

**Efecto de la temperatura y tiempo de tostado y conchado sobre los compuestos de aroma en
la elaboración de chocolate en la empresa Macoex Ltda**

Yuly Fernanda Ojeda Galeano

Proyecto de grado para optar al título de Química

Director

Ing. Luis Javier López Giraldo

Dr. Química, bioquímica y ciencia de alimentos.

Codirector

Arley René Villamizar Jaimes

Químico, MSc

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2018

Dedicatoria

A mis padres, de ustedes aprendí lo esencial de la vida

Gracias por su apoyo en todo momento, por sus consejos, por sus valores, por motivarme constantemente a lograr mis metas, por ser ejemplos de perseverancia, por el valor mostrado para salir adelante, pero más que nada por su amor incondicional.

Los amo inmensamente

*A mis hermanos Juan Fer y Nata
Luchen por lo que anhela su corazón, los quiero.*

Agradecimientos

A Dios por permitirme llegar a este punto y por darme las fuerzas para lograr mis objetivos.

A mi amada familia, mis padres, mis hermanos, mis abuelos y tíos, en especial a mi tía Diana, gracias por su apoyo constante, por la confianza brindada, a todos gracias por darme la inspiración para lograr estas metas, ustedes son los pilares de mi vida.

Al Laboratorio de Alimentos CICTA, en especial al profesor Luis Javier López y Arley René Villamizar, gracias por ofrecerme la oportunidad de trabajar en este bello proyecto, por la confianza, por regalarme su tiempo, por brindarme sus conocimientos y por dejarme ser parte de este grupo. También a Luis Carlos, quien es digno de mi admiración y respeto, a Lady y demás profesionales y estudiantes que hacen parte de esta gran familia. A Sergio, por su ayuda en la realización de mis pruebas, por su paciencia y disponibilidad para compartirme sus conocimientos.

A Laura, la luchadora de la vida, gracias por tu amistad, por ayudarme cuando más necesite, te quiero.

A la empresa MACOEX, por suministrarme las muestras de chocolate para el desarrollo de este proyecto, especialmente a Mónica, por darme la oportunidad de conocer y aprender sobre el proceso de elaboración de chocolate, y por el compromiso y disponibilidad con esta investigación. Al compañero de mi vida Daniel, por ser un modelo de hombre, por apoyarme, por ser amor y paz, la vida se hace más fácil gracias a vos.

A Duvan y Mary, los quiero mucho, gracias por enseñarme que la amistad y el cariño viene en muchas formas de expresión, que los amigos que se hacen en la universidad duran toda la vida.

Por último, agradezco a los profesores Gerardo Bautista García y Cristian Blanco Tirado, por su compromiso con la evaluación de este proyecto de grado, y a todas aquellas personas que aportaron algo a mi formación profesional e integral.

Contenido

	Pág.
Introducción	18
1. Marco Teórico.....	19
1.1 Generalidades: El cacao.....	19
1.2 El cacao en Colombia	22
1.3 Aroma del cacao	22
1.4 Factores que influyen en la formación y desarrollo del aroma del cacao y chocolate.....	25
1.5 Procesamiento del cacao	26
1.6 Procesos de manufactura (transformación del cacao).....	28
1.6.1 Tostado.....	29
1.6.2 Conchado	32
1.7 Análisis de compuestos volatiles	33
1.8 Extracción de compuestos volátiles	34
1.8.1 Headspace estático	34
1.8.2 Headspace dinámico	35
1.8.3 Destilación	35
1.8.4 Extracción con solvente	35
1.8.5 Microextracción en fase sólida en el modo headspace	36
1.9 Cromatografía de gases.....	40

2. Metodología	46
2.1 Materiales, reactivos y equipo	48
2.2 Muestras de cacao y chocolate.....	50
2.3 Extracción de compuestos volátiles del aroma del cacao	50
2.3.1 Tipo de recubrimiento de la fibra.....	50
2.3.2 Diseño experimental para la optimización de los parámetros de extracción de los compuestos volátiles usando microextracción en fase sólida en el modo HeadSpace	50
2.4 Análisis instrumental	51
2.4.1 Análisis por GC/FID	51
2.4.2 Análisis por GC/MSD.....	52
2.5 Identificación	52
2.6 Cuantificación.....	53
2.7 Verificación de las figuras de mérito.....	55
2.7.1 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	55
2.7.2 Precisión intermedia.....	56
2.7.3 Exactitud	57
2.8 Tostado.....	57
2.9 Conchado	59
3. Resultados y discusión de resultados	60
3.1 Verificación de figuras de mérito	60
3.1.1 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)	61
3.1.2 Evaluación de la exactitud del método	61

3.2 Resultados del diseño experimental donde se eligieron los parámetros de extracción de los compuestos volátiles del aroma del cacao	62
3.3 Análisis de resultados proceso de tostado.....	64
3.3.1 Identificación de los compuestos volátiles presentes en licores de cacao	64
3.3.2 Cuantificación de los compuestos volátiles del aroma de cacao tostados	69
3.3.3 Optimización de las condiciones del proceso de tostado.....	70
3.4 Conchado	76
4. Conclusiones.....	81
5. Recomendaciones	82
Referencias Bibliográficas	83
Apéndices.....	88

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Producción mundial de cacao en grano por continentes (miles de toneladas) cifras periodo cacaotero (año cacaotero:1 de octubre al 30 de septiembre) fuente: fedecacao, icco estimado* http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/in	20
Figura 2. Mazorca y semillas de cacao con su composición. adaptado de (aldave 2016)	21
Figura 3. Geometría de algunos compuestos orgánicos que definen el aroma. adaptado de (bascón 2016).....	23
Figura 4. Etapas del desarrollo del aroma del cacao y el chocolate. adaptado de (beckett 2009)	26
Figura 5. Reacción de formación de los compuestos de amadori. adaptado de (beckett 2009) ...	28
Figura 6. Elaboración industrial del chocolate	29
Figura 7. A) Formación de aldehídos y aminocetonas vía degradación de strecker de aminoácidos. B) Conversión de aminocetonas en alquilpirazinas. adaptado de (beckett 2009) ..	31
Figura 8. Redistribución del aroma del cacao en la masa de chocolate (entre las partículas de cacao y las superficies de los cristales de azúcar y manteca de cacao) durante el conchado. adaptado de (beckett 2009)	33
Figura 9. Dispositivo para spme. adaptado de (reyes-patiño and patiño-porras 2007).....	37
Figura 10. Modos de extracción por spme. adaptado de (reyes-patiño and patiño-porras 2007) .	39
Figura 11. Primeras 2 etapas metodológicas del desarrollo experimental para el análisis de compuestos volátiles del aroma del cacao	47

Figura 12. Tercera etapa metodológica para el análisis de compuestos volátiles del aroma del cacao	48
Figura 13. Fórmula utilizada para calcular índices de retención	53
Figura 14. Fórmula utilizada para calcular la concentración de los compuestos volátiles	54
Figura 15. Fórmula utilizada para calcular los factores de respuesta	55
Figura 16. Fórmula para la determinación del límite de detección.....	56
Figura 17. Fórmula para la determinación del límite de cuantificación	56
Figura 18. Fórmula para la determinación del coeficiente de variación.....	56
Figura 19. Fórmula para la determinación del porcentaje de recuperación.....	57
Figura 20. Tostador usado en el procesamiento del cacao en la empresa macoex	59
Figura 21. Superficie de respuesta y valores optimizados que maximizan el área de compuestos volátiles en licores de cacao conforme se modifican las condiciones de extracción.....	63
Figura 22. Perfil cromatográfico obtenido por gc-ms.....	64
Figura 23. Estructuras químicas de los compuestos identificados mediante cg-ms en licores de cacao	66
Figura 24. Espectro de masas para el linalol, obtenido mediante cg/ms	67
Figura 25. Ruta de fragmentación para el linalol.....	68
Figura 26. Superficie de respuesta para la optimización de las condiciones de tostado que maximizaban la concentración de compuestos asociados al atributo frutal	72
Figura 27. Resultados del análisis sensorial para las condiciones de tostado t5 y t6	74
Figura 28. Resultados del análisis sensorial para las condiciones de tostado t5 y t6	75
Figura 29. Variación de las concentraciones de los compuestos asociados a los atributos floral, frutal, nuez y cacao a lo largo de la duración del proceso de conchado.	78

Figura 30. Cromatogramas de un licor de cacao tostado (arriba) y chocolate después del
conchado (abajo)..... 79

Figura 31. Comparación cuantitativa de las variaciones encontradas entre los compuestos
asociados a los atributos analizados para el tostado y el conchado 80

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Recubrimientos de fibras comercialmente disponibles. adaptado de (vas and vékey 2004)	38
Tabla 2. Compuestos volátiles encontrados en el aroma del cacao y chocolate mediante cromatografía de gases con sus respectivos atributos sensoriales y su concentración. (counet, callemien and ouwerx, collin 2002; noguera 2014; rodriguez-campos et al. 2012).....	42
Tabla 3. Metodologías encontradas en la literatura donde se evalúan compuestos volátiles del aroma del cacao.....	44
Tabla 4. Sustancias químicas utilizadas.....	48
Tabla 5. Material de laboratorio.....	49
Tabla 6. Equipos de análisis instrumental y equipos menores.....	49
Tabla 7. Diseño experimental para la optimización de las variables de extracción	51
Tabla 8. Compuestos seleccionados por familias para determinar el factor de respuesta con el fin de calcular la concentración de los compuestos volátiles del aroma del cacao.	55
Tabla 9. Diseño de superficie usado para analizar el tostado	58
Tabla 10. Formulación del chocolate preparado.....	60
Tabla 11. Muestreos hechos en el proceso de conchado	60
Tabla 12. Datos para la determinación del lod y el loq	61
Tabla 13. Resultados del porcentaje de recuperación.....	61

Tabla 14. Resultados del diseño experimental para las condiciones de extracción.....	62
Tabla 15. Parámetros de extracción de compuestos volátiles del aroma del cacao optimizados segun el diseño experimental.....	63
Tabla 16. Compuestos identificados en licores de cacao del departamento de santander. [1](pino et al. 2010); [2](andion and uchbauer 2005); [3](spreng and ericaceae 2010); [4](sajjadi and mehregan 2006); [5](ho et al. 2007); [6](compounds 2010); [7](aida 2008); [8](ra and tabilio 2008).	65
Tabla 17. Factores de respuesta para la cuantificación.....	69
Tabla 18. a) total de las concentraciones para cada grupo de compuestos asociados a los atributos floral, frutal, nuez, y cacao, por cada condición de tostado evaluada. b) abreviaturas de cada experimento con sus respectivas condiciones.....	70
Tabla 19. Resultados sensoriales a partir del análisis realizado para las 8 condiciones de tostado	73
Tabla 20. Concentración de los compuestos asociados a cada atributo sensorial (floral, frutal, nuez y cacao) para los 4 punto de muestreo en el proceso de conchado	77

LISTA DE ANEXOS

Apéndice A. Concentraciones de los compuestos identificados y asociados a los atributos sensoriales floral, frutal, nuez y cacao, para las 8 condiciones de operación de tostado	88
Apéndice B. Resultados del diseño experimental para los 4 atributos especiales analizados: floral, frutal, nuez y cacao.	89
Apéndice C. Superficies de respuesta para cada uno de los 4 atributos sensoriales: floral, frutal, nuez y cacao.	92
Apéndice D. Resultados sensoriales detallados para las condiciones de tostado.	93
Apéndice E. Concentraciones de los compuestos identificados y asociados a los atributos sensoriales floral, frutal, nuez y cacao, para los 4 puntos de muestreo del proceso de conchado.	95
Apéndice F. Coeficiente de variación calculado para determinar la precisión del método analítico en la cuantificación de los compuestos volátiles en el producto terminado después del proceso de conchado para dos repeticiones R1 y R2.	96

Resumen

TÍTULO: EFECTO DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE TOSTADO Y CONCHADO SOBRE LOS COMPUESTOS DE AROMA DEL CACAO EN LA ELABORACIÓN DE CHOCOLATE EN LA EMPRESA MACOEX LTDA *

AUTORA: Yuly Fernanda Ojeda Galeano **

Palabras clave: Compuestos volátiles, aroma del cacao, atributos sensoriales, GC-MS, GC-FID, HS-SPME, tostado, conchado.

DESCRIPCIÓN:

El procesamiento del cacao en la transformación a chocolate consta de una serie de etapas entre las que se destacan el tostado y el conchado, donde el tiempo y la temperatura son dos variables influyentes sobre los compuestos volátiles que conforman al aroma del cacao, en el cual predominan principalmente pirazina, ésteres, alcoholes, aldehídos y cetonas, siendo estos los responsables de percepciones sensoriales descritos como frutal, floral, nuez, cacao entre otros.

Durante las etapas de tostado y conchado en el proceso de elaboración de chocolate en la empresa MACOEX, se ha evidenciado que las temperaturas y tiempos de operación empleados, se ven reflejados en una baja intensidad de las percepciones sensoriales, y que, para cacaos de diferentes orígenes, algunas notas especiales como floral, frutal, nuez y cacao, suelen no estar presentes.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del tiempo y la temperatura de tostado y conchado sobre los compuestos de aroma y por ende en las percepciones sensoriales, en el proceso de manufactura del chocolate en la empresa MACOEX para granos provenientes del departamento de Santander mediante la identificación y cuantificación usando el método HS-SPME-GC.

Se optimizaron las condiciones de operación del tostado a través de un diseño experimental donde se dio como resultado la maximización de las concentraciones de compuestos asociados a los atributos floral, frutal, cacao y nuez (120°C/45 min). Encontrando que entre mayor sea la temperatura y el tiempo de tostado, mayor será la concentración de los compuestos volátiles y también las percepciones sensoriales. No obstante, el conchado produce la disminución de la concentración de dichos compuestos.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: Dr. Luis Javier López Giraldo, Co-director: MSc. Arley Rene Villamizar Jaimés

Abstract

TITLE: EFFECT OF TEMPERATURE AND ROASTING TIME AND CONCHED ON THE COCOA AROMA COMPOUNDS IN THE PREPARATION OF CHOCOLATE IN THE COMPANY MACOEX LTDA*

AUTHOR: Yuly Fernanda Ojeda Galeano**

KEY WORDS: Volatile compounds, cocoa aroma, sensory attributes, GC-MS, GC-FID, HS-SPME, roasting, conched.

DESCRIPTION:

The processing of cocoa in chocolate manufacture consists of a series of stages, among which toast and conching stand out, where time and temperature are two influential variables on the volatile compounds that make up the aroma of cocoa, in which predominantly pyrazine, esters, alcohols, aldehydes and ketones, being these responsible for sensory perceptions described as fruit, floral, nut, cocoa among others.

During the roasting and conching stages in the chocolate making process at the MACOEX company, it has been demonstrated that the temperatures and operating times used are reflected in a low intensity of sensory perceptions, and that, for cocoas of different Origins, some special notes such as floral, fruit, nut and cocoa, are usually not present. In the present work, the effect of time and temperature of roasting and conching on aroma compounds and, therefore, on sensorial perceptions, in the chocolate manufacturing process in the MACOEX company for grains coming from the department of Santander through the identification and quantification using the HS-SPME-GC method.

The operating conditions of roasting were optimized through an experimental design which resulted in the maximization of the concentrations of compounds associated with the floral, fruit, cocoa and walnut attributes (120 ° C / 45 min). Finding that the higher the temperature and the roasting time, the higher the concentration of volatile compounds and also the sensory perceptions. However, the conching produces the decrease in the concentration of said compounds.

* Proyect to degree

** Faculty of Science, School of Chemistry, Director: Dr. Luis Javier López Giraldo, Co-director: MSc. Arley Rene Villamizar Jaimes

Introducción

El aroma en los productos alimenticios está asociado con la fracción de compuestos volátiles que éste contiene. En el caso del chocolate éste tiene uno de los más famosos y apetecidos aromas y sabores conocidos en el mundo. En productos de chocolateros, existe una mezcla de aproximadamente 500 compuestos presentes en su fracción volátil (Ducki et al. 2008), incluso este valor va en aumento (Counet, Callemien and Ouwerx, Collin 2002). Los compuestos asociados con el aroma del chocolate pertenecen a familias químicas como las pirazinas, pirroles, furanos, aldehídos, alcoholes, ésteres, cetonas, ácidos y amidas (Counet, Callemien and Ouwerx, Collin 2002; Diab et al. 2014).

El estudio de los componentes volátiles presentes en el chocolate se remonta ya hace más de cien años cuando se identificaron el linalol, algunos ésteres, y ácidos en los granos de cacao. Desde entonces han sido muchos los intentos por evaluar cuales son los compuestos volátiles responsables del aroma del cacao y chocolate, dónde se producen, y qué factores afectan la fracción volátil (Torres 2012).

En este estudio, se identificaron (usando SPME/GC/MS) y cuantificaron (usando SPME/GC/FID) los compuestos volátiles relacionados con el aroma del cacao, conforme se modificó el tiempo y la temperatura del proceso de tostado y conchado durante la transformación del cacao a chocolate en la empresa MACOEX. Resultados parciales de este trabajo realizado fueron presentados en el “*XVII congreso colombiano de química: Aportes de la química a los desafíos del siglo XXI*”. Para este trabajo se contó con recursos provenientes del Grupo de

Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) adscrito a la Escuela de Química, Proyecto de Investigación titulado “*Desarrollo e innovación de cacaos especiales bajo sistemas agroforestales*” con CORPOICA y el apoyo de la empresa Mariana Cocoa Export MACOEX quien suministró las muestras.

1. Marco Teórico

1.1 Generalidades: El cacao

El grano de cacao proviene de la planta *Theobroma cacao L.*, árbol tropical, originario de países suramericanos tales como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil (Portillo, Graziani De Fariñas, and Cros 2006). Esta especie tiene gran explotación comercial, ya que es la principal materia prima para la elaboración de artículos de chocolatería (Aculey et al. 2010).

La producción mundial de cacao se concentra en África, con una producción mundial del 90 % que para el año 2016 corresponde aproximadamente a 3000 toneladas. En lo que respecta a la producción en América, esta representa alrededor de 1000 toneladas también para el año 2016, tal como se muestra en la Figura 1, donde los principales países americanos que aportan a la producción son Brasil, Ecuador, República Dominicana, Colombia y México.

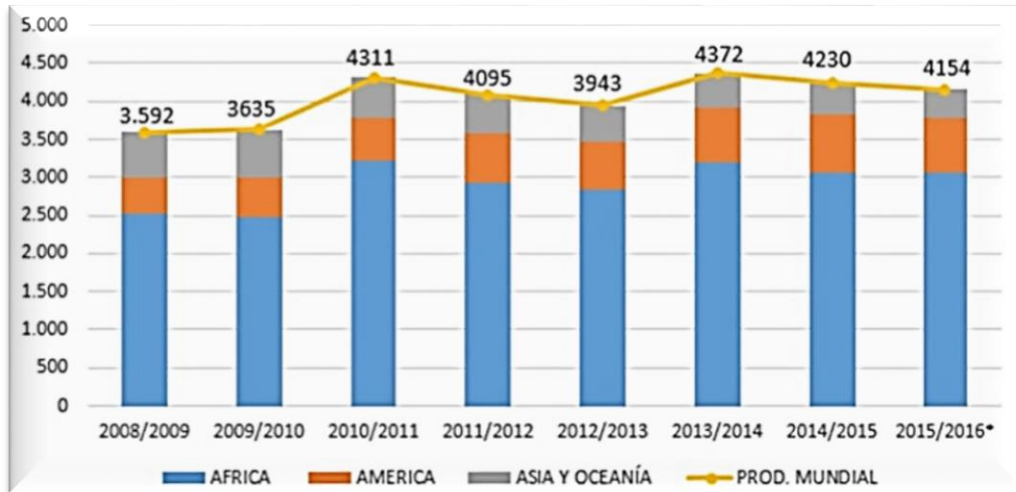


Figura 1. Producción mundial de cacao en grano por continentes (Miles de Toneladas) Cifras periodo cacaotero (Año Cacaotero: 1 de octubre al 30 de septiembre)

Nota. Adaptado de: Fedecacao, ICCO estimado* <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/in>

El grano de cacao (Figura 2) está compuesto por una cascarilla (testa), que representa 10-14% en peso del grano seco, y una almendra (cotiledón) que representa entre el 86-90% del peso restante, donde están concentrados unos compuestos químicos que son los responsables del sabor y aroma del chocolate. Un tercio del cotiledón tiene células con compuestos pertenecientes a polifenoles (taninos, antocianinas y proantocianidinas) y metilxantinas (cafeína y teobromina), cuyo consumo periódico está asociado con efectos beneficiosos para la salud por ser compuestos antioxidantes, además de contribuir como precursores en la formación del sabor y aroma del cacao y chocolate (Lecumberri et al. 2006; Perea-Villamil, Cadena-Cala, and Herrera-Ardila 2009). Los dos tercios restantes están conformados por células de reserva que en su interior contienen lípidos, proteínas y enzimas (Gonz 2012). El cotiledón, se encuentra rodeado de una pulpa mucilaginosa espesa de color blanco de sabor agrisado rica en azúcares, la cual tiene un rol clave en la formación del aroma a cacao (Cadena and Herrera 2008; Gonz 2012).

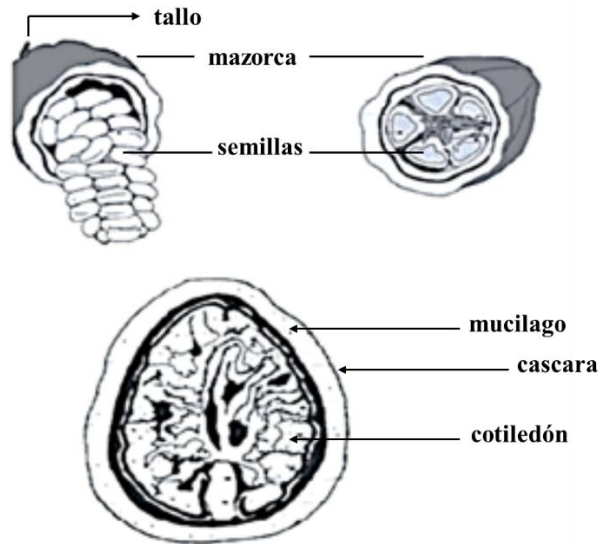


Figura 2. Mazorca y semillas de cacao con su composición. Adaptado de (Aldave 2016)

Según lo reportado por FEDECACAO, para cacaos cultivados en Colombia, la composición química del grano muestra que las grasas presentes son el componente mayoritario, con contenidos entre 52%-54 %, y de proteínas 11,4%-13,8%. Adicional a esto, se encontró que los contenidos de humedad varían entre 2,5%-3,1% y cenizas entre 3,2%-3,9% (Fedecacao 2005). Se ha encontrado que la composición de grasas entre diferentes materiales de cacao, presentan diferencias significativas (Perea, Ramirez, and Villamizar 2011), lo cual puede dar lugar a variaciones en el procesamiento de los granos en la elaboración de chocolate (Gonz 2012).

Comercialmente, la calidad del cacao se ha dividido en dos categorías: cacao corriente y cacao fino de aroma. El cacao corriente tiene notas altas de sabor a cacao. En el cacao fino se encuentran aromas adicionales como frutales, florales, nuez, y caramelo y son utilizados para la elaboración de chocolates especiales o gourmet. En Colombia, los cultivos comerciales de cacao están compuestos en su mayoría por materiales tipo trinitario, el cuál ha sido clasificado como fino para la industria chocolatera y es descrito como frutal, con atributos florales y sabores secundarios agradables como melaza, caramelo y pasas (Perea-Villamil et al. 2017).

1.2 El cacao en Colombia

Colombia cuenta con una posición geográfica que proporciona condiciones apropiadas para la siembra de este fruto. En la actualidad se cultivan cacaos de tipo criollo, forastero, trinitario e híbridos. El país a nivel mundial aporta el 1% de la producción de grano y contribuye con el 8 % de cacao fino y de aroma (Serrano 2009).

De acuerdo con el departamento de estadística FEDECACAO, (Perea-Villamil et al. 2017), la producción colombiana para el año 2016 fue de 56.785 toneladas métricas, siendo el departamento de Santander el mayor productor con el 38% del total nacional, especialmente en el municipio de El Carmen y San Vicente de Chucurí, seguido de Arauca con el 11% y Huila con el 7%.

Los cacaos cultivados en el departamento de Santander cuentan con condiciones agroclimáticas únicas que se reflejan en un perfil sensorial donde predominan notas a nuez y cacao. Las tierras de esta región poseen la altitud indicada para este cultivo, un suelo francoarcilloso el cual preserva la humedad y es rico en materia orgánica. Además cuenta con temperatura entre los 25°C y 28°C (Serrano 2009).

1.3 Aroma del cacao

En el cacao, el aroma está determinado principalmente por la fracción volátil, la cual es una mezcla compleja de una gran cantidad de compuestos orgánicos que presentan alta volatilidad lo que los hace fácilmente perceptibles por los sentidos (Bascón 2016).

Una característica que define el aroma es su identidad sensorial, la cual se describe mediante los descriptores sensoriales (Investigación and Alimentación 2011). El ser humano tiene la

capacidad de diferenciar y discriminar miles de aromas diferentes; sin embargo, existe gran dificultad a la hora de clasificar los aromas de forma objetiva, puesto que no existe la capacidad de obtener una terminología adecuada para definir un aroma verbalmente. Así mismo, suele asignarse la identidad a cosas u objetos familiares para la persona (afrutado, acaramelado, lavanda), o a una condición que informa (quemado, podrido), o a sensaciones de aceptación o rechazo que producen. A pesar de ello, se han logrado clasificar seis aromas básicos: picante, fragante, pútrido, etéreo, resinoso y quemado que para el caso del cacao, los componentes de su aroma están relacionados principalmente con descriptores a frutas, flores y nueces (Bascón 2016).

La mayoría de las especies químicas odorantes son compuestos orgánicos, que poseen heteroátomos tales como N, O, y S. Las moléculas de este tipo deben poseer un grupo funcional activo y presentar una geometría adecuada que logre activar al receptor sensorial. Según sea el odorante, su grupo funcional y geometría, serán quienes determinen el aroma finalmente percibido. Ejemplo de ellos son los hidrocarburos aromáticos, donde las posiciones “para” son características de los olores a especias, y las posiciones “meta” para florales (Bascón 2016). En la figura 3 se muestran algunas geometrías específicas para moléculas odorantes.

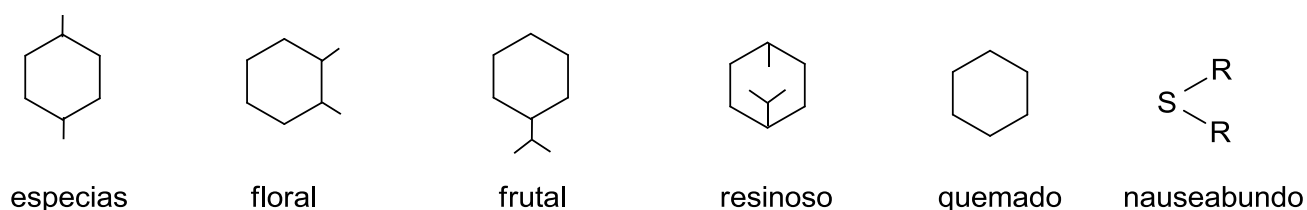


Figura 3. Geometría de algunos compuestos orgánicos que definen el aroma. Adaptado de (Bascón 2016)

Compuestos como el benzaldehído producen el típico aroma a almendras, gracias a que posee un núcleo aromático con enlaces dobles conjugados. Los ésteres aportan el clásico aroma frutal,

donde la intensidad del aroma depende de su estructura, así, ésteres alifáticos con más de ocho átomos de carbono, presentan aromas intensos, sin embargo, a medida que crecen las insaturaciones en las proximidades de la función éster se ve disminuida la intensidad de los tonos frutales y comienzan a percibirse aromas herbales (Bascón 2016).

En 2014, Alvarado *et.al.*, identificaron y cuantificaron 60 compuestos presentes en muestras de cacao seco y 108 en muestras de cacao tostado, lo cual indica y evidencia que el tratamiento de tostado tiene un efecto positivo en la formación de gran cantidad de compuestos. Además, encontraron que, tanto en cacaos secos como tostados, los compuestos predominantes fueron los alcoholes, mientras que el contenido de parafinas en cacaos tostados aumentó. Finalmente se concluyó que los compuestos más numerosos en el aroma del cacao son las familias de cetonas, alcoholes, ácidos, ésteres y pirazinas que representan alrededor del 70% de los compuestos (Alvarado et al. 2014).

Crafack en el 2014, corroboró el efecto del tostado, puesto que al analizar licores de cacao tostados y no tostados encontró que 46 compuestos estaban presentes en licores de cacao no tostado y 63 compuestos en cacao tostado, mostrando que este proceso tiene gran impacto en el desarrollo del aroma de chocolate (Crafack et al. 2014).

En estudios actuales, se han determinado los procesos que afectan la composición de compuestos volátiles formada durante los procesos de beneficio, y se mostró que dicha fracción orgánica volátil se ve fuertemente afectada por la formulación y las condiciones de procesamiento (Acierno et al. 2016). Counet 2002, evaluó el proceso de conchado bajo las mismas condiciones sobre dos muestras de chocolate oscuro, los cuales están igualmente formulados (azúcar, manteca de cacao, vainillina como aroma, y lecitina, todos adicionados antes del conchado), pero

provenían, de dos lotes de licor de cacao diferente. De esta manera se encontraron 60 compuestos en los dos lotes evaluados, donde predominaron heterociclos oxigenados y nitrogenados.

Antes del conchado se observó que las cantidades de los compuestos de aroma variaban en las dos muestras lo que indica que los procesos de fermentación y secado no son reproducibles en los dos lotes. Se identificaron tres aldehídos que son sumamente importantes puesto que están asociados con notas de aroma en el chocolate amargo: 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, y fenilacetaldehído, también se identificaron alcoholes siendo predominante el 2-feniletanol, el cual dio un aroma floral. Durante el proceso de conchado, varios de los compuestos de aroma identificados en los dos lotes de chocolate se eliminaron por efecto de la temperatura del proceso (70-80°C), destacándose que la temperatura del proceso de conchado es una variable influyente. Durante el conchado se da lugar a la formación del 2-fenil-5-metil-2-hexenal en concentraciones significativas, posiblemente producto de la condensación aldólica del fenilacetaldehído y el 3-metilbutanal seguido de una deshidratación (Counet, Callemien and Ouwerx, Collin 2002).

1.4 Factores que influyen en la formación y desarrollo del aroma del cacao y chocolate

El aroma es una característica fundamental para la aceptación del chocolate, el cual se ve influenciado por diversos factores, tales como (i) la variedad del cacao (genotipo), ya que define la composición del grano y de esta manera determina la cantidad de precursores de aroma (azúcares, y aminoácidos libres); (ii) el clima y la posición geográfica donde se efectúa la cosecha; (iii) el tratamiento postcosecha, y (iv) el proceso de manufactura del chocolate (Gonz 2012).

El aroma del cacao y chocolate es desarrollado mediante diferentes etapas de procesamiento, siendo de suma importancia la fermentación, el secado, el tostado y el conchado. Se han encontrado

aproximadamente 600 compuestos asociados con el aroma de cacao fermentados, tostados y conchados, todos estos compuestos de naturaleza volátil interactúan y se potencian entre sí para lograr una experiencia sensorial única y placentera (Beckett 2009). En la figura 4 se da una descripción esquemática de las etapas de desarrollo del aroma del cacao y chocolate a través de las etapas de procesamiento.

1.5 Procesamiento del cacao

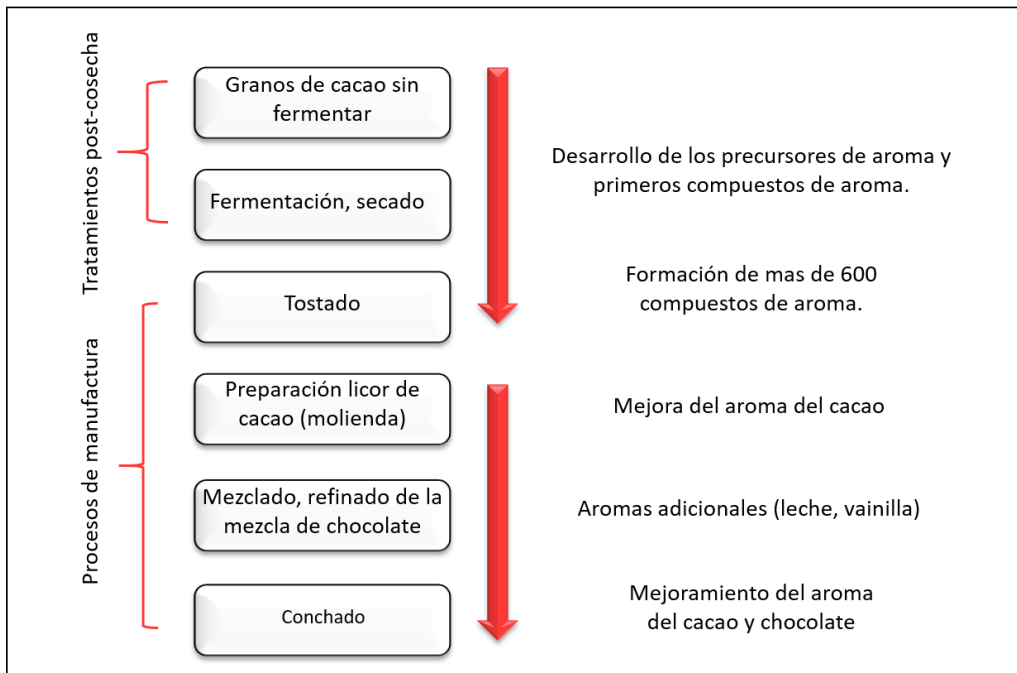


Figura 4. Etapas del desarrollo del aroma del cacao y el chocolate. Adaptado de (Beckett 2009)

La fermentación es quizás la etapa del procesamiento más importante, que consiste puesto que es un proceso espontaneo de naturaleza bioquímica que se da gracias a la inoculación de la pulpa del fruto con microorganismos presentes en el medio como esporas de hongos, levaduras, bacterias ácido-lácticas y bacterias ácido-acéticas; los cuales son activados por el cambio de temperatura.

Este proceso tiene una duración de tres días mínimo y siete días máximo, y en las diferentes etapas que constituyen la fermentación, se da la hidrólisis de carbohidratos, y proteínas, dando lugar a la formación de azúcares reductores, péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres, que serán los precursores de aroma y que en etapas posteriores reaccionaran para generar los compuestos volátiles del aroma del cacao (Aldave 2016; Tran et al. 2015).

La etapa de secado es el paso siguiente a la fermentación, en la cual se hace uso de diferentes métodos para lograr eliminar astringencia y amargor al grano de cacao, pero principalmente eliminar gran parte de la humedad. Sin embargo, está demostrado que las prácticas de secado usando luz solar, logran muestras donde se desarrolla mejor el aroma y se minimizan las notas desagradables (Beckett 2009).

Cuando son usados métodos artificiales como fuegos de leñas o quemadores con aceite, puede causar una pérdida inadecuada de ácidos volátiles desmejorando la calidad del cacao. Además, si los granos entran en contacto con los humos, puede producirse el desagradable aroma a quemado o ahumado puesto que el cacao absorbe con facilidad compuestos fenólicos (Beckett 2009).

En la etapa de secado empieza a tomar lugar la reacción de Maillard, dando paso a la formación de los primeros intermediarios denominados compuestos de Amadori. Estos intermediarios son formados por la reacción de aminoácidos libres con la glucosa. Los compuestos de Amadori son convertidos en la etapa de tostado en gran cantidad de compuestos volátiles (Beckett 2009), en la figura 5 se ilustra la reacción de formación de los compuestos de Amadori.

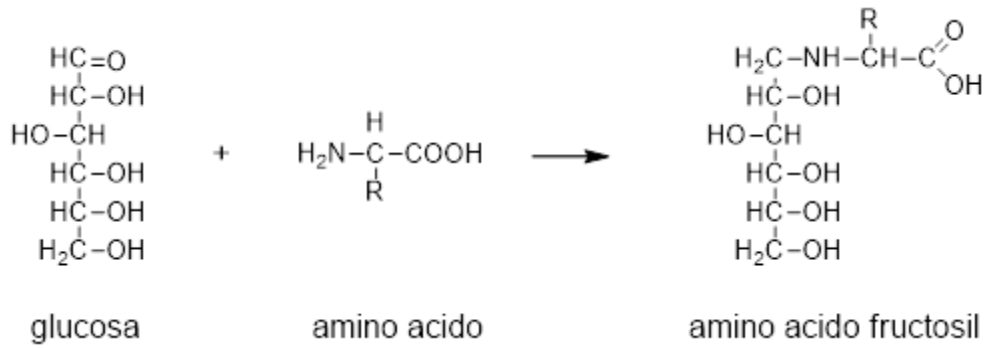


Figura 5. Reacción de formación de los compuestos de Amadori. Adaptado de (Beckett 2009)

1.6 Procesos de manufactura (transformación del cacao)

Terminado el secado de los granos de cacao, estos, son destinados para la transformación en procesos de manufactura para la elaboración de chocolate. Se inicia con un tostado, que consiste básicamente en someter los granos a factores como tiempos y temperaturas que influirán en la formación de los compuestos de aroma.

Seguidamente se procede a un descascarillado y molienda de los granos donde estos se rompen y son formados los nibs, así se reduce el tamaño de las partículas y se prepara la pasta de cacao o licor de cacao. Seguido a esto, el licor de cacao se mezcla con azúcar y durante un tiempo determinado se da la refinación hasta que esta mezcla se compacte lo mayor posible y se reduzca el tamaño de partícula. A esta mezcla se le adiciona lecitina de soya y se le aplica calor para lograr un mayor desarrollo de los compuestos de aroma y se eliminen los ácidos indeseables, proceso conocido como conchado. De esta manera el cacao termina su proceso y gracias a un atemperado y moldeo el cacao se convierte en el tan deseado chocolate (Gonz 2012), en la figura 6 se observa un diagrama que ilustra el proceso de manufactura del chocolate.

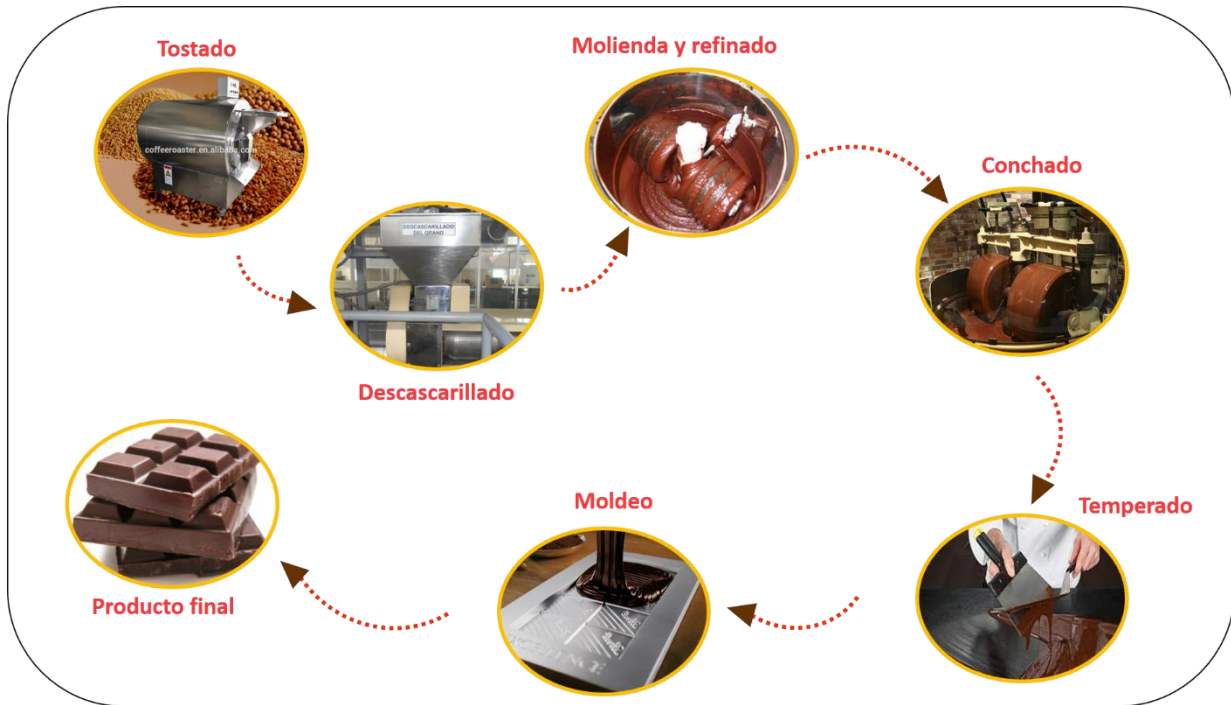


Figura 6. Elaboración industrial del chocolate

1.6.1 Tostado El proceso de tostado es un paso esencial en el proceso de elaboración de chocolate. En el tostado, los granos son sometidos a un tratamiento con calor seco a temperaturas entre 130 °C y 150 °C y tiempos entre los 30 y los 60 minutos, con las finalidades de reducir la humedad y acidez volátil indeseable, desprender la cáscara del grano, y la más importante, continuar el desarrollo de los compuestos de aroma a partir de los precursores formados en el proceso de fermentación y secado. Las condiciones de tiempo y temperatura a las que se realiza el tostado afectan la concentración de compuestos volátiles en los granos de cacao (Ramli et al. 2005).

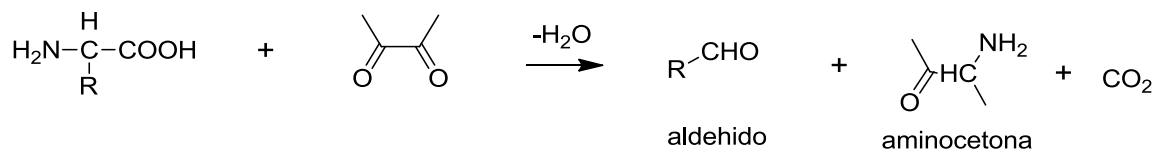
Es importante resaltar que las temperaturas a las que se opera el tostado del cacao son bastante inferiores a las que se hace para tostar nueces o café. Realizar tostados a altas temperaturas o a prolongados tiempos, podría dar como resultado un cacao con sensaciones amargas y a quemado, bastante indeseables (Beckett 2009).

Previo al proceso de tostado, es necesaria y crucial la etapa de secado, puesto que allí se disminuye la humedad del grano, de no ser así, se produce un aroma a cocido, además un exceso de humedad dificultaría las reacciones de condensación y descomposición en las cuales se basa el proceso de formación de los compuestos de aroma (Figura 4), por otra parte, causaría que los productos volátiles se eliminen por evaporación (Beckett 2009).

En el tostado, ocurren múltiples reacciones químicas donde se forman pirazinas, alcoholes, hidrocarburos, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, fenoles, pirroles, furanos, lactonas, quinolinas, oxalinas, tiazoles y oxazoles. La reacción de Maillard toma lugar en este proceso, reacción que se ve iniciada en el proceso de secado con la formación de los compuestos de Amadori (Beckett 2009).

Las pirazinas suelen ser predominantes, aproximadamente 100 tipos de estas pueden ser formadas y se consideran muy importantes puesto que contribuyen en gran medida en el aroma del cacao, son asociadas a percepciones a nueces y cacao. Las pirazinas en el tostado son formadas mediante un mecanismo de dimerización de cetoaminas a dihidroxipirazinas con una etapa posterior de oxidación como lo muestra la reacción de la figura 7. Las pirazinas, no solo son formadas en la etapa de tostado, la tetrametilpirazina es formada en la etapa de fermentación, donde no solo se producen azúcares reductores y aminoácidos productos de la proteólisis, si no también gracias a la acción de microorganismos, se da la síntesis de algunos alcoholes, ácidos orgánicos, aldehídos y pirazinas (Acierno et al. 2016; Portillo et al. 2006). El tipo y cantidad de pirazinas formadas depende de la reactividad de los aminoácidos presentes, el pH y el procedimiento de tostado, además la concentración de las mismas depende principalmente de la variedad de los granos de cacao (Beckett 2009).

- a) Degradación de Strecker de aminoácidos



b) Conversión de aminocetonas en pirazinas

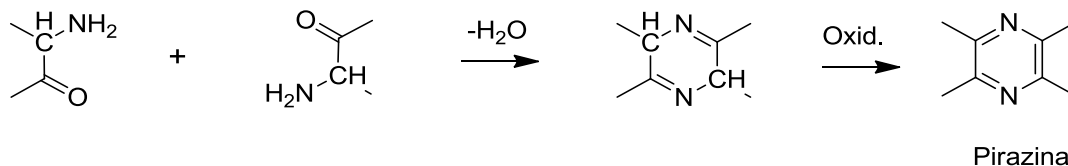


Figura 7. a) Formación de aldehídos y aminocetonas vía degradación de Strecker de aminoácidos. b) Conversión de aminocetonas en alquilpirazinas. Adaptado de (Beckett 2009)

Dado que las condiciones de tiempo y temperatura de torrefacción son influyentes en el desarrollo de los volátiles, condiciones extremas de tostado producirían la expulsión por evaporación de la tetrametilpirazina debido a que los precursores ya no están disponibles. Por el contrario, al aumentar las condiciones de tiempo y temperatura de tostado, la concentración de otras pirazinas como la trimetilpirazina suele aumentar (Beckett 2009).

Otros compuestos con mucha importancia en el aroma del cacao que son desarrollados en el proceso de tostado son los aldehídos, estos presentan un particular aroma floral y frutal, compuestos formados gracias a la degradación de aminoácidos de Strecker una de las reacciones que hacen parte de la reacción de Maillard. Además, los aldehídos son convertidos en otros compuestos de su misma naturaleza gracias a reacciones secundarias. Los aldehídos también son intermediarios en la formación de pirazinas y otros compuestos heterocíclicos, en la continuidad de la reacción de Maillard (ver Figura 7). Los aldehídos aumentan su concentración al aumentar el tiempo de tostado (Beckett 2009).

Por otra parte, hay otros compuestos adicionales a los aminoácidos y azúcares, que ingresan en las reacciones del tostado bajo el tratamiento térmico al que son sometidos los granos. Péptidos,

proteínas, vitaminas, polifenoles, lípidos y sus productos de oxidación, son precursores influyentes en los compuestos volátiles asociados con el aroma final. Por ejemplo se pueden formar compuestos muy específicos como 1,2-bencenediol, producto de la degradación térmica de la catequina, así mismo tiazoles por descomposición de la vitamina tiamina, al igual que algunas pironas (Beckett 2009)

1.6.2 Conchado El proceso de elaboración de chocolate (figura 6), se inicia mezclando los ingredientes como azúcar, licor de cacao y manteca en caso de ser necesaria dependiendo el contenido graso de la variedad del cacao usado. Se da paso al refinado, proceso que tiene como objetivo reducir el tamaño de partícula de los cristales de azúcar y de los sólidos del cacao hasta el punto de no ser detectables en la boca (30 μm aprox.). Después se inicia el conchado, proceso de amasado o de suavizado con una duración de 2 o 3 días en el cual se somete la masa a una temperatura entre 60 °C y 75 °C. La finalidad del proceso de conchado es reducir el tamaño de partícula y darle fluidez a la masa. Además, en el conchado se eliminan los aromas indeseables y se da el desarrollo del aroma agradable y particular del chocolate. El conchador funciona como un agitador mecánico que remueve la masa y distribuye homogéneamente la grasa (o manteca de cacao) a lo largo de todo el volumen del chocolate y azúcar ya agregado a la mezcla. También en este paso, se adiciona un emulsionante (generalmente lecitina de soya) que da flujo y mayor suavidad a la mezcla. La operación de agitación continua y prolongada genera una fricción interna entre las partículas, aumentando la temperatura y así promoviendo que se liberen compuestos volátiles. Este procedimiento mejora las sensaciones organolépticas del chocolate puesto que se da la facilidad de que se funda en la boca (Schumacher et al. 2009).

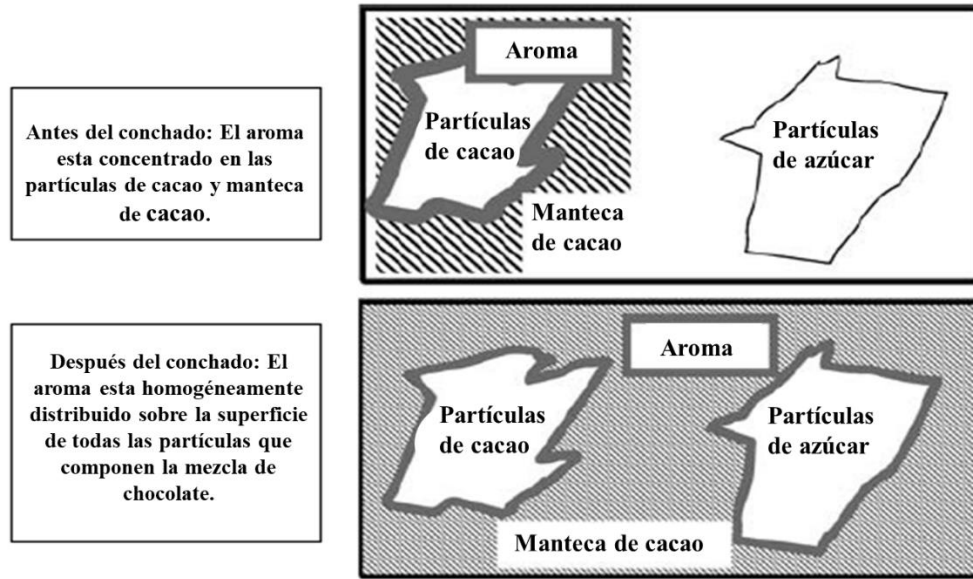


Figura 8. Redistribución del aroma del cacao en la masa de chocolate (entre las partículas de cacao y las superficies de los cristales de azúcar y manteca de cacao) durante el conchado. Adaptado de (Beckett 2009)

En el conchado se da una redistribución de los componentes del aroma en la masa del chocolate (Figura 8). En cuanto inicia el conchado los compuestos de aroma solo se encuentran presentes en el cacao y la manteca, pero no en el azúcar, éste solo contiene los sabores dulces. A través del conchado, los aromas son transferidos a las superficies de los gránulos de azúcar, lo que se percibe como un aroma más uniforme y se reduce el dulce penetrante del azúcar (Beckett 2009).

1.7 Análisis de compuestos volátiles

La identificación de componentes volátiles de aroma de una matriz alimenticia es una tarea con varias problemáticas. En primera medida, la instrumentación de un laboratorio no alcanza la sensibilidad que tiene un sistema olfativo humano. Además, las bajas concentraciones de los

analitos en las muestras y su importancia sensorial requieren ser aislados de la matriz y concentrados para permitir su análisis instrumental.

El hecho de que estos analitos estén en bajas concentraciones, la distribución a través de la matriz alimenticia complica el aislamiento y concentración, puesto que estos sistemas alimenticios contienen azúcares, carbohidratos complejos, lípidos, proteínas y agua, que pueden interferir en el proceso. Los procesos de extracción basados en la volatilidad se complican por el hecho de que el agua también se volatiliza, entonces cualquier procedimiento que implique destilación también dará lugar a la extracción de agua. Otros métodos basados en la solubilidad en solventes orgánicos extraerán además de los analitos de interés, lípidos solubles en dicho solvente. Todas estas interferencias, tendrán sus consecuencias en el análisis instrumental (Analysis 2006).

Las matrices alimenticias comprenden un gran número de clases de compuestos químicos como alcoholes, aldehídos, ácidos, cetonas, aminas, carbonilos, heterociclos, y aromáticos, lo que también dificulta su aislamiento y concentración. Otro problema asociado a la extracción de compuestos volátiles es la inestabilidad de éstos, ya que puede haber degradaciones térmicas o dar lugar a reacciones químicas secundarias. De acuerdo con lo mencionado en los párrafos anteriores, se debe ser cauteloso en el momento de elegir el método de extracción y concentración de compuestos de aroma para su respectivo análisis (Analysis 2006).

1.8 Extracción de compuestos volátiles

1.8.1 Headspace estático La técnica consiste calentar la muestra y agitar a una temperatura determinada durante un tiempo determinado, después de lo cual se recoge mediante una jeringa hermética una fracción de los gases de espacio cabeza y se analiza mediante cromatografía de

gases para determinar la concentración del analito de interés. La principal limitante de este método es la sensibilidad, pues la fracción analizada no representa los componentes totales de la muestra, lo que requerirá un método de concentración de los analitos del espacio cabeza (Analysis 2006).

1.8.2 Headspace dinámico En este método la muestra se mantiene en un recipiente por el que se hace pasar un gas inerte, generalmente gas portador, durante el periodo de muestreo. Los analitos purgados de la muestra se retienen en una trampa de adsorción o se condensan en una trampa fría, de donde posteriormente se desorben térmicamente y pasan a la columna. Esta técnica es la base de los análisis de purga y trampa. Con un sistema dinámico se obtiene una mayor sensibilidad frente a las técnicas convencionales de espacio cabeza. La principal desventaja de una trampa criogénica es que también atraparé el agua, muy volátil en muestras alimenticias (Analysis 2006).

1.8.3 Destilación La destilación a alto vacío y la destilación con arrastre de vapor son de las técnicas más usadas para aislar compuestos de aroma. Gracias a la acción del flujo de gas de un solvente de extracción, los analitos se separan aprovechando la diferencia de sus puntos de ebullición, mediante la evaporación y condensación. Sin embargo, se puede presentar la destilación adicional de agua presente en la muestra, lo que acarrearía la eliminación de dicha agua en una etapa posterior. La principal desventaja es que el agua residual y los solventes usados darían lugar a una mala representación del perfil de aroma del alimento (Analysis 2006).

1.8.4 Extracción con solvente Uno de los enfoques más simples y eficientes para el aislamiento de compuestos asociados con aroma es la extracción directa empleando disolventes. La principal

limitación de este método es que es solamente apropiado para alimentos que no contienen lípidos. Si el alimento contiene lípidos, éstos también se extraerán junto con los constituyentes del aroma, y deben separarse entre sí antes de un análisis posterior. Los constituyentes del aroma se pueden separar de los extractos de disolventes que contienen grasa a través de técnicas tales como destilación molecular, destilación con arrastre de vapor y espacio de cabeza dinámico. Otra consideración es que la pureza del solvente debe ser muy alta. Las principales desventajas de este método es que puede resultar costoso, y puede generar de residuos tóxicos (Analysis 2006).

1.8.5 Microextracción en fase sólida en el modo headspace La microextracción en fase sólida es una técnica de extracción que se introdujo en 1989 por Pawliszyn y sus colaboradores en la universidad de Waterloo, Canadá (Fonseca-García 2005; Rodriguez Hernando 2005; Vas and Vékey 2004). La técnica ha ganado gran aceptación en el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles de diferentes matrices tanto orgánicas como inorgánicas, entre ellas matrices alimenticias, debido a que elimina las dificultades encontradas en métodos de extracción tradicionales.

Varias de las ventajas encontradas son: (1) no requiere el uso de solvente; (2) tiene un bajo costo de operación; (3) sensibilidad; (4) selectividad; (5) rapidez y sencillez; (6) es una técnica muy fácil de adaptar a un sistema cromatográfico; (7) se usan pequeños volúmenes de muestra. Existen muchas más aplicaciones de la técnica, la cual permite la extracción de compuestos volátiles de aromas, alimentos, fármacos, cosméticos, biomarcadores, pruebas medioambientales, polímeros entre otras (Guide n.d.; Stashenko 2012).

El fundamento de esta técnica consiste en la introducción de la muestra en un vial con tapa sellable, entonces se da la repartición de los analitos entre una fase extractiva soportada sobre una

fibra de sílice fundida y la matriz de la muestra, gracias a que los compuestos volátiles a extraer están en un equilibrio entre su fase gaseosa y su fase condensada (Rodríguez Hernando 2005).

El dispositivo que se usa para la técnica SPME (ver figura 9), consta de una fibra de sílice fundida de 1cm de longitud, que va dotada de un recubrimiento la cual se encuentra unida a una pieza tubular de acero inoxidable, que a su vez se encuentra ensamblada en una cubierta o contenedor denominado *holder*, similar a una microjeringa, que se encuentra equipado con una regleta ajustable y con un émbolo, cuyo movimiento está limitado por un tornillo que se desliza a través de una ranura en forma de ‘‘Z’’ (Fonseca-García 2005).

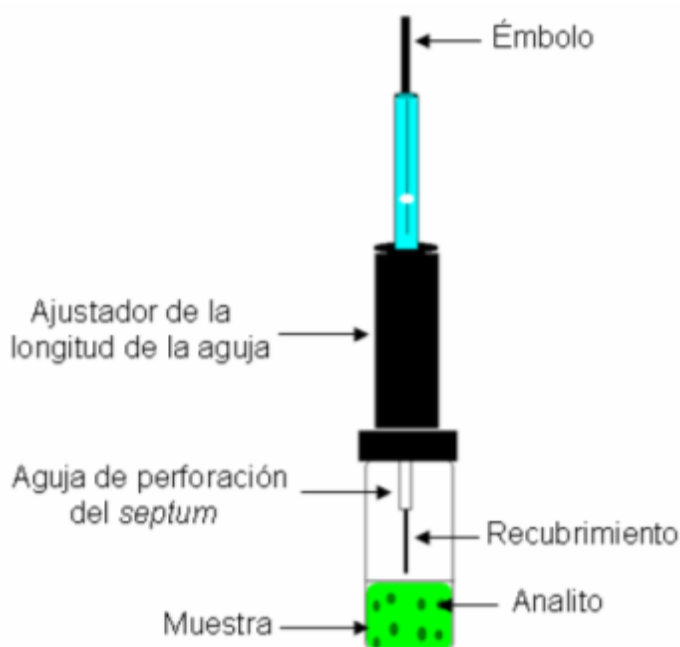


Figura 9. Dispositivo para SPME. Adaptado de (Reyes-Patiño and Patiño-Porras 2007)

El recubrimiento o fase extractiva, se encuentra como polímero líquido altamente viscoso y de elevado peso molecular, un sorbete sólido muy poroso con gran área superficial disponible para la adsorción, absorción, o una combinación de ambos; así el analito se remueve de la muestra por

absorción cuando se usa un polímero líquido o adsorción cuando se emplea un recubrimiento sólido.

En cualquiera de los casos, la extracción se da gracias a la afinidad existente entre el recubrimiento y los compuestos volátiles ya sea por el tamaño molecular o por polaridad. Comercialmente se encuentran disponibles algunos tipos de fibras con distintos recubrimientos para microextracción en fase sólida (SPME), como se muestra en la tabla 1. El tipo de fibra se elige dependiendo de las características del analito (Vas and Vékey 2004).

Tabla 1.

Recubrimientos de fibras comercialmente disponibles.

Material de recubrimiento	Abreviatura	d_F/μm^a	Uso recomendado
<i>Polímeros líquidos puros</i>			
Polidimetilsiloxano	PDMS	7, 30, 100	Analitos no polares
Poliacrilato	PA	85	Analitos polares (específicamente fenoles)
<i>Polímeros sólidos</i>			
Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno	PDMS/DVB	60/65 ^b	Analitos polares (específicamente aminas)
Carboxen/Polidimetilsiloxano	CAR/PDMS	75/85 ^b	Volátiles/analitos de baja peso molar
Carbowax/Divinilbenceno	CW/DVB	65/70 ^b	Analitos polares (específicamente alcoholes)
Carbowax/Resina templada	CW/TPR	50	Para aplicaciones de HPLC
Divinilbenceno/Carboxen/PDMS	DVB/CAR/PDMS	30	Ancho rango de analitos

Nota. Adaptado de (Vas and Vékey 2004)

La extracción por SPME puede realizarse en tres modos básicos: (1) extracción directa o por inmersión; (2) extracción indirecta o en fase vapor (*headspace*); y (3) protección con membrana. El modo directo requiere que la fibra sea sumergida en la muestra y puesta en contacto con los analitos. En el modo *headspace* la fibra no está en contacto directo con la muestra, entonces los analitos son extraídos de la fase gaseosa, así la fibra está protegida, y se disminuyen las interferencias. Por último, el modo protección con membrana, la fibra está en contacto con la muestra, pero está protegida por una membrana selectiva que impide el paso de compuestos de alto peso molecular que puedan deteriorar la fibra. En la figura 10 se ilustran los tres modos de extracción.

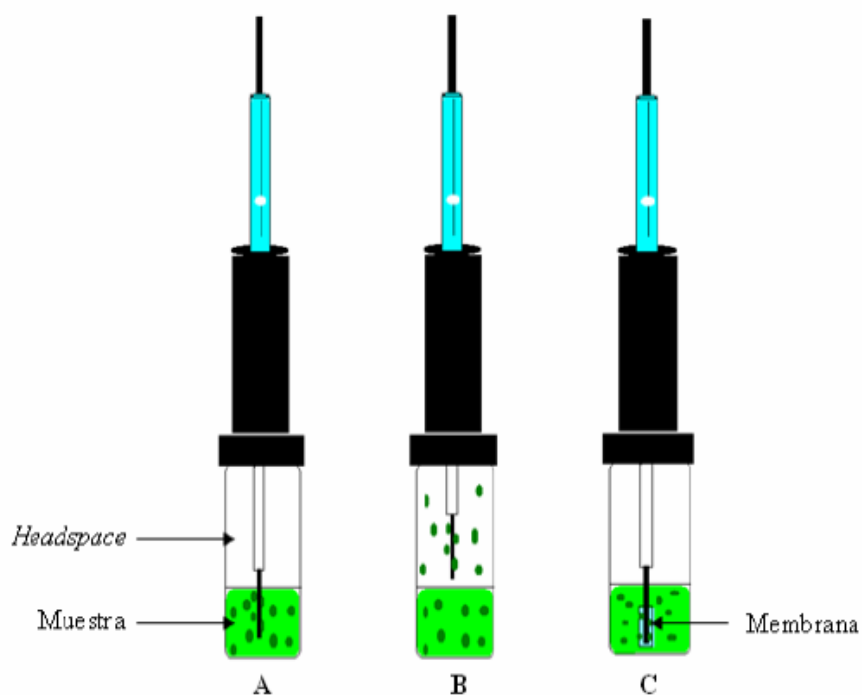


Figura 10. Modos de extracción por SPME. Adaptado de (Reyes-Patiño and Patiño-Porras 2007)

Después de la etapa de extracción donde los analitos se encuentran adheridos a la fibra, se procede a la desorción térmica en el puerto inyector de un cromatógrafo, donde existen las condiciones de temperaturas que facilitan la volatilización de los analitos.

Para llevar a cabo la extracción, inicialmente se debe determinar la temperatura y tiempo de exposición de la fibra. Para tal fin, usualmente se emplea una aproximación experimental en la que se usa una estrategia de superficie de respuesta en la que se busca maximizar el área de los compuestos de interés conforme el tiempo y temperatura de exposición cambian en un experimento controlado (Noguera 2014; Pini et al. 2004).

El método analítico utilizado para analizar un aroma aislado depende de la tarea a realizar. Si se desea determinar la cantidad de compuesto (s) aromático (s) en un alimento, la cromatografía de gases (GC) puede ser suficiente. Si se está buscando compuestos olorosos en un alimento (deseable o indeseable), entonces se usará GC / Olfactometría. Si se desea identificar los compuestos de aroma en un alimento, esto requeriría GC/MS o GC / Olfactometría / MS. Aunque también pueden aplicarse otros métodos instrumentales; por ejemplo, IR o RMN, la mayoría de los estudios de los compuestos de aroma se realiza mediante estos tres métodos (Analysis 2006).

1.9 Cromatografía de gases

Es la técnica cromatográfica más usada con fines analíticos, es probablemente la técnica de más amplia aplicación, puesto que como ninguna otra ofrece gran capacidad de separación y sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. En general la cromatografía de gases está limitada a la separación de compuestos con peso molecular menor de 400-450 Da, a una

temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 400 °C, y compuestos que no sean termolábiles.

La separación de la mezcla se lleva a cabo por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas-líquido), de adsorción (cromatografía gas-sólido) o, en muchos casos, por medio de una mezcla de ambos. Los componentes de la mezcla emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de algún sistema de detección adecuado, o bien serán dirigidos hacia un sistema de recolección de muestras (Reyes-Patiño and Patiño-Porras 2007; Universidad Central de Venezuela 2008).

Teniendo en cuenta la descripción de los métodos de extracción de los compuestos de aroma, en este trabajo se busca evaluar el efecto que tienen los cambios de temperatura y tiempo de las etapas de tostado y conchado los compuestos presentes en el aroma del cacao, una técnica con gran sensibilidad como la microextracción en fase sólida es una buena elección.

En efecto esta técnica tiene la capacidad de cuantificar compuestos a nivel de trazas, así mismo es sencilla, rápida, y con bajo costo de operación. Además, esta técnica no requiere el uso de solventes orgánicos, y puede considerarse que dirige el trabajo analítico hacia un ejercicio profesional de química sostenible pues cumple con varios principios de la química verde.

En la tabla 2 se encuentran los compuestos de aroma del cacao identificados mediante GC-MS y los atributos sensoriales con GC-Olfatometría por Counet 2002, Rodríguez- Campos 2012, y Noguera 2014, donde están relacionados cada compuesto con su respectivo atributo sensorial.

Tabla 2.

Compuestos volátiles encontrados en el aroma del cacao y chocolate mediante cromatografía de gases con sus respectivos atributos sensoriales y su concentración.

Compuestos	Atributo descrito	Concentración (ppb) ^a
Alcoholes		
3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol (linalol)	Floral, frutal	8516
2-Feniletanol	Floral	839
2-Heptanol	Cítrico	- ^b
Fenilmetanol	Floral	-
Aldehídos		
2-Metilpropanal (isobutanal)	Chocolate, malta	18787
3-Metilbutanal	Chocolate, malta	19371
Benzaldehído		2098
Nonanal		247
3-(Metiltio)propionaldehído	Papa	-
Fenilacetaldehido	Floral, miel	7228
2-Fenil-2-butenal	Cacao, verde, menta	-
Ésteres		
2-Feniletil acetato	Floral	198
Furanos		
3-Fenilfurano	Cacao, verde, menta	-
Furfuril alcohol		1247
Furancarboxaldehído (furfural)		1292
4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	Caramelo	172
Cetonas		
2,3-Butanodiona (diacetil)	Mantequilla	857
Pirazinas		
Metilpirazina	Avellana, verde	1932
2-Etil-3,5-dimetilpirazina	Tierra	893
2-Etil-3,6-dimetilpirazina	Tierra	893
3-Isobutil-2-metoxipirazina	Pimienta	-
Etilpirazina	Verde, éter, ron	16
2,3-Dimetilpirazina	Avellana, tostado	2023
Trimetilpirazina	Cacao, tostado, verde	1659
2-Etenil-6-metilpirazina	Avellana, tostado	311
3(o 2),5-Dimetil-2-(o 3)-etilpirazina	Tostado, ahumado, pralina, ron	893

Compuestos	Atributo descrito	Concentración (ppb) ^a
Tetrametilpirazina	Café de leche, moca, tostado, verde	6578
2-Isopropil-3-metoxipirazina	Guisantes, verde, avellana	-
2,3-Dietil-5-metilpirazina	Tierra	-
3,5(o 6)-Dietil-5-metilpirazina	Cacao, chocolate, ron, dulce, tostado	-
2,5(o 6)-Dimetil-3-(2-metilpropil)pirazina	Avellana	-
2,3,5-Trimetilpirazina	Tierra	-
2,5-Dimetil-3-(3-metilbutil)pirazina	Tostado, dulce, verde	-
Pirroles		
1-(1H-pirrol-2-il) etanona (acetilpirrol)	Cacao, chocolate, avellana, tostado	1153
3-Etil-2,5-dimetil-1H-pirrol	Cacao, avellana, café, tostado	-
1-(2-furanilmetil)-1H-pirrol (furfurilpirrol)	Tostado, chocolate, verde	39
Ácidos		
Ácido acético	Ácido	-
Ácido propanoico	Rancio	-
Ácido butanoico	Húmedo	-
Ácido 2 y 3-metilbutanoico	Rancio	-

Nota. Adaptado de: (Counet, Callemien and Ouwerx, Collin 2002; Noguera 2014; Rodriguez-Campos et al. 2012)

En los chocolates oscuros estudiados por Counet 2002, se identificaron 4 pirazinas: 2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina, tetrametilpirazina e 2-isopropil-3-metoxipirazina, destacando la tetrametilpirazina por ser la más abundante (concentraciones de 6 ppm) a la que se le asociaron atributos sensoriales con percepciones de chocolate con leche, moca, y rostizado. La 2,3-dimetilpirazina tenía concentraciones de 400 ppb está asociada con notas de avellana. Entre los alcoholes identificados el más abundante fue el 2-feniletanol, presentando concentraciones de 2 ppm y se asocia con percepciones a notas florales (Counet, Callemien and Ouwerx, Collin 2002).

Varios estudios han evaluado los compuestos de aroma presentes en muestras de cacao (licor de cacao y polvo de cacao) y chocolate, siguiendo una estrategia en la que se involucra HS-SPME y GC; en la tabla 3 se hace un resumen de las metodologías seguidas.

Tabla 3.

Metodologías encontradas en la literatura donde se evalúan compuestos volátiles del aroma del cacao.

Autor	Matriz	Análisis	Parámetros	Fibras	Identificación compuestos	Cuantificación
(Ducki et al. 2008)	Polvo de cacao	HS-SPME- GC-FID y GC-MS Columna capilar: VF-5ms	Inyección splitless.	PDMS PDMS-DVB CAR-PDMS DVB/CAR-PDMS	Índices de retención y comparación espectros de masa con las bases de datos.	Método estándar interno, Tolueno como patrón.
(Noguera 2014)	Licor de cacao	HS-SPME- GC-FID y GC-MS Columnas capilares: HP-5MS y DB-WAX	Inyección splitless.	DVB/CAR-PDMS	Índices de retención y comparación espectros de masa con las bases de datos.	Método del patrón interno, usando Tolueno como patrón.
(Rodríguez-Campos et al. 2012)	Licor de cacao	HS-SPME- GC-FID y GC-MS Columna capilar	Inyección splitless.	DVB/CAR-PDMS	Índices de retención y comparación espectros de masa con las bases de datos.	Método de adición estándar.
(Misnawi and Ariza 2011)	Licor de cacao	HS-SPME- GC-MS Columna DB-FFAP	Inyección splitless	PDMS-DVB	Índices de retención y comparación espectros de masa con las bases de datos.	-

Autor	Matriz	Análisis	Parámetros	Fibras	Identificación compuestos	Cuantificación
(Álvarez et al. 2016)	Licor de cacao	HS-SPME-GC-FID Columna DB-WAX	Inyección Split	DVB/CAR-PDMS	Índices de retención y comparación espectros de masa con las bases de datos.	-
(Pini et al. 2004)	Licor de cacao	HS-SPME-GC-FID	Inyección splitless	PDMS	Método estándar interno.	-

Como se puede observar en la tabla 3, las metodologías seguidas por cada una de las citas bibliográficas tienen procedimientos similares; entre los que se destacan:

- Recubrimiento DVB/CAR-PDMS dado que tiene propiedades anfífilas lo que hace que exista mayor eficiencia en la extracción de compuestos volátiles de diferentes polaridades (Ducki et al. 2008).
- En lo que respecta a la identificación de los compuestos, las estrategias seguidas incluyen el cálculo de los índices de retención y espectrometría de masas (Álvarez et al. 2016).
- En la mayoría de las referencias expuestas en la tabla 3, se hizo uso del modo de inyección splitless, sin embargo, el método split es el método de inyección usado en la referencia más actual encontrado (Álvarez et al. 2016).
- Para la cuantificación, la manera comúnmente empleada es usando el método del estándar interno. Generalmente, se usa el tolueno como patrón porque este compuesto no se encuentra en la matriz, al adicionarse a una muestra no presenta interferencias con los analitos y es suficientemente volátil (Fernandez Segovia and Martínez García 2005).

Con base en lo expuesto en las secciones anteriores y considerando la importancia de los compuestos volátiles sobre la calidad y las características de productos de chocolate terminados, este trabajo centrará su atención en evaluar del efecto que tienen las etapas de tostado y conchado sobre los compuestos de aroma, empleando la microextracción en fase sólida en el modo *headspace* acoplado a cromatografía de gases, para lo cual se siguió el procedimiento metodológico descrito en el siguiente capítulo.

2. Metodología

En las figuras 11 y 12 se muestra el diagrama de flujo asociado con el desarrollo experimental propuesto en este trabajo.

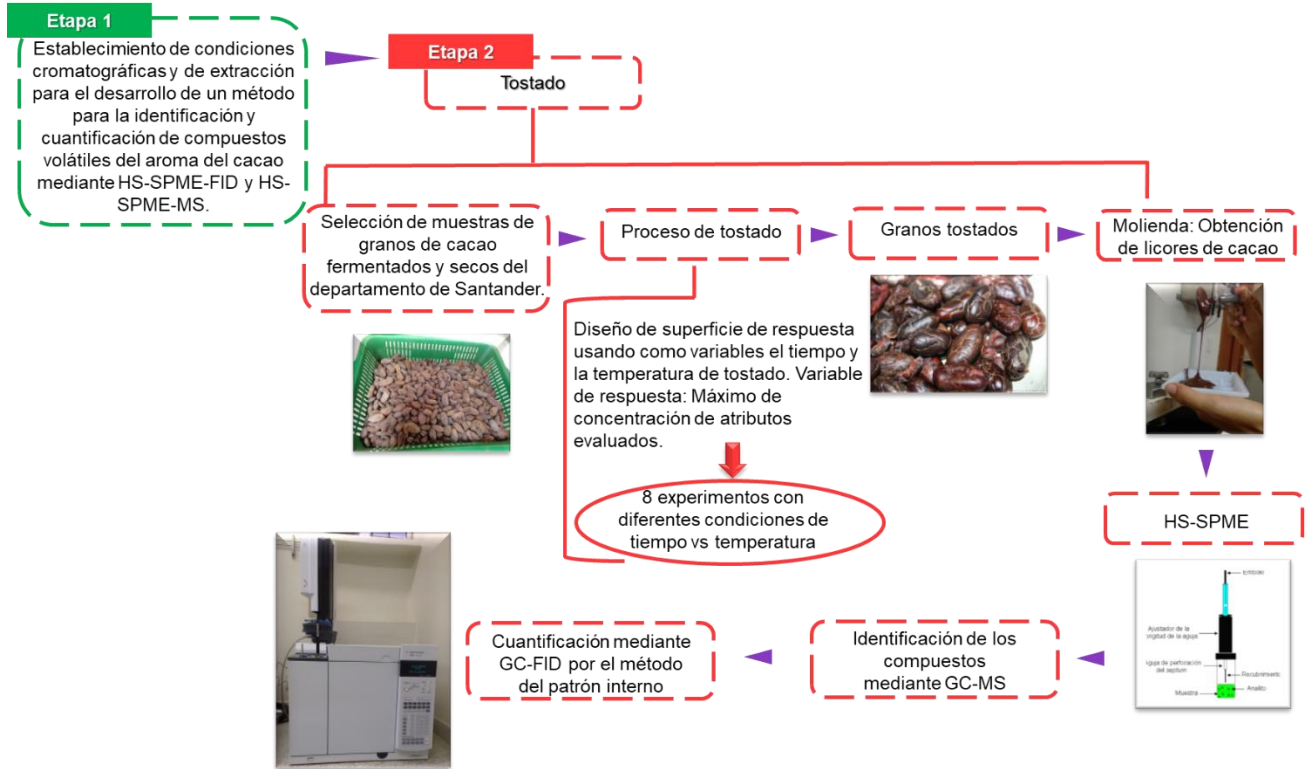


Figura 11. Primeras 2 etapas metodológicas del desarrollo experimental para el análisis de compuestos volátiles del aroma del cacao

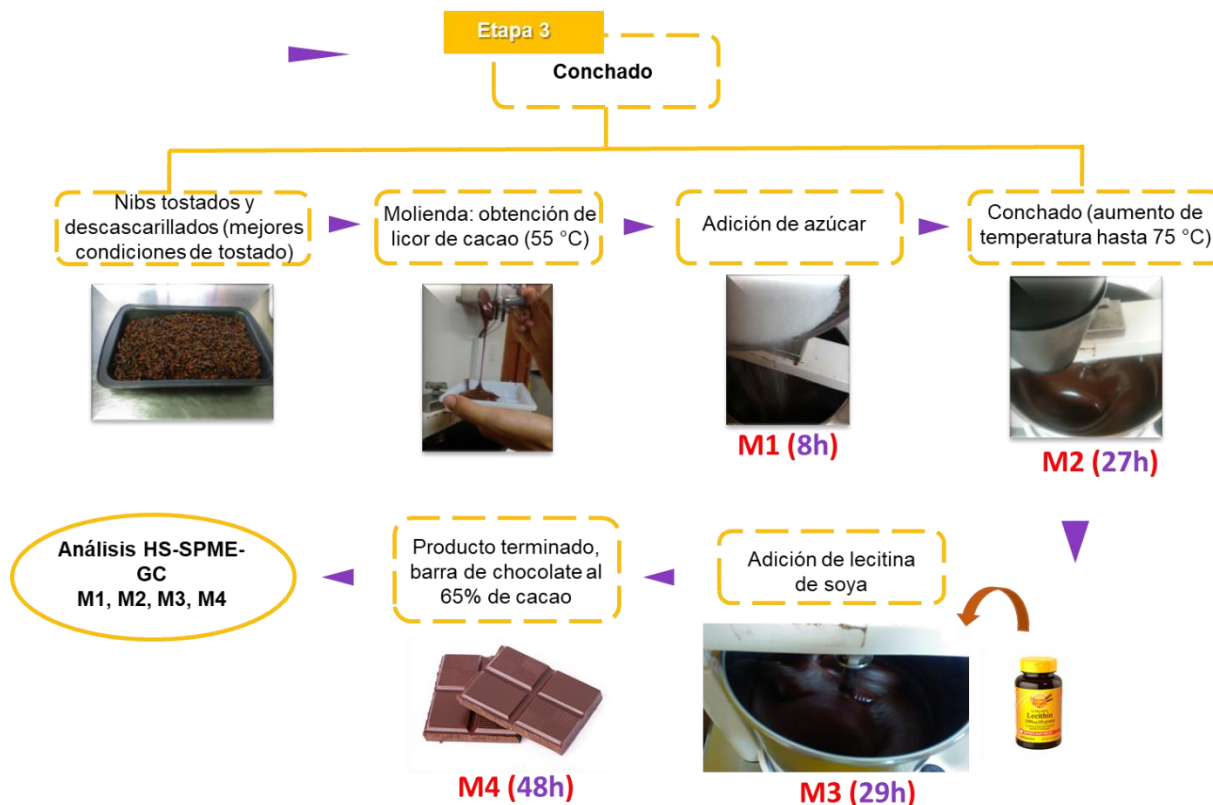


Figura 12. Tercera etapa metodológica para el análisis de compuestos volátiles del aroma del cacao

2.1 Materiales, reactivos y equipo

Para el desarrollo de este trabajo se necesitaron los siguientes materiales (véase tablas 4-6):

Tabla 4.

Sustancias químicas utilizadas

Reactivo	Marca	Pureza	Lote
2,5-dimetilpirazina	Aldrich	99%	07418MAV
2,5,3-trimetilpirazina	Aldrich	99%	MKBJ8537V
Tetrametilpirazina	Aldrich	97%	14003DEV
Acetilpirrol	Aldrich	99%	MKBM3391V
Linalol	Aldrich	97%	00630CH
Fenilacetaldehído	Sigma Aldrich	99%	MKBJ9219V
2,3-butanediol	Aldrich	98%	BCBG4025V

Reactivo	Marca	Pureza	Lote
Fenetilalcohol	SAFC	99%	MKBG5642V
Tolueno	Baker	99.7%	UN1294
Etanol	Panreac	99%	0000571841

Tabla 5.

Material de laboratorio

Material	Volumen	Marca	Especificaciones
Viales	10 mL	Supelco	Viales ámbar estándar para SPME; Catálogo N° 27006
Septa	---	Agilent Technologies	Septa de silicona blanca recubiertas con teflón blanco para viales de 15 mm x 45 mm; Agilent Technologies; Number: 5183-4477
Fibras para SPME	---	Supelco	Fibras de sílice fundida recubiertas con DVB/CAR/PDMS de 50/30 µm; Supelco; Catálogo N° 57328-U
Dispositivo para SPEM (Holder)	---	Supelco	Dispositivo para muestreo manual por SPME; Supelco, Catálogo N° 57330-U
Gases especiales para GC	---	LINDE S.A	Aire, H ₂ , pureza: 99%

Tabla 6.

Equipos de análisis instrumental y equipos menores

Material	Especificaciones
HRGC/FID	Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 A, equipado con un inyector split/splitless y con un detector de ionización en llama (FID).
HRGC/MSD	Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 5975, dotado con un inyector split/splitless y acoplado a un detector selectivo de masas HP5972.
Plancha de calentamiento y agitación	WiserStir
Balanza analítica	OHAUS, Pioneer, exactitud ± 0.01/0.1

2.2 Muestras de cacao y chocolate

Las muestras de cacao fueron suministradas por la empresa MACOEX LTDA, una empresa exportadora de granos de cacao que presta servicios de exportación y catación de cacao, y que actualmente está incursionando en el mercado su propia línea de barras de chocolate “*Carlota Chocolat*”. El material usado fue cacao trinitario originario del departamento de Santander.

2.3 Extracción de compuestos volátiles del aroma del cacao

2.3.1 Tipo de recubrimiento de la fibra La fibra usada para la extracción de los compuestos volátiles tiene un recubrimiento de DVB/CAR/-PDMS la cual es usado cotidianamente para el análisis de volátiles del cacao en trabajos análogos (Ducki et al. 2008).

2.3.2 Diseño experimental para la optimización de los parámetros de extracción de los compuestos volátiles usando microextracción en fase sólida en el modo HeadSpace La optimización de los parámetros operacionales para la extracción de volátiles a partir de cacao (licores de cacao y chocolates), se hizo mediante un diseño de superficie de respuesta: compuesto central 2^{2+} estrella con dos replicas, haciendo uso del software STATGRAPHICS XVI versión 16.1.11. Se eligieron dos factores de variación: el tiempo y la temperatura de extracción, tomando como variable de respuesta la suma total de las áreas de los compuestos extraídos.

En la tabla 7 se muestra el diseño experimental que se llevó a cabo para la optimización de las variables de extracción.

Tabla 7.

Diseño experimental para la optimización de las variables de extracción

Nº de experimento	Tiempo	Temperatura
1	60	5,68
2	60	37,5
3	60	37,5
4	60	69,3
5	70	60
6	70	15
7	74	37,5
8	50	15
9	50	60
10	45,8	37,5
11	60	37,5
12	60	37,5
13	60	37,5

2.4 Análisis instrumental

El desarrollo del método para la identificación y cuantificación de los compuestos de aroma en el cacao se llevó a cabo por cromatografía de gases (CG) con detectores de ionización en llama y selectivo de masas, cuyas especificaciones se reportaron en la tabla 7. El detector en llama (FID) se utilizó para la cuantificación de los compuestos de aroma.

2.4.1 Análisis por GC/FID Se usó una columna capilar apolar HP-5MS con fase estacionaria 5%-fenil-[poli(dimetilsiloxano)], 30 m x 0.25 mm (d.i) x 0.25 µm (f.e). Los parámetros operacionales para el análisis fueron: el inyector se mantuvo a una temperatura de 265 °C con una relación split 3:1, la presión del gas a la entrada de la columna fue de 1.7033 psi, con una velocidad de flujo de 3 mL/min, las velocidades de los gases de combustión fueron 300 mL/min y 30 mL/min, para el aire y el hidrógeno respectivamente. Las temperaturas del horno se programaron de la

siguiente manera: 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 (Noguera 2014).

2.4.2 Análisis por GC/MSD Se hizo uso de la misma columna y las rampas de calentamiento empleadas para el análisis por CG/FID. Se emplearon los siguientes parámetros operacionales: el inyector se operó a una temperatura de 265°C con una relación split 3:1, la presión del gas a la entrada de la columna fue de 1.7033 psi, con una velocidad de flujo de 3 mL/min, las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 185 y 285 °C respectivamente. La energía de bombardeo fue de 70 eV a una temperatura de 230 °C. El analizador másico cuadrupolar se operó en el modo *full scan* (barrido completo).

Para una identificación inequívoca se usó un sistema de datos Enhanced ChemStation G1701 DA (Versión D.00.01.27), equipado con bibliotecas de espectros de masas NBS75K y Wiley 138 de 75000 y 138000 espectros respectivamente.

2.5 Identificación

El reconocimiento de los compuestos volátiles se hizo con base en los índices de retención lineales determinados experimentalmente para la fase estacionaria apolar (HP-5MS), y su respectiva comparación con lo reportado en la literatura.

Los índices de retención fueron calculados a partir de los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C₅ hasta C₁₈, analizados mediante CG-MS con las mismas condiciones operacionales que para los volátiles del aroma del cacao, mediante la siguiente fórmula:

$$I_R = 100n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right]$$

Figura 13. Fórmula utilizada para calcular índices de retención

Donde:

- I_k: Índice de retención del compuesto de interés x.
- n: Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés x.
- N: Número de átomos de carbono de n-alcano que eluye después del compuesto de interés x.
- t_{Rx}: Tiempo de retención del compuesto de interés x.
- t_{RN} y t_{Rn}: Tiempos de retención de n-alcános que eluye antes y después del compuesto x.

También se compararon los espectros de masas de cada compuesto con los reportados en las bases de datos Willey, NIST y Adams.

2.6 Cuantificación

La concentración de cada compuesto identificado, se determinó cuantitativamente mediante el método de patrón interno usando tolueno como estándar (Ducki et al. 2008). Para tal determinación, 2 gramos de licor de cacao (o chocolate según sea el caso) fueron puestos en un vial ámbar para SPME de 4 mL, luego 20 µL de tolueno en solución fueron adicionados a la

muestra, quedando la concentración final del estándar en la muestra de 42 µg/L. La fórmula mostrada en la figura 14 se usó para calcular el valor de la concentración de cada compuesto:

$$C_x(\text{mg/L}) = \text{FR} \times \frac{A_x \times C_{IS}}{A_{IS}}$$

Figura 14. Fórmula utilizada para calcular la concentración de los compuestos volátiles

Donde:

- C_x : Concentración del compuesto de interés x.
- A_x : Área del compuesto de interés x.
- C_{IS} : Concentración del estándar interno (42 µg/L).
- A_{IS} : Área del estándar interno.
- FR: factor de respuesta.

El factor de respuesta (FR) es un valor constante de la relación entre la señal del compuesto de interés y la señal de un compuesto no perteneciente a la muestra (estándar interno tolueno) que es adicionado y sirve como punto de referencia. Debido a la gran cantidad de compuestos que hacen parte del aroma del cacao, se hizo la suposición de que las respuestas de los analitos de interés se aproximan a un compuesto representante de cada familia química. De esta manera se agruparon los compuestos volátiles en siete familias (pirazinas, alcoholes, ácidos, ésteres, pirroles, cetonas, y aldehídos), seleccionando un compuesto por cada una de ellas (tabla 8).

Tabla 8.

Compuestos seleccionados por familias para determinar el factor de respuesta con el fin de calcular la concentración de los compuestos volátiles del aroma del cacao.

Familias	Compuesto representante
Pirazinas	Trimetilpirazina
Alcoholes	Linalol
Ácidos	Ácido acético
Ésteres	Acetato de etilo
Cetonas	Acetofenona
Aldehídos	Fenilacetaldehído
Pirrol	Acetilpirrol

Para calcular los factores de respuesta se utilizó la ecuación mostrada en la figura 15.

$$FR = \frac{A_{IS} \times C_x}{A_x \times C_{IS}}$$

Figura 15. Fórmula utilizada para calcular los factores de respuesta

Donde FR= Factor de respuesta, A_{IS} = Área estándar interno, A_x = Área analito, C_x = Concentración estándar interno, C_{IS} = Concentración analito.

2.7 Verificación de las figuras de mérito

Con el fin de evaluar el método analítico, se determinaron las siguientes figuras de mérito para el estándar interno tolueno.

2.7.1 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) Se determinaron los LOD y LOQ para el estándar interno, preparando soluciones de tolueno en etanol, realizando diluciones hasta obtener la mínima señal detectable.

El límite de detección se determinará con un 95 % de confianza como la concentración en mg/L que proporciona una señal (LOD) en el detector significativamente diferente de la señal del 'blanco' o 'ruido de fondo', de acuerdo con la fórmula de la figura 16.

$$\text{LOD} = Y_B + 3S_B$$

Figura 16. Fórmula para la determinación del límite de detección

Donde Y_B = Concentración mínima detectable del analito, S_B = Desviación estándar de las mediciones realizadas para determinar Y_B , para un nivel de confianza del 95%.

El límite de cuantificación LOQ se define como:

$$\text{LOQ} = Y_B + 10S_B$$

Figura 17. Fórmula para la determinación del límite de cuantificación

2.7.2 Precisión intermedia Esta figura de mérito se evaluó en términos del coeficiente de variación. Para el coeficiente de variación se usó la fórmula de la figura 18.

El criterio de aceptación será $CV > 10\%$.

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Figura 18. Fórmula para la determinación del coeficiente de variación

Donde S representa la desviación estándar intermedia de los datos (3 repeticiones) y \bar{X} el promedio de estos.

2.7.3 Exactitud Para la evaluación de la exactitud del método se determinó el porcentaje de recuperación, donde la muestra de licor de cacao se enriqueció con uno de los analitos, para el caso de estudio se seleccionó la trimetilpirazina, empleando una concentración (100 mg/kg) que represente una respuesta de área integrable del analito. Se calculará de acuerdo con la fórmula 19.

$$\%R = \frac{C_{ME} - C_A}{C_E} \times 100$$

Figura 19. Fórmula para la determinación del porcentaje de recuperación.

Donde C_{ME} es la concentración del analito medido en la muestra enriquecida, y C_A es la concentración del analito en la muestra sin enriquecer, y C_E es la concentración adicionada a la muestra.

2.8 Tostado

El objetivo del estudio del proceso de tostado fue analizar el efecto de variar las condiciones de operación tiempo y temperatura, sobre los compuestos volátiles de aroma del cacao, además de encontrar las condiciones óptimas que dieran como resultado mayor concentración de compuestos volátiles asociados a notas sensoriales especiales (floral, frutal, nuez, y cacao). De esta manera se utilizó un diseño de superficie de respuesta: compuesto central 2^2+ estrella con dos replicas, haciendo uso del software STATGRAPHICS XVI versión 16.1.11. Donde se tomaron como variables el tiempo y la temperatura de operación. Se desarrollaron 4 diseños de superficie, uno para cada atributo especial. De este modo, se asumió como variable de respuesta la suma de las concentraciones de los compuestos asociados a cada atributo.

Tabla 9.

Diseño de superficie usado para analizar el tostado

Nº de experimento	Bloque	Tiempo	Temperatura
1	1	55	115
2	1	30	130
3	1	24	120
4	1	110	45
5	1	120	45
6	1	134	45
7	1	106	45
8	1	110	60
9	2	120	45
10	2	120	24
11	2	134	45
12	2	115	55
13	2	106	45
14	2	110	30
15	2	110	60
16	2	130	30

Para la realización de cada tostado (bajo diferentes condiciones), se tomó 1 kg de granos de cacao fermentados, secos y limpios, originarios del departamento de Santander, y se introdujeron en el tostador, el cual consiste en un tambor rotatorio muy similar al usado para tostar café, y que contiene adaptada una termocupla dentro del tambor que funciona como sensor de temperatura y que permite controlar la misma por medio de un pequeño tablero de control. En la figura 20 se muestra el tostador usado.



Figura 20. Tostador usado en el procesamiento del cacao en la empresa MACOEX

Para realizar el análisis de los compuestos volátiles, cada muestra de granos tostados se descascarilló y se molió para obtener licores de cacao y así poder llevar a cabo la extracción por SPME y posterior la cuantificación por GC.

2.9 Conchado

Para la realización del proceso de conchado en la empresa MACOEX, se hace uso de un refinador-conchador, de esta manera el proceso inicia desde la molienda y así a través del tiempo se agregan los ingredientes (azúcar y lecitina de soya), y se aplica calor con un sistema de calentamiento, para obtener el deseado chocolate. La formulación del chocolate que se preparó se muestra en la tabla 10. Para preparar chocolates de cacaos provenientes del departamento de Santander, en MACOEX no se agrega manteca de cacao adicional, puesto que el contenido graso inherente al grano es suficiente para la fluidez del chocolate a preparar.

Tabla 10.

Formulación del chocolate preparado

Ingrediente	Cantidad (%)
Cacao	65
Azúcar	34,7
Lecitina de soya	0,3

En la tabla 11 se encuentran los puntos de muestreo del proceso de conchado descritos en la figura 12. Cada punto de muestreo fue analizado mediante la técnica HS-SPME-GC para cuantificar los compuestos volátiles presentes durante el proceso de conchado.

Tabla 11.

Muestras hechas en el proceso de conchado

Código	Muestreo (h)	Cantidad (g)
M1	8 horas.	100
M2	27 horas.	100
M3	29 horas.	100
M4	48 horas.	100

3. Resultados y discusión de resultados

3.1 Verificación de figuras de mérito

El procedimiento que se siguió para la verificación de las figuras analíticas de mérito del método fue el especificado en el apartado 2.7 de la metodología.

3.1.1 Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

Tabla 12.

Datos para la determinación del LOD y el LOQ

Promedio de concentración mínima detectada de tolueno ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Desviación estándar	Límite de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
0,0186	0,002	0,024	0,037

Los criterios empleados para la determinación del LOD y LOQ son los descritos en el apartado 2.7.1. Se obtuvo un LOD de 0,024 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y un LQD de 0,037 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para todos los compuestos separados, identificados y cuantificados en muestras de cacao, en términos del estándar interno tolueno.

3.1.2 Evaluación de la exactitud del método Los resultados obtenidos en la evaluación de la exactitud del método, por medio del porcentaje de recuperación (%R) en una muestra de licor de cacao, se muestran en la tabla 13. En promedio se alcanza una recuperación del analito del 96%, con una desviación estándar de 0,357 y un coeficiente de variación de 0,369%.

Tabla 13.

Resultados del porcentaje de recuperación

Concentración del enriquecido	Concentración del analito en la muestra sin enriquecer mg/kg	Concentración del analito en la muestra enriquecida mg/kg	Porcentaje de recuperación (%R)	Promedio mg/kg	DS	CV %
100 mg/kg	43,278	139,587	96,309	96,720	0,357	0,369
	46,253	143,21	96,957			
	40,766	137,659	96,893			

La precisión del método se evaluó teniendo en cuenta el coeficiente de variación, encontrando valores por debajo del 10% como aceptables. En el Anexo F, se exponen los datos del CV% para las concentraciones de los compuestos analizados.

3.2 Resultados del diseño experimental donde se eligieron los parámetros de extracción de los compuestos volátiles del aroma del cacao

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de la aplicación del diseño experimental, el cual constó de 13 experimentos con su respectiva replica. La variable de respuesta está dada en área total de los compuestos extraídos.

Tabla 14.

Resultados del diseño experimental para las condiciones de extracción

Experimento	Tiempo [min]	Temperatura[°C]	Área extraída
1	5,7	60	2934,6
2	37,5	60	4525,8
3	37,5	60	4313,7
4	69,3	60	3408,1
5	60	70	2916,2
6	15	70	2364,6
7	37,5	74.1	2768,3
8	15	50	2114,5
9	60	50	2933,5
10	37,5	45.8	2439,3
11	37,5	60	2946,9
12	37,5	60	4825,2
13	37,5	60	5315,9

Según los resultados del diseño experimental, fueron determinados los valores de tiempo y temperatura en los cuales se maximizó la respuesta del modelo experimental. La gráfica de

superficie de respuesta del modelo se muestra en la figura 21 en donde se aprecia que las condiciones óptimas de tiempo y temperatura están alrededor de 40 minutos y 60 °C respectivamente. Ducki *et al.* 2008, efectuaron la extracción de compuestos volátiles del cacao usando SPME, empleando un recubrimiento de fibra DVB/CAR-PDMS, con tiempo de exposición de 15 minutos y temperatura de 60°C, por otra parte, Noguera 2014 realizó la extracción de volátiles en condiciones similares a las anteriores utilizando tiempo de exposición de 60 minutos y 60°C de temperatura.

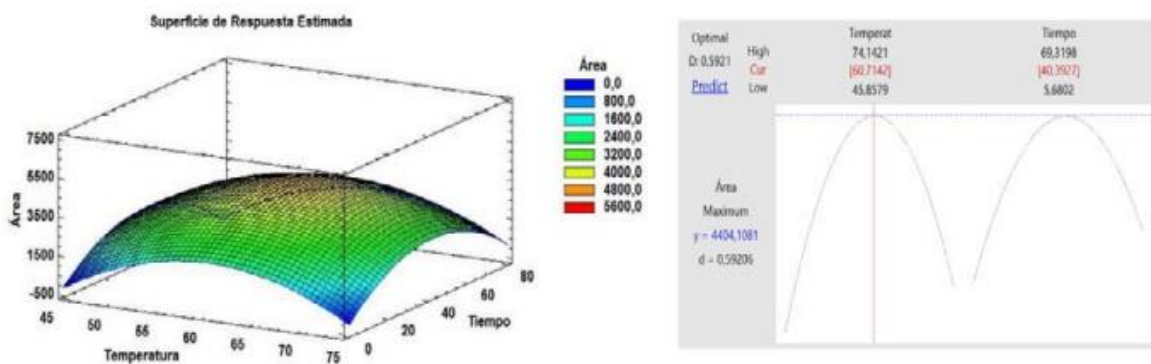


Figura 21. Superficie de respuesta y valores optimizados que maximizan el área de compuestos volátiles en licores de cacao conforme se modifican las condiciones de extracción.

En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos de la aplicación del diseño experimental.

Tabla 15.

Parámetros de extracción de compuestos volátiles del aroma del cacao optimizados según el diseño experimental

Parámetro	Valor
Volumen del vial	10 mL
Tamaño de la muestra	2 g
Fibra utilizada	DVB/CAR/PDMS
Tiempo de acondicionamiento	15 minutos

Parámetro	Valor
Tiempo de extracción	40 minutos
Temperatura de extracción y acondicionamiento	60°C

3.3 Análisis de resultados proceso de tostado

3.3.1 Identificación de los compuestos volátiles presentes en licores de cacao La figura 22 muestra un ejemplo del perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-MS siguiendo las condiciones especificadas en la tabla 7.

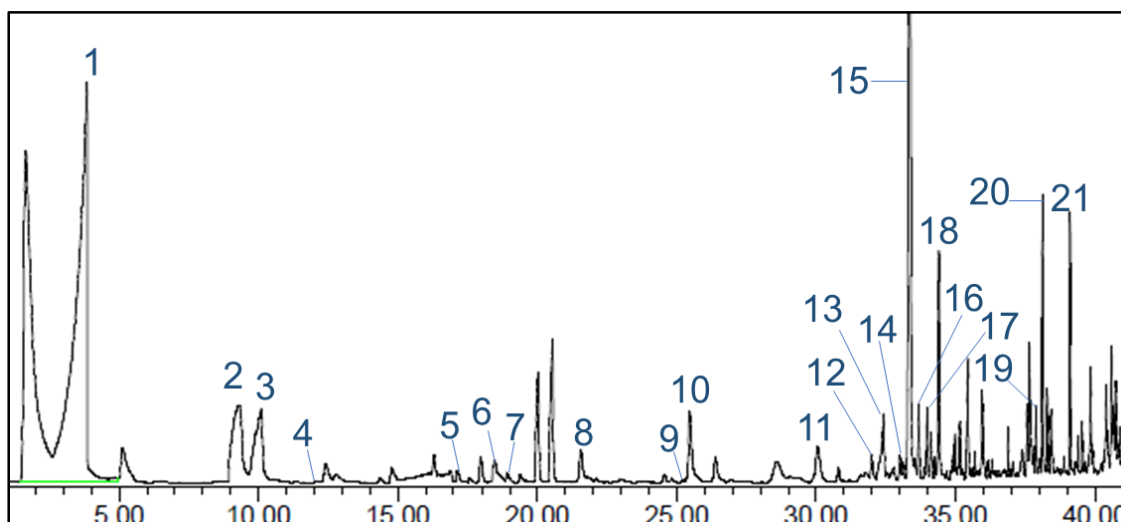


Figura 22. Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS

En la tabla 16 se muestra la composición química de compuestos volátiles asociados con el aroma de los licores de cacao de Santander. Según los datos presentados en dicha tabla, en el aroma del cacao analizado están presentes varios compuestos que fueron formados en la etapa de fermentación, como el ácido acético, y la tetrametilpirazina, que se intensifica su concentración en la reacción de Maillard en el proceso de tostado, así como otras pirazinas, alcoholes, y aldehídos también formados en el tostado.

Tabla 16.

Compuestos identificados en licores de cacao del departamento de Santander.

N° Pico	Compuesto	Atributo sensorial	IRL EXP. HP-5MS	IRL LIT. HP-5MS
1	Ácido acético	Acético	605,659	602 [1]
2	2-metilpropanoato	Frutal	785,337	758 [1]
3	2,3-butanodiol	Cacao	785,338	782[2]
4	2,3-butanodiol	Cacao	800,181	-
5	2-metilpirazina	Nuez	826,870	824[3]
6	1-metilbutil acetato	Floral	856,582	882[4]
7	2,5-dimetilpirazina	Quemado, nuez, cacao	909,721	912[5]
8	2,3-dimetilpirazina	Quemado, nuez	915,101	920[3]
9	Benzaldehído	Nuez	948,567	965[3]
10	2-etil-6-metilpirazina	Cacao, quemado	993,332	1001[3]
11	trimetilpirazina	Cacao, nuez, quemado	997,335	1005[3]
12	Fenilacetaldehído	Floral	1052,171	1047[3]
13	Acetofenona	Floral, frutal	1075,099	1071[3]
14	Acetilpirrol	Cacao, nuez, quemado	1079,682	1063[6]
15	2,5-dimetil-3-etilpirazina	Quemado	1087,309	1082[7]
16	Tetrametilpirazina	Quemado, nuez	1091,447	1090[7]
17	2-nonanona	Frutal	1095,369	1089[1]
18	Linalol	Floral, frutal	1098,845	1102[3]
19	2-feniletanol	Floral	1111,481	1117[3]
20	Etil fenil acetato	Floral, frutal	1222,803	1246[1]
21	Fenetil alcohol acetato	Floral, frutal	1229,207	1255[8]

Nota. Tomado de: [1](Pino et al. 2010); [2](Andion and Uchbauer 2005); [3](Spreng and Ericaceae 2010); [4](Sajjadi and Mehregan 2006); [5](Ho et al. 2007); [6](Compounds 2010); [7](Aida 2008); [8](Ra and Tabilio 2008).

En la figura 23 aparecen las estructuras químicas de los compuestos volátiles extraídos e identificados.

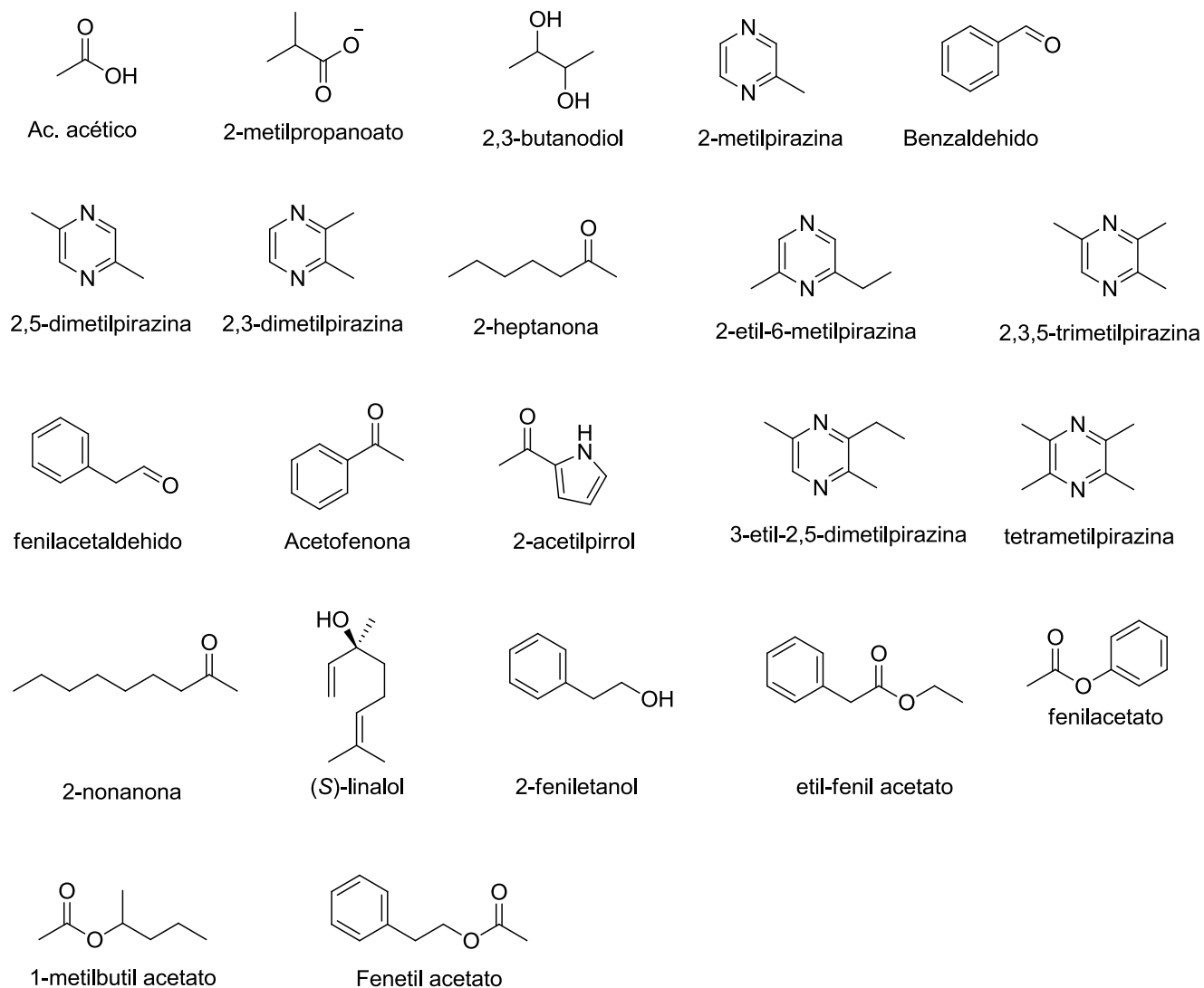


Figura 23. Estructuras químicas de los compuestos identificados mediante CG-MS en licores de cacao

Se identificaron 21 compuestos químicos asociados con el aroma del cacao de las muestras de Santander; cada uno de los compuestos mostrados fueron determinados y cuantificados para cada una de las condiciones de tostado descritas en la sección 2.8.

La identificación de los compuestos volátiles se realizó con base en los índices de retención lineales y los espectros de masas obtenidos experimentalmente, y la comparación de los mismos

con las bibliotecas del GC-MS, además estudiando los patrones de fragmentación de los compuestos. A continuación, se muestran un ejemplo de la fragmentación para el linalol.

El linalol es un terpeno con un grupo alcohol, el cual está presente naturalmente en las flores. En el cacao, es un componente clave en el aroma, confiriendo notas florales agradables.

En la figura 24 se presenta el espectro de masas obtenido experimentalmente para el linalol.

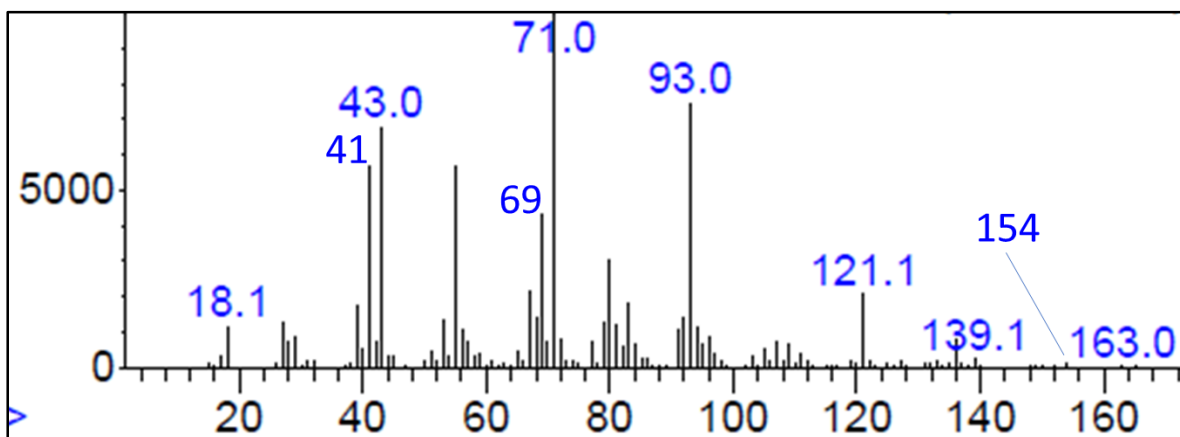


Figura 24. Espectro de masas para el linalol, obtenido mediante CG/MS

El linalol muestra un patrón de fragmentación propio de los terpenos. Las rutas de fragmentación se observan en la figura 25.

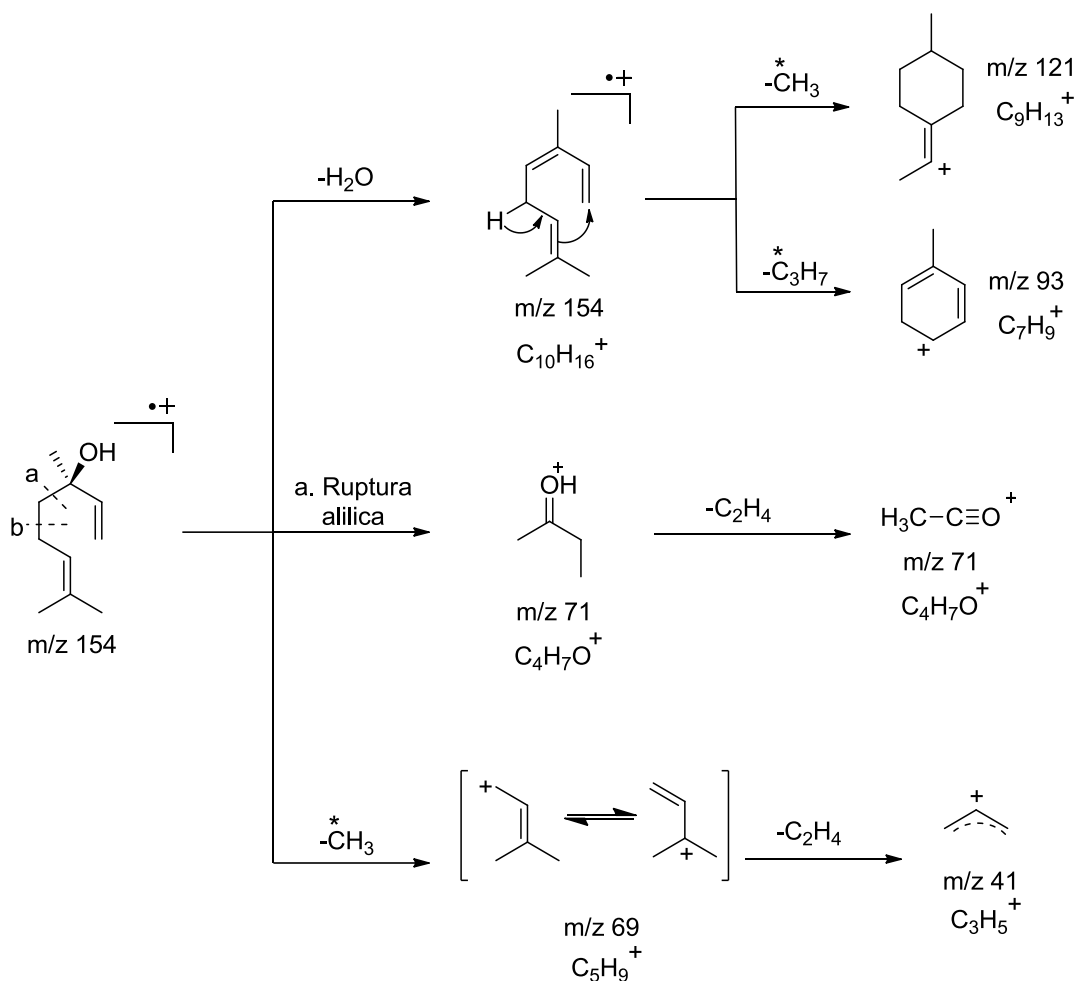


Figura 25. Ruta de fragmentación para el linalol

El ion molecular con m/z 154, no se alcanza a observar puesto que muestra una intensidad baja. Dos rupturas alílicas se dan sobre el ion molecular (ruptura A y B), que conllevan a la formación de los fragmentos $C_4H_7O^+$ con m/z 71, y $C_5H_9^+$ en m/z 69. Seguidamente, a partir del fragmento con m/z 71 (ruptura A) se da la eliminación de una molécula de etileno llevando a cabo la formación del ion CH_3CO^+ en m/z 43. Así mismo, el fragmento con m/z 69, también elimina (ruptura B) una molécula de etileno (C_2H_4) dando lugar a la formación del ion $C_3H_5^+$ con m/z 41. De esta manera los fragmentos formados en m/z 71, m/z 69, m/z 43, y m/z 41, son propios del linalol lo que hace que pueda diferenciarse fácilmente de otros terpenos validando la identidad del

compuesto. El espectro de masas obtenido experimentalmente para el linalol se comparó con las bases de datos de la NIST, NBS75K y Wiley 138 encontrando un 94 % de coincidencia.

3.3.2 Cuantificación de los compuestos volátiles del aroma de cacao tostados La cuantificación de los compuestos volátiles se realizó empleando el método descrito en el apartado 2.6. Inicialmente se determinaron los factores de respuesta de familia química, que se presentan en la tabla 17.

Tabla 17.

Factores de respuesta para la cuantificación

Familia de compuestos	Factores de respuesta ($\pm s$, n=3)
Ácidos	1,02 \pm 0,11
Pirazinas	0,88 \pm 0,04
Ésteres	6,32 \pm 0,35
Aldehídos	2,84 \pm 0,05
Cetonas	0,38 \pm 0,02
Pirroles	1,1 \pm 0,02
Alcoholes	2,16 \pm 0,22

La cuantificación se centró solo en los compuestos que tienen asociadas notas sensoriales relacionadas con los atributos especiales nuez, floral, frutal y cacao. Así mismo se cuantificaron compuestos asociados con el aroma a quemado y ácido acético.

En el Anexo A, se muestran las concentraciones expresadas en mg de compuesto por cada kg de licor de cacao de los 21 compuestos mostrados en la tabla 16, los cuales fueron agrupados de acuerdo con su percepción sensorial tal como se muestra en la tabla 18. Así por ejemplo las concentraciones de los compuestos: acetofenona, etil fenil acetato, 2-nonanona, linalol, 2-

metilpropanoato, y etil fenil acetato se sumaron y el respectivo valor se tabulo asociándolo al atributo frutal.

Tabla 18.

A) Total de las concentraciones para cada grupo de compuestos asociados a los atributos floral, frutal, nuez, y cacao, por cada condición de tostado evaluada. B) Abreviaturas de cada experimento con sus respectivas condiciones.

A)

Atributo sensorial	Concentración (mg/kg)							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Floral	52,836	55,576	54,735	51,656	61,67	95,1	53,46	65,51
Frutal	35,433	38,692	38,46	33,982	38,87	70,129	34,868	43,279
Nuez	40,271	38,821	40,061	32,546	54,181	120,408	35,476	50,43
Cacao	66,189	60,631	61,175	44,715	153,263	392,511	78,689	90,824

B)

Experimento	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Tostado 1 (T1)	55	115
Tostado 2 (T2)	30	110
Tostado 3 (T3)	60	110
Tostado 4 (T4)	45	106
Tostado 5 (T5)	45	120
Tostado 6 (T6)	45	134
Tostado 7 (T7)	24	120
Tostado 8 (T8)	30	130

3.3.3 Optimización de las condiciones del proceso de tostado Para llevar a cabo el proceso de optimización se elaboraron superficies de respuesta en las que se determinó el máximo de concentración, por grupo de compuestos, asociada con cada atributo. En el anexo B se pueden observar las tablas con los resultados de los diseños de superficie para cada atributo especial (floral, frutal, nuez, y cacao).

En la figura 26 se puede apreciar el comportamiento típico de las superficies de respuesta obtenidas para la percepción asociada con floral. En el anexo C se presentan las superficies de respuesta para los atributos floral, nuez y cacao. En todos los casos, se encontró que el máximo de concentración de cada grupo de compuestos asociados con las características sensoriales de floral, frutal, nuez y cacao se obtienen cuando el tostado se realiza a 134,14 °C y 60 minutos. Si bien a estas condiciones se obtiene la máxima concentración de compuestos volátiles asociados con percepciones sensoriales agradables, hay que verificar que a esas condiciones no se lleve a cabo un quemado o ahumado de la masa de chocolate. Además del máximo global (134,14 y 60°C), se aprecia un máximo local de 110°C y 40 min; este punto tiene unas condiciones de temperatura que puede minimizan los compuestos asociados a quemado en la masa de chocolate.

A las condiciones descritas en los párrafos anteriores, se obtienen dos máximos (uno global y otro local) de concentración de compuestos asociadas con una percepción sensorial agradable en particular; no obstante en la industria chocolatera, los atributos del aroma, son percibidos mediante un análisis sensorial.

Para la optimización, en el anexo B se pueden observar las tablas con los resultados de los diseños de superficie para cada atributo especial (floral, frutal, nuez, y cacao).

Se encontró que todos los atributos coincidieron en las mismas condiciones óptimas de tostado, las cuales fueron 134,14 °C /60 minutos para la temperatura y el tiempo respectivamente. Este hecho facilitó la elección de las condiciones para realizar el proceso de tostado que mayor concentración de compuestos mostraba. En la figura 23 se observa la superficie de respuesta para el atributo frutal con sus respectivas condiciones optimizadas. En el anexo C se presentan las superficies de respuesta para los atributos floral, nuez y cacao.

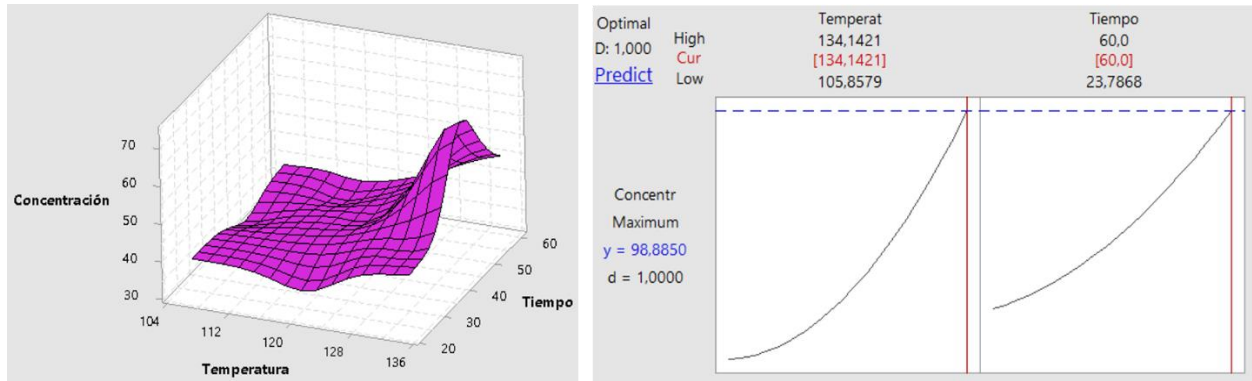


Figura 26. Superficie de respuesta para la optimización de las condiciones de tostado que maximizaban la concentración de compuestos asociados al atributo frutal

Los resultados del análisis sensorial, de los mismos puntos experimentales usados para construir las superficies de respuesta mostradas en los párrafos anteriores, son tabulados en la tabla 19. El análisis fue desarrollado por un catador experto y la intensidad de percepción de los atributos detectados fue valorada por medio de una escala de 0 a 10 puntos (véase tabla 19).

A partir de los resultados de análisis sensorial se evidencia que la mayor intensidad de los atributos floral, frutal, nuez y cacao, están presentes en los licores preparados a partir de cacaos tostados con las condiciones T4, T5 y T7.

0	AUSENTE	3-5	MEDIO	9-10	ALTO
1-2	BAJO	6-8	ALTO		

Tabla 19.

Resultados sensoriales a partir del análisis realizado para las 8 condiciones de tostado

Atributo sensorial	Intensidad de percepción (0-10)							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Floral	1	3	0	1	1	0	1	0
Frutal	3	3	2	3	4	1	4	2
Nuez	3	3	3	4	4	1	3	2
Cacao	3	3	3	4	4	2	4	2

Según el análisis sensorial (tabla 19), la condición de tostado de los atributos evaluados es muy variable, el atributo floral se percibió con una intensidad media en la condición T2, no obstante, en T1, T4, T5 y T7 es bastante bajo, y en T3, T8 y T6 está completamente ausente. Por otro lado, los atributos frutal, nuez y cacao presentan su mayor intensidad en la condición T5. Entonces, teniendo en cuenta sólo el análisis sensorial, la condición T5 (120°C/45min) es la que presenta mayor intensidad de percepción sensorial. El análisis sensorial más detallado para todas las condiciones de tostado se presenta en el anexo D.

Los resultados analíticos arrojados por el diseño experimental mostraron que la condición de tostado T6, presentó mayor concentración de compuestos volátiles para el aroma del cacao, sin embargo, el resultado sensorial evidencio que la condición T6 percibía una baja intensidad de atributos floral, frutal, nuez y cacao, y que por otro lado la condición T5 mostro más intensidad sensorial. Esto indica que la hipótesis anteriormente definida que indica que entre mayor sea la concentración de compuestos, mayor será su percepción sensorial, no se cumple; por ello se hizo una comparación entre la condición T5 y T6 como se observa en a figura 27.

T5	
Atributo sensorial	Intensidad de percepción
Floral	1
Frutal	4
Nuez	4
Cacao	4
Quemado	0
Acidéz	3

Observaciones: Se destaca el sabor a cacao de larga duración en boca, pizca de ácido cítrico, y astringencia aceptable. Acento en floral, persistencia en frutos rojos y nuez.

T6	
Atributo sensorial	Intensidad de percepción
Floral	0
Frutal	1
Nuez	1
Cacao	2
Quemado	4
Acidéz	2

Observaciones: Se destaca el sabor quemado de larga duración en boca, opacando los sabores básicos y específicos de la muestra.

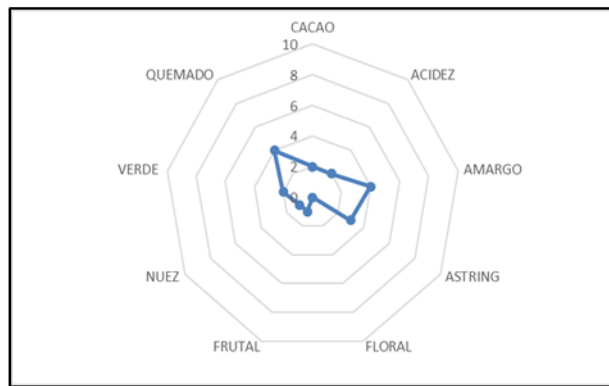
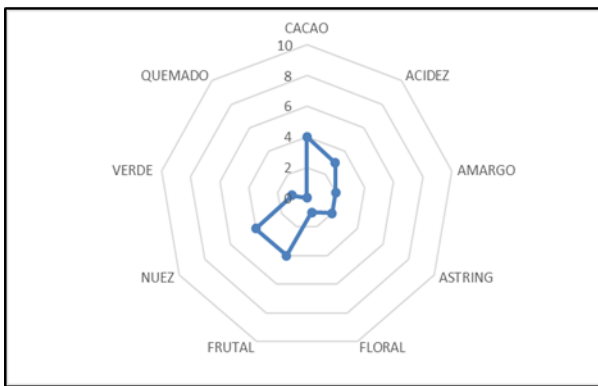


Figura 27. Resultados del análisis sensorial para las condiciones de tostado T5 y T6

En la figura 27 se observa el análisis sensorial de las condiciones T5 y T6. Un análisis sensorial es una evaluación donde se miden las propiedades organolépticas de un producto que aporta información útil para dar un juicio acerca de la calidad de dicho producto. La presencia de ácido acético es un descriptor de un mal proceso de fermentación y por ende de tostado puesto que es allí donde se elimina por el aumento de la temperatura. Así mismo, si la temperatura se excede y el tiempo de aplicación de la misma se alarga, la percepción a quemado también juega un rol negativo en la calidad del producto.

Las condiciones T5 y T6 fueron evaluadas para los atributos especiales y para los defectos desagradables. Es importante resaltar que en la condición T6 se incrementó la concentración de

los compuestos volátiles agradables, sin embargo, también se aumentó la concentración de otros compuestos que se asocian con notas desagradables como el quemado (véase figura 28).

Algunos compuestos como las pirazinas: 2,5-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina, y tetrametilpirazina, están relacionadas generalmente con el aroma a nuez, frutos secos, pero también se relacionan con el desagradable aroma a quemado, esto podría suponer que hay un valor de concentración probablemente definido por un umbral de percepción donde las notas pasan de ser agradables para ser convertidas en desagradables.

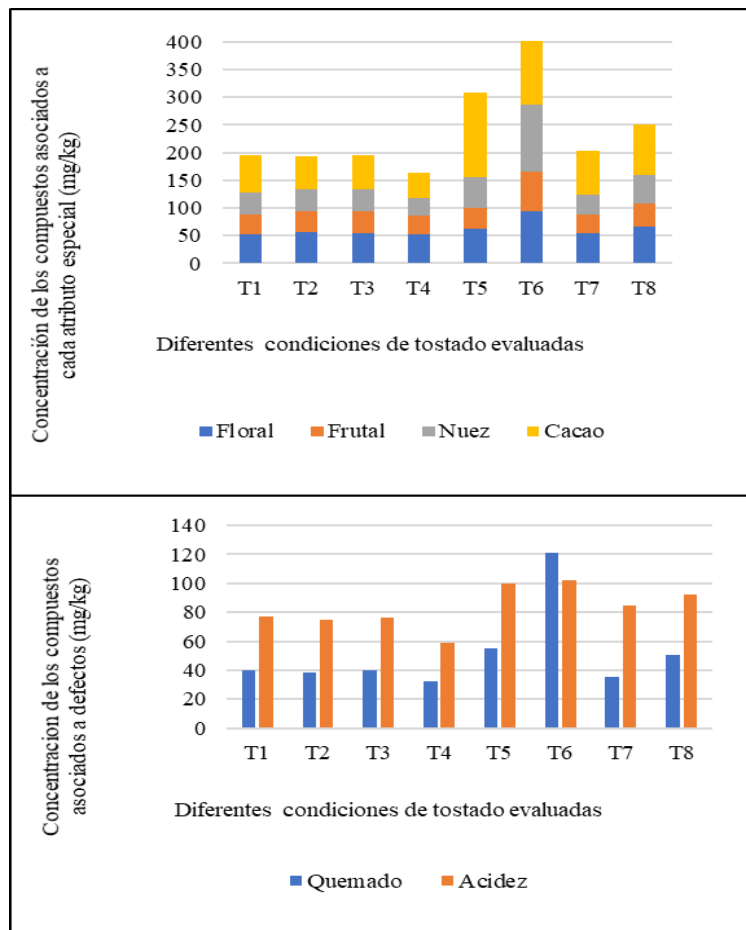


Figura 28. Resultados del análisis sensorial para las condiciones de tostado T5 y T6

La condición T6 en cuanto a la maximización de las concentraciones suele ser óptima, pero sensorialmente suele ser la que menor intensidad se percibe. En la superficie de respuesta que se ilustra en la figura 26, exhibe un máximo global que corresponde a la condición T6, sin embargo, existe otro máximo ($\approx 110^{\circ}\text{C} / 40 \text{ min}$) comprendido entre las condiciones T4 y T5. La condición T5 ($120^{\circ}\text{C}/45 \text{ min}$) relaciona las mayores intensidades de percepción por las altas concentraciones de atributos especiales y sensorialmente no se percibe el quemado. Para evitar la formación de compuestos asociados con notas a quemado y ahumado, se recomienda emplear el máximo local y no el máximo global de las superficies de respuesta.

3.4 Conchado

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas ($120^{\circ}\text{C}/45 \text{ min}$) a la cuales se operó el proceso de tostado de las muestras de licor de cacao, se procedió a realizar un seguimiento cuantitativo de los mismos compuestos ya identificados en los licores con respecto a su atributo sensorial asociado, a través del proceso de refinado-conchado en 4 diferentes puntos de muestreo como se especificó en la tabla 11.

En el anexo E se presenta la concentración de todos los compuestos expresada en mg de compuesto por kg de muestra y su respectivo atributo sensorial para los 4 puntos de muestreo. Los compuestos también fueron agrupados por atributo y se determinó la concentración total para cada uno de ellos (véase tabla 20).

Tabla 20.

Concentración de los compuestos asociados a cada atributo sensorial (floral, frutal, nuez y cacao) para los 4 punto de muestreo en el proceso de conchado

Atributo sensorial	Concentración (mg/kg)			
	M1	M2	M3	M4
Floral	28,491	14,500	13,343	14,527
Frutal	18,544	12,091	11,317	12,701
Nuez	33,144	10,533	10,393	9,529
Cacao	44,293	11,092	12,170	12,330
Quemado	32,859	10,383	10,259	9,361

El proceso de conchado se realizó durante 48 horas, a través de las cuales se hicieron muestreos en diferentes etapas del proceso donde se aplica aditivos y era necesario suministrar temperatura entre (55 °C a 75 °C). Según los resultados mostrados en la tabla 20 y la figura 29, en el punto de muestreo M1, la concentración de los compuestos asociados a las notas floral, frutal, nuez y cacao es mayor comparada con la concentración de los muestreos M2, M3 y M4. Así mismo, se observa una tendencia constante entre las concentraciones de los grupos de compuestos asociados para cada percepción sensorial de las muestras M2, M3 y M4. Lo anterior muestra que, en el conchado gracias a la fricción generada, y por las variaciones de temperatura, logró homogenizar el aroma en toda la mezcla, pero por otro lado se eliminó una significativa cantidad de cada compuesto.

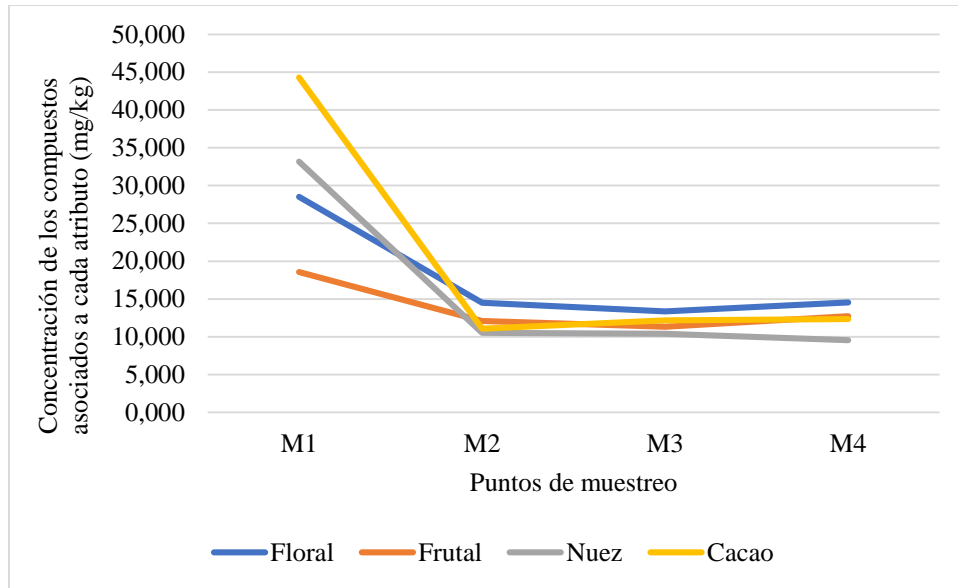


Figura 29. Variación de las concentraciones de los compuestos asociados a los atributos floral, frutal, nuez y cacao a lo largo de la duración del proceso de conchado.

Por otra parte, se hizo una comparación de la concentración de los compuestos de aroma analizados en el proceso de tostado T5 (óptimo) y el punto de muestreo M4 (producto terminado) con el fin de observar el efecto del conchado sobre los compuestos de aroma. En la figura 30 se ilustran los cromatogramas obtenidos experimentalmente para el conchado y el tostado.

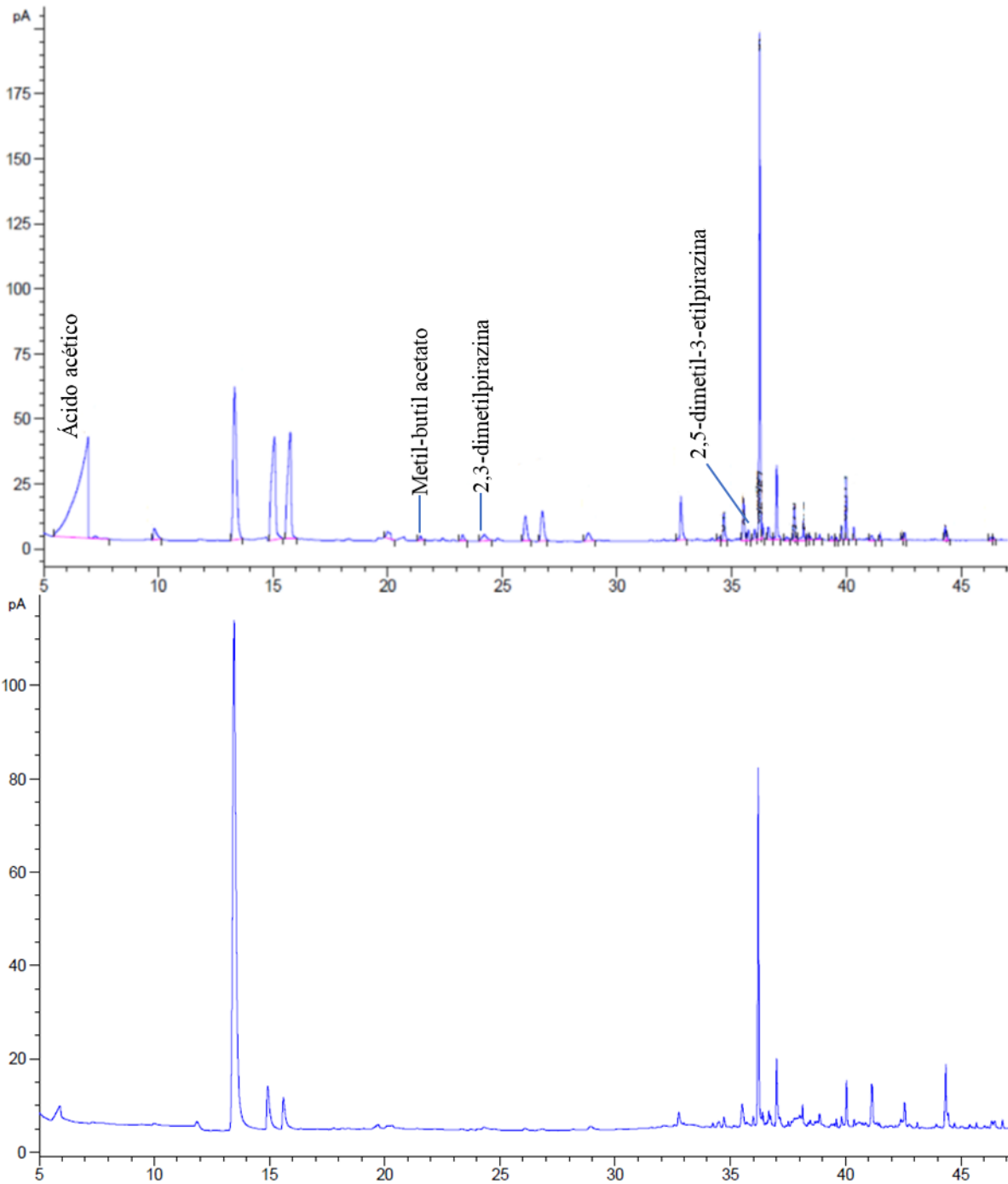


Figura 30. Cromatogramas de un licor de cacao tostado (arriba) y chocolate después del conchado (abajo)

Al revisar los cromatogramas se observa que algunos compuestos específicos que estaban presentes en el cacao tostado, ya no lo estaban en el producto terminado después de finalizado el

proceso de conchado. La 2,3-dimetilpirazina, metilbutil acetato ,2,5-dimetil-3-etilpirazina, están ausentes después de la etapa del conchado. De esta manera el proceso de conchado tiene un efecto positivo sobre el aroma del cacao, puesto que contribuye eliminando el defecto indeseable (quemado) 2,5-dimetil-3-etilpirazina y disminuye la concentración de ácido acético, percibidos en cacaos tostados, no obstante, también elimina atributos deseables metilbutil acetato (floral) y 2,3-dimetilpirazina (nuez) que fueron formados en etapas previas.

En la figura 31 se observa la disminución dramática que tiene la concentración de los compuestos asociados con atributos floral, frutal, nuez (véase figura 32), cuando se pasa del proceso de tostado al de conchado. Esta disminución fue del 76,4 % para floral, 67,32% para frutal, 82,4% para nuez, y un 92% para cacao.

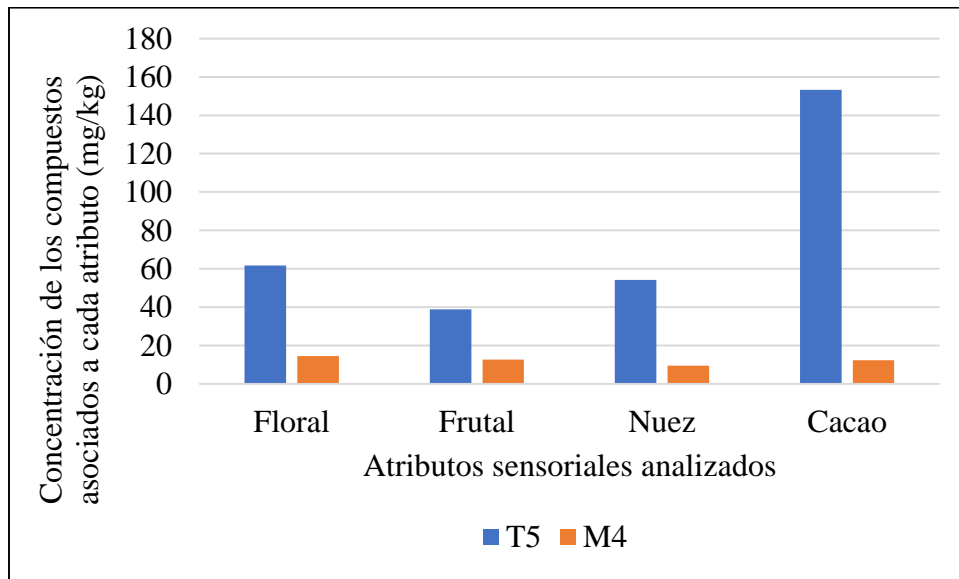


Figura 31. Comparación cuantitativa de las variaciones encontradas entre los compuestos asociados a los atributos analizados para el tostado y el conchado

Dada la reducción de las concentraciones de todos los compuestos asociados con percepciones sensoriales se deberá hacer un análisis sensorial en el que permita correlacionar las observaciones hechas desde el punto de vista analítico.

4. Conclusiones

- Se verifico que el método empleado con la técnica HS-SPME-GC-FID arrojó valores de figuras de mérito satisfactorias puesto que los CV% fueron menores al 10%. Con unos LOD de 0,024 mg/kg y un LOQ de 0,037 mg/kg, además se obtuvo una exactitud expresada como porcentaje de recuperación del 96%.
- El hecho de que se incrementen los valores de temperatura y tiempo al que se opera el proceso de tostado y por ende aumente la concentración de los compuestos volátiles del aroma del cacao, no significa que haya un aumento de intensidad de percepción sensorial, puesto que existen límites donde los defectos indeseables como el quemado y la acidez volátil suelen opacar la percepción de los atributos específicos agradables floral, frutal, nuez y cacao.
- El proceso de conchado disminuyó la concentración de los compuestos volátiles del aroma del cacao asociados a atributos agradables, no obstante, también redujo la concentración de algunos compuestos asociados a los defectos indeseables del aroma del cacao entre los que se destacan el ácido acético.

- Con la optimización de las condiciones (tiempo y temperatura) de tostado del cacao proveniente del departamento de Santander usada por la empresa MACOEX, se logró incrementar la concentración de los compuestos asociados para el atributo floral, frutal, nuez y cacao, destacándose el atributo floral no percibido anteriormente.
- Se realizó una primera aproximación para correlacionar la percepción sensorial vs resultados analíticos por la técnica HS-SPME-GC del aroma del cacao de las muestras elaboradas por la empresa MACOEX.

5. Recomendaciones

- Se recomienda continuar con este estudio, donde se pueda relacionar cuantitativamente el aporte de cada compuesto asociado a los atributos sensoriales.
- En el proceso de elaboración del chocolate hay otras variables influyentes en el desarrollo de los compuestos de aroma o que afectan el proceso de tostado y conchado tales como la humedad y la grasa del grano, la cantidad de muestra que se usa, y la calidad de los aditivos, es por esto que se aconseja estudiar a futuro cómo influyen estas otras variables de manera cualitativa y cuantitativa sobre los compuestos de aroma del cacao.

Referencias Bibliográficas

- Acierno, Valentina, Sine Yener, Martin Alewijn, Franco Biasioli, and Saskia Van Ruth. 2016. "Factors Contributing to the Variation in the Volatile Composition of Chocolate: Botanical and Geographical Origins of the Cocoa Beans, and Brand-Related Formulation and Processing." *Food Research International* 84:86–95. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.022>).
- Aculey, Patrick C. et al. 2010. "Ghanaian Cocoa Bean Fermentation Characterized by Spectroscopic and Chromatographic Methods and Chemometrics." *Journal of Food Science* 75(6):300–307.
- Aida, Wan. 2008. "Relating Descriptive Sensory Analysis to Gas Chromatography / Mass Spectrometry of Palm Sugars Using Partial Least Squares Regression." 15(1):35–45.
- Aldave. 2016. "Efecto de La Temperatura Y Tiempo de Tostado En Los Caracteres Sensoriales Y En Las Propiedades Químicas de Granos de Cacao (Theobroma Cacao L .) Procedente de Uchiza , San Martín – Perú Para La Obtención de NIBS."
- Alvarado, M., E. Portillo, R. Boulanger, P. Bastide, and I. Macia. 2014. "Compuestos Precursores Del Aroma En El Cacao (Theobroma Cacao L.) de Chabasqu??n Estado Portuguesa." *Revista de La Facultad de Agronomía* 31:812–23.
- Álvarez, Climaco et al. 2016. "Identification of the Volatile Compounds in the Roasting Venezuela Criollo Cocoa Beans by Gas Chromatography- Spectrometry Mass." *Journal of Nutritional Health and Food Engineering* 5(4).
- Analysis, Flavor. 2006. "Flavor Analysis 3.1." 33–72.
- Andion, F.Ranz B. and G.Erhard B. Uchbauer. 2005. "Analysis of Volatile Compounds and Triglycerides of Seed Oils Extracted from Different Poppy Varieties (Papaver Somniferum L .)." 8310–16.

- Bascón, Carmen. 2016. “Facultad de Farmacia TRABAJO FIN DE GRADO EN GRADO EN FARMACIA DE CARÁCTER BIBLIOGRÁFICO Título Del Trabajo : La Cromatografía de Gases-Olfatometría Como Herramienta En La Evaluación Del Aroma de Los Alimentos Autor : María Del Carmen Bascón Suárez Grado En Farmacia Tutor : María Teresa Morales Millán Departamento Química Analítica Fecha : Sevilla , Diciembre 2016.” 1–40.
- Beckett, Stephen T. 2009. *Industrial Chocolate*.
- Cadena, T. and Y. Herrera. 2008. “Evaluación Del Efecto Del Procesamiento Del Cacao Sobre El Contenido De Polifenoles Y Su Actividad Antioxidante.”
- Compounds, Volatile Organic. 2010. “Composition of Sulla (.” 6375–85.
- Counet, Callemien, C. and D. Ouwerx, Collin. 2002. “Use of Gas Chromatography – Olfactometry To Identify Key Odorant Compounds in Dark Chocolate . Comparison of Samples before and after Conching.”
- Crafack, Michael et al. 2014. “Impact of Starter Cultures and Fermentation Techniques on the Volatile Aroma and Sensory Profile of Chocolate.” *Food Research International* 63:306–16.
- Diab, Jana, Romy Hertz-Schünemann, Thorsten Streibel, and Ralf Zimmermann. 2014. “Online Measurement of Volatile Organic Compounds Released during Roasting of Cocoa Beans.” *Food Research International* 63:344–52. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.047>).
- Ducki, Sylvie, Javier Miralles-Garcia, Albert Zumbé, Antonio Tornero, and David M. Storey. 2008. “Evaluation of Solid-Phase Micro-Extraction Coupled to Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Headspace Analysis of Volatile Compounds in Cocoa Products.” *Talanta* 74(5):1166–74.
- Fedecacao. 2005. *Caracterización Físicoquímica Y Beneficio Del Grano de Cacao (Theobroma Cacao L.) En Colombia*. Retrieved (http://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_09B.pdf).
- Fernandez Segovia, I. and E. Martínez García. 2005. “Cuantificación de Compuestos Por Cromatografía.” 1–8.

- Fonseca-García, Libia. 2005. “Desarrollo de Un Método HS-SPME Y GC-MS Para La Determinación de Safrol En Bebidas Tipo.”
- Gonz, Yuniesky. 2012. “Factores Que Inciden En La Calidad Sensorial Del Chocolate.” (November).
- Guide, Using This. n.d. *Bulletin 925F*.
- Ho, C. W., W. M.Wan Aida, M. Y. Maskat, and H. Osman. 2007. “Food Chemistry Changes in Volatile Compounds of Palm Sap (Arenga Pinnata) during the Heating Process for Production of Palm Sugar.” 102:1156–62.
- Investigación, Instituto De and De Alimentación. 2011. “ANÁLISIS SENSORIAL DE ALIMENTOS OCTUBRE 2011.”
- Lecumberri, E. et al. 2006. “Caracterización de La Fibra de Cacao Y Su Efecto Sobre La Capacidad Antioxidante En Suero de Animales de Experimentación EFFECT ON THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF.” 21(5):622–28.
- Misnawi and B. T. S. Ariza. 2011. “Use of Gas Chromatography-Olfactometry in Combination with Solid Phase Micro Extraction for Cocoa Liquor Aroma Analysis.” *International Food Research Journal* 18(2):829–35.
- Noguera, Laura. 2014. “Caracterización de Materiales Regionales Promisorios de Cacao Colombiano: Física, Química; Funcional Y Organoléptica.”
- Pera, Janeth Aide, Olga Lucia Ramirez, and Arley Rene Villamizar. 2011. “Caracterización Fisicoquímica de Materiales Regionales de Cacao Colombiano.” *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial* 9(1):35–42.
- Perea-Villamil, Janeth, Tatiana Cadena-Cala, and Jenny Herrera-Ardila. 2009. “El Cacao Y Sus Productos Como Fuente de Antioxidantes: Efecto Del Procesamiento.” *Salud UIS* 41:128–34.
- Perea-Villamil, Janeth, Nubia Martínez-Guerrero, Fabio Aranzazu-Hernández, and Tatiana Cadena-Cala. 2017. *Características de Calidad Del Cacao de Colombia. Catálogo de 26*

Cultivares. Segunda ed. edited by D. de publicaciones UIS. Bucaramanga, Colombia.

- Pini, Gláucia F., Edy S. De Brito, Nelson H. P. García, Antonio L. P. Valente, and Fabio Augusto. 2004. "A Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) Method for the Chromatographic Determination of Alkylpyrazines in Cocoa Samples." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15(2):267–71.
- Pino, Jorge Antonio, Eliosbel Márquez, Clara Elizabeth Quijano, and Déborah Castro. 2010. "Volatile Compounds in Noni (*Morinda Citrifolia* L .) at Two Ripening Stages." 30(1):183–87.
- Portillo, E., L. Graziani De Fariñas, and E. Cros. 2006. "Efecto de Algunos Factores Post-Cosecha Sobre La Calidad Sensorial Del Cacao Criollo Porcelana (*Theobroma Cacao* L.)." *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 23:49–57.
- Ra, A. V and N.Nardo M. R. Tabilio. 2008. "Effects of Cold Storage on Aroma Compounds of White- and Yellow- X Eshed Peaches." 1503–12.
- Ramli, Nazaruddin, Osman Hassan, Mamot Said, Wahid Samsudin, and N. O. R.Aini Idris. 2005. "INFLUENCE OF ROASTING CONDITIONS ON VOLATILE FLAVOR OF ROASTED MALAYSIAN COCOA BEANS." 30(2006):280–98.
- Reyes-Patiño, Johan Augusto and José Gregorio Patiño-Porras. 2007. "Comparación de Los Metabolitos Secundarios Volátiles de Dos Especies de."
- Rodriguez-Campos, J. et al. 2012. "Effect of Fermentation Time and Drying Temperature on Volatile Compounds in Cocoa." *Food Chemistry* 132(1):277–88. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.078>).
- Rodriguez Hernando. 2005. "Determinación de Aldehídos Volátiles En Aceites Comestibles, Por Microextracción En Fase Sólida En El Modo." 110.
- Sajjadi, S.Ebrahim and I. Mehregan. 2006. "VOLATILE CONSTITUENTS OF FLOWERS AND LEAVES OF *Anthemis Hyalina*." 42(5):428–29.
- Schumacher, Andrea Bordin, Adriano Brandelli, Erwino Wulf Schumacher, Fernanda Carrion

- Macedo, and Luiza Pieta. 2009. "Original Article Development and Evaluation of a Laboratory Scale Conch for Chocolate Production." 616–22.
- Serrano, Carolina. 2009. "Cocoa Santander."
- Spreng, Arctostaphylos L. and Vaccinium L. Ericaceae. 2010. "Comparative Study of the Leaf Volatiles of." 6168–85.
- Stashenko, PÉREZ Y; BATHUEL C; 2012. "Determinación Por Gc-Ms De Compuestos Volátiles De Piscos Peruanos Aislados Por Hs-Spme."
- Torres, Miriam. 2012. "Influencia de Las Características Y Procesado Del Grano de Cacao En La Composición Físico-Química Y Propiedades Sensoriales Del Chocolate Negro." *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)* 287. Retrieved (<http://www.tesisenred.net/handle/10803/80743>).
- Tran, Phuong Diem et al. 2015. "Assessing Cocoa Aroma Quality by Multiple Analytical Approaches." *Food Research International* 77:657–69. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.019>).
- Universidad Central de Venezuela. 2008. "Guia de Cromatografía." *Escuela de Química, Facultad de Ciencias* 11. Retrieved (http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia_cromatografia.pdf) para
- Vas, György and Károly Vékey. 2004. "Solid-Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool prior to Mass Spectrometric Analysis." *Journal of Mass Spectrometry* 39(3):233–54.

Apéndices

Apéndice A. Concentraciones de los compuestos identificados y asociados a los atributos sensoriales floral, frutal, nuez y cacao, para las 8 condiciones de operación de tostado

Compuesto	Atributo sensorial	Concentración (mg/kg)							
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Ácido acético	Acético	76,976	75,125	76,565	59,165	99,865	101,895	84,815	92,473
2-metilpropanoato	Frutal	3,629	2,133	3,848	2,044	3,997	12,804	3,404	5,061
2,3-butanodiol	Cacao	33,819	30,948	29,441	21,098	73,671	198,762	38,409	41,390
2,3-butanodiol	Cacao	27,856	26,129	26,425	20,467	66,283	168,756	34,329	41,175
2-metilpirazina	Nuez	0,081	0,074	0,083	0,090	0,076	1,083	0,073	0,077
1-metilbutil acetato	Floral	3,435	3,933	4,380	3,715	3,286	4,847	4,001	3,358
2,5-dimetilpirazina	Quemado, nuez, cacao	1,330	0,758	1,009	0,714	1,960	5,229	1,517	1,361
2,3-dimetilpirazina	Quemado, nuez	0,330	0,215	0,323	0,198	0,449	1,751	0,272	0,454
Benzaldehído	Nuez	0,643	0,642	0,458	0,411	0,000	1,008	0,462	0,870
2-etil-6-metilpirazina	Cacao, quemado	0,139	0,176	0,098	0,074	0,150	0,922	0,117	0,185
trimetilpirazina	Cacao, nuez, quemado	2,939	2,644	3,838	2,072	6,011	21,134	3,431	5,500
Fenilacetaldehído	Floral	5,867	4,631	5,901	6,501	9,438	7,024	6,688	7,779
Acetofenona	Floral, frutal	1,504	1,471	1,995	1,367	1,793	3,275	1,497	1,759
Acetilpirrol	Cacao, nuez, quemado	0,106	0,314	0,364	0,290	5,189	0,996	0,886	1,212
2,5-dimetil-3-etilpirazina	Quemado	0,425	0,153	0,257	0,135	0,760	1,941	0,303	0,925
Tetrametilpirazina	Quemado, nuez	34,842	34,173	33,985	28,771	40,495	89,207	28,835	40,956
2-nonanona	Frutal	0,454	0,475	0,411	0,408	0,413	0,626	0,450	0,648
Linalol	Floral, frutal	4,705	3,239	2,841	4,294	3,210	7,678	3,694	5,250
2-feniletanol	Floral	12,184	10,927	10,253	9,910	14,485	26,531	11,757	16,804
Etil fenil acetato	Floral, frutal	0,911	0,426	1,242	1,419	1,061	2,623	0,948	0,989
Fenil alcohol acetato	Floral, frutal	24,230	30,948	28,123	24,450	28,397	43,123	24,874	29,571

Apéndice B. Resultados del diseño experimental para los 4 atributos especiales analizados: floral, frutal, nuez y cacao.

Diseño experimental atributo floral			
Bloque	Tiempo [min]	Temperatura[°C]	Área extraída
1	55	115	50,726
1	30	130	65,543
1	24	120	53,231
1	30	110	54,704
1	45	120	61,012
1	45	134	92,984
1	45	106	50,151
1	60	110	54,779
2	45	120	62,328
2	24	120	53,688
2	45	134	97,216
2	55	115	54,947
2	45	196	53,161
2	30	110	56,447
2	60	110	54,691
2	30	130	65,476

Diseño experimental atributo frutal			
Bloque	Tiempo [min]	Temperatura[°C]	Área extraída
1	55	115	33,924
1	30	130	42,668
1	24	120	34,902
1	30	110	38,727
1	45	120	37,787
1	45	134	66,753
1	45	106	33,206
1	60	110	37,629
2	45	120	39,954
2	24	120	34,833
2	45	134	73,506
2	55	115	36,942
2	45	106	34,759

Diseño experimental atributo frutal			
Bloque	Tiempo [min]	Temperatura[°C]	Área extraída
2	30	110	38,658
2	60	110	39,290
2	30	130	43,890

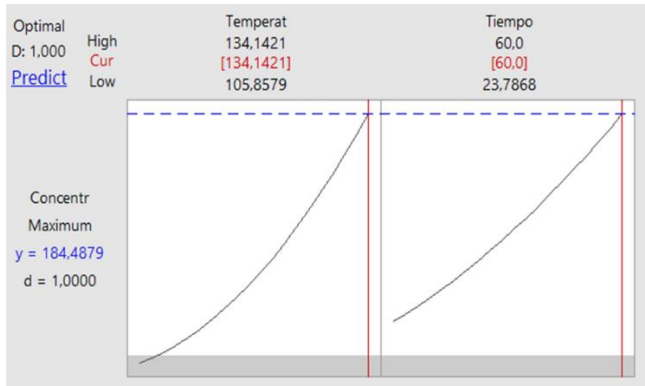
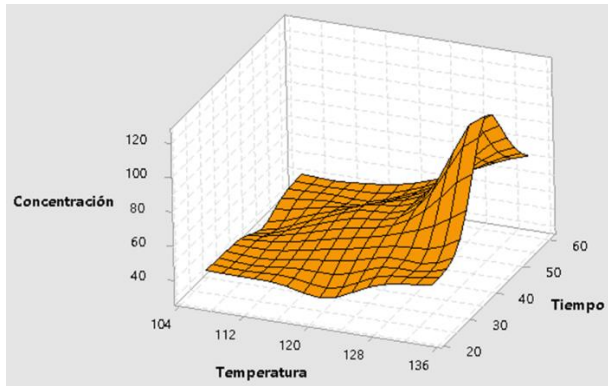
Diseño experimental atributo nuez			
Bloque	Tiempo [min]	Temperatura[°C]	Área extraída
1	55	115	39,482
1	30	130	50,820
1	24	120	34,960
1	30	110	36,840
1	45	120	55,033
1	45	134	123,187
1	45	106	31,065
1	60	110	40,127
2	45	120	53,330
2	24	120	35,992
2	45	134	117,630
2	55	115	41,060
2	45	106	34,026
2	30	110	40,801
2	60	110	39,995
2	30	130	50,039

Diseño experimental atributo cacao			
Bloque	Tiempo [min]	Temperatura[°C]	Área extraída
1	55	115	69,444
1	30	130	88,850
1	24	120	77,397
1	30	110	58,482
1	45	120	156,703
1	45	134	389,866
1	45	106	44,304
1	60	110	62,995
2	45	120	149,823
2	24	120	79,981
2	45	134	395,157

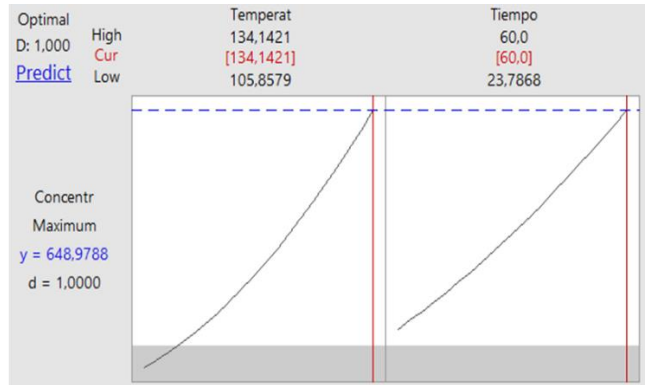
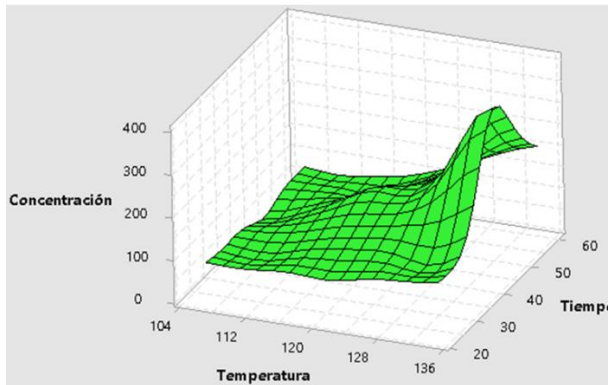
Diseño experimental atributo cacao			
Bloque	Tiempo [min]	Temperatura[°C]	Área extraída
2	55	115	62,934
2	45	106	45,125
2	30	110	62,779
2	60	110	59,354
2	30	130	92,797

Apéndice C. Superficies de respuesta para cada uno de los 4 atributos sensoriales: floral, frutal, nuez y cacao.

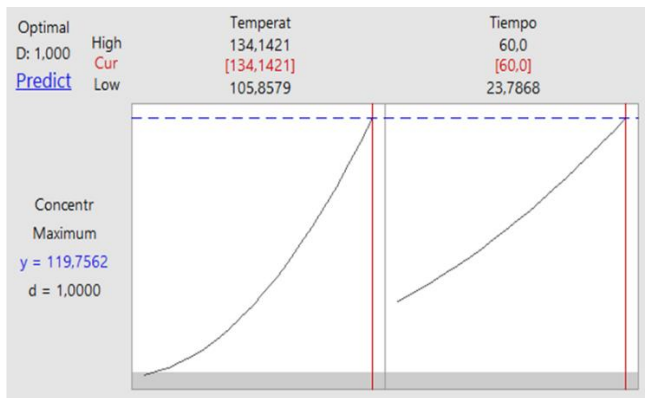
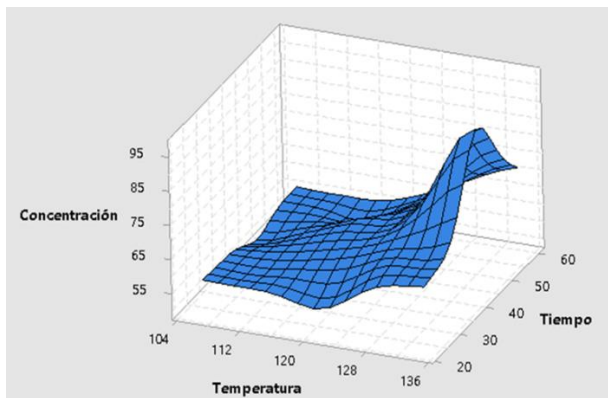
• **Atributo nuez**



• **Atributo cacao**



• **Atributo floral**



Apéndice D. Resultados sensoriales detallados para las condiciones de tostado.

T1	
Atributo sensorial	Intensidad de percepción
Floral	1
Frutal	3
Nuez	3
Cacao	3
Quemado	2
Acidéz	3

Observaciones: Se destaca el aroma a cacao y amargo agradable, con una pizca de astringencia y aroma floral, se resaltan frutos rojos y nuez, y al final acento en quemado.



T2	
Atributo sensorial	Intensidad de percepción
Floral	0
Frutal	3
Nuez	3
Cacao	3
Quemado	0
Acidéz	4

Observaciones: Destacado el aroma del ácido acético de larga duración en boca, opacando el aroma a cacao. Persistencia en amargo y astringencia, no se percibe el floral, acetnto en frutos y nuez.



T3	
Atributo sensorial	Intensidad de percepción
Floral	0
Frutal	2
Nuez	3
Cacao	3
Quemado	0
Acidéz	5

Observaciones: Se destaca el aroma del ácido acético de larga duración en boca, opacando el sabor a cacao, persistencia en amargo y astringencia, no se percibe floral, acento en frutos y nuez.



T4	
Atributo sensorial	Intensidad de percepción
Floral	1
Frutal	3
Nuez	4
Cacao	4
Quemado	0
Acidéz	2

Observaciones: Se destaca el aroma a cacao de larga duración en boca, pizca de ácido cítrico, amargo y astringencia aceptable, acento en floral y persistencia en frutos rojos y nuez.



T7	
Atributo sensorial	Intensidad de percepción
Floral	1
Frutal	4
Nuez	3
Cacao	4
Quemado	0
Acidéz	3

Observaciones: Se destaca el aroma a cacao de larga duración en boca, ácido cítrico, pizca en amargo, astringencia y floral, acento en frutos rojos y nuez.

T8	
Atributo sensorial	Intensidad de percepción
Floral	0
Frutal	2
Nuez	2
Cacao	2
Quemado	3
Acidéz	4

Observaciones: Se destaca el aroma quemado y ácido de larga duración en boca, opacando el aroma a cacao, persistencia en amargo y astringencia, no se percibe floral, frutos y nuez.



Apéndice E. Concentraciones de los compuestos identificados y asociados a los atributos sensoriales floral, frutal, nuez y cacao, para los 4 puntos de muestreo del proceso de conchado.

Compuesto	Concentración mg/kg			
	M1	M2	M3	M4
Ácido acético	3,868	0,937	1,110	1,708
2-metilpropanoato	3,300	2,397	2,705	3,199
2,3-butanodiol	23,949	6,051	6,752	6,874
2,3-butanodiol	16,005	4,160	4,418	4,622
2-metilpirazina	0,104	0,048	0,037	0,072
1-metilbutil acetato	0,614	0,000	0,000	0,000
2,5-dimetilpirazina	0,590	0,142	0,139	0,214
2,3-dimetilpirazina	0,339	0,049	0,046	0,000
Benzaldehído	0,372	0,148	0,139	0,131
2-etil-6-metilpirazina	0,191	0,046	0,042	0,036
trimetilpirazina	3,409	0,639	0,756	0,525
Fenilacetaldehído	4,378	1,009	1,018	1,055
Acetofenona	0,982	0,399	0,391	0,425
Acetilpirrol	0,150	0,054	0,062	0,059
2,5-dimetil-3-etilpirazina	0,000	0,000	0,000	0,000
Tetrametilpirazina	28,181	9,453	9,213	8,527
2-nonanona	0,235	0,085	0,072	0,074
Linalol	1,880	0,509	0,478	0,412
2-feniletanol	8,490	3,882	3,585	4,140
Etil fenil acetato	1,520	1,151	1,019	1,055
Fenil alcohol acetato	10,628	7,550	6,578	0,425

Apéndice F. Coeficiente de variación calculado para determinar la precisión del método analítico en la cuantificación de los compuestos volátiles en el producto terminado después del proceso de conchado para dos repeticiones R1 y R2.

Compuesto	Atributo sensorial	R1	R2	Promedio	Desviación estandar	CV%
Ácido acético	Acético	1,708	1,684	1,696	0,017	1,014
2-metilpropanoato	Frutal	3,199	3,162	3,181	0,027	0,837
2,3-butanodiol	Cacao	6,874	7,340	7,107	0,330	4,639
2,3-butanodiol	Cacao	4,622	4,893	4,758	0,192	4,025
2-metilpirazina	Nuez	0,072	0,075	0,074	0,002	2,377
1-metilbutil acetato	Floral	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2,5-dimetilpirazina	Quemado, nuez, cacao	0,214	0,226	0,220	0,009	3,884
2,3-dimetilpirazina	Quemado, nuez	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Benzaldehído	Nuez	0,131	0,126	0,129	0,004	2,948
2-etil-6-metilpirazina	Cacao, quemado	0,036	0,036	0,036	0,000	0,215
trimetilpirazina	Cacao, nuez, quemado	0,525	0,528	0,526	0,002	0,435
Fenilacetaldehído	Floral	1,055	1,016	1,035	0,028	2,662
Acetofenona	Floral, frutal	0,425	0,425	0,425	0,000	0,019
Acetilpirrol	Cacao, nuez, quemado	0,059	0,057	0,058	0,001	2,258
2,5-dimetil-3-etilpirazina	Quemado	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Tetrametilpirazina	Quemado, nuez	8,527	8,447	8,487	0,057	0,668
2-nonanona	Frutal	0,074	0,071	0,072	0,002	3,224
Linalol	Floral, frutal	0,412	0,410	0,411	0,001	0,204
2-feniletanol	Floral	4,140	4,080	4,110	0,042	1,025
Etil fenil acetato	Floral, frutal	1,055	0,951	1,003	0,074	7,330
Fenil alcohol acetato	Floral, frutal	0,425	7,512	3,968	5,011	126,280