mayor concentración de 2-butanone-3-hidroxi en el estado I-2 y M-1, su concentración comienza a decaer en estados más maduros.
- La concentración del butanal-3-metil aumenta a partir del estado I-1 hasta el estado M-2 y disminuyó considerablemente para el estado SM-1.
- La concentración máxima de limoneno se presentó en el estado de SM-2, seguida por el estado I-1, I-2 y SM-3.
- 1-butanol-3-metil presentó variaciones en su concentración, alcanzando la concentración más alta en el estado SM-3.

RECOMENDACIONES

- Aplicar microextracción en fase sólida estática a diferentes intervalos de temperatura, y tiempo para desarrollar un método característico para análisis de cacao en estados de maduración.
- Extracción de compuestos volátiles con diferentes tipos de fibras y análisis de compuestos en diferentes columnas.
- Realizar trabajos de investigación similares en procesos de fermentación natural y fermentación inducida en cacao, para conocer la diferencia en concentración de compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Afoakwa, Emmanuel Ohene, Paterson, Alistair, Fowler, Mark, y Ryan, Angela. (2009). Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. *Food Chemistry*, 113(1), 208-215.
- ANECACAO. (2015). Cacao en Ecuador. 2015. Retrieved 12/04/2015, from <http://www.anecacao.com/es/cacao-en-ecuador/>
- Arthur, Catherine L, y Pawliszyn, Janusz. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry*, 62(19), 2145-2148.
- Belitz, HD, Grosch, W, y Schieberle, P. (2009). Food Chemistry, 4th revised and extended edn. *Heidelberg, Germany*, 4, 62-63. doi: 10.1007/978-3-540-69934-7
- BIOCOMERCIO. (2014). BIODIVERSIDAD DEL ECUADOR. Retrieved 05/05/2015, from <http://www.biocomercioecuador.ec/biocomercio-en-el-ecuador/biodiversidad-en-el-ecuador>
- Bonvehí, J Serra. (2005). Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research and Technology*, 221(1-2), 19-29.
- Brčić Karačonji, Irena, y Skender, Ljiljana. (2007). Comparison between dynamic headspace and headspace solid-phase microextraction for gas chromatography of BTEX in urine. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 58(4), 421-427.
- Carlin, James T, Lee, Ken N, Hsieh, Oliver A-L, Hwang, Lucy Sun, Ho, Chi-Tang, y Chang, Stephen S. (1986). Comparison of acidic and basic volatile compounds of cocoa butters from roasted and unroasted cocoa beans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63(8), 1031-1036.
- Counet, Christine, Callemien, Delphine, Ouwertx, Caroline, y Collin, Sonia. (2002). Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2385-2391.
- Crafac, Michael, Keul, Hanna, Eskildsen, Carl Emil, Petersen, Mikael A, Saerens, Sofie, Blennow, Andreas, Heimdal, Hanne. (2014). Impact of starter cultures and

fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63, 306-316.

- Ducki, Sylvie, Miralles-Garcia, Javier, Zumbé, Albert, Tornero, Antonio, y Storey, David M. (2008). Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 74(5), 1166-1174. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.034>
- FAO. (2015). Producción de cacao en Ecuador. Retrieved 05/05/2015, from <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/>
- FEDECACAO. (2013). Producción de Cacao a nivel Mundial. Retrieved 12/05/2015, from <http://www.fedecacao.com.co/site/index.php>
- FORBES. (2012). Five chocolate bars you should be eating now. Retrieved 05/05/2015, from <http://www.forbes.com/sites/carolpinchefsky/2012/11/23/five-chocolate-bars-you-should-be-eating-now/>
- Frauendorfer, Felix, y Schieberle, Peter. (2008). Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10244-10251.
- Gill, Manraj S, Macleod, Alexander J, y Moreau, Marie. (1984). Volatile components of cocoa with particular reference to glucosinolate products. *Phytochemistry*, 23(9), 1937-1942.
- González-Nuñez, Leslie N, y Cañizares-Macías, María P. (2011). Focused microwaves-assisted extraction of theobromine and caffeine from cacao. *Food Chemistry*, 129(4), 1819-1824.
- Gutiérrez, MC, y Droguet, Marta. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter (upc) Catalunya*.
- Harris, Daniel C, Alegret, Salvador, Bosch, Elisabeth, y Barrachina, Coral. (2006). *Anàlisi química quantitativa* (Tercera edi.): Reverté.924 pag.
- Harvey, David, Rodríguez, Luis Cuadros, y Ruizalvar, SL. (2002). *Química analítica moderna*: McGraw-Hill.570 pag.

- Iijima, Yoko. (2014). Recent Advances in the Application of Metabolomics to Studies of Biogenic Volatile Organic Compounds (BVOC) Produced by Plant. *Metabolites*, 4(3), 699-721.
- Jinap, S, Rosli, WI Wan, Russly, AR, y Nordin, LM. (1998). Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(4), 441-448.
- Jonfia-Essien, WA, Alderson, PG, Tucker, G, Linforth, R, y West, G. (2007). Behavioural Responses of *Theobroma castaneum* (Herbst) to Volatiles Identified from Dry Cocoa Beans. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(20), 3549-3556.
- Kolb, Bruno, y Ettre, Leslie S. (2006). *Static headspace-gas chromatography: theory and practice*: John Wiley & Sons (2nd edi.).376 pag.
- Li, Yue, Feng, Yun, Zhu, Song, Luo, Changrong, Ma, Jianguo, y Zhong, Fang. (2012). The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1), 17-23.
- Moreno, Miriam Torres. (2012). *Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro: tesis doctoral*. Universitat Rovira i Virgili.216 pag.
- Motamayor, Juan C, Lachenaud, Philippe, e Mota, Jay Wallace da Silva, Loor, Rey, Kuhn, David N, Brown, J Steven, y Schnell, Raymond J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS One*, 3(10), e3311.
- Owusu, Margaret, Petersen, Mikael Agerlin, y Heimdal, Hanne. (2012). Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(5), 446-456.
- Perego, P, Fabiano, B, Cavicchioli, M, y Del Borghi, M. (2004). Cocoa quality and processing: A study by solid-phase microextraction and gas chromatography analysis of methylpyrazines. *Food and bioproducts processing*, 82(4), 291-297.
- Portillo, Elvis, Labarca, María, Grazziani, Lucía, Cros, Emile, Assemat, Sophie, Davrieux, Fabrice, Marcano, María. (2009). Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(2), 458-468.

- Quijano, Clara E, Salamanca, Guillermo, y Pino, Jorge A. (2007). Aroma volatile constituents of Colombian varieties of mango (*Mangifera indica* L.). *Flavour and Fragrance Journal*, 22(5), 401-406.
- Quingaísa, Eugenia, y Riveros, Hernando. (2007). Estudio de caso: Denominación de origen “cacao arriba”. *Serie de agronegocios. Cuadernos para la exportación (IICA)(02)*.
- Quiroz, James, y Amores, Freddy. (2002). Rehabilitación de plantaciones tradicionales de cacao en Ecuador. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No, 63*, 73-80.
- Ramírez, Felipe Durán. (2013). *Cultivo y Explotación del Cacao* (Primera ed. Vol. 1). Colombia: Grupo Latino Editores. 424 pag.
- Rodríguez-Campos, J, Escalona-Buendía, HB, Contreras-Ramos, SM, Orozco-Avila, I, Jaramillo-Flores, E, y Lugo-Cervantes, E. (2012). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1), 277-288.
- Sampietro, Diego A, Catalan, Cesar AN, y Vattuone, Marta A. (2009). *Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products*. USA: Science Publishers. 551 pag.
- Sarker, Satyajit D, Latif, Zahid, y Gray, Alexander I. (2005). *Natural products isolation* (Vol. 20). London: Springer Science & Business Media. 552 pag.
- Schmarr, Hans-Georg, y Engel, Karl-Heinz. (2012). Analysis and stereodifferentiation of linalool in *Theobroma cacao* and cocoa products using enantioselective multidimensional gas chromatography. *European Food Research and Technology*, 235(5), 827-834.
- Schnermann, Petra, y Schieberle, Peter. (1997). Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 867-872.
- Siedentopp, U. (2009). El cacao, planta medicinal y de deleite. *Revista Internacional de Acupuntura*, 3(4), 197-200.
- Skoog D., West D., Holler F., Crouch S. (2003). *Química Analítica* (Séptima ed.). México. 1990 pag.

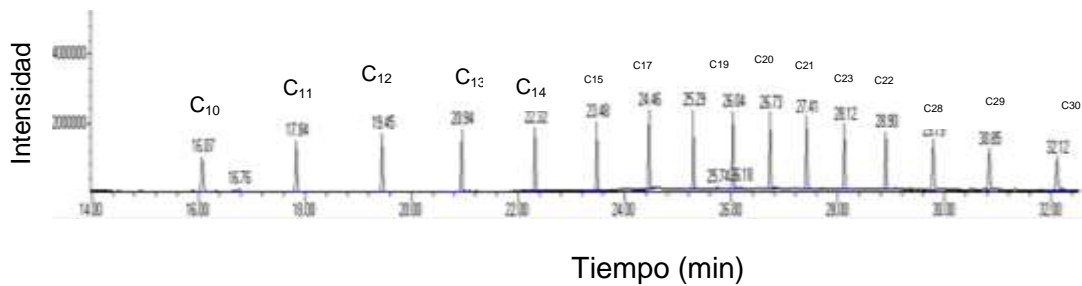
- Stashenko, Elena , y Martínez, Jairo René. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47.
- Stashenko, Elena, y Martínez, Jairo René. (2011). Algunos consejos útiles para el análisis cromatográfico de compuestos orgánicos volátiles. *Scientia Chromatographica*, 3, 199-221. doi: 10.4322/sc.2011.012
- Sukha, Darin A, Butler, David R, Umaharan, Pathmanathan, y Boulton, Emma. (2008). The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology*, 226(3), 405-413.
- Toci, Aline T, y Farah, Adriana. (2008). Volatile compounds as potential defective coffee beans' markers. *Food Chemistry*, 108(3), 1133-1141.
- TROPICOS. (2015). Clasificación Botánica del Cacao. Retrieved 12/05/2015, from <http://www.tropicos.org/Name/30401022>

ANEXOS

Anexo 1. Muestras procesadas de cacao



Anexo 2. Cálculo del índice de retención



Limoneno

Tiempo de Retención del compuesto: 16,72

Número de Carbonos del Alcano más corto=10 (n)

Número de Carbonos del Alcano más largo=11 (N)

Tiempo de Retención del Alcano más corto=16,07

Tiempo de Retención del Alcano más largo=17,84

$$I = 100 \left[10 + (10 - 11) \frac{\log(16,72) - \log(16,07)}{\log(17,84) - \log(16,07)} \right]$$

I=1038

*El IK de todos los compuestos fueron calculados mediante la fórmula empleada anteriormente.

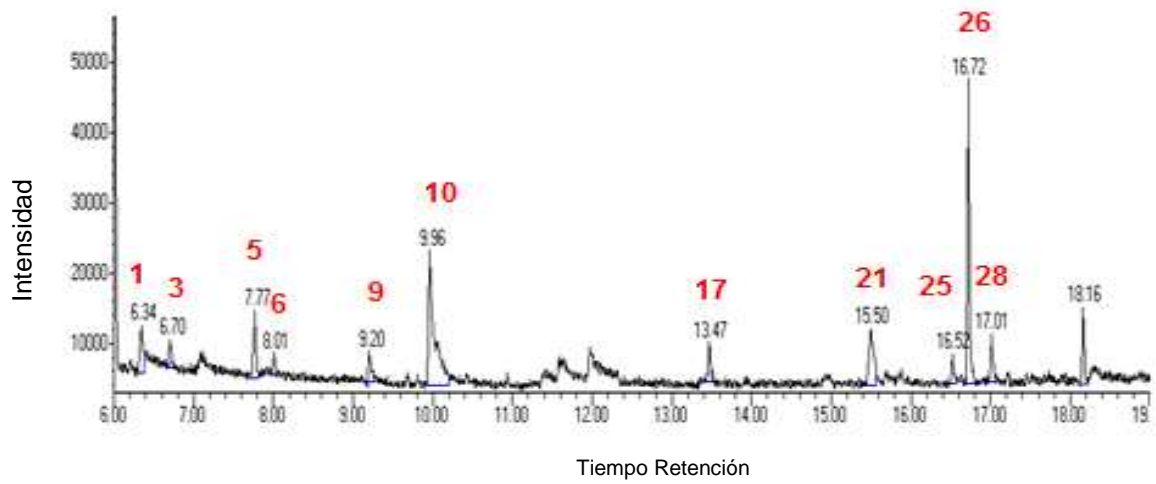
Anexo 3. Compuestos volátiles de cacao

	NOMBRE COMPUESTO	I-1	I-2	M-1	M-2	SM-1	SM-2	SM-3
ÁCIDO								
Tiempo (min)								
1	ácido acético	6,34				6,32		
ALCOHOL								
2	3-buten-2-ol, 2-metil					6,55		
4	1 propanol-2-metil		7,10	7,10	7,01	6,93	6,99	6,95
8	2-pentanol			8,97	8,88	8,80	8,85	
10	1 butanol, 3-metil	9,96	9,96	9,97	9,88	9,81	9,86	9,83
11	1 butanol, 2-metil		10,07	10,07	9,99	9,92	9,97	9,94
13	1-pentanol				10,76	10,71		
12	2,3-butanediol		11,35	11,34				
16	1-hexanol				13,31			
20	2-heptanol				14,03		14,03	
29	trans linalol óxido					17,43	17,45	
31	linalol					17,86	17,87	17,87
32	bencenetalol						18,26	18,25
ALDEHÍDO-CETONA								
7	2-pentanona					8,38	8,44	
9	2-butanone-3-hidroxi	9,20	9,21	9,19	9,09	9,08		
15	hexanal			11,66	11,60	11,54		
5	Butanal-3-metil	7,77	7,78	7,78	7,69	7,61		
6	Butanal-2-metil	8,01	8,02	8,01	7,93	7,85		
18	2-heptanona						13,75	
21	benzaldehido	15,50	15,49	15,50	15,47	15,47	15,48	15,47
30	2-nonanone						15,67	
ÉSTER								
3	ácido acético etil éster	6,70		6,72			6,60	6,60
14	ácido acético metil propil éster						10,86	
17	1 - butanol, 3-metil acetato	13,47				13,40	13,43	13,42
23	ácido hexanoico etil éster			15,97	15,96	15,94		
24	ácido acético hexil éster						16,21	
FENOL								
28	bencenacetaldehido	17,01	17,01	17,01	17,00	17,00	16,91	16,89
HIDROCARBURO								
19	estireno							13,88
22	mirceno				15,84	15,82	15,84	15,83
25	benceno-1,2 dicloro	16,53						
26	limoneno	16,72	16,72	16,72	16,70	16,69	16,69	16,70
27	ocimeno							16,89

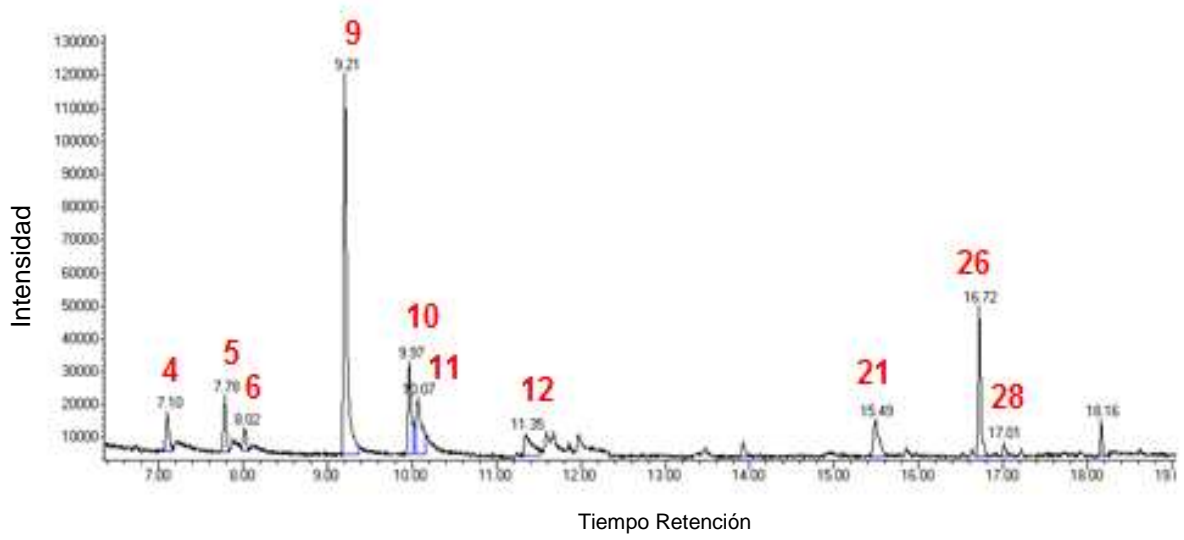
*El tiempo de retención se encuentra en minutos (min)

*La intensidad en unidades de área (u.a)

Cacao inmaduro (I-1)

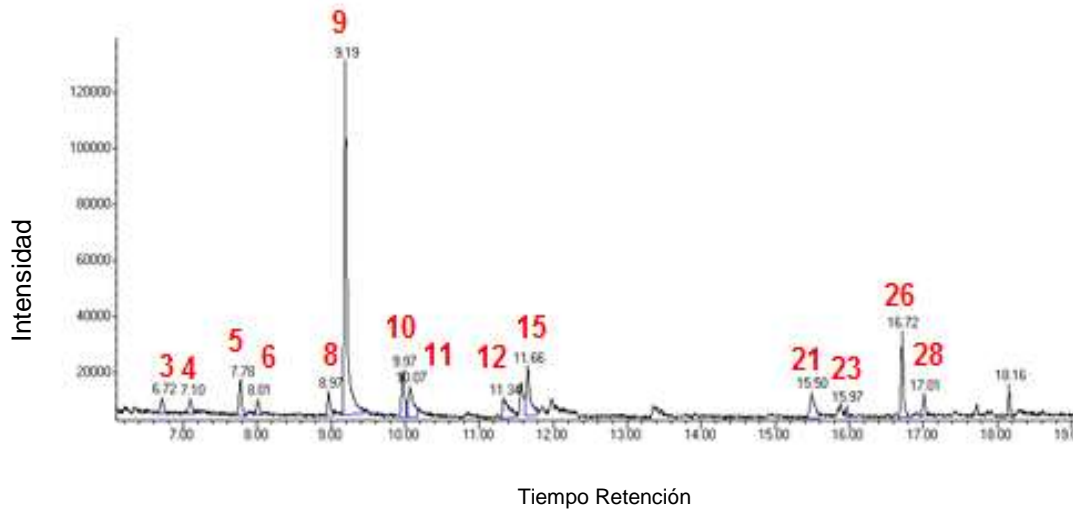


Cacao inmaduro (I-2)

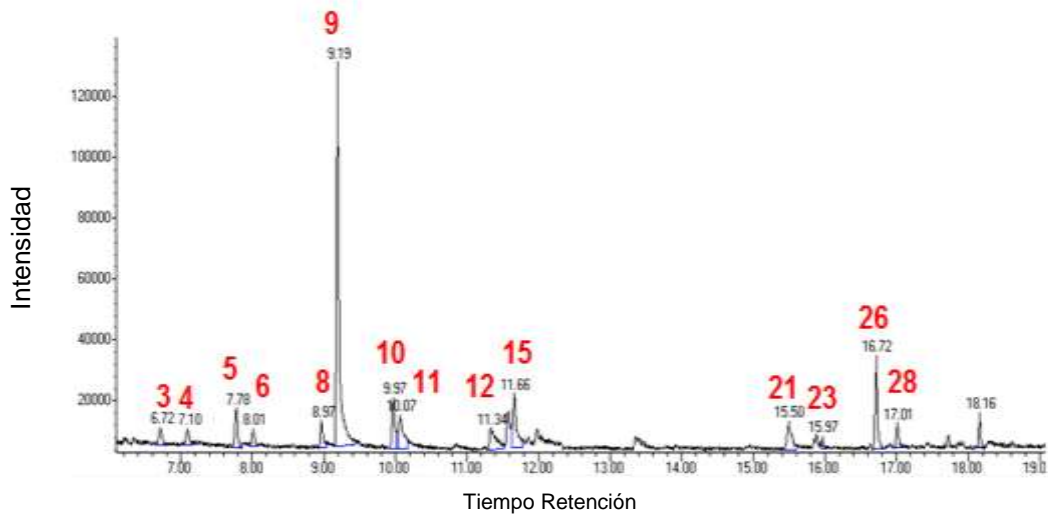


Compuestos volátiles de cacao maduro

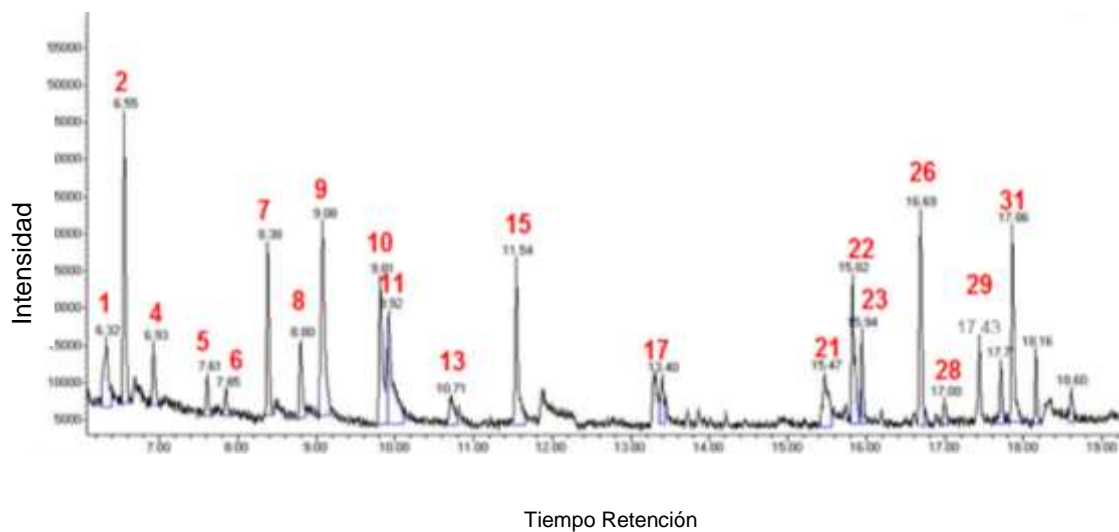
Cacao maduro (M-1)



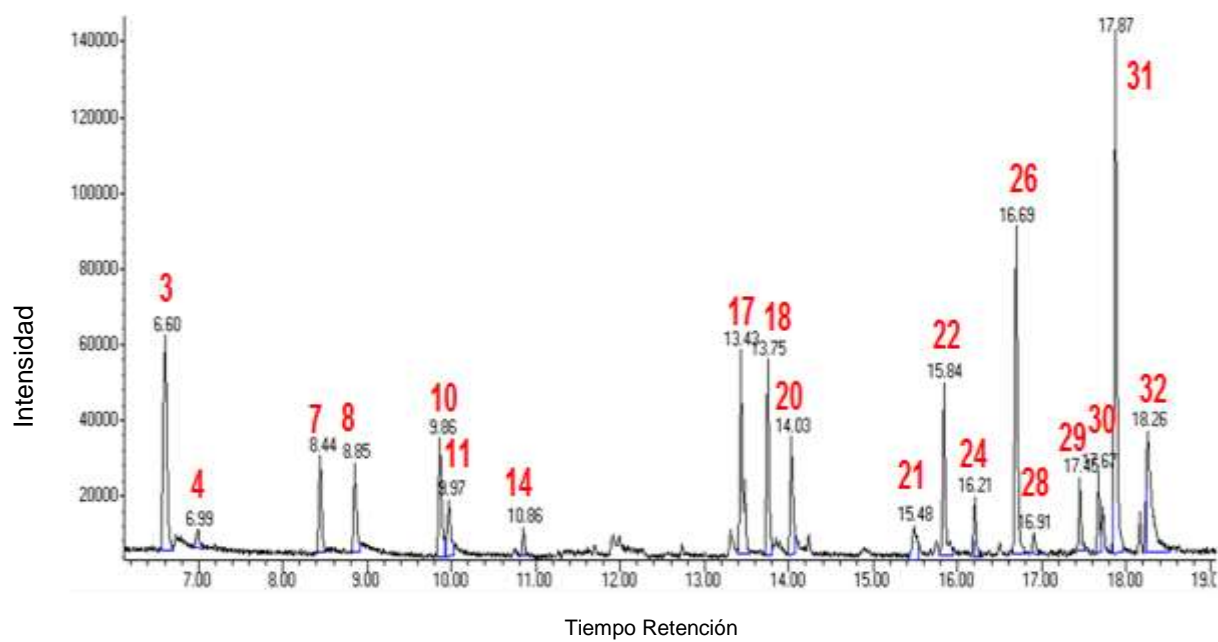
Cacao maduro (M-2)



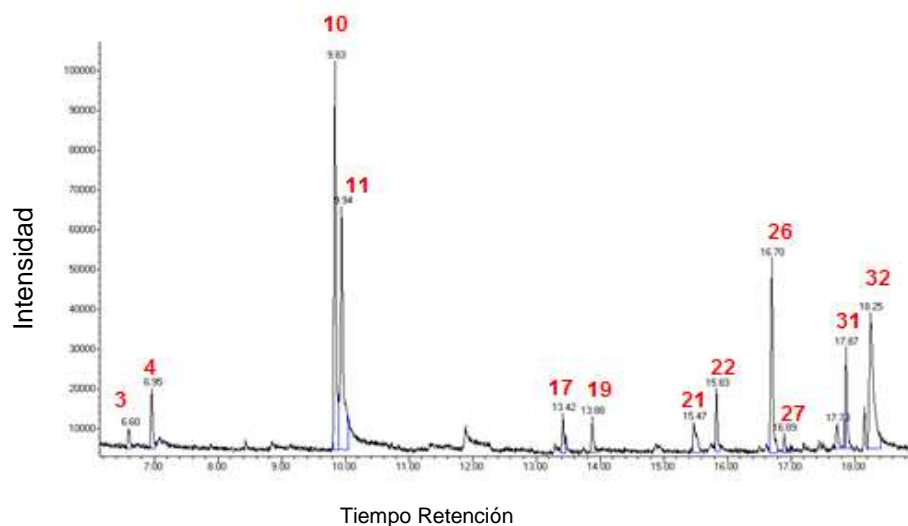
Cacao sobre-maduro (SM-1)



Cacao sobre-maduro (SM-2)



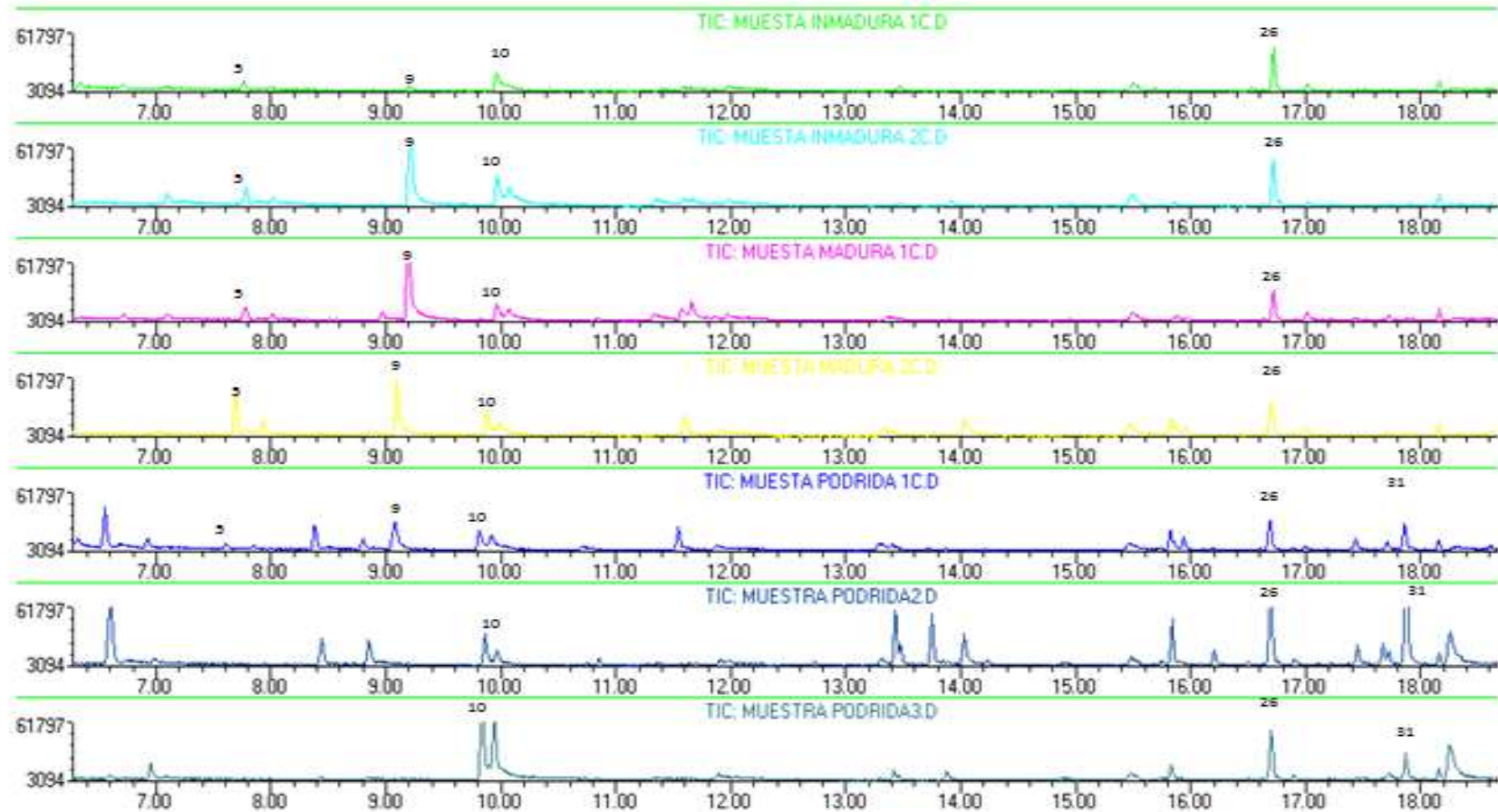
Cacao sobre-maduro (SM-3)



Anexo 4. Compuestos claves de cacao

Tipo de Muestra	Butanal-3-metil	2-Butanone 3 hidroxí	1-Butanol-3-metil	Limoneno	Linalol
	Tiempo (min)				
Inmaduro 1	7,77	9,20	9,96	16,72	
Inmaduro 2	7,78	9,21	9,96	16,72	
Maduro 1	7,78	9,19	9,97	16,72	
Maduro 2	7,69	9,09	9,88	16,70	
Sobre Maduro 1	7,61	9,08	9,81	16,69	17,87
Sobre Maduro 2			9,86	16,69	17,86
Sobre Maduro 3			9,83	16,70	17,87
Promedio	7,726	9,154	9,899	16,7057	17,8666
DS	0,072	0,059	0,060	0,010	0,08

Anexo 5. Cromatogramas de cacao



Anexo 6. Análisis estadístico de compuestos claves de cacao

2-butanone-3-hidroxi

C1	N	Media	Agrupación
M-1	2	3226815	A
I-2	2	3058690	A
M-2	2	1520065	B
SM-1	2	883115	C
I-1	2	69141	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Butanal 3-metil

Agrupar información utilizando el método de Tukey

C1	N	Media	Agrupación
M-2	2	789463	A
I-2	2	329459	B
M-1	2	311418	B
I-1	2	164676	C
SM-1	2	113442	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Limoneno

Agrupar información utilizando el método de Tukey

C1	N	Media	Agrupación
SM-2	2	1690214	A
SM-3	2	935453	B
I-2	2	909858	B
I-1	2	867324	B C
M-2	2	677838	C D
SM-1	2	613307	D
M-1	2	575655	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Linalol:

Agrupar información utilizando el método de Tukey

C1	N	Media	Agrupación
SM-2	2	2492850	A
SM-3	2	555563	B
SM-1	2	517153	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

1-butanol-3 metil

Agrupar información utilizando el método de Tukey

C1	N	Media	Agrupación
7	2	1917004	A
6	2	747318	B
2	2	712001	B C
5	2	668889	C D
4	2	644685	C D
1	2	632732	D
3	2	438007	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.