

**RELACIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES PRECURSORES DE
AROMA Y NOTAS SENSORIALES EN VARIEDADES DE CACAO DEL
DEPARTAMENTO DE SANTANDER POR MEDIO DE ANÁLISIS DE
COMPONENTES PRINCIPALES PCA.**

**MARÍA ALEJANDRA GUALDRÓN ZAMBRANO
MARÍA ISABEL GUARÍN HENAO**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2017

**RELACIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES PRECURSORES DE AROMA Y
NOTAS SENSORIALES EN VARIETADES DE CACAO DEL DEPARTAMENTO DE
SANTANDER POR MEDIO DE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES
PCA**

**MARÍA ALEJANDRA GUALDRÓN ZAMBRANO
MARÍA ISABEL GUARÍN HENAO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Ingeniero Químico**

**Director:
Prof. LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO
Ingeniero Químico, Ph.D.**

**Co-director:
CRISTIAN GIOVANNY PALENCIA BLANCO
Ingeniero Químico**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2017

DEDICATORIA

***Dios**, por guiarme para culminar con éxito este trabajo, darme fortaleza para superar cada obstáculo y por haber puesto en mi camino a personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este proceso.*

*Mis padres, **Claudia** y **Dario**, por ser mi apoyo incondicional, por su amor y sus enseñanzas y por ser la motivación para lograr todos mis objetivos.*

*Mi hermano, **Daniel**, por su amor, su compañía y por alegrarme cada día.*

*Mi **familia y amigos**, por siempre esperar lo mejor de mí y darme ánimos constantemente.*

*Mi compañera y amiga **Isa** por su apoyo y por los momentos vividos durante el desarrollo de este proyecto.*

María Alejandra.

*A mis padres, **Luis Felipe** y **Patricia**, porque sin ellos nada de esto hubiera sido posible.*

*A mis hermanos, **Jose** y **Laura**, por sus consejos y apoyo en cada uno de mis pasos.*

*A mi familia, especialmente a mi abuelita **Isabel** y mi tía **Lucila**, quienes sé que pidieron mucho a **Dios** para que se dieran todos mis logros.
A mi abuelito **Jaime**, que desde el cielo me cuida y me alcahuetea en cada una de mis decisiones.*

A mis amigos y amigas, porque siempre estuvieron ahí con una sonrisa o un plan para subir el ánimo y celebrar los triunfos.

*A **Aleja**, mi compañera y ahora amiga, porque cada momento vivido me dejó una enseñanza para siempre.
¡LO LOGRAMOS!*

María Isabel

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander y a la escuela de Ingeniería Química por ofrecernos una formación integral durante este proceso.

A nuestro director, el profesor Luis Javier López, por su confianza, su guía constante, su tiempo y sobre todo por su apoyo en cada paso del proyecto.

A nuestro codirector y amigo, Cristian Palencia, por su colaboración, apoyo constante y por sus consejos que fueron de gran ayuda en cada momento.

Al Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA, especialmente a Luis Carlos Rodríguez y Sergio Pico, por ayudarnos en la realización experimental y por sus enseñanzas académicas y morales.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA por suministrarnos el material requerido para el desarrollo del proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. METODOLOGÍA	27
1.1 PRIMERA ETAPA.....	28
1.1.1 Análisis bromatológico	28
1.1.2 Prueba de corte	29
1.2 SEGUNDA ETAPA	30
1.2.1 Preparación de la muestra	30
1.2.3 Análisis sensorial	31
1.3 TERCERA ETAPA.....	31
1.3.1 Acondicionamiento de la muestra	31
1.3.2 Diseño de experimentos: Superficie de respuesta para determinar condiciones de SPME.....	32
1.3.3 Absorción de compuestos volátiles usando la técnica de SPME.....	33
1.3.4 Cromatografía de gases FID.....	33
1.3.5 Identificación de compuestos volátiles precursores de aroma.....	34
1.3.6 Cuantificación de los compuestos volátiles precursores de aroma.....	35
1.3.6.1 Método de estándar interno	35
1.3.6.2 Cuantificación de los compuestos volátiles.....	36
1.4 CUARTA ETAPA	36
1.4.1 Análisis por componentes principales PCA.....	36

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS	38
2.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO.....	38
2.2 PRUEBA DE CORTE.....	39
2.3 ANÁLISIS SENSORIAL	41
2.4 DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	42
2.5 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN EL LICOR DE CACAO	44
2.6 DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA POR EL MÉTODO DE ESTÁNDAR INTERNO.....	45
2.7 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES POR EL MÉTODO ESTÁNDAR INTERNO.....	46
2.8 ANÁLISIS POR COMPONENTES PRINCIPALES PCA.....	47
2.8.1 Regresión por componentes principales PCR	51
3. CONCLUSIONES	57
4. RECOMENDACIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59
ANEXOS.....	64

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Relación teobromina/cafeína para grupos genéticos de cacao.....	19
Tabla 2. Requisitos Norma Técnica Colombiana 1252.....	29
Tabla 3. Factores y niveles del diseño de experimentos.	32
Tabla 4. Resultados de análisis bromatológico.....	38
Tabla 5. Resultados polifenoles totales y relación teobromina/cafeína.....	38
Tabla 6. Resultados prueba de corte para las variedades TCS 01 e ICS 95.....	40
Tabla 7. Resultados de las áreas (integraciones de los picos).	43
Tabla 8. Cargas de correlación Matriz X.....	49
Tabla 9. Valores de relación de matrices X y Y.	54
Tabla 10. Familias representativas de compuestos volátiles y su respectivo atributo sensorial.	65
Tabla 11. Condiciones cromatográficas Teobromina, Cafeína.	72
Tabla 12. Concentración de compuestos representantes de familias.....	80
Tabla 13. Tiempos de retención de los alcanos.....	81
Tabla 14. Índices de retención y bases de comparación.	81
Tabla 15. Compuestos volátiles de las 4 variedades de cacao identificados por CG-MS.....	83
Tabla 16. Factores de respuesta por medio del método estándar interno.	84
Tabla 17. Concentración de los compuestos volátiles precursores de aroma para cada variedad.	85

Tabla 18. Compuestos volátiles en común en las 4 muestras. 87

Tabla 19. Datos de análisis sensorial Matriz Y. 88

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Perfil sensorial para la variedad ICS 6.....	21
Figura 3. Perfil sensorial TCS 01.	41
Figura 4. Perfil sensorial ICS 95.	41
Figura 5. Superficie de respuesta y optimización para SPME.	44
Figura 6. Gráfica de puntuaciones Matriz X.....	47
Figura 7. Gráfica de cargas Matriz X.	47
Figura 8. Gráfica de cargas de correlación Matriz X.....	49
Figura 9. Gráfica puntuaciones Matriz Y.....	50
Figura 10. Gráfica cargas Matriz Y.	51
Figura 11. Cargas de correlación Matrices X y Y.....	51
Figura 12. Gráfica de cargas de correlación Matrices X y Y.....	52

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. FAMILIAS DE COMPUESTOS Y ATRIBUTOS SENSORIALES DESCRITOS	65
ANEXO B. IMAGEN DE DIAGRAMA METODOLÓGICO	67
ANEXO D. PROCEDIMIENTOS DEL ANÁLISIS BROMATOLÓGICO	68
ANEXO D. PROCEDIMIENTO PARA CÁLCULO DE POLIFENOLES TOTALES	71
ANEXO E. PROCEDIMIENTO PARA CÁLCULO DE TEOBROMINA Y CAFEÍNA	72
ANEXO F. TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	73
ANEXO G. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR MEDIO DEL SOFTWARE NIST MS 13. (FRAGMENTACIÓN DE MOLÉCULAS)	75
ANEXO H. ÍNDICES DE RETENCIÓN DE KOVATS PARA LOS COMPUESTOS DE LA VARIEDAD TCS 01 BIEN FERMENTADA.....	77
ANEXO I. BÚSQUEDA DE COMPUESTOS EN LA BIBLIOTECA NIST	78
ANEXO J. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA.....	79
ANEXO K. RESULTADOS ÍNDICES DE KOVATS.....	81
ANEXO L. COMPUESTOS VOLÁTILES IDENTIFICADOS POR CG-MS, FRAGMENTACIÓN E ÍNDICES DE KOVATS	83

ANEXO M. FACTORES DE RESPUESTA POR FAMILIAS	84
ANEXO N. CONCENTRACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRECURSORES DE AROMA.....	85
ANEXO O. DATOS DE ANÁLISIS SENSORIAL MATRIZ Y	88
ANEXO Ñ. CURVAS DE VARIANZA EXPLICADA PARA LA CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA MATRICES X Y Y.....	89

RESUMEN

TÍTULO: RELACIÓN ENTRE COMPUESTOS VOLÁTILES PRECURSORES DE AROMA Y NOTAS SENSORIALES EN VARIEDADES DE CACAO DEL DEPARTAMENTO DE SANTANDER POR MEDIO DE ANÁLISIS POR COMPONENTES PRINCIPALES PCA*

AUTORES: MARÍA ALEJANDRA GUALDRÓN ZAMBRANO,
MARÍA ISABEL GUARÍN HENAO**

PALABRAS CLAVES: Compuestos volátiles, análisis sensorial, DOE, superficie de respuesta, SPME, GC-FID, GC-MS, índices de Kovats, PCA.

DESCRIPCIÓN:

Se caracterizaron los compuestos volátiles de dos variedades de *Theobroma cacao* L cultivadas y cosechadas en el departamento de Santander TCS 01 e ICS 95, 2 muestras por cada una (al azar y bien fermentada), por análisis sensorial descriptivo, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y análisis estadístico multivariable de componentes principales PCA. Se seleccionaron seis notas sensoriales (cacao, nuez, floral, frutal, ácido y dulce) para evaluar los licores de cacao. La extracción de los compuestos de aroma se realizó por SPME determinando las condiciones óptimas de temperatura y tiempo (60°C y 40 minutos, respectivamente) por medio de un diseño de experimentos (DOE) de superficie de respuesta con 13 experimentos y sus respectivas réplicas. Un total de 52 compuestos volátiles fueron identificados por GC-MS, fragmentación de moléculas e índices de retención de Kovats, y cuantificados por el método de estándar interno.

Los ésteres y los alcoholes constituyeron las familias con mayor número de compuestos de aroma encontrados en los licores de cacao representando un 38% del número total. Se utilizó la técnica PCA para dilucidar la relación entre los 6 atributos sensoriales y 21 compuestos precursores de aroma presentes en las 4 muestras. PCA permitió explicar un 95% de la varianza total asociada a la caracterización sensorial. Las percepciones nuez y cacao estuvieron relacionadas con los compuestos 2,3,5-trimetilpirazina, 2,3,5,6-tetrametilpirazina y 2,3-butanodiol. La nota ácida estuvo relacionada con ácido acético y 3-hidroxi-2-butanona. Además, dulce se relacionó con 2-heptanona y 2-acetil-pirrol.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Director: Luis Javier López Giraldo, Ingeniero Químico Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: RELATION BETWEEN AROMA PRECURSORS VOLATILE COMPOUNDS AND SENSORIAL NOTES IN COCOA VARIETIES OF SANTANDER DEPARTMENT BY PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS PCA*

AUTHORS: MARÍA ALEJANDRA GUALDRÓN ZAMBRANO,
MARÍA ISABEL GUARÍN HENAO**

KEYWORDS: Volatile compounds, sensory analysis, DOE, response surface, SPME, GC-FID, GC-MS, Kovats Indexes, PCA.

DESCRIPTION:

Volatiles of two varieties of *Theobroma cocoa L* grown and harvested in the department of Santander TCS 01 and ICS 95, two samples for each one (random and well-fermented cocoa beans) were characterized by descriptive sensory analysis, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and statistic multivariable principal component analysis (PCA). Six attributes (cocoa, nutty, floral, fruity, acid and sweet) were selected to evaluate cocoa liquor. Aroma compounds extraction was realized by SPME determining the optimum conditions of temperature and time (60°C and 40 minutes, respectively), by a design of experiments (DOE) containing 13 experiments and their respective replicates. A total of 52 volatile compounds were identified by GC-MS, fragmentation of molecules and retention indexes of Kovats and quantified by the standard internal method.

Esters and alcohols constituted the families with the highest number of aroma compounds found in cocoa liquor representing 38% of the total number. PCA was used to elucidate the relationship between the 6 sensory attributes and 21 aroma precursor compounds present in the 4 samples. PCA allowed 95% of the total variance associated with sensory characterization. Nutty and cocoa perceptions were related to 2,3,5-trimethylpyrazine, 2,3,5,6-tetramethylpyrazine and 2,3-butanediol. The acid note was related to acetic acid and 3-hydroxy-2-butanone. Sweet was related to 2-heptanone and 2-acetyl-pyrrole.

* Undergraduate Project

** Physical and Chemical Engineering's Faculty. School of Chemical Engineering. Food Science And Technology Research Center. Advisor: Luis Javier López Giraldo. Chemical Engineer, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao L.*) tiene gran aplicación en la industria por ser materia prima de chocolatería y confitería, además, por sus micro y macronutrientes que son usados en productos cosméticos y farmacéuticos. Actualmente, es uno de los cultivos priorizados con fines comerciales en varios países tropicales, debido a que el consumo de productos chocolateros ha aumentado en los últimos años¹. El cacao se cultiva exclusivamente en una banda geográfica muy estrecha cerca del Ecuador (20° al Norte y Sur de Ecuador) debido a sus exigencias climáticas². Esta banda se extiende por África occidental, partes de Centro y Sudamérica y el Sudeste de Asia³.

El consumo de esta materia prima ha aumentado en los últimos años, gracias a que numerosas investigaciones han mostrado que los productos derivados del cacao tiene un efecto benéfico sobre la salud de los consumidores.

El cacao se clasifica en fino y de aroma y en ordinario o común. En la primera categoría se encuentran los granos provenientes de materiales criollos y trinitarios; mientras que en la segunda, los granos de cacaos forasteros. El cacao fino y de aroma posee atributos sensoriales agradables específicos tales como frutales, florales, de nueces y de malta⁴; los cuales son apreciados por la industria de transformación porque a partir de este tipo de granos, pueden obtenerse productos chocolateros de alta calidad que satisfacen los paladares más

¹ VILLAMIL, Perea, et al. Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia) Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), Bogotá (Colombia), 2013.

² AFOAKWA, Emmanuel Ohene. Chocolate science and technology. John Wiley & Sons, 2016.

³ DUCKI, Sylvie, et al. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 2008, vol. 74, no 5, p. 1166-1174.

⁴ INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, ICCO. Fine or flavour cocoa. [Online]. 03 January 2016. Available in: <https://icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>.

exigentes⁵. Pese a que existen nichos de mercado que buscan cacaos finos y de aroma, cerca del 90% de la producción mundial de cacao es del tipo forastero (común) y es producida por África y Asia, mientras que el 8% de la producción, la cual corresponde a cacaos finos y de aroma, es producida en países de Sudamérica, Centroamérica y en Nueva Guinea^{6,7}. Según la Organización Internacional del Cacao (ICCO por sus siglas en inglés), el 95% de la producción Colombiana corresponde a cacao fino y de aroma^{8,9}. En 2016 el mayor productor de cacao en Colombia fue el departamento de Santander, con una participación del 38,94% de la producción total que correspondió a 56.785 toneladas¹⁰.

La calidad del cacao, es decir, su clasificación en fino y de aroma o forastero establece la demanda del producto final. Este importante aspecto se determina por medio de la caracterización física, química y organoléptica, la cual se realiza después de la etapa de beneficio (fermentación y secado). Las características físicas corresponden al tamaño o índice de grano, contenido de cascarilla y prueba de corte¹¹. Las características químicas incluyen el análisis bromatológico (contenido de humedad, cenizas, carbohidratos, proteínas y grasa), el cálculo de

⁵ SOLÓRZANO CHAVEZ, Eddyn Solórzano, et al. Comparación sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional fino de aroma cultivado en diferentes zonas del Ecuador. *Revista Ciencia y Tecnología UTEQ*, 2015, vol. 8, no 1, p. 37-47.

⁶ PORTILLO, Elvis, et al. Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista UDO Agrícola*, 2009, vol. 9, no 2, p. 458-468.

⁷ PROCOLOMBIA. Inversión en el sector de Cacao, Chocolatería y Confitería en Colombia. [En línea]. Acumulado 2008 – 2014. pp. 2011–2016, 2016. Disponible en Internet: <http://inviertaencolombia.com.co/images/Adjuntos/SECTOR-CACAOYCHOCOLATERIA2016.pdf>

⁸ INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, ICCO. Fine or flavour cocoa. [Online]. 03 January 2016. Available in: <https://icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>.

⁹ INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, ICCO. International Cocoa Agreement,” 2010. [Online]. Available: https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/2-icco-agreements-and-their-history/3-2010-international-cocoa-agreement.html.

¹⁰ FEDECACAO. Producción Nacional de Cacao en grano (TON). 2016.

¹¹ PINZÓN USECHE, José Omar, et al. El beneficio y características físico químicas del cacao (*Theobroma Cacao* L.). [En línea]. En: FEDECACAO. Bogotá D.C., 2006. Disponible en Internet: <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/fedecacao-dt-beneficio-caracteristicas-fisicoquimicas-cacao.pdf>

polifenoles totales (que tiene una relación con la nota de astringencia¹²), y el contenido de metilxantinas que da la relación teobromina/cafeína, valor con el que se clasifica el grano según lo indicado en la tabla 1.

Tabla 1. Relación teobromina/cafeína para diferentes grupos genéticos de cacao.

Grupo genético	Relación Teobromina/Cafeína
Cacao Forastero	10-15
Cacao Trinitario	5-10
Cacao Criollo	1-2

Fuente: SOLÓRZANO CHAVEZ, Eddyn Solórzano, et al. Comparación sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional fino de aroma cultivado en diferentes zonas del Ecuador. Revista Ciencia y Tecnología UTEQ, 2015, vol. 8, no 1, p. 37-47.

Por último, se encuentran las propiedades organolépticas, las cuales son las más importantes al momento de catalogar a un cacao como fino y de aroma (de calidad)¹³. Estas se definen por los atributos básicos como dulce, amargo, ácido y astringente; atributos específicos como cacao, floral, frutal y nuez, y defectos adquiridos como crudo, moho y humo.¹⁴

¹² VILLAMIL, Perea, et al. Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia) Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), Bogotá (Colombia), 2013.

¹³ INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, ICCO. Fine or flavour cocoa. [Online]. 03 January 2016. Available in: <https://icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>.

¹⁴ DÍAZ, S.; PINOARGOTE, M.; CASTILLO, P. Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN-51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. 2012. Tesis Doctoral. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Ingeniería en Alimentos, Guayaquil.

Para obtener el sabor y aroma característico de un cacao fino y de aroma se deben tener en cuenta aspectos como el beneficio (fermentación y secado), tostado, genotipo y factores ambientales, primordiales para fomentar el desarrollo de los compuestos volátiles precursores de aroma¹⁵.

En el proceso de fermentación participan los microorganismos que se encuentran naturalmente en los granos que actúan modificando su color, sabor y olor¹⁶. Posteriormente en el secado se exponen los granos al sol durante varios días para disminuir el contenido de humedad del grano del 55 al 7% y así, eliminar algunos ácidos que posee el cacao. Un buen secado es clave para evitar moho y hongos en el grano y garantizar un buen sabor y aroma¹⁷. Finalmente, en el proceso de tostado, los granos se exponen a altas temperaturas para mejorar su sabor. Es en esta etapa donde se desarrolla la mayor parte de los compuestos volátiles que ofrecen las características de sabor y aroma agradables. Durante este proceso se dan reacciones tipo Maillard (pardeamiento no enzimático), conjunto complejo de reacciones químicas para la obtención de melanoidinas y de compuestos volátiles precursores de aroma como pirazinas, aldehídos, ésteres, cetonas, entre otros.¹⁸

Desde el punto de vista sensorial, la caracterización y análisis del aroma y sabor del cacao es una combinación compleja de sensaciones gustativas, olfativas, táctiles y visuales, que se perciben cuando se consume la pasta o licor de cacao o los productos chocolateros. Por este motivo esta caracterización se lleva cabo por un panel experto de catadores¹⁹, el cual consta de un grupo de 8 a 12 expertos que ponen a prueba sus sentidos para determinar el perfil sensorial siguiendo el

¹⁵ WACHER, M. Microorganismos y chocolate. Revista digital universitaria, 2011, vol. 12, no 4, p. 1-9.

¹⁶ *Ibíd.*

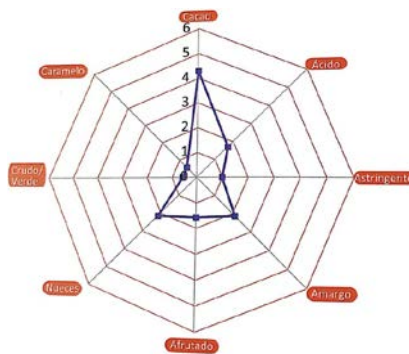
¹⁷ CASA LUCKER. Cacao fino de aroma. 2016. [Online]. Disponible en Internet: <http://www.cacaofinodearoma.com/es/cacao-fino-de-aroma/>

¹⁸ REINECCIUS, Gary. Flavor chemistry and technology. CRC press. 2006, pp. 33–72.

¹⁹ SOLÓRZANO CHAVEZ, Eddyn Solórzano, et al. Comparación sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional fino de aroma cultivado en diferentes zonas del Ecuador. Revista Ciencia y Tecnología UTEQ, 2015, vol. 8, no 1, p. 37-47.

proceso establecido en la Norma Técnica Colombiana 3929²⁰. Empleando este tipo de metodología estandarizada, los catadores califican las características sensoriales percibidas en el licor de cacao en una escala previamente establecida por el panel, que generalmente es de 0 a 10²¹. Con los resultados se obtiene un perfil sensorial para la variedad analizada como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Perfil sensorial para la variedad ICS 6.



Descripción organoléptica: Muestra que presenta un aroma de fruta seca y un color café oscuro, sabor frutal intenso (a ciruela) que perdura, con una acidez media al final de la cata. Se percibieron notas de chocolate y amargo muy agradable.

Fuente: PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé, et al. Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia) Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), Bogotá (Colombia), 2013.

Perea et al.,²² realizaron la caracterización morfológica, agronómica, física, química, funcional, y sensorial de 26 cultivares que correspondían a los materiales introducidos y regionales más comercializados en Colombia, obteniendo un perfil físico, químico y sensorial para cada una de las variedades tratadas.

²⁰ NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 3929. Análisis sensorial. Metodología: Métodos del perfil del sabor. No. 571. 2009.
²¹ CORDERO, G. Aplicación del Análisis Sensorial de los alimentos en la cocina y en la Industria Alimentaria. 2013.
²² PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé, et al. Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia) Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), Bogotá (Colombia), 2013.

En estudios realizados para identificación de los compuestos volátiles responsables del sabor y aroma del cacao, se han reportado gran cantidad de compuestos volátiles²³, que han sido asociados con aromas deseables e indeseables y agrupados en familias representativas donde cada una indica una o varias características y atributos sensoriales, como se muestra en la tabla del ANEXO A.^{24, 25}.

La extracción de los compuestos volátiles se ha realizado mediante varias técnicas, una de ellas es la Micro-extracción en Fase Sólida con Espacio de Cabeza (SPME-HS*), la cual ha sido ampliamente utilizada por su rapidez, selectividad, repetitividad y no requerimiento de solventes²⁶. Esta técnica se basa en la exposición de una microfibra para extraer por absorción la mayor cantidad de los compuestos volátiles a un determinado tiempo y temperatura. Ducki *et al.*,²⁷ examinaron la eficiencia de diferentes microfibras para absorber los compuestos volátiles de licores de cacao. Se obtuvo un mejor resultado con la microfibra 50/30 µm con recubrimiento divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), la cual aumenta la capacidad de extracción y absorción de los compuestos volátiles. Las condiciones óptimas para asegurar la transferencia eficiente de los volátiles a la fibra fueron temperatura de 60°C y tiempo de exposición de 15 minutos. Rodríguez-Campos *et al.*,²⁸ efectuaron la extracción de compuestos volátiles en granos de cacao fermentados y secos por medio de la

²³ RODRIGUEZ-CAMPOS, J., et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 2011, vol. 44, no 1, p. 250-258.

²⁴ AFOAKWA, Emmanuel Ohene, et al. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2008, vol. 48, no 9, p. 840-857.

²⁵ APROTOSOAI, Ana Clara; LUCA, Simon Vlad; MIRON, Anca. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, vol. 15, no 1, p. 73-91.

²⁶ VAS, György; VEKEY, Karoly. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of mass spectrometry*, 2004, vol. 39, no 3, p. 233-254.

²⁷ DUCKI, Sylvie, et al. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 2008, vol. 74, no 5, p. 1166-1174.

²⁸ RODRIGUEZ-CAMPOS, J., et al. Op. Cit.

técnica SPME-HS con una microfibra DVB-CAR-PDMS con tiempo de exposición de 30 min y temperatura 60°C, extrayendo diferentes compuestos como ésteres, alcoholes, ácidos entre otros. Noguera²⁹ realizó la extracción de volátiles por la técnica SPME-HS con una microfibra de DVB-CAR-PDMS y tiempos de exposición de una hora a una temperatura de 60°C en el espaciado de cabeza. Pallares-Pallares *et al.*,³⁰ utilizó la técnica SPME-HS y la microfibra DVB-CAR-PDMS manejando tiempos de acondicionamiento de 15 min y de exposición de la microfibra de 30 min con una temperatura de 60°C en el espaciado de cabeza, en donde se absorbieron los compuestos volátiles.

Para el análisis de los compuestos volátiles, la microfibra se expone en un cromatógrafo de gases (GC*) equipado con un detector de masas (MS*) o de ionización de llama (FID*); en dicho sistema cromatográfico se da la desorción, identificación y posterior cuantificación de los compuestos. Ducki *et al.*,³¹ identificaron 42 compuestos olor-activos por GC-MS. La cuantificación se llevó a cabo con el método de estándar interno, usando el tolueno como estándar. Rodríguez-Campos *et al.*,³² identificaron 39 compuestos relacionados con notas deseables e indeseables del aroma del cacao. Noguera³³ realizó identificación de 11 compuestos presentes en los licores de cacao evaluados y cuantificó por el método de adición estándar. Pallares-Pallares *et al.*,³⁴ identificaron un total de 34

²⁹ NOGUERA, Laura Marcela y MUÑOZ, N. Caracterización de materiales regionales promisorios de cacao colombiano: Física, química, funcional y organoléptica. Universidad Industrial de Santander, 2014.

³⁰ PALLARES-PALLARES, Andrea; PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; LÓPEZ-GIRALDO, Luis Javier. Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51. Respuestas, 2016, vol. 21, no 1, p. 120-133.

³¹ DUCKI, Sylvie, et al. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. Talanta, 2008, vol. 74, no 5, p. 1166-1174.

³² RODRIGUEZ-CAMPOS, J., et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. Food Research International, 2011, vol. 44, no 1, p. 250-258.

³³ NOGUERA, Laura Marcela; MUÑOZ, N. Op. Cit. 2014.

³⁴ PALLARES-PALLARES, Andrea; PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; LÓPEZ-GIRALDO, Luis Javier. Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en

compuestos volátiles durante el proceso de fermentación y secado del clon CCN-5.

Así mismo, estudios realizados han mostrado que se pueden relacionar las notas sensoriales con compuestos volátiles precursores de aroma utilizando técnicas multivariantes como el Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés). Esta es una técnica usada para la reducción de la dimensionalidad de un conjunto de datos, facilitando así su interpretación³⁵. Su método de proyección toma la información que transportan las variables originales y la proyecta sobre un número menor de variables latentes llamadas componentes principales que explican cierta variabilidad de los datos. El trazado o gráfica de PCs pueden revelar importantes relaciones entre muestras y variables, lo que conduce a la interpretación de ciertas agrupaciones de muestras, similitudes o diferencias³⁶. M. González *et al.*,³⁷ estudiaron la relación entre análisis instrumental de compuestos volátiles de vino Godello con su percepción sensorial mediante el uso de PCA. Dos componentes principales explicaron la varianza en un 99 % y 79% para los compuestos y las notas sensoriales, respectivamente. Se encontraron, por ejemplo, correlaciones positivas del descriptor floral con hexanoato de etilo y acetato de isoamilo, y del descriptor de fruta madura (notas de melón), y ácido caprílico. Para cacao no se ha aplicado esta técnica que relaciona los compuestos volátiles con notas sensoriales, sin embargo se ha trabajado con PCA para otros fines. De Brito *et al.*,³⁸ implementaron PCA en distintas muestras de cacao para observar la variación de la concentración de aminoácidos y azúcares reductores en las etapas del beneficio de cacao, logrando explicar el 62,6% y el 29,1% de la

granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51. *Respuestas*, 2016, vol. 21, no 1, p. 120-133.

³⁵ PEÑA, Daniel. *Análisis de datos multivariantes*. Madrid: McGraw-Hill, 2002.

³⁶ JACKSON, J. Edward. *A user's guide to principal components*. John Wiley & Sons, 2003.

³⁷ ÁLVAREZ, M. González, et al. Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC-MS. *Food Chemistry*, 2011, vol. 129, no 3, p. 890-898.

³⁸ DE BRITO, Edy S., et al. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001, vol. 81, no 2, p. 281-288.

varianza total (PC1 y PC2 respectivamente). Así mismo, Rodríguez-Campos *et al.*,³⁹ aplicaron PCA para determinar cuáles compuestos volátiles y no volátiles fueron importantes en el proceso de fermentación y secado de los granos de cacao. Pallares-Pallares *et al.*,⁴⁰ utilizaron PCA para el análisis del efecto del proceso de beneficio en los compuestos volátiles del clon de cacao CCN-51. Los componentes principales obtenidos explicaron el 43,49% y el 24,54% de la varianza total (PC1 y PC2 respectivamente).

La calidad del cacao colombiano en los últimos años ha disminuido por la falta de conocimiento de la caracterización del perfil sensorial, lo que conlleva a mezclar variedades de cacao fino y de aroma con forastero, perdiendo las propiedades y cualidades de fino y de aroma⁴¹.

Como se mencionó anteriormente, la caracterización sensorial de licores de cacao se realiza mediante un panel de cata pero estos son escasos, poco accesibles, costosos además de subjetivos. Aunque la subjetividad depende de la percepción, experiencia y estado físico y mental de los catadores, esta puede reducirse gracias al entrenamiento y calibración del panel, empleando estándares de referencia para cada uno de los descriptores analizados⁴². El problema radica en que los pocos paneles existentes en Colombia se encuentran asociados con grandes empresas transformadoras o con algunas agremiaciones siendo muy solicitados. Esto sumado al hecho de que se saturan porque solo pueden realizar hasta 12 catas por día, conlleva a la imposibilidad de hacer una caracterización

³⁹ RODRIGUEZ-CAMPOS, J., et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 2011, vol. 44, no 1, p. 250-258.

⁴⁰ PALLARES-PALLARES, Andrea; PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; LÓPEZ-GIRALDO, Luis Javier. Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51. *Respuestas*, 2016, vol. 21, no 1, p. 120-133.

⁴¹ FEDECACAO. Colombia tiene plan decenal para el CACAO. *Colombia Cacaotera*, vol. 11, pp. 13-14, 2011.

⁴² CORDERO, G. *Aplicación del Análisis Sensorial de los alimentos en la cocina y en la Industria Alimentaria*. 2013.

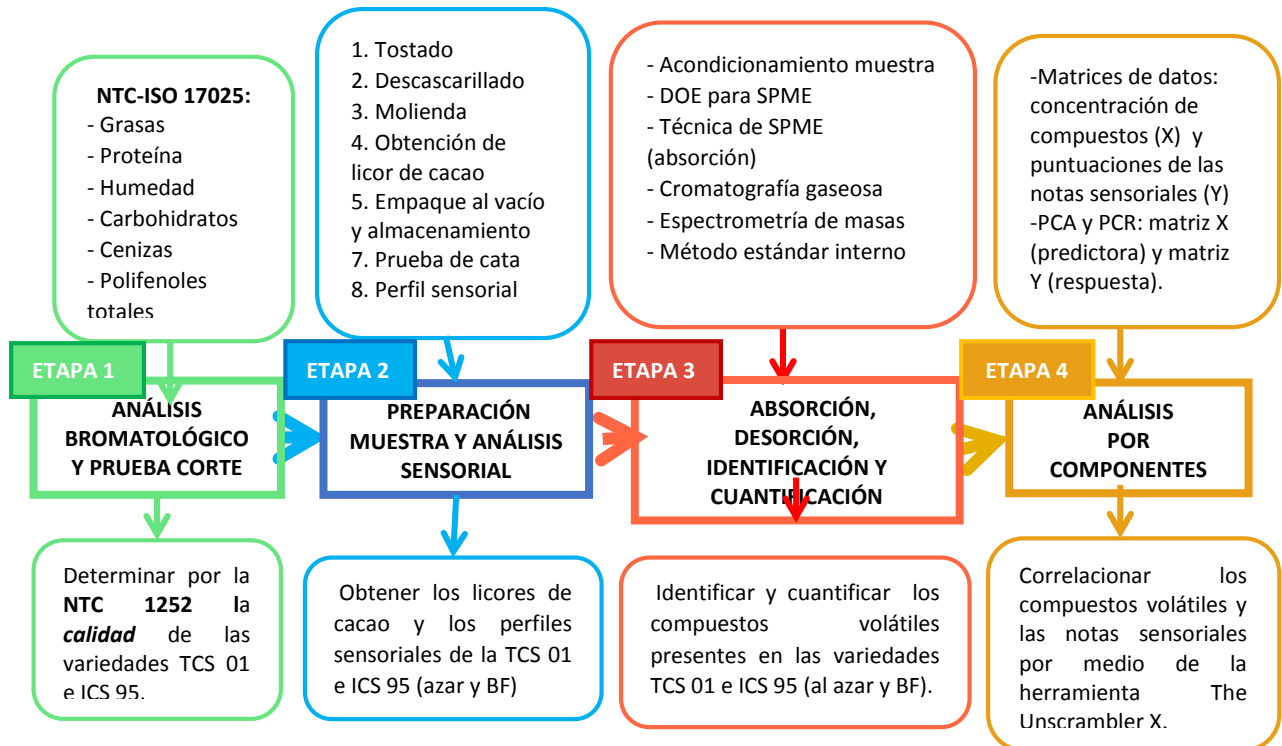
sensorial rápida en tiempo real de las cosechas. Por esta razón se impide el ingreso del cacao producido por los pequeños productores a nichos de mercado altamente especializados, haciendo que las posibilidades de exportación sean prácticamente nulas, pues en un futuro no se va a poder cumplir con los volúmenes o cuotas de granos uniformes y perfilados como finos y de aroma.

Así las cosas, aunque el proceso de cata es utilizado mundialmente para la caracterización sensorial de granos de cacao, se propone un estudio que no se ha realizado anteriormente para cacao pero sí para otros productos como vino, aceites esenciales y café, en el que se busque explicar las características sensoriales de varias muestras empleando como variables predictoras las concentraciones de los compuestos de aroma y como variables de respuesta las puntuaciones de los atributos sensoriales, incursionando en nuevas técnicas estadísticas alternativas más objetivas y rápidas como el Análisis de Componentes Principales PCA.

En este estudio se propone obtener una relación de los compuestos volátiles precursores de aroma y las notas sensoriales cacao, frutal, floral, nuez, ácido y dulce de las variedades Theobroma Cacao La Suiza TCS 01 e International Collage Selection ICS 95, suministradas por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, tomando para cada variedad dos muestras: granos bien fermentados (BF) y granos al azar, para desarrollar perfiles sensoriales y químicos de las mismas. De esta forma, se esperaría tener una base para lograr un mapa de perfil sensorial y químico y así conseguir un seguimiento de la calidad de cacao para variedades específicas del país. Lo anterior sin intención de reemplazar los paneles de cata, sino crear una herramienta de apoyo a estos.

1. METODOLOGÍA

Figura 2. Diagrama metodológico por etapas



En la figura 2 se muestra la metodología que se empleó para cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo. La metodología tiene 4 etapas, las cuales fueron aplicadas a cada una de las muestras sujetas a análisis. En la etapa 1, se realizó el análisis bromatológico y la prueba de corte con el fin de caracterizar los granos de cacao; en la etapa 2, se tomaron los granos de las variedades (TCS 01 e ICS 95), previamente fermentados y secados por CORPOICA; estos granos fueron separados en 2 muestras por cada variedad (granos al azar y bien fermentados), se les realizó tostado, descascarillado y molienda para la obtención del licor de cacao, al que posteriormente se le evaluó el perfil sensorial por medio de una prueba de cata. En la etapa 3 se tomaron muestras del licor de cacao y fueron analizadas usando las técnicas de Microextracción en Fase Sólida SPME,

Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas GC-MS y método de estándar interno aplicadas a los cromatogramas obtenidos en GC-FID para los procesos de extracción, identificación y cuantificación de los compuestos volátiles. Finalmente, en la etapa 4 se realizó el análisis de componentes principales PCA para relacionar los compuestos identificados con las notas sensoriales encontradas en los licores de cacao por medio de la herramienta The Unscrambler X. El procedimiento paso a paso se muestra en el ANEXO B.

1.1 PRIMERA ETAPA

1.1.1 Análisis bromatológico. La determinación de grasa, humedad, proteína, cenizas y carbohidratos se desarrolló siguiendo los métodos de la Association of Official Analytical números 963.15; 931.04; 920.87 y 972.15, respectivamente. Los métodos de realización se describen en el ANEXO C. Los carbohidratos totales se calculan por la sustracción de 100 menos la humedad, ceniza, grasa total y proteína de la masa total del alimento (Resolución 333 de 2011 del Ministerio de Protección Social). Así mismo, se realizó el cálculo de los polifenoles totales (PT) debido a su relación con la nota de astringencia y para poder comparar los resultados del análisis sensorial. La determinación de PT se realizó según metodología descrita por Cadena y Herrera⁴³ (ANEXO D). Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mgAG/gms)⁴⁴. Se realizó además, el cálculo de la relación teobromina/cafeína para comprobar el material del que provienen los granos (criollo, trinitario o forastero). La separación e identificación de la teobromina y la cafeína se efectuaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en

⁴³ CADENA CALA, Tatiana y HERRERA ARDILA, Yenny Mayerly. Evaluación del Efecto del Procesamiento del Cacao Sobre el Contenido de Polifenoles y Su Actividad Antioxidante, 2008.

⁴⁴ PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé, et al. Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia) Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), Bogotá (Colombia), 2013.

inglés) en el equipo HPLC Agilent Technologies 1100 equipado con un detector UV-vis (ANEXO E); la cuantificación se realizó usando el método de estándar externo (procedimiento explicado en el ANEXO J).

1.1.2 Prueba de corte. Para la prueba de corte se seleccionaron 100 granos de cacao al azar de cada variedad y se cortaron longitudinalmente por la mitad usando una guillotina magra. Seguidamente, cada uno de los granos fue analizado y categorizado de acuerdo con los requisitos de la Norma Técnica Colombiana NTC 1252⁴⁵ mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Requisitos Norma Técnica Colombiana 1252.

REQUISITOS	Premio	Corriente	Pasilla
Contenido de humedad en % (m/m) máx.	7	7	7
Contenido de impurezas o materias extrañas en % (m/m) máx.	0	0,3	0,5
Grano mohoso interno, número de granos/100 granos máx.	2	2	3
Grano dañado por insectos y/o germinados, número de granos/100 granos máx.	1	2	2
Contenido de pasilla, número de granos/100 granos máx.	1	0	0
Contenido de almendra en % (m/m), mín.	-	-	40-60
Masa (peso) en g/100 granos, mín.	120	105-119	40
Granos bien fermentados, número de granos/ 100 granos mín.	65	60	60
Granos insuficientemente fermentados, número de granos/ 100 granos máx.	35	31	24
Granos pizarrosos, número de granos/100 granos máx.	3	2	1

El contenido de humedad se determinó utilizando un medidor Aqua-Boy KPM introduciendo en él 4 granos y observando el valor en porcentaje que se muestra en el tablero. El proceso se realizó por triplicado y se determinó el porcentaje

⁴⁵ NORMA TÉCNICA COLOMBIANA, ICONTEC. NTC. 1252, Cacao en grano. p. 12, 2003.

promedio para cada variedad. Las impurezas incluyen todo material diferente al grano de cacao como tierra o piedras. El grano mohoso interno presenta una formación del hongo perceptible a la vista y con olor desagradable. El grano dañado por insectos se observa alterado en su apariencia y presenta perforaciones causadas por algún insecto. El grano pasilla es un grano plano, tan delgado que se dificulta su partida longitudinal.

La masa o índice del grano se determina tomando 100 granos al azar y pesándolos en la balanza. El nivel de fermentación se determina teniendo en cuenta aspectos de color, estructura y olor: el grano bien fermentado presenta cáscara de color marrón rojizo o pardo rojizo que se desprende fácilmente de la almendra, la cual tiene alvéolos bien definidos y olor a chocolate. Por el contrario, el grano insuficientemente fermentado presenta un color violeta o marrón violeta, de estructura semi-compacta, con cáscara difícilmente separable. Finalmente, el grano pizarroso presenta un color interior gris negruzco y estructura completamente compacta.

1.2 SEGUNDA ETAPA

1.2.1 Preparación de la muestra. Se tomaron 120 gramos de la muestra de cacao fermentado y seco y se les realizó el proceso de tostado a 100°C durante 12 minutos para granos enteros (al azar) y a 100°C durante 7 minutos para granos partidos por mitad (bien fermentados); empleando un tostador TC-150R. Posteriormente, los granos tostados fueron descascarillados manualmente y molidos usando un molino Restch GM 200 que se operó a 6000 rpm durante 2 minutos hasta obtener el licor o pasta de cacao. Después este fue almacenado al vacío a 4°C para su posterior uso.

1.2.3 Análisis sensorial. El análisis sensorial para las variedades propuestas se llevó a cabo en el laboratorio CICTA por una catadora experta de CORPOICA, quien indicó según su percepción sensorial, el número o puntuación correspondiente a cada atributo teniendo en cuenta lo establecido en la NTC 3929⁴⁶ para pruebas de cata. Se estableció una escala de 0 a 10, siendo 0 ausencia del aroma o sabor, 1-2 percepción baja, 3-5 percepción media, 6-8 fuerte y 9-10 muy fuerte. Inicialmente se fundieron las muestras a baño María a 55°C por 20 min, y se realizó la cata evaluando las notas sensoriales establecidas por la catadora (cacao, ácido, frutal, floral, nuez y dulce), el sabor amargo, la sensación astringente y algunas observaciones encontradas (defectos o notas atípicas) obteniendo los perfiles sensoriales para las dos muestras (bien fermentado y al azar) de cada variedad.

1.3 TERCERA ETAPA

1.3.1 Acondicionamiento de la muestra. Previo a la absorción de los compuestos volátiles sobre la microfibra, la muestra (2 g de licor de cacao) se deposita en un vial con septa que está provisto de un agitador magnético. Seguidamente, el vial se acondiciona en un montaje de baño María en aceite mineral donde se mantiene la temperatura constante a 60°C durante 15 minutos. Con este procedimiento se favorece la saturación del espacio de cabeza con los compuestos volátiles.

⁴⁶ NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 3929. Análisis sensorial. Metodología: Métodos del perfil del sabor. No. 571. 2009.

1.3.2 Diseño de experimentos: Superficie de respuesta para determinar condiciones de SPME. La microextracción de los compuestos volátiles se llevó a cabo utilizando una microfibras de polidimetilsiloxano DVB/CAR/PDSM anfífilica (doble recubrimiento). Las condiciones de tiempo y temperatura de exposición de la microfibras fueron determinadas usando un diseño de experimentos 2^2 + estrella con 2 réplicas y 5 puntos centrales; la variable de respuesta seleccionada fue el área total de los picos de los compuestos absorbidos. Los niveles inferior y superior de cada uno de los factores evaluados se establecieron según bibliografía consultada^{47,48,49}. En la tabla 3 se muestran los factores y niveles establecidos, donde -1 representa nivel inferior y 1 nivel superior.

Tabla 3. Factores y niveles del diseño de experimentos.

Factores	Temperatura [°C]		
	Niveles	50	70
Tiempo [min]	15	-1,-1	-1,1
	60	1,-1	1,1

El objetivo fue determinar los valores de temperatura y tiempo de exposición de la microfibras de tal forma que se obtuviera el mayor valor de área total de los picos cromatográficos. Se obtuvo la gráfica de superficie de respuesta y se utilizó el método Optimizer del Software para obtener las condiciones óptimas de

⁴⁷ DUCKI, Sylvie, et al. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 2008, vol. 74, no 5, p. 1166-1174.

⁴⁸ RODRIGUEZ-CAMPOS, J., et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 2011, vol. 44, no 1, p. 250-258.

⁴⁹ PALLARES-PALLARES, Andrea; PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; LÓPEZ-GIRALDO, Luis Javier. Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51. *Respuestas*, 2016, vol. 21, no 1, p. 120-133.

temperatura y tiempo que generarían la mayor área total de los picos cromatográficos.

1.3.3 Absorción de compuestos volátiles usando la técnica de SPME. Para la absorción de los compuestos volátiles por la microfibra, se realizó el montaje planteado en la sección 1.3.1 y se expuso la microfibra a las condiciones de tiempo y temperatura óptimas determinadas en la sección 1.3.2.

1.3.4 Cromatografía de gases FID. Se utilizó un cromatógrafo GC 7890A (Agilent Technologies), equipado con inyector, horno, detector FID, y una columna apolar HP-5 de 30m x 0,25mm x 0,25 μ m. La desorción de los compuestos volátiles se realizó en el puerto de inyección a una temperatura de 265°C, modo split, exponiendo la fibra durante un período de tiempo de 7 minutos⁵⁰. La temperatura y rampas de calentamiento en el horno del cromatógrafo fueron las siguientes: inicialmente se mantuvo una temperatura de 30°C durante 10 minutos, luego se realizó un incremento de 3°C/min hasta alcanzar 60°C; después se continuó con una velocidad de calentamiento de 10°C/min hasta alcanzar 150°C, seguidamente se empleó una rampa de 4°C/min hasta alcanzar 200°C, se incrementó a una velocidad de 4°C/min hasta alcanzar 250°C; finalmente se mantuvo la temperatura durante 5 minutos. El gas de arrastre empleado fue nitrógeno a una velocidad de flujo de 1 mL/min⁵¹.

⁵⁰ NOGUERA, Laura Marcela; MUÑOZ, N. Caracterización de materiales regionales promisorios de cacao colombiano: Física, química, funcional y organoléptica. Universidad Industrial de Santander, 2014.

⁵¹ *Ibíd.*

1.3.5 Identificación de compuestos volátiles precursores de aroma. La identificación de los compuestos de aroma se realizó usando la técnica GC-MS. El equipo empleado fue un cromatógrafo de gases Agilent 7890A, acoplado a un detector de masas cuadrupole (Hewlett Packard, modelo 5972) con sistema de ionización de impacto electrónico a 70 eV y temperatura de fuente de 230°C.

El procedimiento para la absorción y desorción de los compuestos precursores de aroma es el expuesto en las secciones 1.3.1 a 1.3.4. Una vez los compuestos precursores de aroma son desorbidos en el puerto inyector, pasan a través de la columna para finalmente llegar al detector de masas. En éste último se obtienen las señales de relación masa/carga (m/z) para cada uno de los picos correspondientes a los compuestos precursores de aroma; seguidamente, se crea un reporte en donde cada señal (pico) es comparada con 3 bibliotecas Wiley 275 L de espectros, comparando el grado de coincidencia para cada una de las relaciones e intensidades m/z de cada compuesto (fragmentos) versus la información tabulada en las bases de datos de espectros de compuestos conocidos (ANEXO F). La identificación se corroboró con la herramienta NIST MS Search 2.3, donde se encuentra la lista de los compuestos con sus espectros y se comparan con los obtenidos por el espectrómetro de masas (ANEXO G).

Finalmente, para confirmar del todo la identificación de los compuestos, se calcularon los índices de retención de Kovats para cada uno de ellos mediante el procedimiento mostrado en el ANEXO H teniendo en cuenta los tiempos de retención en que estos aparecen en GC-MS.

El índice de retención obtenido para cada compuesto se busca y se compara en la biblioteca de cromatografía de gases de NIST SRD 69, donde se encuentran referencias, teniendo en cuenta el tipo de columna y las rampas de calentamiento en las que ha sido utilizado. La comparación se realiza con el dato de columna HP5 MS capilar no polar con temperatura programada, tal como se muestra en el

ANEXO I. Para GC-FID se confirmó la identidad de los compuestos volátiles realizando la comparación de los tiempos de retención y verificando los respectivos índices de retención igualmente que para GC-MS.

1.3.6 Cuantificación de los compuestos volátiles precursores de aroma:

1.3.6.1 Método de estándar interno. El método de estándar interno corrige variaciones en el rendimiento del cromatógrafo. Se hace uso de un compuesto con área y tiempo de retención predecibles, permitiendo que se usen para determinar si se han producido anomalías. Para este trabajo se eligió el tolueno puesto que tiene un área definida, no hace parte de la matriz, no interfiere con los analitos de interés y es suficientemente volátil. Así mismo, en trabajos análogos se reporta el uso de tolueno como estándar interno para cuantificar los compuestos volátiles en matrices de cacao^{52, 53}.

Debido a la gran cantidad de compuestos de aroma que se encuentran en el cacao se hace la suposición de que la respuesta de los analitos de interés podrá aproximarse por familias. Para esto se determinaron factores de respuesta para cada familia de compuestos (pirazinas, ácidos, ésteres, aldehídos, cetonas y pirroles) mediante la ecuación 1, teniendo en cuenta el procedimiento experimental mostrado en el ANEXO 10.

$$FR = \frac{[Analito] * \text{Área}_{SI}}{[SI] * \text{Área}_{Analito}}$$

Ecuación 1. Cálculo del factor de respuesta.

Donde,

- *FR*: Factor de respuesta; *SI*: Estándar interno

⁵² DUCKI, Sylvie, et al. Op. Cit.

⁵³ COUNET, Christine, et al. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. Journal of agricultural and food chemistry, 2004, vol. 52, no 20, p. 6243-6249.

1.3.6.2 Cuantificación de los compuestos volátiles. Una vez obtenidos los factores de respuesta para cada familia, se realizó la cuantificación de todos los compuestos volátiles presentes en la muestra. Para este fin se repite el procedimiento experimental de la sección 1.3.6.1 cambiando únicamente la preparación de la solución, puesto que sólo contendrá una concentración del estándar interno (tolueno) de 4200 mg/L en etanol absoluto. Las demás sub-etapas se repiten de igual manera obteniendo los valores de área necesarios para calcular mediante la ecuación 2, las concentraciones de cada analito presente en la muestra.

$$[Analito] = \frac{FR * \text{Área}_{Analito} * [SI]}{\text{Área}_{SI}}$$

Ecuación 2. Cálculo de concentración del analito (compuesto).

Donde,

- *FR*: Factor de respuesta; *SI*: Estándar interno

1.4 CUARTA ETAPA

1.4.1 Análisis por componentes principales PCA. Para realizar el análisis por componentes principales se utilizó el paquete estadístico The Unscrambler X 10.3 del Software CAMO. En este se requieren dos matrices de datos con las muestras como filas y las variables como columnas. En la primera matriz de datos (Matriz X) las filas correspondieron a las variedades analizadas y las columnas correspondieron a las concentraciones en mg/L de cada compuesto. Se decidió trabajar únicamente con los compuestos comunes en las 4 muestras, puesto que al tener pocas filas (muestras), el hecho de incluir ceros en la matriz puede afectar la sensibilidad de los datos y por tanto el resultado del análisis.

Para la segunda matriz de datos (Matriz Y) en las filas se tabularon las variedades analizadas y en las columnas los atributos sensoriales (cacao, floral, frutal, nuez, ácido y dulce) con sus calificaciones en escala de 1 a 10. Una vez creadas las matrices en el software, se realizó PCA para cada una, estableciendo el número de componentes principales hasta lograr una varianza mayor al 70%.⁵⁴

Para validar el método se escogió validación cruzada por segmentos por ser la que representa de manera más eficiente las muestras si el número es pequeño o moderado⁵⁵. El algoritmo escogido para la calibración del modelo es el de descomposición de valor singular (SVD), debido a su rapidez para datos que contengan un gran número de variables y relativamente pocas muestras como el de este estudio⁵⁶. El método propone la normalización de los datos para escalarlos en el caso de múltiples características con diferentes unidades. Para este trabajo no es necesario normalizar, debido a que las variables poseen las mismas unidades y similares órdenes de magnitud.

Se realizó regresión por componentes principales PCR para verificar la relación entre las variables de las dos matrices (compuestos y atributos sensoriales). Se estableció la Matriz X de compuestos volátiles como variable predictora y la Matriz Y de atributos sensoriales como variable respuesta y se configuraron las opciones de validación y algoritmo de la misma forma que en PCA.

⁵⁴ JACKSON, J. Edward. A user's guide to principal components. John Wiley & Sons, 2003.

⁵⁵ ESBENSEN, Kim H., et al. Multivariate data analysis: in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design. Multivariate Data Analysis, 2002.

⁵⁶ JACKSON, J. Edward. Op. Cit.

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

El análisis bromatológico, el cálculo de PT y metilxantinas para las variedades TCS 01 e ICS 95 se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 1.1.1, se tomaron datos por duplicado y se calculó el valor promedio. Los resultados se muestran en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Resultados de análisis bromatológico.

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO		
%	TCS 01	ICS 95
Humedad	4,1	5,1
Cenizas	2,7	2,8
Proteína	11,9	12,9
Grasa	54,9	53,3
Carbohidratos	26,2	25,8

Tabla 5. Resultados polifenoles totales y relación teobromina/cafeína.

	TCS 01	ICS 95
Polifenoles totales [mg EAG/gms]	22,19	29,55
Teobromina [mg/g muestra]	8,29	9,59
Cafeína [mg/g muestra]	4,24	2,55
Relación Teobromina/Cafeína	1,046	3,754

En la tabla 4 se observó que el porcentaje de grasa está dentro del rango normal para ambas variedades según lo establecido por Pinzón *et al*⁵⁷. Este porcentaje es de gran utilidad, si se tiene en cuenta que la grasa constituye una materia prima de alto valor para las industrias de chocolatería, alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos⁵⁸. El contenido de PT obtenido fue aceptable en comparación con Noguera⁵⁹ que registró valores entre 19 y 29 mgEAG/gms para semillas fermentadas y Álvarez *et al.*,⁶⁰ quienes registraron valores entre 21 y 36 mgEAG/gms para clones de cacaos fermentado y secos. Con respecto a la relación teobromina/cafeína, se compararon los datos obtenidos con bibliografía consultada⁶¹ y se comprobó según la tabla 1 que la variedad TCS 01 corresponde a cacao de origen criollo y la ICS 95 a cacao de origen trinitario.

2.2 PRUEBA DE CORTE

Los resultados obtenidos para la prueba de corte y la caracterización física de las dos variedades de cacao evaluadas se muestran en la tabla 6.

⁵⁷ PINZÓN USECHE, José Omar, et al. El beneficio y características físico químicas del cacao (*Theobroma Cacao L.*). [En línea]. En: FEDECACAO. Bogotá D.C., 2006. Disponible en Internet: <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/fedecacao-dt-beneficio-caracteristicas-fisicoquimicas-cacao.pdf>

⁵⁸ PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé, et al. Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia) Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), Bogotá (Colombia), 2013.

⁵⁹ NOGUERA, Laura Marcela; MUÑOZ, N. Caracterización de materiales regionales promisorios de cacao colombiano: Física, química, funcional y organoléptica. Universidad Industrial de Santander, 2014.

⁶⁰ COUNET, Christine, et al. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, vol. 52, no 20, p. 6243-6249.

⁶¹ PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé, et al. Op. Cit.

Tabla 6. Resultados prueba de corte para las variedades TCS 01 e ICS 95.

REQUISITO	REQUISITO SEGÚN NTC 1252	RESULTADOS TCS 01	RESULTADOS ICS 95
Contenido máximo de humedad en %	7	6,76	6,5
Contenido de impurezas o materias extrañas en %	0,3	0	0
Grano mohoso interno, número de granos/100 granos máx.	2	0	0
Grano dañado por insectos y/o germinados/100 granos máx.	2	0	0
Contenido de pasilla/100 granos máx.	2	0	0
Masa en g/100 g min	105-119	200,98	110,12
Granos bien fermentados/100 granos min	65	67	75
Granos insuficientemente fermentados /100 granos min	35	31	24
Granos pizarrosos/100 granos máx.	3	2	1

Al realizar la comparación con los valores establecidos por la NTC 1252 se concluyó que las variedades cumplían con la norma y sus granos se clasificaron como corrientes; el número de granos insuficientemente fermentados fue alto (muy cercano al valor límite) especialmente para la variedad TCS 01. Sin embargo, se llegó a la conclusión de que ambas variedades pueden ser utilizadas para fines de chocolatería.

2.3 ANÁLISIS SENSORIAL

Las características aromáticas de las cuatro muestras de cacao fueron puntuadas usando las notas sensoriales de cacao, ácido, frutal, floral, nuez y dulce, obteniendo los perfiles sensoriales para las 4 muestras analizadas como se puede observar en las figuras 3 y 4.

Figura 2. Perfil sensorial TCS 01.



Figura 3. Perfil sensorial ICS 95.



De acuerdo al perfil sensorial la TCS 01 BF tiene el mayor puntaje en cacao, nuez y dulce, esto se debe a que se escogieron los granos bien fermentados de un material criollo; mientras que los atributos sensoriales como ácido y frutal tuvieron una mayor puntuación para la variedad ICS 95 AZAR. Además, se puede observar que el atributo floral no se percibió en ninguna de las variedades, esto puede deberse a que los compuestos que lo representan (ANEXO A) no estuvieron presentes en gran concentración en las muestras. La variedad ICS 95 BF está representada por las notas de dulce y cacao. En cuanto a la TCS 01 AZAR se destacan las notas nuez, atribuida por las pirazinas, y ácido, porque se tomaron los granos al azar y varios de ellos están insuficientemente fermentados (tabla 6). Por todo lo anterior se concluye que los valores de los seis atributos sensoriales fueron adecuados y pueden ser usados para describir las características de aroma de las cuatro muestras de cacao analizadas.

Por otro lado, se analizaron los resultados para la astringencia, que si bien no se tuvo en cuenta para el análisis sensorial por tratarse de una sensación y no de un aroma, si se analizó su relación con la cantidad de PT de las muestras, obtenidos en la caracterización química. La catadora puntuó con 1 y 2 la sensación de astringencia para la variedad TCS 01 en las muestras bien fermentada y al azar respectivamente; y con 3 para la variedad ICS 95 en sus dos muestras. Esto se confirma con los resultados mostrados en la tabla 5, en la que se muestra que la variedad con mayor concentración de PT fue la ICS 95, comprobando que la cantidad de PT aumenta el nivel de astringencia, aun cuando las muestras han sido previamente fermentadas y secas.

2.4 DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

El diseño de experimentos constó de 13 experimentos con sus respectivas réplicas; cada uno se desarrolló con las condiciones descritas en los numerales

1.3.1 a 1.3.4 y los resultados del promedio de las áreas totales para cada prueba y su réplica se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de las áreas (integraciones de los picos).

PRUEBA	ÁREA	PRUEBA	ÁREA
1	2934.6	8	2114.5
2	4525.85	9	2933.5
3	4313.7	10	2439.3
4	3408.1	11	2946.9
5	2916.2	12	4825.15
6	2364.55	13	5315.85
7	2768.3	Total	43806.5

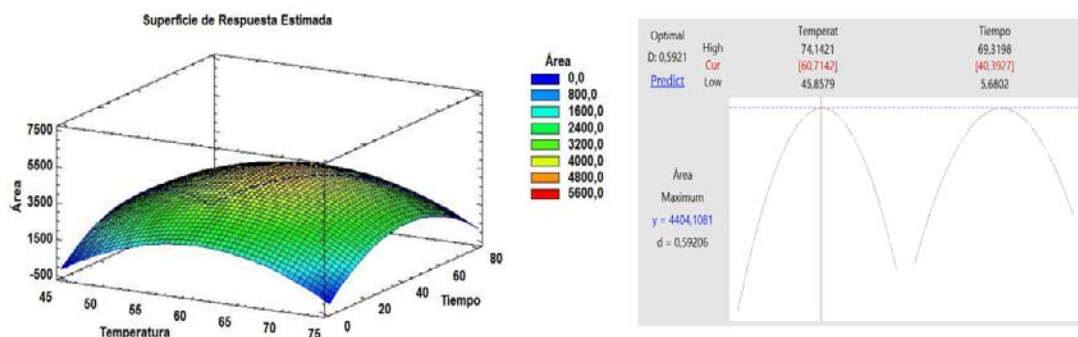
Las condiciones óptimas de temperatura y tiempo para SPME teniendo en cuenta que el área total de los picos fuese la máxima, se obtuvieron optimizando el diseño como se observa en la figura 4 y fueron 60,7142°C y 40,3927 min. Estos valores se aproximaron a 60 °C y 40 min para realizar la SPME de los compuestos volátiles. Comparando los resultados de la optimización con las condiciones encontradas en bibliografía^{62, 63, 64}, se observó que la temperatura de 60 °C era la más utilizada en los estudios obteniendo buenos resultados. Así mismo, el tiempo de exposición se mantuvo dentro del rango de los tiempos reportados (30-60 min).

⁶² NOGUERA, Laura Marcela; MUÑOZ, N. Caracterización de materiales regionales promisorios de cacao colombiano: Física, química, funcional y organoléptica. Universidad Industrial de Santander, 2014.

⁶³ RODRIGUEZ-CAMPOS, J., et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 2011, vol. 44, no 1, p. 250-258.

⁶⁴ PALLARES-PALLARES, Andrea; PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; LÓPEZ-GIRALDO, Luis Javier. Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51. *Respuestas*, 2016, vol. 21, no 1, p. 120-133.

Figura 4. Superficie de respuesta y optimización para SPME.



2.5 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN EL LICOR DE CACAO

Se realizó la identificación y comprobación de los compuestos por los métodos de Espectrometría de masas, fragmentación e índices de retención de Kovats. Para este último se obtuvieron por cromatografía gaseosa los tiempos de retención de los alcanos y se introdujeron en la ecuación del ANEXO H para así obtener los índices de retención de los compuestos. Estos resultados se muestran en las tablas del ANEXO K.

Se identificaron en total 52 compuestos volátiles presentes en los granos de cacao fermentados, secados y tostados de las 4 muestras analizadas. En el ANEXO M se observan estos compuestos organizados por familias (ácidos, aldehídos, alcoholes, cetonas, ésteres, pirazinas, pirroles y otros) y su respectivo factor de respuesta (FR).

Resultados similares a los obtenidos fueron reportados por Ducki *et al.*,⁶⁵ quienes identificaron 42 compuestos olor-activos por GC-MS; Rodríguez-Campos *et al.*, [9], quienes identificaron 39 compuestos volátiles en una variedad de cacao por GC-MS y Pallares-Pallares *et al.*,⁶⁶ quienes identificaron 34 compuestos durante los procesos de fermentación y secado en un clon. Realizando la comparación con estas fuentes bibliográficas, se identificaron 3 compuestos nuevos para este trabajo (Limoneno, 3-metil-2-butenal y 2,3 butanodiol-di-acetato).

2.6 DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA POR EL MÉTODO DE ESTÁNDAR INTERNO

En el ANEXO A se presentan los valores promedio de los factores de respuesta, la desviación estándar y los coeficientes de variación, para cada una de las familias representativas de los compuestos precursores de aroma característicos en licores de cacao. Para las familias de pirazinas, ésteres, cetonas, pirroles y aldehídos los porcentajes de coeficiente de variación fueron menores o iguales al 5%. Este valor representa la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad y se espera que sea menor a 10% para comprobar que exista repetibilidad en la toma de datos^{67,68}.

⁶⁵ DUCKI, Sylvie, et al. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 2008, vol. 74, no 5, p. 1166-1174.

⁶⁶ PALLARES-PALLARES, Andrea; PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; LÓPEZ-GIRALDO, Luis Javier. Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51. *Respuestas*, 2016, vol. 21, no 1, p. 120-133.

⁶⁷ DUCKI, Sylvie, et al. Op. Cit. *Talanta*, 2008, vol. 74, no 5, p. 1166-1174.

⁶⁸ NOGUERA, Laura Marcela; MUÑOZ, N. Op. Cit.

2.7 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES POR EL MÉTODO ESTÁNDAR INTERNO

En las tablas del ANEXO N se muestran los valores de concentración de los compuestos precursores de aroma para las 4 muestras analizadas y los 21 compuestos que se encontraron en común para las mismas. En las variedades al azar, especialmente en la TCS 01 se puede observar que la concentración de ácido acético es mayor con respecto a la de las muestras bien fermentadas. Esta diferencia se debe a que el ácido acético aporta atributos sensoriales no deseables (vinagre, agrio y astringente) los cuales están presentes en los granos de cacao insuficientemente fermentados.

Como se indicó en la tabla del ANEXO A la mayoría de los compuestos de aroma son agradables y están asociados a notas sensoriales deseadas en el cacao. Así por ejemplo, resulta benéfica la presencia de benzaldehído, fenilacetaldehído, 2-fenil-2-butenal, 2,3 butanodiol, 2-heptanol, linalool, 2-fenil-etanol, 3-hidroxi-2-butanona, 2-heptanona, 2-nonanona, 3-metil-butanol acetato, acetato de etilo, octanoato de etilo, 2,3,5,6-tetrametil pirazina, 1-(1h-pirrol-2-yl) etanona para las características sensoriales del cacao, aportando notas de cacao, dulce, nuez, floral y frutal.

Las pirazinas aportan atributos sensoriales a nuez y cacao. Observando las concentraciones de 2,3,5-trimetilpirazina y 2,3,5,6-tetrametilpirazina en la variedad TCS 01, se puede concluir que la muestra bien fermentada contiene mayor concentración de estos compuestos que la de granos al azar, este resultado concuerda con los resultados de la sección 2.3 en donde se observó que la TCS 01 BF es la que tiene una mayor nota de nuez.

2.8 ANÁLISIS POR COMPONENTES PRINCIPALES PCA

PCA se utilizó para identificar los compuestos volátiles y las notas sensoriales que mejor representan a las muestras estudiadas. El análisis se aplicó a las concentraciones de los 21 compuestos en común en las 4 muestras (Matriz X) (ANEXO N).

Figura 5. Gráfica de puntuaciones Matriz X.

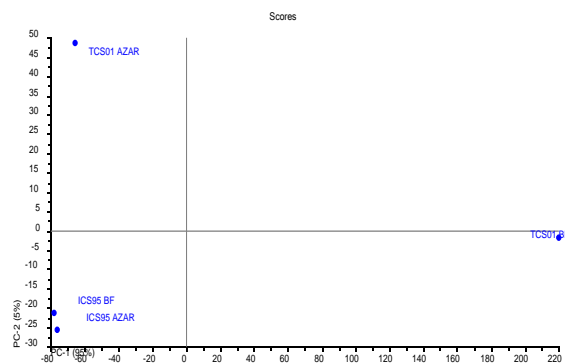
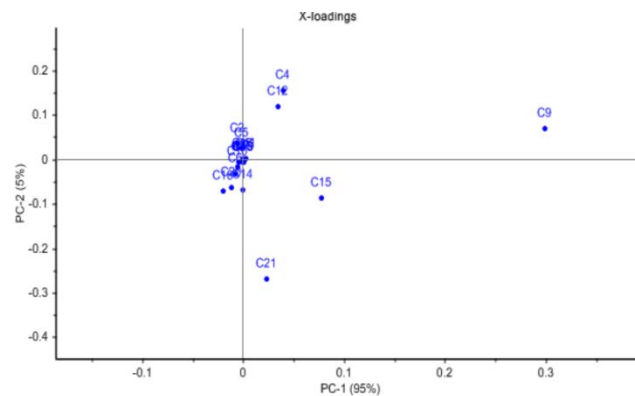


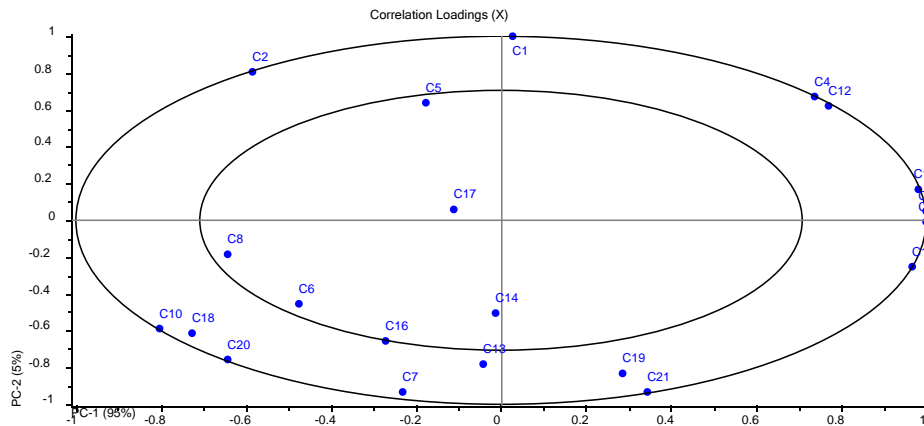
Figura 6. Gráfica de cargas Matriz X.



La figura 5 muestra el gráfico de puntuaciones para los 2 PCs, que representaron el 100% de la varianza (95 y 5% respectivamente). Las puntuaciones describen las principales características de las muestras, en relación con las variables con cargas altas en el mismo PC. La figura 6 muestra la gráfica de cargas que es empleada para establecer, en conjunto con la gráfica de puntuaciones, la importancia de cada componente y su relación con las muestras. La variedad TCS 01 BF está altamente relacionada con PC1 positivamente. TCS 01 AZAR presentó puntuaciones positivas en PC2 pero negativas para PC1. Las muestras ICS 95 bien fermentada y al azar se asociaron y presentaron valores negativos en PC1 y PC2.

Con respecto a la figura 6 se observa que C4, C9 y C12 presentan relación baja positiva con PC1 y PC2 mientras que C15 y C21 están relacionados positivamente con PC1 y negativamente con PC2. Al formarse aglomeraciones de puntos (compuestos) no se logra observar con claridad la correlación existente entre los PCs y algunos compuestos. Dicho esto, para visualizar más claramente la importancia de las variables individuales, se realiza la gráfica de cargas de correlación (figura 7). Las cargas de correlación se calculan para cada variable de los componentes principales mostrados. Además, la trama contiene dos elipses que indican cuánta varianza se tiene en cuenta. La elipse exterior indica la varianza explicada al 100% y la elipse interior al 50%.

Figura 7. Gráfica de cargas de correlación Matriz X



Esta gráfica se interpreta cualitativamente de la siguiente manera: C1 tiene baja relación con PC1 pero muy alta con PC2 y además se encuentra sobre la elipse externa del 100% lo que indica que contribuye en gran porcentaje a la explicación de la varianza total. C17 por el contrario no se puede explicar por ninguna de las PCs, porque está muy cerca al centro de las dos y dentro de la elipse interna, lo que indica que este compuesto no aporta a la explicación de la varianza. De esta forma se analizan los demás compuestos. El análisis de cargas también se realizó cuantitativamente mediante el uso de la tabla 8 de cargas de correlación, y observando el ANEXO N, el nombre del compuesto correspondientes a cada PC.

Tabla 8. Cargas de correlación Matriz X.

Correlation..	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	
	1	2	3	4	5	6	7	8	
PC-1	1	0,0279	-0,5841	1,0000	0,7381	-0,1747	-0,4739	-0,2327	-0,6409
PC-2	2	0,9995	0,8101	-0,0066	0,6726	0,6378	-0,4569	-0,9303	-0,1818

Correlation..	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	
	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
PC-1	1	0,9985	-0,8042	0,9805	0,7700	-0,0425	-0,0116	0,9678	-0,2722	-0,1113	-0,7262	0,2872	-0,6407	0,3452
PC-2	2	0,0530	-0,5887	0,1652	0,6196	-0,7866	-0,5077	-0,2512	-0,6554	0,0622	-0,6126	-0,8323	-0,7613	-0,9343

Se observa, por ejemplo, que C1 está representado por el PC1 en 0,0279 y por PC2 en 0,995, lo que confirma el análisis cualitativo de la figura 7 (C1 está altamente representado por PC2). Vale aclarar que no se trata de un porcentaje, sino de valores de distancia que oscilan entre -1 y 1, donde -1 representa la mayor correlación negativa, 1 la mayor correlación positiva y 0 que no hay correlación.

Se realizó un segundo PCA para analizar las notas obtenidas en el análisis sensorial (Matriz Y, ANEXO Ñ). Las figuras 8 y 9 muestran las relaciones entre dichas notas y las 4 muestras. Los componentes principales PC1 y PC2 representaron en conjunto el 95% de la varianza total (56% y 39%, respectivamente). La muestra ICS 95 AZAR tiene relación alta positiva con PC2 y no está explicada por PC1. ICS 95 BF se encuentra relacionada en proporciones similares positivamente con PC2 y negativamente con PC1. Por el contrario, TCS 01 BF y AZAR se muestran en puntuaciones negativas de PC2, TCS 01 BF en positivas de PC1 y TCS 01 AZAR en negativas de PC1. De acuerdo con las figuras 8 y 9, las notas ácido y frutal se asociaron a la muestra TCS 01 AZAR porque ambas se encuentran más explicadas por PC1; cacao y nuez se asociaron a la muestra TCS 01 BF, mientras que las percepciones floral y dulce se asociaron a las muestras de la variedad ICS 95.

Figura 8. Gráfica puntuaciones Matriz Y.

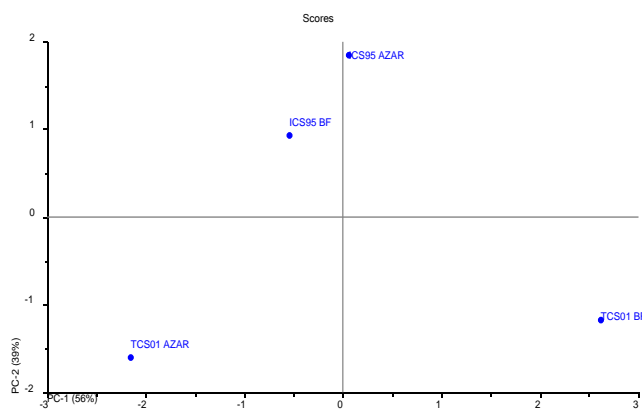
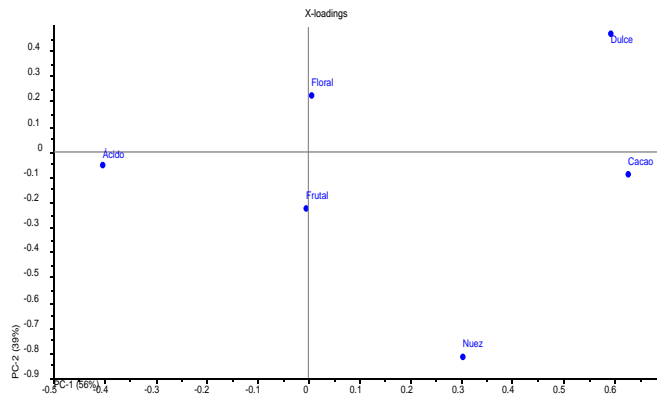


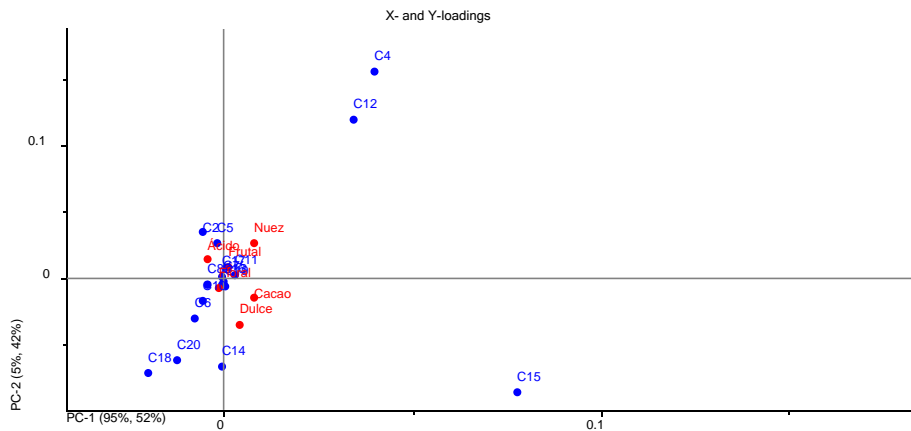
Figura 9. Gráfica cargas Matriz Y.



Las gráficas de las varianzas explicadas para calibración y validación del método se muestran en el ANEXO O con sus respectivos análisis. Adicionalmente, para mayor entendimiento de esta técnica, un ejemplo del procedimiento algebraico para PCA con dos variables, se muestra en el ANEXO P.

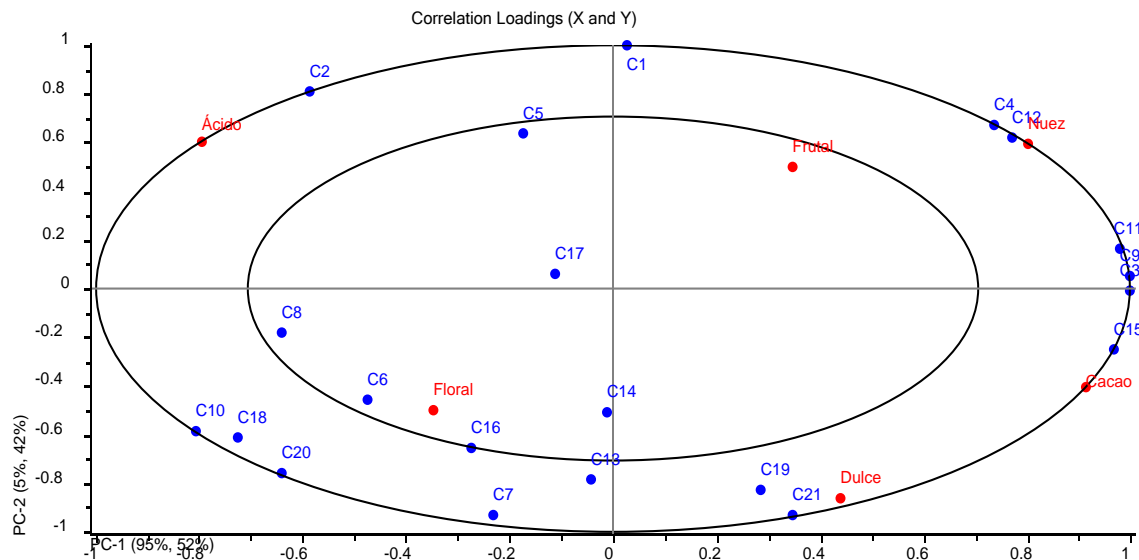
2.8.1 Regresión por componentes principales PCR. PCR se realizó para relacionar las matrices X y Y analizadas por los PCA. Se obtuvo una gráfica bidimensional de cargas (X y Y) mostrada en la figura 10 donde se asocian los compuestos y los atributos sensoriales representando el 100% y el 94% de la varianza, respectivamente.

Figura 10. Cargas de correlación Matrices X y Y.



La gráfica de cargas de correlación se interpreta de mejor manera con la figura 11. Los puntos correspondientes a compuestos o atributos que se encuentran dentro de la elipse interior no están del todo bien modelados y fallan en explicar la variación de la sensibilidad de datos.

Figura 11. Gráfica de cargas de correlación Matrices X y Y.



Se observa que las notas frutal y floral y los compuestos C5, C6, C8 y C14 explican menos del 50% de la varianza y por lo tanto la sensibilidad de estos datos es baja. En el caso de las notas (frutal y floral) esto se puede explicar por las bajas puntuaciones en el análisis sensorial. Existe correlación positiva entre la nota de nuez con los compuestos 2,3-butanodiol (C4) y 1-metil-4-(1metil etenil) ciclohexeno (Limoneno) (C12), la nota dulce se relaciona con los compuestos 6-metil-3,5-dihidroxi-2,3-dihidro-4h-piran-4-ona (C19) y etanoato de 2-fenil etilo (C21); igualmente, cacao y 2,3,5,6-tetrametilpirazina (C15); floral con ácido-2-metil-butanoico (C6) y 2-nonanona (C16); el atributo ácido con 3-hidroxi-2-butanona (C2). Estos resultados se pueden interpretar por la cercanía y por la distancia igual o similar a cada eje de las PCs entre los compuestos y las notas sensoriales. También se observan correlaciones negativas entre notas y compuestos que se encuentran en cuadrantes diagonales o muy lejanos con respecto a los ejes de las PCs. Este es el caso de la nota ácido con los compuestos 2,3,5-trimetil pirazina (C11), 2,3-butanodiol (C3) y acetato de etilo (C9), dulce con ácido acético (C1); y nota cacao con benzaldehido (C10) y 2-feniletanol (C18).

En la tabla 9 se muestra el análisis cuantitativo de la figura 11 comparando las cargas de los compuestos y las notas sensoriales para las dos PCs.

Tabla 9. Valores de relación de matrices X y Y.

		PC-1	PC-2
		1	2
C1	1	0,0279	0,9995
C2	2	-0,5841	0,8101
C3	3	1,0000	-0,0066
C4	4	0,7381	0,6726
C5	5	-0,1747	0,6378
C6	6	-0,4739	-0,4569
C7	7	-0,2327	-0,9303
C8	8	-0,6409	-0,1818
C9	9	0,9985	0,0530
C10	10	-0,8042	-0,5887
C11	11	0,9805	0,1652
C12	12	0,7700	0,6196
C13	13	-0,0425	-0,7866
C14	14	-0,0116	-0,5077
C15	15	0,9678	-0,2512
C16	16	-0,2722	-0,6554
C17	17	-0,1113	0,0622
C18	18	-0,7262	-0,6126
C19	19	0,2872	-0,8323
C20	20	-0,6407	-0,7613
C21	21	0,3452	-0,9343
Cacao	22	0,9125	-0,4083
Ácido	23	-0,7943	0,6065
Frutal	24	0,3473	0,5009
Floral	25	-0,3473	-0,5009
Nuez	26	0,8008	0,5983
Dulce	27	0,4411	-0,8643

Para encontrar la relación entre las variables y las notas sensoriales que fueron difíciles de observar en la gráfica, primero se tomó para un compuesto, el mayor valor (positivo o negativo) entre las dos componentes. Con este valor se seleccionó el PC y se buscó por la misma columna en los valores de la notas, el más cercano al valor original, mostrando de esta manera a cuales notas sensoriales se asociaba el compuesto.

Por ejemplo, el ácido acético (C1) tiene mayor valor entre las dos PCs de 0,9995 correspondiente a PC2. En la columna de PC2, se buscaron los valores más cercanos a 0,9995 entre las notas sensoriales, obteniendo las notas ácido, frutal y nuez (0,6065, 0,5009 y 0,5983 respectivamente) y dando como resultado que C1 se asociaba principalmente con la notas ácida y nuez.

Realizando el mismo procedimiento para cada compuesto, se obtuvieron las relaciones como se muestran a continuación:

C1: ácido acético → ácido, nuez

C2: 3-hidroxi-2-butanona → ácido, nuez

C3, C4: 2,3-butanodiol → cacao, nuez

C5: 3-metil-2-butanodiol diacetato → ácido, nuez

C6: ácido 2-metil-butanoico → floral, ácido

C7: 2-heptanona → dulce, floral

C8: 2-heptanol → floral

C9: acetato de etilo → cacao, nuez

C10: benzaldehido → floral

C11: 2,3,5-trimetil pirazina → cacao, nuez

C12: 1-metil-4-(1metil etenil) ciclohexeno (Limoneno) → nuez, cacao

C13: 1-(1h-pirrol-2-yl) etanona → dulce

C14: 2,3-butanodiol-diacetato → floral, cacao

C15: 2,3,5,6-tetrametil pirazina → cacao, nuez

C16: 2-nonanona → floral, dulce

C17: 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (Linalool) → floral, frutal

C18: 2-feniletanol → floral, dulce

C19: 6-metil-3,5-dihidroxi-2,3-dihidro-4h-piran-4-ona → dulce, cacao

C20: octanoato de etilo → dulce, floral

C21: etanoato de 2-fenil etilo → dulce, cacao

La mayoría de compuestos fueron representados por las notas sensoriales deseables (cacao, nuez, dulce, floral y frutal) con excepción del ácido acético (C1), 3-hidroxi-2-butanona (C2) y 3-metil-2-butanodiol diacetato (C5), los cuales se asociaron principalmente a la nota de ácido, que no es tan deseable por su relación con sensaciones de rancidez y astringencia.

Las pirazinas 2,3,5-trimetil pirazina (C11) y 2,3,5,6-tetrametil pirazina (C15) como se había reportado en bibliografía consultada^{69,70,71}, se asociaron a las notas cacao y nuez. Así mismo, las cetonas 2-heptanona (C7), 2-nonanona (C16) y los compuestos con estructura cetónica 1-(1h-pirrol-2-yl) etanona (C13) y 6-metil-3,5-dihidroxi-2,3-dihidro-4h-piran-4-o⁷² na (C19), se asociaron a la nota dulce. Los alcoholes 2-heptanol (C8), linalool (17) y 2-feniletanol (C18) se asociaron principalmente a la nota floral. Para el caso de los ésteres no se logró hacer una generalización para relacionarlos con alguna nota: el 3-metil-2-butanodiol diacetato (C5), por ejemplo, se asoció con las notas ácido y nuez mientras que el octanoato de etilo (C20) y el etanoato de 2-feniletilo (C21) se asociaron con notas dulce y floral.

⁶⁹ DUCKI, Sylvie, et al. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 2008, vol. 74, no 5, p. 1166-1174.

⁷⁰ RODRIGUEZ-CAMPOS, J., et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 2011, vol. 44, no 1, p. 250-258.

⁷¹ APROTOSOAI, Ana Clara; LUCA, Simon Vlad; MIRON, Anca. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, vol. 15, no 1, p. 73-91.

⁷² *Ibíd.*

3. CONCLUSIONES

Las técnicas SPME, GC-FID, GC-MS y análisis sensorial fueron implementados para estudiar las características de aroma de dos variedades de cacao promisorias del departamento de Santander. Un total de 52 compuestos de aroma fueron identificados por GC-MS, fragmentación e índices de retención de Kovats, y cuantificados por el método de estándar interno.

PCA logró relacionar 21 compuestos comunes en las 4 muestras analizadas con los 6 atributos sensoriales, explicando el 100 y 95% de la varianza para compuestos y notas respectivamente. Así mismo, se logró comparar la relación de las variedades tanto para las muestras al azar como para las bien fermentadas, con los compuestos de aroma y las notas sensoriales.

PCA permitió desarrollar una alternativa para relacionar atributos sensoriales y compuestos volátiles precursores de aroma creando un perfil sensorial y químico de las variedades TCS 01 e ICS 95.

4. RECOMENDACIONES

Desarrollar perfiles sensoriales con más de un catador experto, para así obtener resultados más aceptables y exactos de puntuaciones para los atributos de variedades a trabajar.

Realizar la técnica PCA con un número mayor de muestras (variedades) ya que este tipo de herramientas están diseñadas para trabajar con tablas de datos extensas (gran número de filas y columnas) para poder representar mejor la variabilidad de los datos.

Extender el estudio de esta técnica para un mayor número de variedades y así crear una base de perfil sensorial y químico que pueda ser utilizada para el seguimiento de la calidad del cacao en Santander.

BIBLIOGRAFÍA

AFOAKWA, Emmanuel Ohene, *et al.* Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2008, vol. 48, no 9, p. 840-857.

AFOAKWA, Emmanuel Ohene. *Chocolate science and technology*. John Wiley & Sons, 2016.

ÁLVAREZ, Clímaco; PÉREZ, Evelina; LARES, Mary C. Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, estado Aragua. *Agronomía Tropical*, 2007, vol. 57, no 4, p. 249-256.

ÁLVAREZ, M. González, *et al.* Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC–MS. *Food Chemistry*, 2011, vol. 129, no 3, p. 890-898.

APROTOSOAIÉ, Ana Clara; LUCA, Simon Vlad; MIRON, Anca. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, vol. 15, no 1, p. 73-91.

CADENA CALA, Tatiana y HERRERA ARDILA, Yenny Mayerly. Evaluación del Efecto del Procesamiento del Cacao Sobre el Contenido de Polifenoles y Su Actividad Antioxidante, 2008.

CASA LUCKER. Cacao fino de aroma. 2016. [Online]. Disponible en Internet: <http://www.cacaofinodearoma.com/es/cacao-fino-de-aroma/>

CORDERO, G. Aplicación del Análisis Sensorial de los alimentos en la cocina y en la Industria Alimentaria. 2013.

COUNET, Christine, et al. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, vol. 52, no 20, p. 6243-6249.

DE BRITO, Edy S., et al. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001, vol. 81, no 2, p. 281-288.

DÍAZ, S.; PINOARGOTE, M.; CASTILLO, P. Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN-51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. 2012. Tesis Doctoral. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Ingeniería en Alimentos, Guayaquil.

DUCKI, Sylvie, et al. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 2008, vol. 74, no 5, p. 1166-1174.

ESBENSEN, Kim H., et al. *Multivariate data analysis: in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design*. Multivariate Data Analysis, 2002.

FEDECACAO. Colombia tiene plan decenal para el CACAO. *Colombia Cacaotera*, vol. 11, pp. 13–14, 2011.

FEDECACAO. Producción Nacional de Cacao en grano (TON). 2016.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, ICCO. "International Cocoa Agreement," 2010. [Online]. Available: https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/2-icco-agreements-and-their-history/3-2010-international-cocoa-agreement.html.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, ICCO. Fine or flavour cocoa. [Online]. 03 January 2016. Available in: <https://icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>.

JACKSON, J. Edward. A user's guide to principal components. John Wiley & Sons, 2003.

NOGUERA, Laura Marcela; MUÑOZ, N. Caracterización de materiales regionales promisorios de cacao colombiano: Física, química, funcional y organoléptica. Universidad Industrial de Santander, 2014.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 3929. Análisis sensorial. Metodología: Métodos del perfil del sabor. No. 571. 2009.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA, ICONTEC. NTC. 1252, Cacao en grano. p. 12, 2003.

PALLARES-PALLARES, Andrea; PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; LÓPEZ-GIRALDO, Luis Javier. Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51. *Respuestas*, 2016, vol. 21, no 1, p. 120-133.

PEÑA, Daniel. *Análisis de datos multivariantes*. Madrid: McGraw-Hill, 2002.

PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé, et al. *Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia) Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), Bogotá (Colombia), 2013.

PINZÓN USECHE, José Omar, et al. El beneficio y características físico químicas del cacao (*Theobroma Cacao L.*). [En línea]. En: FEDECACAO. Bogotá D.C., 2006. Disponible en Internet: <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/fedecacao-dt-beneficio-caracteristicas-fisicoquimicas-cacao.pdf>

PORTILLO, Elvis, et al. Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao L.*) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista UDO Agrícola*, 2009, vol. 9, no 2, p. 458-468.

PROCOLOMBIA. Inversión en el sector de Cacao, Chocolatería y Confitería en Colombia. [En línea]. Acumulado 2008 – 2014. pp. 2011–2016, 2016. Disponible en Internet: <http://inviertaencolombia.com.co/images/Adjuntos/SECTOR-CACAOYCHOCOLATERIA2016.pdf>

RIVERA FERNÁNDEZ, Rubén Darío, et al. Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao L.*) tipo nacional. *Cienc. y Tecnol.*, vol. 5, pp. 7–12, 2012.

REINECCIUS, Gary. *Flavor chemistry and technology*. CRC press. 2006, pp. 33–72.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J., et al. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao L.*) during fermentation and drying processes using

principal components analysis. Food Research International, 2011, vol. 44, no 1, p. 250-258.

SOLÓRZANO CHAVEZ, Eddyn Solórzano, et al. Comparación sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional fino de aroma cultivado en diferentes zonas del Ecuador. Revista Ciencia y Tecnología UTEQ, 2015, vol. 8, no 1, p. 37-47.

VAS, György; VEKEY, Karoly. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. Journal of mass spectrometry, 2004, vol. 39, no 3, p. 233-254.

WACHER, M. Microorganismos y chocolate. Revista digital universitaria, 2011, vol. 12, no 4, p. 1-9.

ANEXOS

ANEXO A. FAMILIAS DE COMPUESTOS Y ATRIBUTOS SENSORIALES DESCRITOS

Familias representativas de compuestos volátiles y su respectivo atributo sensorial.

No	Compuestos	Atributo sensorial	No	Compuestos	Atributo sensorial
1	Alcoholes y fenoles			Esteres	
2	1-Propanol	Caramelo	43	Acetato de etilo	Piña, frutal
3	2-Metil-1-propanol	Vino, frutal Malta,	44	Acetato de isobutilo	banana, frutal
4	3-Metil-1-Butanol	mantequilla	45	Acetato de isoamilo	Frutal
5	2,3-Butanediol	Caramelo	46	Acetato de fenilo	Floral
6	2-Pentanol	Verde	47	Fenilacetato de metilo	Floral
7	1-Hexanol	Frutal	48	Fenilacetato de etilo	Floral, caramelo
8	2-Hexanol	Frutal	49	Acetato de fenetila	Floral, caramelo
9	Feniletilalcohol	Dulce, picante,	50	Buriato de etilo	Futal
10	2-Heptanol	Cítrico	51	Lactato de etilo	Frutal
11	1-Feniletanol	Caramelo, Floral	52	Succinato de dietilo	Floral
12	2-Feniletanol	Caramelo, Floral	53	2-Metilbutanoato de etilo	Frutal
13	Alcohol bencílico	Floral, caramelo	54	3-Metilbutanoato de etilo	Frutal
	Aldehidos y Cetonas		55	Valerato de etilo	Frutal
14	2-Fenilacetaldehído	Floral, Caramelo	56	Hexanoato de etilo	Uvas, frutal
15	2-Metilpropanal	Chocolate, malta	57	Octanoato de etilo	Floral, frutal
16	2-Fenilpropanal	Floral	58	Decanoato de etilo	Pera, frutal
17	2-Metilbutanal	Chocolate, malta	59	Laurato de etilo	Frutal
18	3-Metilbutanal	Chocolate, malta	60	Benzoato de isoamilo	Floral
19	2-Fenil-2-butenal	Cacao	61	Salicilato de metilo	Nuez
20	4-Metil-2-Fenil-2-pentenal	Chocolate	62	Cinamato de metilo	Frutal
21	n-Hexanal	Herbal	63	Cinamato de etilo	Caramelo
22	5-Metil-2-fenil-2-hexenal	Chocolate		Terpenos	
23	2-Nonenal	Herbal	64	(S)-Linalool	Floral
24	Vanilina	Vainilla	65	(R)-Linalool	Floral

No	Compuestos	Atributo sensorial	No	Compuestos	Atributo sensorial
25	2-Pentanona	Frutal	Pirroles		
26	2,3-butanoïdona	Mantequilla	66	Pirrol	Nuez
27	Acetoïna	Mantequilla, crema	67	2-Acetilpirrol	Caramelo
28	Fenilmetilcetona		68	2-Pirrolaldehido	Nuez
29	2-Heptanona	Frutal, floral	Pirazinas		
30	Acetofenona	Floral	69	2-Metilpirazina	Cacao
31	2-Hidroxiacetofenona	Herbal	70	2-Etilpirazina	Nuez
32	4-Metilacetofenona	Frutal	71	2,5-Dimetilpirazina	Nuez
	Ácidos		72	2,6-Dimetilpirazina	Nuez
33	Ácido Acético	Vinagre, rancio	73	2-Etil-5-metilpirazina	Pimienta
34	Ácido Propanoico	Rancio, acre	74	2,3-Dietilpirazina	Tierra, nuez
35	Ácido Isobutírico	Manteca, queso	75	2,3-Dimetilpirazina	Caramelo
36	Ácido Butanóico	Rancio	76	2,3,5-Trimetilpirazina	Nuez
		Purga, rancio,			
37	Ácido Hexanóico	ácido	77	2,3,5,6-Tetrametilpirazina	Café, Nuez
38	Ácido Octanóico	Manteca, rancio	78	2,3,5-Trimetil-6-etilpirazina	Caramelo
39	Ácido FenilAcético	Manteca	Otros		
	Ácido 2-				
40	Metilpropionico	Metal	79	Benzonitrilo	Nuez
	Ácido 3-				
41	Fenilpropionico	Floral	80	2-Furfural	Almendra, nuez
42	Ácido Cinámico	Dulce	81	5-Metil-2-furfural	Caramelo
			82	2-Acetilfurano	Café, caramelo
				4-Hidroxi-2,5-dimeril-3-	
			83	furanona	Cereza, caramelo
			84	3-Hidroxi-2-metil-4-pirona	Coco, nuez

ANEXO B. IMAGEN DE DIAGRAMA METODOLÓGICO



Diagrama metodológico paso a paso.

ANEXO C. PROCEDIMIENTOS DEL ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

Para la determinación de la humedad se toman 2 gramos de cacao pulverizado y se ponen en la estufa a 103°C durante 1 hora y después en un desecador para dejar enfriar durante 50 minutos. Esta muestra (muestra inicial) se pone de nuevo en la estufa durante 4 horas y después en el desecador durante 50 minutos. Se pesan las dos muestras (antes y después del proceso de secado) y se calcula el porcentaje así:

$$\%Humedad = \frac{P_M - P_{MS}}{P_M} * 100$$

Donde,

- P_M : Peso de la muestra inicial
- P_{MS} : Peso de la muestra seca

El porcentaje de ceniza se determina poniendo 3 gramos de cacao pulverizado en la mufla e incinerando por 7 horas con rampas de calentamiento programadas hasta la temperatura de calcinación. Se pesan las dos muestras (antes y después del calentamiento) y se calcula el porcentaje así:

$$\%Ceniza = \frac{P_{CEN}}{P_M}$$

Donde,

- P_{CEN} : Peso de la ceniza
- P_M : Peso de la muestra seca

La determinación del porcentaje de proteínas se realiza por el método KJELDAHL, utilizando 0,6 gramos de cacao pulverizado, 25 mL de ácido sulfúrico y una tableta de Kjeldahl. Esta mezcla se introduce en el digestor y se calienta hasta que la solución esté clara y verde. En el destilador se pone un Erlenmeyer con 50 mL de HBO_3 y 3 gotas de indicador. Esta mezcla se usa para recoger el destilado. Se realiza la destilación de la muestra hasta recoger en el Erlenmeyer un volumen final de 200 mL. La solución destilada se valora en una bureta con HCl 0,1 N hasta que el indicador torne color violeta. Se registra el volumen de HCl usado y se calcula el porcentaje de Nitrógeno y de proteína así:

$$\%Nitrógeno = \frac{V_{HCl} * N_{HCl} * 14}{P_M} * 100$$

$$\% Proteína = \%Nitrógeno * F$$

Donde,

- V_{HCl} : Volumen de HCl que se consume en la titulación
- N_{HCl} : Normalidad de HCl con el que se titula. Para este análisis $N_{HCl} = 0,1$
- P_M : Peso de la muestra
- F: Factor de dilución (para cacao F=6,25)

El porcentaje de grasa se determina con el método Soxhlet, realizando previamente hidrólisis con 45 mL de agua destilada y 55 mL de HCl 8N en una plancha hasta ebullición. Esta muestra se filtra con agua y se pone en la estufa a 103°C durante 2 horas y seguido se introduce en el Extractor de grasa. El solvente recuperado se traslada al desecador para enfriar durante 50 minutos y se pesa para calcular el porcentaje de grasa así:

$$\%Grasa = \frac{P_G}{P_M} * 100$$

Donde,

- P_G : Peso de la grasa
- P_M : Peso de la muestra

ANEXO D. PROCEDIMIENTO PARA CÁLCULO DE POLIFENOLES TOTALES

Para iniciar el cálculo de los polifenoles totales se debe realizar la curva de calibración. Para esto se prepara una solución patrón de 2 mg/mL de ácido gálico en un balón de 50 mL y a partir de esta se preparan diluciones entre 0,2 y 1,8 mg/mL y se agregan a tubos de ensayo de 5 mL protegidos de la luz. Seguidamente, se añaden 1.5 mL de la solución Folin-Ciocalteu y 1.5 mL de Na_2CO_3 75% p/v y se almacenan en condiciones de oscuridad durante 1 hora. Después se lee la absorbancia en un espectrómetro a 765 nm. Estos valores se registran y se realiza la calibración obteniendo los valores de pendiente m y punto de corte b , necesarios para el cálculo. Una vez obtenida la curva de calibración se realiza el mismo procedimiento para las muestras respectivas y se realiza el cálculo así:

$$PT = \frac{\frac{Abs_{muestra} - b}{m} * 25mL * F}{P_M}$$

Donde,

- PT : Polifenoles totales
- $Abs_{muestra}$: Absorbancia de la muestra
- b : punto de corte de la curva de calibración
- m : pendiente de la curva de calibración
- $g_{muestra}$: peso de la muestra
- F : factor de dilución; en este caso $F=4$

ANEXO E. PROCEDIMIENTO PARA CÁLCULO DE TEOBROMINA Y CAFEÍNA

Se preparan 100 mL de una mezcla de ácido acético y metanol 85:15 para utilizar como solvente. Se realiza curva de calibración tomando soluciones stock de 300 mg/L y 20 mg/L para teobromina y cafeína, respectivamente. Se pesan 0,02 g de muestra previamente homogeneizada en un tubo de ensayo y se agregan 5 mL de la solución de ácido acético-metanol. Se agita y se toma 1 mL para filtrar con filtros de PDVF de 0,45 μm en un vial ámbar y seguido se inyecta en el cromatógrafo. Las condiciones cromatográficas de análisis son las siguientes:

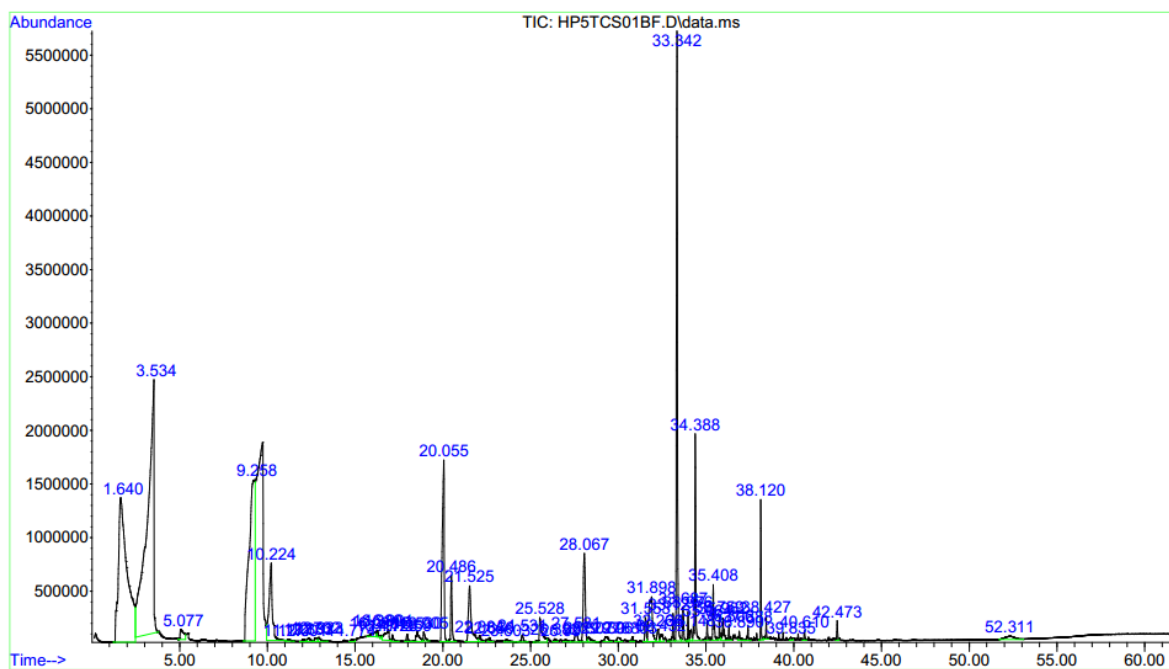
Condiciones cromatográficas Teobromina, Cafeína.

Parámetro	Condiciones			
	Fase móvil	Tiempo	0,3 %	%
			Hac	MeOH
Gradiente (Fracción de volumen)	Inicial	85	85	15
	10	85	85	15
	11	75	75	25
	18	75	75	25
	18,1	70	70	30
	25	70	70	30
	25,1	0	0	100
	30	0	0	100
	30,1	100	100	0
	35	100	100	0
Flujo	0,5 mL/min			
Columna	Agilent Eclipse XDB-C18 5 μm 150x 2.1 mm d.i. con guarda columna Agilent Eclipse XDB-C8 5 μm 12,5 x 2.1 mm d.i			
Temperatura	Ambiente			
Temperatura en el muestreador	10 °C			
Detector	UV a 273 nm			
Tiempo de corrida	35 min			
Volumen de inyección	5 μL			

Los picos de referencia a tener en cuenta en el análisis se muestran en los tiempos de retención 4-4,5 para Teobromina y 8,7-9 min para cafeína.

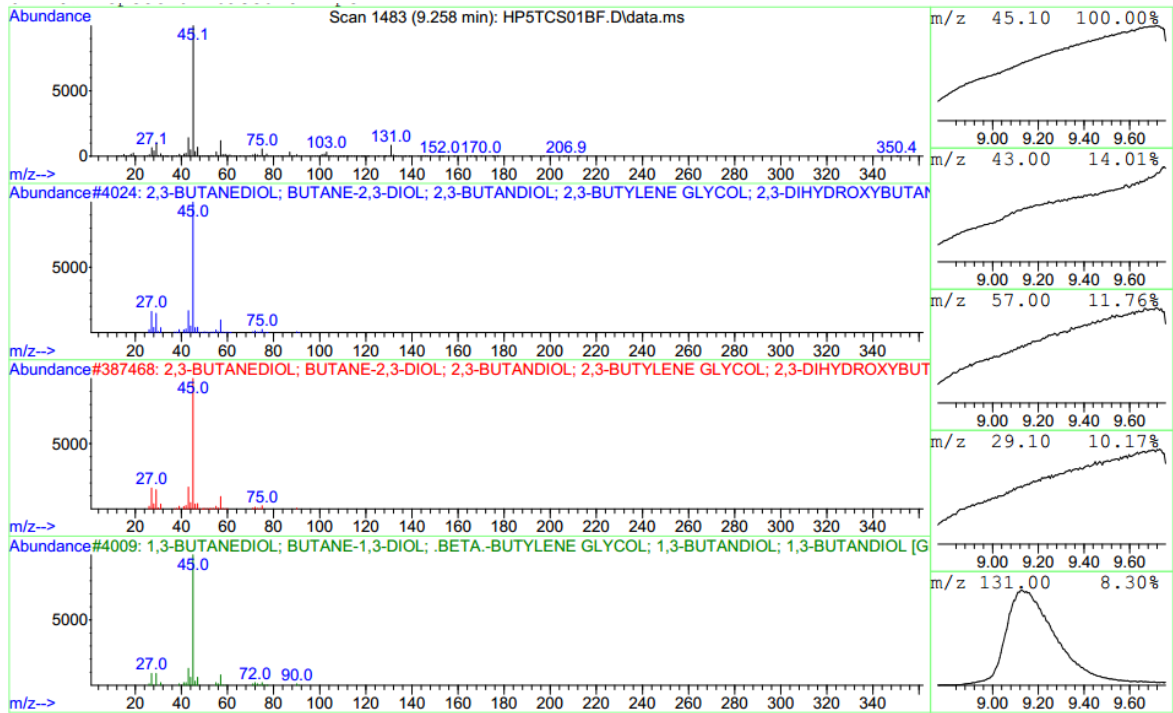
ANEXO F. TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Señales obtenidas de relación masa/carga (picos correspondientes a los compuestos volátiles)



Señales de relación masa/carga.

Por ejemplo, para el pico encontrado en el tiempo 9,258 min se reportó lo siguiente:



Espectros para el tiempo 9.258 del espectrómetro de masas.

El primer espectro (color negro) es el obtenido por el espectrómetro, y los espectros siguientes (azul, rojo, verde) pertenecen a bases de datos de la biblioteca Wiley 275. Se obtiene también la calidad de la comparación en un porcentaje de 0 a 100 así:

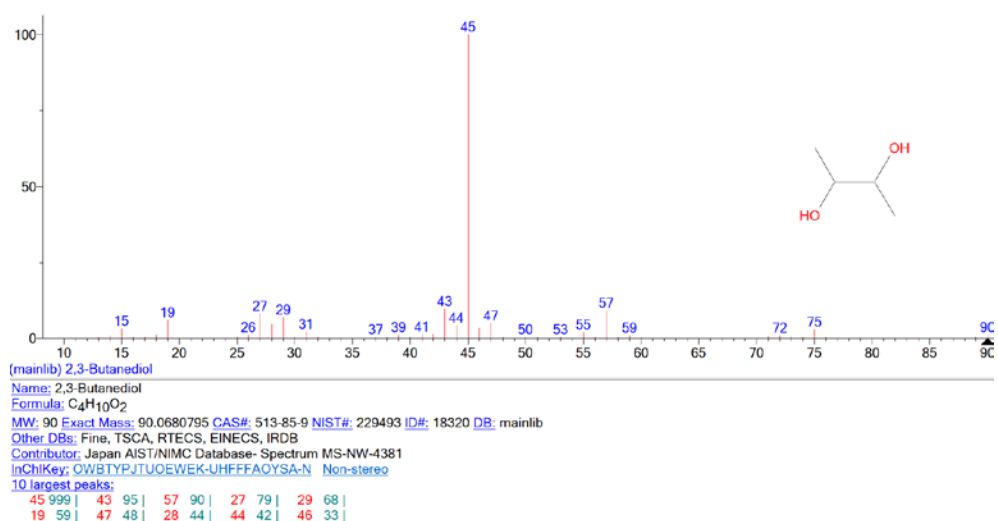
Peak Number: 4 at 9.258 min Area: 35632305 Area % 13.95

The 3 best hits from each library.			
	Ref\#	CAS\#	Qual
D:\DATABASE\W8.1			
1	2,3-BUTANEDIOL; BUTANE-2,3-DIOL;...	4024 000513-85-9	87
2	2,3-BUTANEDIOL; BUTANE-2,3-DIOL;...	387468 000513-85-9	87
3	1,3-BUTANEDIOL; BUTANE-1,3-DIOL;...	4009 000107-88-0	83

Compuestos y calidad para el espectro del pico 4.

ANEXO G. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR MEDIO DEL SOFTWARE NIST MS 13. (FRAGMENTACIÓN DE MOLÉCULAS)

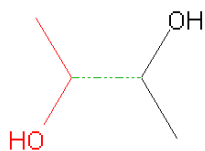
Para picos en los que la calidad del compuesto no fuera mayor a 80 o para los que se encontraran altas referencias para 2 o 3 compuestos diferentes, como en el caso del ejemplo del ANEXO 6, se hace necesario verificar la identificación por medio de la herramienta del Software NIST MS 13. En este se encuentran los distintos compuestos con la fragmentación de las moléculas correspondientes y de esta forma se logra comparar con las mostradas en el espectrograma y se define a cuál compuesto corresponde el pico analizado.



Espectrograma de 2,3-butanodiol NIST MS 13.

En la figura 18 se muestra la fragmentación de la molécula de 2,3-butanodiol para la relación masa/carga 45, se observa que la molécula se fragmenta por mitad, resultando dos “semimoléculas” (roja y negra) con relación masa/carga 45 cada una.

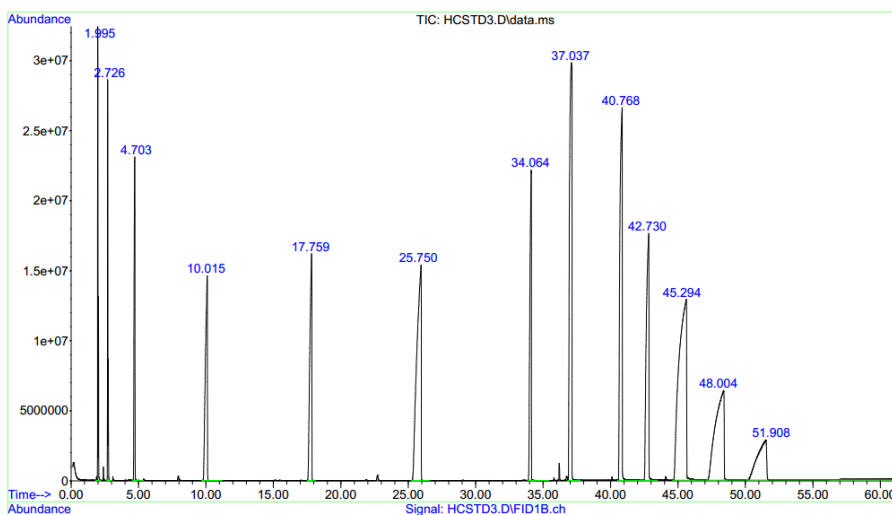
m/z	mass	formula	loss	type	rate	abund
45 (1/2)	45.0340397	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	dissociation	100	999



Fragmentación de la molécula de 2,3-butanodiol.

ANEXO H. ÍNDICES DE RETENCIÓN DE KOVATS PARA LOS COMPUESTOS DE LA VARIEDAD TCS 01 BIEN FERMENTADA.

Para la determinación de los índices de retención se inyectó una muestra de hidrocarburos alifáticos por CG-MS. Se obtiene el espectro con los correspondientes tiempos de retención para cada hidrocarburo de la serie.



Espectro de Hidrocarburos alifáticos.

ÍNDICES DE KOVATS

$$I_x = 100n + \frac{100(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$$

Donde,

n : número de átomos de C en el alcano anterior

t_n : tiempo de retención del alcano anterior

t_{n+1} : tiempo de retención del alcano siguiente

t_x : tiempo de retención del compuesto desconocido

Se aplicó la anterior ecuación para cada compuesto a analizar y se comparó con la base de datos de la biblioteca NIST.

ANEXO I. BÚSQUEDA DE COMPUESTOS EN LA BIBLIOTECA NIST

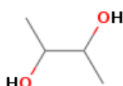
1. Se busca el compuesto por el número de registro del CAS.

NIST National Institute of Standards and Technology U.S. Department of Commerce **Libro del Web de Química del NIST, SRD 69**

🏠 Búsquedas ▼ Datos de NIST ▼ Sobre ▼

2,3-Butanediol

- **Fórmula:** C₄H₁₀O₂
- **Peso molecular:** 90.1210
- **IUPAC InChI Estándar:**
 - InChI=1S/C4H10O2/c1-3(5)4(2)6/h3-6H,1-2H3
 - [Descarga el identificador en un archivo..](#)
- **IUPAC InChIKey Estándar:** OWBTYPJTUOEWEK-UHFFFAOYSA-N
- **Número de registro CAS:** 513-85-9
- **Estructura química:**



InChI TRUST
CERTIFIED
2011

2. Se selecciona la biblioteca de cromatografía de gases y se realiza comparación con el dato de columna HP5-MS capilar no polar con temperatura programada.

Normal alkane RI, non-polar column

[View large format table.](#)

Column type	Active phase	I	Reference
Capillary	HP-5	795.	Piyachaiseth, Jirapakkul, et al., 2011
Capillary	SPB-5	789.	Sivadier, Ratel, et al., 2009
Capillary	DB-5	806.	Ozel, Gogus, et al., 2006
Capillary	DB-5 MS	803.	Schirack, Drake, et al., 2006
Capillary	HP-5MS	782.	Krist, Stuebiger, et al., 2005
Capillary	OV-101	824.	Zenkevich, 2005

ANEXO J. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DEL MÉTODO ESTÁNDAR INTERNO Y LA DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA.

El procedimiento experimental incluye las siguientes sub-etapas:

- Preparación de la muestra: se tomaron 2 gramos del licor de cacao preparado según los pasos presentados en la sección 1.2.1.
- Preparación de la solución: se prepara una solución stock para cada familia de compuestos en un balón aforado de 5 mL que contenga una concentración definida de tolueno HPLC y del analito de interés usando etanol absoluto como solvente y finalmente se agita en vórtex durante 1 minuto. Los valores de concentración utilizados del tolueno y el analito para preparar las soluciones se muestran en la tabla 12 de este ANEXO.
- Adición de la solución a la muestra: de la solución preparada en la sub-etapa anterior se toman 20 μ L y se adicionan a la muestra de 2g de licor.
- Integración de los picos cromatográfico (proceso realizado por triplicado): después de realizar SPME y CG, el método “volátiles cacao CICTA” arroja un cromatograma en el que se integran automáticamente todos los picos presentes, inicialmente se identifica el pico de acuerdo a los tiempos de retención y se verifica que esté integrado correctamente, en el caso contrario, se integra manualmente y se toman los datos de área del analito y del tolueno (estándar interno) para calcular el respectivo factor de respuesta (ecuación 2).

Concentración de compuestos representantes de familias.

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN COMPUESTO O [mg/L]	VOLUMEN COMPUESTO [μL]	CONCENTRACIÓN TOLUENO [mg/L]	VOLUMEN DE TOLUENO [μL]	VOLUMEN EN DE AFORO [mL]
Ácidos (ácido acético)	2070	12.5	4200	25	5
Cetona (Acetofenona)	3040	12.5	4200	25	5
Ester (acetato de etilo)	2070	12.5	4200	25	5
Aldehído(fenilacetaldehído)	9300	12.5	4200	25	5
Pirazina(trimetilpirazina)	2580	12.5	4200	25	5
Alcohol (Linalol)	2680	12.5	4200	25	5
Pirrol (Acetilpirrol)	2500	12.5	4200	25	5

ANEXO K. RESULTADOS ÍNDICES DE RETENCIÓN DE KOVATS

Tiempos de retención de los alcanos.

Alcano	Tiempo[<i>min</i>]	Alcano	Tiempo[<i>min</i>]
Pentano	1,994	Undecano	34,065
Hexano	2,726	Dodecano	37,035
Heptano	4,705	Tetradecano	40,767
Octano	10,018	Pentadecano	42,729
Nonano	17,759	Hexadecano	45,293
Decano	25,752	Heptadecano	48,004

Índices de retención y bases de comparación.

No	Compuesto	<i>t_x</i>	<i>t_n</i>	<i>t_{n+1}</i>	<i>n</i>	<i>l_x</i>	BASE	REFERENCIA
1	Ácido acético	3.53	2.73	4.7	6	640.8	645	Steinhaus and Schieberle, 2007
2	3-hidroxi-2-butanona	5.08	4.71	10	7	707	707	Kim and Chung, 2009
3	2,3-butanodiol	9.26	4.71	10	7	785.7	782	Krist, Stuebiger, et al., 2005
4	2,3-butanodiol	10.2	10	18	8	802.7	802	Kim, Shin, et al., 2001
5	2-metilpirazina	12	10	18	8	825.6	824	Xie, Sun, et al., 2008
6	3-metil-1-butanol-acetato	16.3	10	18	8	880.9	878	Demyttenaere, Dagher, et al., 2002
7	ácido-3metil-butanoico	16.9	10	18	8	888.9	894	Alissandrakis E., Tarantilis P.A., et al., 2007
8	2-heptanona	17.1	10	18	8	891.9	889	Pino, Mesa, et al., 2005
9	2-heptanol	18	17.8	26	9	902.5	902	Yu, Huang, et al., 2007
10	2,5-dimetil-pirazina	18.5	17.8	26	9	909.7	911	Xie, Sun, et al., 2008
11	2,3-dimetil-pirazina	18.9	17.8	26	9	914.3	919	Ho, Wan Aida, et al., 2007
12	acetato de etilo	20.5	17.8	26	9	934.9		
13	Benzaldehído	21.5	17.8	26	9	948.2	945	Pavlovic, Kovacevic, et al., 2006
14	1,6-octadieno-7-metil-3-metileno (mirceno)	24.5	17.8	26	9	986.7	981	Kartal N., Sokmen M., et al., 2007
15	2,3,5-trimetilpirazina	25.5	17.8	26	9	999.4	1005	Wanakhachornkrai and Lertsiri., 2009

No	Compuesto	tx	tn	tn+1	n	lx	BASE	REFERENCIA
16	p-cimeno	27.6	25.6	34	10	1024	1027	Alissandrakis E., et al., 2007
17	Limoneno	28.1	25.6	34	10	1029	1030	Harzallah-Skhiri F., et al., 2006
18	Fenilmetanol	29.3	25.6	34	10	1044	1042	Kim, Shin, et al., 2001
19	Fenilacetaldhido	30	25.6	34	10	1052	1049	Alissandrakis E., Tarantilis P.A., et al., 2007
20	acetato de secbutilo	30.8	25.6	34	10	1062		
21	Terpineno	31.6	25.8	34	10	1070	1065	Payo, Colo, et al., 2011
22	3-metilbutil-2-metil propanoato	31.9	25.8	34	10	1074	1021	Mooio&Addo 1998
23	1-(1h-pirrol-2-yl) etanona	32.3	25.8	34	10	1078	1063	Andriamaharavo, 2014
24	2,3-butanodioldiacetato	33.1	25.8	34	10	1089	1065	Andriamaharavo, 2014
25	2,3,5,6-tetrametilpirazina	33.3	25.8	34	10	1091	1089	Andriamaharavo, 2014
26	2-nonanona	33.7	25.8	34	10	1095	1095	Bonaiti, Irlinger, et al., 2005
27	Linalool	34	25.8	34	10	1099	1098	Mevy, Bousquet-Melou, et al., 2006
28	Nonanal	34.2	34.1	37	11	1103	1103	Nance and Setzer, 2011
29	2-feniletanol	34.4	34.1	37	11	1111	1110	Martí, Mestres, et al., 2003
30	3-metil-2-butanol	35.1	34.1	37	11	1134		
31	6-metil-3,5-dihidroxi-2,3-dihidro-4h-piran-4-ona	35.4	34.1	37	11	1145	1149	Alissandrakis, Kibaris, et al., 2005
32	2,3,5-trimetil-6-etilpirazina	36	34.1	37	11	1164	1163	Nance and Setzer, 2011
33	octanoato de etilo	36.9	34.1	37	11	1195	1194	Andriamaharavo, 2014
34	ácido 2etil butanoico	37.4	37	41	12	1209		
35	etanoato de 2-fenil etilo	38.1	37	41	12	1229	1256	Martí, Mestres, et al., 2003
36	2 fenil-2-butenal	38.4	37	41	12	1237	1237	Kim and Chung, 2009
37	benzoato de butilo	40.6	37	41	12	1296	1324	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
38	5-metil-2-fenil-2-hexenal	42.5	40.8	43	14	1487	1485	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

**ANEXO L. COMPUESTOS VOLÁTILES IDENTIFICADOS POR CG-MS,
FRAGMENTACIÓN E ÍNDICES DE KOVATS**

Compuestos volátiles de las 4 variedades de cacao identificados por CG-MS.

FAMILIA	No.	COMPUESTO	FAMILIA	No.	COMPUESTO
ÁCIDOS FR: 1,02	1	Ácido acético	ÉSTERES FR: 6,38	27	Acetato de sebutilo
	2	Ácido 2-metil butanoico		28	isobutil-isobutirato
	3	Ácido 3-metil butanoico		29	2,3-butanodiol-diacetato
	4	Ácido 2-metil propanoico		30	octanoato de etilo
	5	Ácido 2-etil butanoico		31	etanoato de 2-fenil etilo
ALDEHIDOS FR: 2,84	6	Benzaldehido		32	benzoato de etilo
	7	Nonanal		33	2-fenil etanoato de etilo
	8	Fenilacetaldhido		34	acetato de 2-metil propilo
	9	Decanaldehido		35	2-metil-butanol acetato
	10	2-fenil-2-butenal		36	acetato de metilpropilo
	11	3-metil butanal		37	decanoato de etilo
ALCOHOLES FR: 2,16	12	2,3-butanodiol	PIRAZINAS FR: 0,88	38	2-metil pirazina
	13	2,3-butanodiol		39	2,5-dimetil pirazina
	14	2-heptanol		40	2,3-dimetil pirazina
	15	Linalool		41	2,3,5-trimetil pirazina
	16	2-fenil etanol		42	2,3,5,6-tetrametil pirazina
	17	3-metil-2-butanol	43	2,3,5-trimetil-6-etilpirazina	
	18	2-octanol	PIRROLES FR: 1,10	44	1-(1h-pirrol-2-yl) etanona
	19	fenil etanol		45	1,6-octadieno-7-metil-3-metileno (mircenol)
	20	fenil metanol	OTROS FR: 1,00	46	P-cimeno
CETONAS FR: 0,38	21	3-hidroxi-2-butanona		47	1-metil-4-(1metil etenil) ciclohexeno (Limoneno)
	22	2-heptanona		48	Terpineno
	23	2-nonanona		49	2 (3H)-dihidro furanona
	24	3-metil-2-ciclohexenona		50	2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano
ÉSTERES FR: 6,38	25	3-metil-butanol-acetato		51	1-metil-4-(1-metil etil)- 1,4-ciclohexadieno
	26	Acetato de etilo		52	6-metil-3,5-dihidroxi-2,3-dihidro-4h-piran-4-ona

ANEXO M. RESULTADOS FACTORES DE RESPUESTA POR FAMILIAS

Factores de respuesta por medio del método estándar interno.

FACTORES DE RESPUESTA							
	Pirazinas	Ésteres	Ácidos	Cetonas	Alcoholes	Pirroles	Aldehídos
	0.903	6.06	1.15	0.392	2.238	1.11	2.83
	0.831	6.75	0.969	0.395	2.329	1.076	2.89
	0.899	6.32	0.937	0.364	1.992	1.11	2.8
Promedio	0.88	6.38	1.02	0.38	2.19	1.1	2.84
Desviación estándar	0.04	0.35	0.11	0.02	0.17	0.02	0.05
% Coef. de variación	4.61	5.465	11.17	4.456	7.974	1.787	1.614

ANEXO N. CONCENTRACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRECURSORES DE AROMA

Concentración de los compuestos volátiles precursores de aroma para cada variedad.

Familia	No.	Compuesto	TCS 01 BF		TCS 01 AZAR		ICS 95 BF		ICS 95 AZAR	
			Tiempo MS	[] prom	Tiempo MS	[] prom	Tiempo MS	[] prom	Tiempo MS	[prom]
ÁCIDOS FR: 1,02	1	Ácido acético	3.534	59.809	2.91	104.96	2.222	40.693	2.761	35.52
	2	Ácido 2-metil butanoico	16.901	0.599	15.49	1.014	15.613	5.633	16.048	1.468
	3	Ácido 3-metil butanoico			14.783	1.979	14.74	10.163	15.082	1.055
	4	Ácido 2-metil propanoico					7.577	1.004	8.18	1.298
	5	Ácido 2-etil butanoico	37.388	0.483	37.397	0.139				
ALDEHIDOS FR: 2,84	6	Benzaldehido	21.525	3.286	21.645	3.991	21.571	5.172	21.649	5.442
	7	Nonanal	34.148	1.088						
	8	Fenilacetaldehido	29.961	0.73	30.068	1.522	30.007	2.452	30.085	6.976
	9	Decanaldehido			37.053	0.547				
	10	2-fenil-2-butenal			38.449	0.762	38.406	0.458	38.404	0.446
	11	3-metil butanal					3.193	5.084		
ALCOHOLES FR: 1,36	12	2,3-butanodiol	9.258	284.27	8.812	12.143	8.303	5.794	8.848	4.102
	13	2,3-butanodiol	10.224	21.538	9.476	18.046	8.961	7.192	9.493	5.537
	14	2-heptanol	17.959	0.631	17.882	1.631	17.71	1.086	17.899	2.854
	15	Linalool	33.976	1.657	33.96	1.857	34.053	1.128	33.965	2.35
	16	2-fenil etanol	34.388	3.683	34.372	5.808	34.367	12.824	34.383	12.78
	17	3-metil-2-butanol	35.064	0.716						
	18	2-octanol			34.083	0.256				
	19	fenil etanol			31.894	1.475				
	20	fenil metanol	29.278	0.856						
	21	3-hidroxi-2-butanona	5.077	0.772	4.914	4.169	4.417	1.921	4.956	1.58
CETONAS	22	2-heptanona	17.128	0.282	17.082	0.183	16.843	0.353	17.075	0.442

Familia	No.	Compuesto	TCS 01 BF		TCS 01 AZAR		ICS 95 BF		ICS 95 AZAR	
FR: 0,38	23	2-nonanona	33.687	0.431	33.671	0.33	33.66	0.443	33.676	0.922
	24	3-metil-2-ciclohexenona	31.145	34.7			31.145	0.577		
ÉSTERES FR: 6,38	25	3-metil-butanol-acetato	16.28	2.011	16.234	3.706	15.962	3.299	16.177	0.639
	26	Acetato de etilo	20.055	95.272	19.892	13.275	19.788	5.676	19.909	4.174
	27	Acetato de secbutilo	30.803	5.959						
	28	isobutil-isobutirato	31.898	30.526						
	29	2,3-butanodiol-diacetato	33.121	4.799	32.435	1.15	32.405	11.074	32.44	1.83
	30	octanoato de etilo	36.89	0.653	36.875	1	36.863	5.145	36.855	6.084
	31	etanoato de 2-fenil etilo	38.12	30.625	38.129	10.334	38.124	30.032	38.121	29.12
	32	benzoato de etilo			36.205	4.329	36.174	1.67	36.178	4.082
	33	2-fenil etanoato de etilo			37.883	4.092	37.884	2.439	37.888	2.753
	34	acetato de 2-metil propilo			40.625	3.346				
	35	2-metil-butanol acetato					16.136	1.534	16.325	
	36	acetato de metil propilo	30.727	31.733			38.124	30.032		
	37	decanoato de etilo					40.589	6.456	40.593	6.428
PIRAZINAS FR: 0,88	38	2-metil pirazina	12.001	10.835						
	39	2,5-dimetil pirazina	18.53	0.139					18.618	1.41
	40	2,3-dimetil pirazina	18.905	0.275	19.007	0.059				
	41	2,3,5-trimetil pirazina	25.528	1.689	25.641	0.988	25.58	0.749	25.664	0.854
	42	2,3,5,6-tetrametil pirazina	33.342	29.979	33.315	3.368	33.297	8.719	33.319	8.78
	43	2,3,5-trimetil-6-etilpirazina	35.962	0.5561						
PIRROLES FR: 1,1	44	1-(1h-pirrol-2-yl) etanona	32.266	0.664	32.06	0.39	32.11	0.977	32.071	0.639
OTROS	45	1,6-octadieno-7-metil-	24.531	0.222	24.504	0.541	24.381	0.252	24.489	0.742

Familia	No.	Compuesto	TCS 01 BF		TCS 01 AZAR		ICS 95 BF		ICS 95 AZAR	
FR:1		3-metileno (mirceno)								
	46	P-cimeno	27.581	2.161						
	47	1-metil-4-(1metil etenil) ciclohexeno (Limoneno)	28.067	14.14	28.076	10.418	27.923	0.263	28.038	2.248
	48	Terpineno	31.553	3.362						
	49	2 (3H)-dihidro furanona			18.669	0.366				
	50	2,4,6-trimetil-1,3,5-trioxano			20.335	5.111	20.274	1.827	20.386	1.584
	51	1-metil-4-(1-metil etil)-1,4-ciclohexadieno			31.538	1.537				
	52	6-metil-3,5-dihidroxi-2,3-dihidro-4h-piran-4-ona	35.408	1.36	35.387	0.883	35.387	1.169	35.398	1.515

Los compuestos en común en las 4 muestras se agruparon en la siguiente tabla:

Compuestos volátiles en común en las 4 muestras.

No	COMPUESTO	No	COMPUESTO
C1	Ácido acético	C12	1-metil-4-(1metil etenil) ciclohexeno (Limoneno)
C2	3-hidroxi-2-butanona	C13	1-(1h-pirrol-2-yl) etanona
C3	2,3-butanodiol	C14	2,3-butanodiol di acetato
C4	2,3-butanodiol	C15	2,3,5,6-tetrametilpirazina
C5	3-metil-butanol-acetato	C16	2-nonanona
C6	ácido 2-metil-butanoico	C17	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (Linalool)
C7	2-heptanona	C18	2-feniletanol
C8	2-heptanol	C19	6-metil-3,5-dihidroxi-2,3-dihidro-4h-piran-4-ona
C9	acetato de etilo	C20	octanoato de etilo
C10	Benzaldehído	C21	etanoato de 2-fenil etilo
C11	2,3,5-trimetil pirazina		

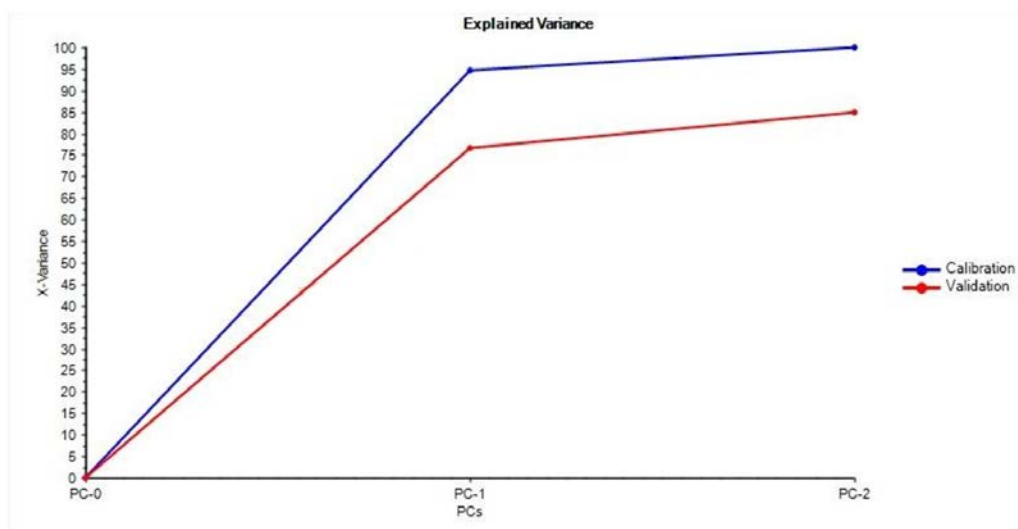
ANEXO Ñ. DATOS DE ANÁLISIS SENSORIAL MATRIZ Y

Datos de análisis sensorial Matriz Y.

Variedad/Nota	Cacao	Ácido	Frutal	Floral	Nuez	Dulce
TCS 01 BF	7	2	3	1	5	5
TCS 01 AZAR	4	4	3	1	4	2
ICS 95 BF	5	3	3	1	2	4
ICS 95 AZAR	5	3	2	2	2	5

ANEXO O. CURVAS DE VARIANZA EXPLICADA PARA LA CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA MATRICES X Y Y.

MATRIZ X: En la figura 20 se muestra la curva de varianza explicada para la calibración y su validación. La varianza de calibración se basa en ajustar los datos de calibración al modelo y la varianza de validación se calcula probando el modelo en datos que no se utilizaron para construirlo. Si las dos curvas de varianza están cercanas, el modelo es representativo. Los valores atípicos pueden causar la disminución en la varianza de validación explicada[24].

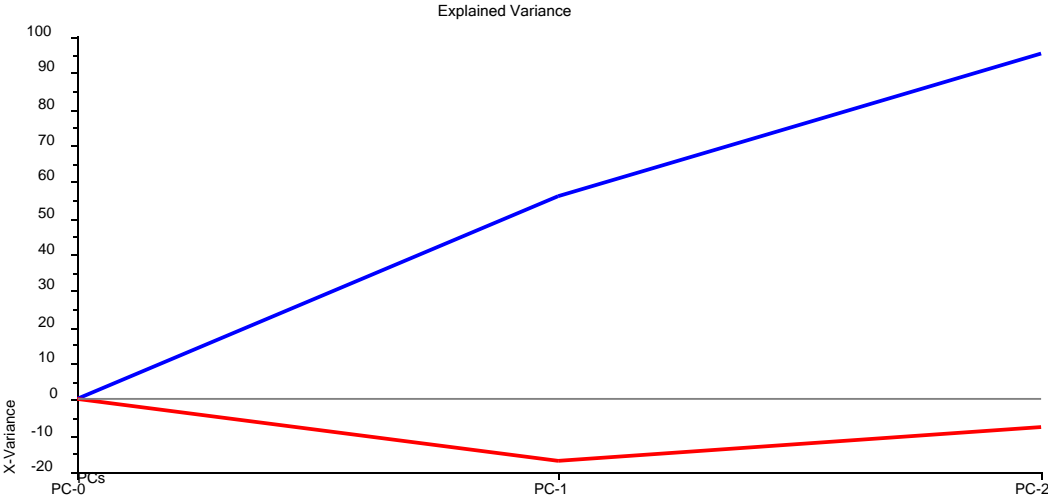


Varianza explicada Matriz X.

La gráfica muestra la curva de calibración representada en un 100% por los componentes principales PC1 y PC2 y la de validación representada por 85%. La cercanía entre las curvas muestra que el modelo es representativo con el uso de dos componentes principales.

MATRIZ Y: La figura 21 muestra la explicación de varianza para calibración y validación de la Matriz Y. La varianza explicada para la calibración está representada en un 95% por los componentes principales 1 y 2. La varianza de validación presenta una disminución o caída. El comportamiento asociado con la

validación del modelo sugiere que hay puntos atípicos, sin embargo, estos no fueron eliminados dado que se tienen muy pocos puntos experimentales. En un futuro cercano se realizarán nuevos experimentos que involucren un mayor número de variedades que permitan robustecer los resultados que se obtienen a partir de esta aproximación.



Varianza explicada Matriz Y.

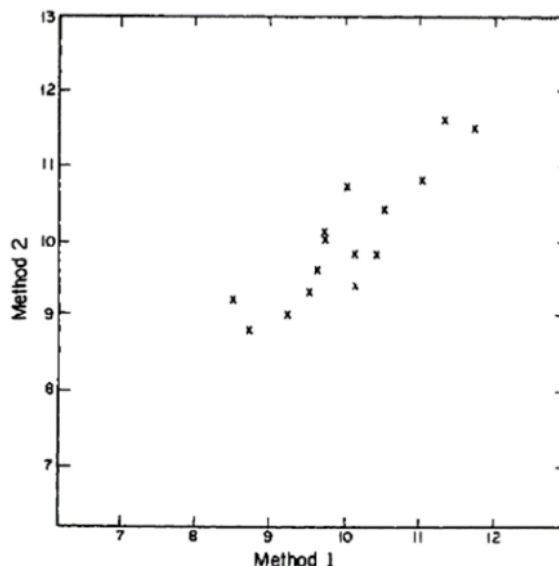
ANEXO P. EJEMPLO DE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES PARA DOS VARIABLES.

Un proceso en el que una prueba de control de calidad para la concentración de un componente químico en una solución, se llevó a cabo por dos métodos diferentes. El Método 1, fue el procedimiento estándar y el Método 2 fue un procedimiento que se usó como una prueba de respaldo.

Se supuso que los dos métodos eran intercambiables y con el fin de comprobar se obtuvo una serie de 15 muestras de producción, cada una de las cuales se midió por ambos métodos.

La tabla de los resultados de las 15 muestras y el diagrama de dispersión de los datos se muestran a continuación:

Obs. No.	Method 1	Method 2
1	10.0	10.7
2	10.4	9.8
3	9.7	10.0
4	9.7	10.1
5	11.7	11.5
6	11.0	10.8
7	8.7	8.8
8	9.5	9.3
9	10.1	9.4
10	9.6	9.6
11	10.5	10.4
12	9.2	9.0
13	11.3	11.6
14	10.1	9.8
15	8.5	9.2



Con el fin de ilustrar el método de PCA, tendremos que obtener los medios de muestra, las varianzas y la covarianza entre los dos métodos para los datos de la Tabla Sea X_{1k} el resultado de la prueba para el Método 1 para la k -ésima

ejecución y el resultado correspondiente para el Método 2 sea denotado por X_{2k} . El vector de los medios de muestreo es

$$\bar{\mathbf{x}} = \begin{bmatrix} \bar{x}_1 \\ \bar{x}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 10.00 \\ 10.00 \end{bmatrix}$$

La matriz de covarianza de la muestra es:

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} s_1^2 & s_{12} \\ s_{12} & s_2^2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} .7986 & .6793 \\ .6793 & .7343 \end{bmatrix}$$

Donde S_i^2 es la varianza, y la covarianza es:

$$s_{ij} = \frac{n \sum x_{ik} x_{jk} - \sum x_{ik} \sum x_{jk}}{[n(n-1)]}$$

Con el índice de suma, k , va sobre toda la muestra de $n = 15$. Aunque la correlación entre x_1 y x_2 no es necesaria, puede ser de interés:

$$r = \frac{s_{12}}{(s_1 s_2)} = .887$$

El método de los componentes principales se basa en un resultado clave del álgebra matricial: Una matriz simétrica no singular $p \times p$, tal como la matriz de covarianza S , puede reducirse a una matriz diagonal L por premultiplicación y postmultiplicación por una matriz ortonormal U tal que:

$$\mathbf{U}'\mathbf{S}\mathbf{U} = \mathbf{L}$$

Los elementos diagonales de L , L_{11} , L_{22} ... L_{pp} se llaman raíces características, raíces latentes o valores propios de S . Las columnas de U , U_1 , U_2 ... U_p se llaman

vectores característicos o vectores propios de S. Las raíces características pueden obtenerse de la ecuación característica:

$$|\mathbf{S} - \lambda \mathbf{I}| = 0$$

Donde I es la matriz de identidad. Esta ecuación produce un polinomio de grado p. Para este ejemplo, hay p = 2 variables y, por lo tanto,

$$|\mathbf{S} - \lambda \mathbf{I}| = \begin{vmatrix} .7986 - \lambda & .6793 \\ .6793 & .7343 - \lambda \end{vmatrix} = .124963 - 1.53291\lambda + \lambda^2 = 0$$

Los valores de λ que satisfacen esta ecuación son $\lambda_1 = 1,4465$ e $\lambda_2 = 0,0864$. Los vectores característicos pueden entonces ser obtenidos por la solución de las ecuaciones:

$$[\mathbf{S} - \lambda \mathbf{I}] \mathbf{t}_i = 0 \quad \mathbf{u}_i = \frac{\mathbf{t}_i}{\sqrt{\mathbf{t}_i^T \mathbf{t}_i}}$$

Para $i=1$

$$[\mathbf{S} - \lambda_1 \mathbf{I}] \mathbf{t}_1 = \begin{bmatrix} .7986 - 1.4465 & .6793 \\ .6793 & .7343 - 1.4465 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} t_{11} \\ t_{21} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$\text{Si } t_{11}=1 \rightarrow -.6478 + .6793 t_{21} = 0 \rightarrow t_{21} = 0.9538$$

Y para obtener el primer vector característico:

$$\mathbf{u}_1 = \frac{\mathbf{t}_1}{\sqrt{\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1}} = \frac{1}{\sqrt{1.9097}} \begin{bmatrix} 1.0 \\ .9538 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} .7236 \\ .6902 \end{bmatrix}$$

Similarmete si $\lambda_2 = 0.0864$ y $t_{22}=1$, el segundo vector característico es:

$$\mathbf{u}_2 = \begin{bmatrix} -.6902 \\ .7236 \end{bmatrix}$$

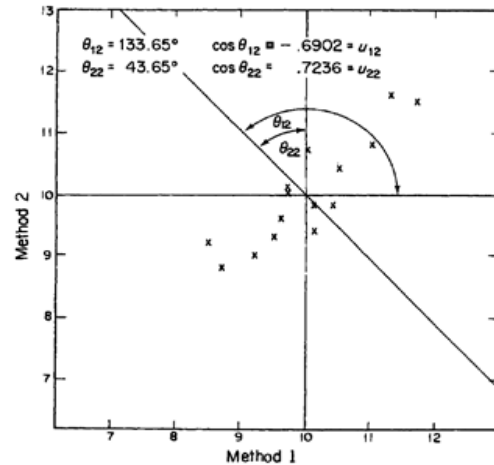
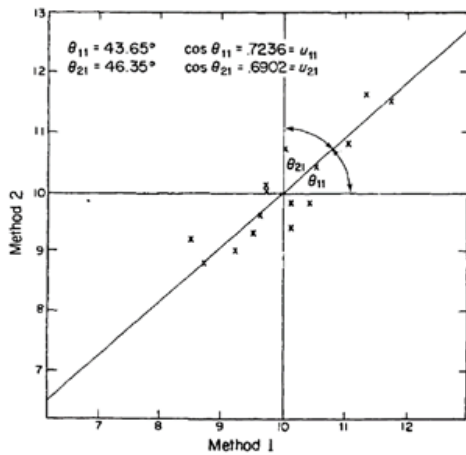
Obteniendo la matriz:

$$U = [u_1 | u_2] = \begin{bmatrix} .7236 & | & -.6902 \\ .6902 & | & .7236 \end{bmatrix}$$

Entonces:

$$\begin{aligned} U'SU &= \begin{bmatrix} .7236 & 0.6902 \\ -.6902 & .7236 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} .7986 & .6793 \\ .6793 & .7343 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} .7236 & -.6902 \\ .6902 & .7236 \end{bmatrix} \\ &= \begin{bmatrix} 1.4465 & 0 \\ 0 & .0864 \end{bmatrix} = L \end{aligned}$$

El el procedimiento que se acaba de describir no es más que una rotación del eje principal de los ejes de coordenadas originales x_1 y x_2 sobre sus medios como se ve en la siguiente figura. Los elementos de los vectores característicos son los cosenos de dirección de los nuevos ejes relacionados con los antiguos. En la figura $u_{11} = 0,7236$ es el coseno del ángulo entre este nuevo eje y el eje x_2 . El nuevo eje relacionado con u_1 es la línea de regresión ortogonal que se buscaba.



Ahora bien se tiene la nueva variable no correlacionada z :

$$z = U'[x - \bar{x}]$$

Donde \mathbf{x} y \mathbf{y} son los vectores de observación $p \times 1$ de las variables originales.

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} 10.0 \\ 10.7 \end{bmatrix} \quad \mathbf{z} = \begin{bmatrix} .7236 & .6902 \\ -.6902 & .7236 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 10.0 - 10.00 \\ 10.7 - 10.00 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} .48 \\ .51 \end{bmatrix}$$

Las puntuaciones z para la primera observación son $z_1 = 0.48$ y $z_2 = 0.51$. La varianza de z_1 es igual a $l_1 = 1.4465$ y la varianza de z_2 es igual a $l_2 = 0.0864$.