

**CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES REGIONALES PROMISORIOS DE  
CACAO COLOMBIANO: FÍSICA, QUÍMICA; FUNCIONAL Y ORGANOLÉPTICA.**

**LAURA MARCELA NOGUERA MUÑOZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2014**

**CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES REGIONALES PROMISORIOS DE  
CACAO COLOMBIANO: FÍSICA, QUÍMICA; FUNCIONAL Y ORGANOLEPTICA**

**LAURA MARCELA NOGUERA MUÑOZ**

**Propuesta de investigación para obtener el título de  
*Magíster en Química (Ms)***

**Directora:  
JANETH AIDE PEREA VILLAMIL  
Química, Magíster en Química, Doctora en Química  
Profesora Titular, Escuela de Química**

**Codirectora:  
ADRIANA SOTO MENDÉZ  
Nutricionista y Dietista, Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos  
Profesora Titular, Escuela de Nutrición**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2014**

## **Dedicatoria**

A todos aquellos que con su apoyo, cariño, trabajo, esfuerzo y paciencia hicieron posible este trabajo.

## **Agradecimientos**

A **Dios** por el amor.

A **Mi Familia** por su apoyo incondicional.

A la **Comunidad Misionera Verbum Dei** por hacer posible este sueño.

A la **Doctora Janeth Aidé Perea Villamil** por todas las oportunidades, por la paciencia y por todo: GRACIAS.

A la **Docente Adriana Soto Méndez**, por la dirección y el apoyo en el trabajo desarrollado.

Al **Laboratorio de Alimentos CICTA**, por el apoyo brindado.

A la **Familia Duran Cadena** (Tata y Juancho, por la colaboración y el apoyo)

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUCCIÓN.....	16
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	18
1.1 EL CULTIVO DE CACAO.....	18
1.2 CLASIFICACIÓN DEL CACAO.....	18
1.3 EL CACAO EN COLOMBIA.....	21
1.3.1 Propiedades físicas del cacao.....	21
1.3.2 Propiedades químicas del cacao.....	22
1.3.3 Propiedades funcionales del cacao.....	23
1.3.4 Propiedades organolépticas del cacao.....	25
1.3.5 Caracterización del perfil aromático del cacao y de sus compuestos volátiles.....	27
2. METODOLOGÍA.....	32
2.1 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAL VEGETAL.....	32
✓ Reactivos.....	32
✓ Equipos.....	32
✓ Material vegetal.....	33
2.2 DISEÑO METODOLÓGICO.....	33
2.3 MUESTREO Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.....	33
2.4 ANÁLISIS FÍSICO.....	35

✓ Masa del grano .....	35
✓ Cascarilla. ....	35
2.5 ANÁLISIS QUÍMICO .....	35
✓ Cenizas .....	35
✓ Proteína .....	35
✓ Fibra cruda.....	36
✓ Grasa .....	36
✓ Perfil de ácidos grasos.....	36
2.6 ANÁLISIS FUNCIONAL .....	37
2.6.1 Extracción polifenoles totales, flavonoides y metilxantinas .....	37
2.6.2 Cuantificación de Polifenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu. ...	37
2.6.3 Cuantificación de flavonoides y metilxantinas por HPLC.....	37
2.6.4 Determinación de actividad antioxidante .....	38
2.7 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES .....	39
2.7.1 Extracción e identificación de los compuestos volátiles de los licores de cacao. ....	39
2.7.2 Cuantificación de los compuestos volátiles extraídos.....	41
2.8 ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO.....	41
2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	42
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	44
3.1 ANÁLISIS FÍSICO .....	44
3.1.1 Masa del grano.....	44
3.1.2 Cascarilla.....	45
3.2 ANÁLISIS QUÍMICO .....	45
3.2.1 Cenizas.....	45
3.2.2 Grasa.....	47
3.2.3 Fibra .....	50
3.2.4 Proteína .....	52

3.3	ANÁLISIS FUNCIONAL .....	55
3.3.1	Determinación de polifenoles totales .....	55
3.3.2	Determinación de la actividad antioxidante .....	57
3.3.3	Cuantificación de (+)-catequina, (-) epicatequina y catequinas totales..	58
3.3.4	Determinación del contenido de cafeína y teobromina.....	63
3.4	ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES .....	65
3.4.1	Extracción e identificación de los compuestos volátiles. ....	65
3.5	ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO.....	72
3.5.1	Perfil del sabor.....	72
3.5.2	Análisis de conglomerados.....	81
4.	CONCLUSIONES.....	88
5.	RECOMENDACIONES .....	89
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	90

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición de ácidos grasos de la manteca de cacao natural (%), reportada por varios autores.....	23
<b>Tabla 2.</b> Relación de compuestos volátiles identificados en el licor de cacao.....	29
<b>Tabla 3.</b> Identificación, nombre y origen de los clones seleccionados para estudio. ....	33
<b>Tabla 4.</b> Diseño experimental para optimizar las condiciones de extracción de los compuestos volátiles. ....	40
<b>Tabla 5.</b> Clasificación de la masa de grano de los materiales más comerciales de cacao en Colombia. ....	44
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de materiales de cacao por contenido de grasa en Colombia.....	45
<b>Tabla 7.</b> Contenido de cenizas (%) de los materiales regionales de cacao.....	46
<b>Tabla 8.</b> Dendogramas y subgrupos para CENIZA BS según el origen. ....	47
<b>Tabla 9.</b> Contenido de grasa (%) de los materiales regionales de cacao.....	48
<b>Tabla 10.</b> Dendograma y grupos para el contenido de grasa según el origen. ....	49
<b>Tabla 11.</b> Variación de la composición de ácidos grasos de materiales regionales de cacao.....	50
<b>Tabla 12.</b> Clasificación de materiales según composición del perfil de ácidos grasos.....	50
<b>Tabla 13:</b> Contenido de fibra (%) de los materiales regionales de cacao.....	51
<b>Tabla 14.</b> Dendograma y grupos para el contenido de fibra según el origen. ....	52
<b>Tabla 15.</b> Contenido de proteína (%) de los materiales regionales de cacao.....	53
<b>Tabla 16:</b> Dendograma y de los materiales regionales según el contenido de proteínas.....	54
<b>Tabla 17.</b> Contenido de polifenoles totales en semillas fermentadas de materiales regionales de cacao.....	55

<b>Tabla 18.</b> Actividad antioxidante en semillas fermentadas de materiales regionales de cacao colombiano. ....	57
<b>Tabla 19.</b> Contenido de epicatequina, catequina y catequinas totales en semillas fermentadas de materiales regionales de cacao colombiano. ....	59
<b>Tabla 20.</b> Contenido teobromina, cafeína y relación teobromina/cafeína en los granos de cacao fermentados. ....	63
<b>Tabla 21.</b> Resultados del diseño experimental. ....	66
<b>Tabla 22.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para el valor de las áreas extraídas. ....	67
<b>Tabla 23.</b> Condiciones de extracción empleadas en el análisis de compuestos volátiles. ....	67
<b>Tabla 24.</b> Composición química, obtenida por GC-MS, de los compuestos volátiles aislados por HS-SPME del licor de cacao. ....	70
<b>Tabla 25.</b> Compuestos volátiles presentes en todos los materiales de cacao. ....	71
<b>Tabla 26.</b> Compuestos volátiles presentes en el licor de cacao, cuantificados por GC-FID. ....	72
<b>Tabla 27.</b> Promedio de la calificación de los sabores identificados en los 7 materiales regionales de cacao. ....	73
<b>Tabla 28.</b> Resultados del análisis de conglomerados para los cuatro grupos de materiales regionales promisorios. ....	83
<b>Tabla 29.</b> Compuestos volátiles comunes a los cuatro conglomerados conformados. ....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Mazorcas (a) y semillas fermentadas y secas (b), de Cacao Criollo.....	19
<b>Figura 2.</b> Mazorcas de Cacao forastero del bajo amazonas. ....	20
<b>Figura 3.</b> Mazorcas de Cacao Trinitario. ....	20
<b>Figura 4:</b> Granos de cacao insuficientemente fermentados y bien fermentados. .	22
<b>Figura 5.</b> Estructuras químicas de: a) Catequina, b) Epicatequina, c) Procianidina B <sub>1</sub> , epicatequina-(4β-8)-catequina y d) Procianidina B <sub>2</sub> , epicatequina-(4β-8)-epicatequina. ....	24
<b>Figura 6.</b> Estructuras químicas de: a) teobromina y b) cafeína. ....	24
<b>Figura 7.</b> Tostador, molino y licor de cacao. ....	39
<b>Figura 8.</b> Rampas de calentamiento en el horno del cromatógrafo.....	41
<b>Figura 9.</b> Clasificación de los materiales de cacao colombiano según el tamaño de grano. ....	44
<b>Figura 10.</b> Diagrama de cajas para la variable cenizas.....	46
<b>Figura 11.</b> Diagrama de caja para la variable grasa.....	48
<b>Figura 12.</b> Diagrama de caja del contenido de fibra.....	51
<b>Figura 13.</b> Diagrama de caja del contenido de proteína.....	52
<b>Figura 14.</b> Diagrama de cajas del contenido de polifenoles totales. ....	56
<b>Figura 15.</b> Diagrama de cajas para la actividad antioxidante de las semillas fermentadas de los materiales regionales de cacao.....	58
<b>Figura 16.</b> Perfil cromatográfico de un extracto de granos de cacao: <b>(A)</b> (-)-epicatequina y <b>(B)</b> (±)-catequina.....	61
<b>Figura 17.</b> Diagrama de caja del contenido de: <b>a.</b> catequina, <b>b.</b> epicatequina, <b>c.</b> catequinas totales.....	62
<b>Figura 18.</b> Perfil cromatográfico de un extracto de granos de cacao: <b>(A)</b> teobromina y <b>(B)</b> cafeína. ....	64

<b>Figura 19.</b> Relación teobromina/cafeína vs concentración de cafeína para 7 materiales regionales de cacao colombiano. ....	65
<b>Figura 20.</b> Diagrama de efectos principales. ....	66
<b>Figura 21.</b> Perfil cromatográfico de licor de cacao obtenido por el método HS-SPME-GC-MS en columna DB-WAX, J&W <i>Scientific</i> , Folsom, CA, EE.UU.) de 30m x 0.25mm, D.I x 0.25µm, df. ....	68
<b>Figura 22.</b> Perfil cromatográfico de licor de cacao obtenido por el método HS-SPME-GC-MS en columna HP-5MS, J&W <i>Scientific</i> , Folsom, CA, EE.UU.) de 30m x 0.25 µm, df. ....	69
<b>Figura 23.</b> Diagrama radial de las variables de sabor. ....	73
<b>Figura 24.</b> Diagrama de cajas para la variable cacao. ....	76
<b>Figura 25.</b> Diagrama de caja de la variable ácido. ....	77
<b>Figura 26.</b> Diagrama de cajas de la variable astringente. ....	78
<b>Figura 27.</b> Diagrama de cajas para el sabor amargo. ....	79
<b>Figura 28.</b> Diagrama de cajas para la variable afrutado. ....	80
<b>Figura 29.</b> Diagrama de cajas para el sabor nueces. ....	81
<b>Figura 30.</b> Dendograma para los sabores identificados en los licores de cacao de los materiales regionales promisorios colombianos. ....	81

## RESUMEN

**TÍTULO:** CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES REGIONALES PROMISORIOS DE CACAÑO COLOMBIANO: FÍSICA, QUÍMICA; FUNCIONAL Y ORGANOLÉPTICA\*.

**AUTOR:** Noguera Muñoz, Laura Marcela \*\*

**PALABRAS CLAVES:** *Theobroma cacao* L, caracterización física, química, funcional, perfil del sabor, compuestos volátiles.

### DESCRIPCION:

La alta variabilidad genética y el poco conocimiento que se tiene de los materiales sembrados en Colombia, dificulta la búsqueda de mercados internacionales. En el presente trabajo se realizó la caracterización física, química, funcional y organoléptica de siete materiales regionales promisorios de cacao y un material introducido, con el fin de encontrar parámetros diferenciadores.

La caracterización físico química correspondió a la evaluación de: masa del grano, porcentaje de cascarilla, fibra, grasa, proteína y cenizas. En el análisis funcional se cuantificaron los polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) y se examinó la actividad antioxidante (*Oxygen Radical Absorbance Capacity* ORAC). Se hizo la caracterización y cuantificación de compuestos volátiles y se determinó el perfil del sabor a través del panel de cata del Laboratorio Cacao Aroma.

Los materiales evaluados presentaron diferencias significativas entre sí en cuanto a sus propiedades físicas, químicas, funcionales y organolépticas y estas diferencias dieron lugar a la conformación de grupos estadísticamente distintos. Estos grupos difieren entre sí según la característica analizada.

Entre las variables físico químicas evaluadas resaltan la masa de grano de los materiales FLE 2 y SCC 61 y el alto contenido de grasa encontrado en todos los materiales evaluados, el cual osciló entre el 55,23% y el 60,37%, superando a los reportes de otros países.

Con respecto al análisis funcional el material FSV 155 presentó valores altos en cuanto a contenido de catequina, epicatequina y de actividad antioxidante, además de que mostró la menor relación teobromina/cafeína, relacionándose por tanto con los materiales criollos. Este material también obtuvo un perfil sensorial típico de un material criollo.

La correlación de los compuestos volátiles cuantificados con el perfil del sabor permitió identificar relaciones entre el sabor floral con los compuestos 2,3-butanodiol y la acetofenona, el sabor sobrefermentado se relacionó con el 2-feniletanol y el fenetil acetato con el sabor ácido.

---

\* Proyecto de grado.

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Janeth Aidé Perea Villamil. Codirectora: Adriana Soto Méndez.

## ABSTRACT

**TÍTULO:** PHYSICAL, CHEMICAL, FUNCTIONAL AND SENSORY CHARACTERIZATION OF PROMISING COLOMBIAN CACAO\*.

**AUTOR:** Noguera Muñoz, Laura Marcela\*\*

**KEYWORDS:** *Theobroma cacao* L, physical, chemical, functional characterization, flavor profile, volatile compounds.

### DESCRIPTION:

The high genetic variability and the limited knowledge that we have about the materials grown in Colombia, hinders the search for international markets. In the present work we performed the physical, chemical, functional and organoleptic characterization of seven regional materials promising of Colombian coca and an international material, in order to find differentiating parameters.

The physicochemical characterization corresponded to the assessment of: bean size, fiber, fat, protein and ash. In functional analysis the total polyphenols (Folin-Ciocalteu) were quantified and antioxidant activity (ORAC Oxygen Radical Absorbance Capacity) was examined. Characterization and quantification of volatile compounds was performed and the flavor profile was determined through the tasting panel Cocoa Aroma Laboratory.

The materials evaluated showed significant differences among them in terms of their physical, chemical, functional and sensory properties and these differences led to the creation of statistically different groups. These groups differ according to the characteristic analyzed.

Among the physical and chemical variables evaluated highlight the bean size of the materials FLE 2 and SCC 61 and the high fat content found in all materials tested, which ranged between 55.23% and 60.37%, outperforming reports from other countries.

With respect to the functional analysis the material FSV 155 showed high values in terms of content of catechin, epicatechin and antioxidant activity, plus it had the lowest ratio theobromine / caffeine, being related to the "criollo" materials. This material also obtained a typical sensory profile of a "criollo" material.

The correlation of the quantified volatiles with the flavor profile allowed to identify relationships between the floral flavor with 2,3-butanediol and acetophenone compounds, the sobrefermentado taste related to the 2-phenylethanol and phenethyl acetate with the acidic flavor.

---

\* Research Work, Master in Chemistry Thesis

\*\* Faculty of sciences, Department of Chemistry. Directed by: Janeth Aidé Perea Villamil. Co-directed by: Adriana Soto Méndez.

## INTRODUCCIÓN

En el año 2008, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural incluyó el cultivo de cacao dentro de los diez renglones exportables que el gobierno nacional ha definido para apoyar el desarrollo del campo y aumentar la competitividad del país. En el año 2011 la producción fue de 40.000 Ton [111] y fue destinada principalmente al mercado nacional. Esta producción no ha logrado suplir la demanda interna por lo que se ha tenido que importar cacao [111].

El cacao es una materia prima de gran importancia para la industria de chocolatería y confitería, cosméticos, productos farmacéuticos y más recientemente de compuestos bioactivos como los flavonoides que presentan propiedades antioxidantes benéficas para la salud, por lo que sus posibilidades de desarrollo, junto con la producción y comercialización de cacaos finos de aroma, son amplias.

Colombia actualmente posee la más alta diversidad genética tanto de materiales (clones) introducidos, como regionales. Los clones que se están sembrando poseen mejor calidad que los híbridos que hoy generan el grano producido, debido a su sabor, aroma, tamaño del grano, porcentaje de cascarilla. Algunos de estos materiales han sido caracterizados parcialmente por FEDECACAO y la UIS con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en cuanto a sus propiedades físicas (índice de grano, índice de mazorca, contenido de cascarilla, pH) y a su composición en macronutrientes (ceniza, grasa, fibra, proteína) y micronutrientes (hierro, zinc, magnesio, sodio, potasio y fósforo); sin embargo, la caracterización en cuanto al contenido de compuestos bioactivos y compuestos volátiles que determinan el aroma, sabor y perfiles sensoriales de los mismos, no han sido reportados.

En el área de análisis sensorial, se cuenta sólo con información generada en evaluaciones esporádicas realizadas por expertos extranjeros provenientes de Ecuador y de Venezuela, en eventos desarrollados por FEDECACAO y las caracterizaciones desarrolladas por las empresas transformadoras del grano Compañía Nacional de Chocolates del Grupo Nutresa y Casa Luker.

Por lo anterior y con el fin de lograr un mejor posicionamiento en los diversos mercados internacionales existentes para el grano, como el cacao fino y de aroma, el cacao rico en compuestos bioactivos, entre otros productos, se requiere la caracterización de los cacaos que más se comercializan actualmente (10) y de 11 que han sido considerados promisorios por el Consejo Nacional Cacaotero. La caracterización de los materiales de cacao constituye un punto de partida para construir una válida denominación de origen, a partir del cual se espera el reconocimiento internacional de la calidad del cacao. Esta caracterización integral también servirá a futuro para generar modelos de siembra específicos en cada región o piso térmico, que incluyan además de las tradicionales características agronómicas y sanitarias, las fisicoquímicas, organolépticas y funcionales.

En el presente proyecto se plantea la caracterización de siete materiales regionales: CAU 39, FSV-155, FSV-25, FLE-2, FSA-13, FTA-2 y SCC-61 en cuanto a las características físicas, químicas, funcionales (metilxantinas, polifenoles totales), compuestos que influyen en el "flavour" (compuestos volátiles, acidez) y perfil sensorial del grano de cacao. Estos parámetros diferenciadores permitirán al sector cacaotero conocer de manera objetiva los materiales de cacao comercializados en el país y los considerados promisorios por el Consejo Nacional Cacaotero, como herramienta para establecer el uso y comercialización del grano.

## **1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

### **1.1 EL CULTIVO DE CACAO.**

El árbol de cacao (*Theobroma cacao L.*) es un árbol nativo de regiones tropicales húmedas del norte de Suramérica, el cual se difundió a lo largo del Valle Amazónico y posteriormente tribus nómadas lo introdujeron en Centro América [1]. Durante la época de la conquista los españoles lo llevaron a Europa, donde fue altamente comercializado, lo cual motivó su siembra en las Islas del Caribe, Asia, África y Oceanía [2].

Actualmente la siembra de cacao ofrece beneficios tanto ambientales como económicos. En el aspecto ambiental, el cacao puede asociarse con maderables y otros cultivos que le proporcionan sombra y aportan diferentes nutrientes al suelo [3, 9]. En cuanto a la economía, el cacao es muy apreciado por ser la materia prima de artículos de chocolatería, cosméticos, productos alimenticios y recientemente una importante fuente de compuestos bio-activos [4, 5].

Por estos múltiples beneficios el cacao fue el cultivo que permitió en Colombia una transición social, económica, productiva y ambiental entre miles de familias, quienes lograron pasar de los cultivos ilícitos como la coca y la marihuana, al cacao como principal actividad generadora de ingresos [6]. Como resultado de estas siembras y de mejoramientos realizados en cuanto al control de plagas, en el año 2013 se superó la demanda interna de cacao dejando excedentes en materia de exportación [8]. Además, algunos de estos cultivos recibieron importantes certificados en calidad para exportación, los cuales les permitieron hacer presencia internacional con una exportación de 100 toneladas en 2012, las cuales pasaron a 250 en 2013.

Para el 2014 la Federación Nacional de Cacaoteros (Fedecacao) espera una cosecha superior a las 50.000 toneladas, planea fortalecer la comercialización y consolidar mercados internacionales, que en el año 2012 empezaron exportando 100 toneladas, y en el 2013 llegaron a más de 2000 toneladas [8].

### **1.2 CLASIFICACIÓN DEL CACAO.**

Como se mencionó anteriormente los campos de comercialización del cacao están en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y de compuestos bioactivos. Por esto, la consolidación de mercados internacionales depende de las características físicas, químicas, nutricionales, funcionales y aromáticas que se reconozcan y se puedan ofrecer [10, 11].

A nivel internacional, según las características que presentan los granos de cacao, se han realizado clasificaciones en las que se nombra el cacao como: - fino de

aroma o cacao corriente, y - cacao criollo, forastero o trinitario. Cada una de estas designaciones tiene nichos de mercado diferentes y algunas poseen valores agregados por sus propiedades especiales [41, 37, 42].

Las denominaciones cacao criollo, cacao forastero y/o cacao trinitario, corresponden a clasificaciones realizadas desde la botánica. El **Cacao Criollo**, (**Figura 1**) se caracteriza por presentar fruto alargado, con punta pronunciada, doblada y aguda; la superficie es generalmente rugosa, delgada, de color verde frecuentemente con salpicaduras de rojo a púrpura oscuro, también se encuentran algunos con superficie lisa, denominados "Cacao porcelana". Las almendras son grandes, rollizas, de sección transversal redondeada, con los cotiledones frescos de color blanco o ligeramente pigmentado. Los criollos son materiales de bajo rendimiento y muy susceptibles a enfermedades. También se caracterizan por ser materiales finos, con mayor suavidad y aroma en comparación con los forasteros. A partir de este material se obtiene el chocolate más apreciado por sus características de sabor [12, 13, y 14].

**Figura 1.** Mazorcas (a) y semillas fermentadas y secas (b), de Cacao Criollo.



Fotografía suministrada por el autor.

El **Cacao Forastero**, (**Figura 2**) corresponde a un material proveniente de la Cuenca Amazónica, con dos subgrupos bien definidos. Por un lado el subgrupo de los materiales provenientes de la parte alta de la cuenca amazónica, ríos Caquetá, Napo y Putumayo, con frutos de diversas formas y con diferentes tamaños de almendras de color violeta oscuro y por otro lado los materiales de la región del bajo Amazonas cuyos frutos son de forma amelonada, corta, de color verde y amarillo cuando alcanzan su madurez, con una superficie lisa, de corteza gruesa y difícil de cortar. Los granos son pequeños y más o menos aplanados, con un color que varía entre púrpura claro y oscuro. Este tipo de cacao forma un grupo complejo, tanto en sus formas silvestres como cultivadas. Dada su alta productividad y las siembras masivas en África y Brasil, el cacao de tipo forastero domina la producción mundial. En general el sabor a chocolate de estas variedades no está acompañado de los sabores especiales que distinguen los

cacaos finos y de aroma, al contrario, el cacao forastero está dentro de los llamados cacaos corrientes [1, 2, 14].

**Figura 2.** Mazorcas de Cacao forastero del bajo amazonas.



Fotografía suministrada por el autor.

El **Cacao Trinitario (Figura 3)** es altamente variable dado su origen híbrido por cruces naturales o dirigidos, algunos son poblaciones segregantes que se originaron por hibridación natural entre Forastero (amelonado) del bajo Amazonas y Criollos. En el comercio es conocido como “cacao fino y de aroma” y su sabor puede deberse en parte a su herencia criolla; a este grupo pertenecen todos los materiales ICS que se conocen en el mundo (ICS 1, 6,39, etc.) [15].

**Figura 3.** Mazorcas de Cacao Trinitario.



Fotografía suministradas por el autor.

El cacao **Nacional** es conocido como una cuarta variedad y se cultiva únicamente en Ecuador. La característica principal es el sabor “arriba”, el cual es descrito como un sabor floral, fuerte, con matices de astringencia, sabor a leguminosas verdes, flores de cítricos, una sensación de frescura que invade la boca y desaparece rápidamente. Los cacaos de tipo Nacional, poseen características en calidad y aroma, que los diferencian de los otros tipos de cacao. Según Amores

(2004), la variedad Nacional de Ecuador posee en sus cromosomas genes que favorecen el sabor floral [16].

### **1.3 EL CACAO EN COLOMBIA.**

El cultivo de cacao en Colombia, según las crónicas de la conquista, data desde 1620. El cacao cultivado en este periodo se consideraba de primera calidad, con sabores suaves y aromáticos, y se clasificó como “criollo” o caucano. En los siguientes años se optó por continuar con el cultivo de cacaos criollos y cacaos trinitarios, originados del cruce entre materiales forasteros y criollos. Hacia 1955 se registraron en el país las enfermedades conocidas como el Mal de Machete y la Escoba de Bruja, las que afectaron los cultivos comerciales de la época [18].

Con el objeto de afrontar la Escoba de Bruja y la baja productividad, en la década de los 60 se inició el mejoramiento genético en Colombia. En esta época se importaron de Trinidad y Ecuador un gran número de materiales para iniciar el proceso de producción de semilla híbrida [2]. Como resultado del mejoramiento genético, los materiales híbridos obtenidos lograron mejorar características como: precocidad, alta resistencia a enfermedades y productividad [14].

Un alto número de híbridos se probaron en el mundo. Con el fin de aprovechar la alta variabilidad genética existente en las diferentes regiones cacaoteras del país, hacia el año 2002, Fedecacao y Corpoica iniciaron un proceso de selección varietal participativa (SVP) en fincas de agricultores de diferentes regiones del país. En el año 2012 se evaluaron alrededor de 500 árboles y de éstos se seleccionaron 67 materiales promisorios, de los cuales 9 fueron registrados como cultivares comerciales [17].

#### **1.3.1 Propiedades físicas del cacao**

Para las industrias procesadoras de cacao es importante el tamaño del grano o almendra, y el de cascarilla. La comercialización de las almendras exige pesos superiores a 1 gramo y contenidos de cascarilla que no deben superar el 12% del peso total del grano. Sin embargo, las características físicas del grano fermentado y seco dependen en gran medida de la calidad del proceso de beneficio realizado y del material genético, por eso se emplean como criterio para definir el tipo de grano obtenido, según sea premio, corriente o pasilla, tal como se describe en la NTC 1252 del 28 de Mayo de 2003. Según esta norma, las propiedades que se miden en el grano de cacao son: contenido de humedad, contenido de impurezas o materias extrañas, contenido de almendra, contenido de pasilla, granos bien fermentados, granos insuficientemente fermentados y granos pizarrosos [43]. Una de las propiedades más importantes para definir la calidad del grano de cacao es el tamaño de grano [41, 44], y se ha reportado que existe una relación entre el

tamaño de los granos y el contenido de las almendras, con el genotipo del material evaluado y los factores ambientales [19]

De acuerdo con la norma, los granos bien fermentados son aquellos granos que presentan cáscara de color marrón rojizo o pardo rojizo, en las que la almendra se desprende fácilmente de la cáscara y el color es marrón o pardo rojizo oscuro con alvéolos bien definidos de forma arriñonada y con olor a chocolate. Los granos insuficientemente fermentados, presentan un color violeta o marrón violeta, la estructura es semicompacta y difícilmente se separa la cáscara de la almendra [43].

En la **Figura 4** se muestran a la derecha un par de granos bien fermentados y a la izquierda un par de granos insuficientemente fermentados. Los granos insuficientemente fermentados se caracterizan por el color violeta, en tanto que los granos bien fermentados aparecen de color marrón.

**Figura 4:** Granos de cacao insuficientemente fermentados y bien fermentados.



Fotografías suministradas por el Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA).

### 1.3.2 Propiedades químicas del cacao

En la comercialización de los granos de cacao también intervienen otros criterios de composición química como el contenido de grasa y el índice de acidez de la grasa [45, 46, 47, 48, 49]. El constituyente cualitativo y cuantitativo más importante en las semillas es la grasa, y puede oscilar entre 45 y 57% según el tipo de grano y método de extracción empleado [19, 26, 50].

Con respecto a la composición de la manteca de cacao, los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción son el palmítico, el esteárico y el oleico [51]. Estudios realizados en diferentes países (**Tabla 1**), demuestran que la concentración de los ácidos grasos puede variar según el lugar de origen; así por ejemplo, el cacao de Brasil presenta los valores más altos de ácido oleico y linoleico [51], mientras que los de Malasia presentan una mayor proporción de ácidos grasos saturados como el palmítico y el esteárico [52].

**Tabla 1.** Composición de ácidos grasos de la manteca de cacao natural (%), reportada por varios autores.

Autor	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico
Tucci (Brasil)*	29,3	30,5	36,0	3,3
Chin (Malasia)**	25,2	36,7	33,4	2,5
Chin (Ghana)**	25,4	34,7	34,7	3,1
Jahurul (Ecuador)**	25,5	35,3	34,7	2,8

\* Semillas de cacao, secas y sin fermentar.

\*\* Semillas de cacao, secas y fermentadas.

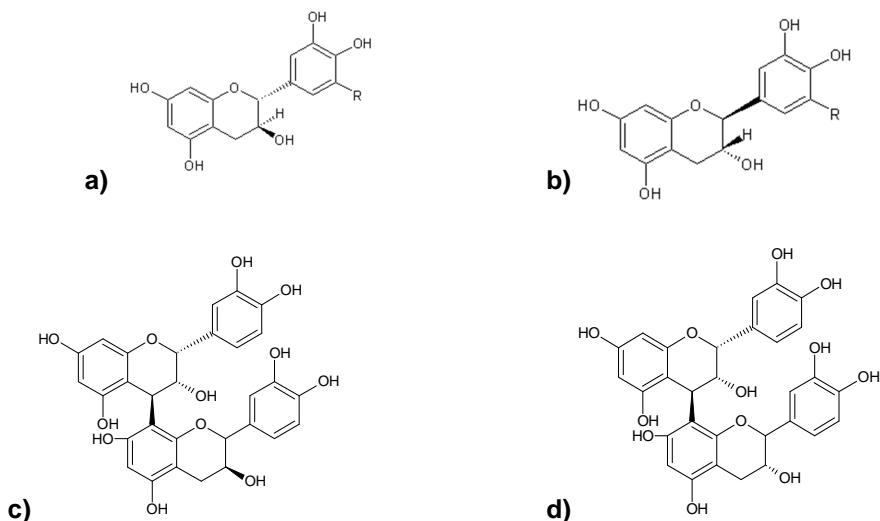
Adicionalmente, el cacao es una fuente de macronutrientes como proteína y fibra. Perea y colaboradores reportaron en materiales sembrados en Colombia, un contenido de proteína que osciló en un rango de 11,8 – 14,6% de la variedad [19]. Similares resultados fueron obtenidos por Bertazzo quienes evaluaron granos de cacaos fermentados y secos de diferentes lugares del mundo [27]. En cuanto a la fibra cruda, para materiales cultivados en el país se han reportado valores entre 1.5 y 4.1% [19].

### 1.3.3 Propiedades funcionales del cacao

En la última década la quimio-prevención ha cobrado interés. Esta disciplina busca procesos de exposición repetida a agentes que, o bien prevengan totalmente que una lesión se produzca, o renueven tejidos morfo-genéticamente alterados y los restauren a un estado normal [53]. Dentro de esta búsqueda, las respuestas alentadoras al emplear polifenoles, han hecho que la popularidad de estos compuestos se incremente.

Los polifenoles son compuestos que poseen un núcleo bencénico sustituido con uno o varios grupos hidroxilos (-OH) y con una cadena lateral funcional. Son producidos por las plantas, en las que ejercen un importante papel como mecanismos de defensa frente a agentes externos como animales o infecciones microbianas, facilitan la polinización y dispersión de las semillas mediante señales que atraen a insectos y forman parte de mecanismos de protección frente a la radiación ultravioleta y/o agentes oxidantes [38]. En los granos de cacao se han encontrado compuestos polifenólicos clasificados como flavonoides (**Figura 5**), tales como la catequina, (-)-epicatequina y procianidinas poliméricas y oligoméricas conformadas por subunidades de (-)-epicatequina [54, 55, 56, 57]; De este grupo de compuestos con conocida actividad antiradicalaria, la epicatequina y sus polímeros clasificados como procianidinas, son los que se encuentran en mayor proporción en el grano, con 34 y 58%, respectivamente [58].

Algunos de los hallazgos más recientes sobre el papel que juegan los polifenoles o flavonoides del cacao en la salud humana, son los reportados por Abril-Gil y colaboradores [59], quienes plantearon que los flavonoides del cacao tienen gran potencial en la prevención o tratamiento de enfermedades alérgicas; también se ha mencionado que los polifenoles del licor de cacao tienen actividad anticlastogénica, ya que previenen daños en el ADN [60].



**Figura 5.** Estructuras químicas de: a) Catequina, b) Epicatequina, c) Procianidina B<sub>1</sub>, epicatequina-(4β-8)-catequina y d) Procianidina B<sub>2</sub>, epicatequina-(4β-8)-epicatequina.

Otro importante grupo de sustancias con propiedades funcionales identificadas en el cacao son las metilxantinas como la teobromina y la cafeína (**Figura 6**). Estos compuestos clasificados como alcaloides, han mostrado efectos fisiológicos en diversos sistemas del organismo, incluyendo el sistema nervioso central, cardiovascular, gastrointestinal, respiratorio y renal [39, 22].

Se ha encontrado que tanto la concentración de metilxantinas como de flavonoides está relacionada con el genotipo del cacao, las condiciones de crecimiento y el país de origen [11]. La determinación y cuantificación de los polifenoles presentes en los granos de cacao se ha realizado mediante métodos colorimétricos como el ensayo Folin-Ciocalteu, o mediante cromatografía de alta eficiencia (HPLC), tanto en fase normal como en fase reversa [61]



**Figura 6.** Estructuras químicas de: a) teobromina y b) cafeína.

Dentro de las evaluaciones realizadas para determinar el contenido de polifenoles, se ha reportado que los granos de cacaos criollo, forastero y trinitario varían en las proporciones de flavonoides y metilxantinas. En granos frescos de cacao forastero, se ha encontrado una concentración de polifenoles de 71,42 - 82,68mg GAE/g, mientras que en semillas de cacao criollo corresponden a 50 mgGAE/g

[62]. Counet y colaboradores compararon el contenido de procianidinas en materiales criollos, forasteros y trinitarios, los cuales tuvieron diferentes tiempos de fermentación. Los materiales criollos, con poco tiempo de fermentación mostraron el contenido más alto de procianidinas – 3500 mg/kg de cacao- mientras que, las semillas de cacaos forasteros, las cuales tuvieron más días de fermentación, presentaron una concentración de procianidinas de 1000 mg/kg de cacao. [63]

Elwers y colaboradores [64] evaluaron el contenido de compuestos fenólicos en muestras, fermentadas y sin fermentar, de materiales de cacao forasteros del bajo y del alto amazonas, criollo, nacional y trinitario de diferentes orígenes. Estos autores reportaron: contenidos de polifenoles similares en los granos de cacao frescos, con una variación máxima del 2% entre las semillas del cacao trinitario y el cacao criollo y, durante el proceso de fermentación del cacao criollo, una gran pérdida de (+)-epicatequina, aproximadamente el 90%. Risner encontró en los granos fermentados y secos, polifenoles y metilxantinas tales como la teobromina, catequina, cafeína y epicatequina en concentraciones de 8909, 434, 827 y 1909 mg/kg de cacao, respectivamente [32].

Además de los estudios realizados sobre las propiedades funcionales de los polifenoles y metilxantinas del cacao, se han realizado investigaciones sobre el papel que juegan estos compuestos en las propiedades sensoriales de los granos. Efraím y colaboradores [65], estudiaron la influencia de la fermentación y el secado de los granos de cacao sobre el contenido de compuestos fenólicos y de la aceptabilidad sensorial, encontrando que en la fermentación, a mayor tiempo se disminuye el contenido de polifenoles, pero mejoran las notas sensoriales, y que los granos que han sido secados naturalmente presentan perfiles sensoriales más agradables. Noor-Soffalina y colaboradores demostraron que la concentración de polifenoles en los granos de cacao incide considerablemente en la generación de precursores de los compuestos del flavor [66]. Por otra parte, se ha visto que los niveles de compuestos del aroma del cacao formados durante el tostado tienen una relación inversa con el contenido de procianidinas residuales en el licor de cacao [63].

#### **1.3.4 Propiedades organolépticas del cacao.**

La calidad del cacao también se define según sus propiedades organolépticas [67], las cuales dependen del tipo, origen y clima del cacao, y de procesos como el beneficio y tostado [5]. Dichas características organolépticas se describen según el *flavor*, cuyos elementos más importantes son el aroma y el sabor [67]

Para definir el perfil del aroma y el sabor se emplean las técnicas descriptivas, las cuales comprenden la identificación, descripción y cuantificación de las características sensoriales de un producto determinado [98]. La realización de un análisis sensorial empleando técnicas descriptivas implica la formación de un personal entrenado que esté completamente familiarizado con los atributos del producto que analiza y del que pueda comunicar exactamente y con precisión sus percepciones. Los parámetros sensoriales percibidos que definen el producto se conocen con términos como atributo, características, notas de carácter, términos descriptivos o descriptores. La intensidad o el aspecto cuantitativo del análisis

descriptivo expresa el grado en el cual la característica está presente asignándole un valor establecido en una escala de medida [99].

Con respecto al sabor, en el cacao se han identificado los sabores amargo, ácido y dulce, y además la sensación astringente. El sabor dulce ha sido percibido principalmente en la punta de la lengua. La astringencia se describe como una sensación seca y áspera en la parte posterior de la lengua, el sabor amargo corresponde a un sabor fuerte que se percibe inicialmente en la parte posterior del paladar o en la garganta, y el sabor ácido es percibido por la punta de la lengua [68].

Otros sabores identificados en el cacao son los sabores específicos: cacao, floral, frutal y nuez, entre otros. El sabor a cacao es el sabor típico en los granos bien fermentados, tostados y libres de defectos, la referencia empleada son barras de chocolate de cacao fermentado. El sabor floral se encuentra en aquellos licores con sabor y aroma a flores, casi perfumado, como referencia se usan las flores de cítricos. El sabor a nuez es característico de los cacaos criollos y trinitarios y el sabor frutal es un sabor a fruta madura y como referencia se usa cualquier fruta seca o cacao fresco almacenado [67, 69].

Según el aroma y el sabor de los granos de cacao, el cacao es clasificado en granos de cacao finos de sabor y aroma, y granos de cacao corriente. La primera clasificación contempla los granos que dan características específicas de sabor, aroma y color y se usan en la producción de chocolates finos. Este tipo de granos se denomina cacao fino y en él se encuentran el cacao criollo, el cacao trinitario y el Nacional de Ecuador. El cacao fino de aroma tiene una característica principal que es su genética y de allí se detectan matices de nueces, flores, frutas, panela - malta, etc. En la segunda clasificación se incluyen los cacaos corrientes, los cuales poseen un sabor a chocolate muy fuerte y son utilizados para elaborar manteca de cacao, artículos para la cosmetología y productos para los que se requiere gran cantidad de materia prima [70, y 71].

Se han realizado numerosas investigaciones acerca de los perfiles organolépticos de materiales de cacao provenientes de países con trayectoria en el cultivo y la comercialización del cacao a nivel mundial. Dentro de estos países están Ghana, Trinidad y Tobago, México, Venezuela y Ecuador. [42, 69, 72, 73, 75, 76]. En el año 2008, Sukha y colaboradores optimizaron un protocolo de evaluación organoléptica para describir y cuantificar diferentes atributos del sabor de licores de cacao hechos con granos de Ghana (forasteros) y de Trinidad (trinitarios). Con base en el protocolo desarrollado se observaron diferencias entre una muestra de Ghana y cuatro clones de Trinidad. El perfil sensorial de los clones evaluados varió de acuerdo con el genotipo, mientras que en las cosechas de diferentes años no hubo una gran variación. Las muestras de Ghana presentaron altos valores en el sabor a cacao y bajos valores de los sabores floral y frutal. Las muestras de cacao trinitario mostraron valores moderados de sabor a cacao, y altas notas de los sabores ácidos, floral y frutal [72].

Los estudios realizados en el Ecuador se han dirigido a caracterizar el perfil sensorial de los materiales de cacao más comercializados [69, 76, 42]. Sánchez realizó una caracterización organoléptica de materiales de cacao, para seleccionar árboles con características sensoriales de interés comercial y encontró perfiles

organolépticos balanceados (bajos en acidez, amargor y astringencia) en los genotipos analizados. Solórzano evaluó muestras provenientes de diversos lugares del Ecuador, para determinar las diferencias y semejanzas sensoriales entre muestras de cacao tipo Nacional provenientes de distintas zonas productoras y determinaron que los cacaos de tipo Trinitario presentan un mediano sabor a cacao al momento de la degustación.

A diferencia de países como Ghana, Ecuador, Trinidad y Tobago, en donde la caracterización de los perfiles organolépticos de los materiales de cacao ha sido desarrollada y publicada, en Colombia la caracterización de los perfiles organolépticos la han llevado a cabo empresas privadas, las cuales han utilizado sus conocimientos para expandirse y crecer como empresa [77, 78, 81]. Adicionalmente, no se tienen protocolos estandarizados de procesos importantes como la fermentación y el secado. Por tanto, aunque se han obtenido premios en el Salón Internacional del Chocolate en París [79] y la Organización Internacional del Cacao (*International Cocoa Organization*, ICCO), ha reconocido el cacao colombiano como fino de sabor y aroma, no hay un sabor particular por el cual el cacao colombiano pueda ser reconocido. El pasado 26 de Septiembre de 2013, en Floridablanca (Santander), se llevó a cabo el III Concurso Nacional de Calidad del cacao colombiano, donde se evaluaron muestras de fincas de agricultores provenientes de diferentes regiones del país [80]. Dentro de las muestras evaluadas, la gran mayoría presentaba defectos de fermentación, secado y algunas muestras mostraban sabores que recordaban el estiércol de animales domésticos, típicos de las regiones en las que se cultiva el cacao.

### **1.3.5 Caracterización del perfil aromático del cacao y de sus compuestos volátiles**

En cuanto a la caracterización de los aromas presentes en el cacao Frauendorfer y colaboradores [75] evaluaron el perfil del aroma formado antes y después del tostado del cacao criollo; para lo cual emplearon el análisis de dilución de extractos de aroma y GC-MS. Estos autores compararon los compuestos encontrados en GC-MS con los identificados a través de factores de dilución y reconocieron importantes compuestos del aroma desarrollados durante el tostado, como el 3-metilbutanal (malta), la 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (caramelo), los ácidos 2 y 3-metilbutanoico (dulce), el etil-2-metilbutanoato (frutal) y el 2-feniletanol (floral).

En la **Tabla 2**, se muestran algunos de los compuestos volátiles más importantes, relacionados con el sabor y el aroma, reportados en muestras de licor de cacao y polvo de cacao, cubriendo desde aldehídos, pirazinas, ácidos, ésteres, furanos, cetonas, fenoles, pirroles, alcoholes, y también compuestos reportados con bajos umbrales del olor, entre ellos el fenil acetaldehído, 2-etil-3,5-dimetilpirazina, 2-y 3-metilbutanoico ácido, dimetiltrisulfuro, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona, fenilacetaldehído, y 3-4-hidroxi-dimetil-2 (5H) - furanona [5, 63, 11, 82].

Al agrupar los compuestos en sus grupos funcionales, se ha encontrado que existen relaciones con los sabores y los aromas descritos. A continuación se

describe de qué manera los alcoholes, aldehídos, pirazinas y ácidos participan en la generación del perfil del sabor y del aroma del cacao.

- **Alcoholes**

En la fracción volátil de los licores de cacao se han encontrado alcoholes [83]. El umbral oloroso de los alcoholes es considerablemente más alto que el de los aldehídos, ésteres y cetonas, por ello, es normalmente menos importante para el perfil del sabor [68]. Sin embargo, la presencia de alcoholes ha sido empleada para medir del grado de fermentación y envejecimiento de los granos y se encontró que los pentanoles y el metil-1-butanol se incrementan con el grado o el tiempo de fermentación y disminuyen si los granos han sido almacenados durante mucho tiempo. Según esto, bajas concentraciones de pentanoles y de metil-1-butanol pueden traer defectos en el aroma [84]. Serra Bonheví (2005) encontró linalol en la fracción volátil del cacao tostado. Al linalol se le atribuye el sabor floral [112].

- **Aldehídos**

En el proceso de beneficio del cacao, los aldehídos se empiezan a generar durante la fermentación en las etapas anaerobias, por oxidación de los alcoholes [84] y continúan su formación durante el proceso de tostado [85]. En el chocolate de mesa, en los confites y en los granos de cacao, se han encontrado aldehídos responsables del sabor y del aroma característico del cacao. Entre estos el (S)-2-nonenal, (S)-2-octenal, 2-furaldehído, 2-metilbutanal, 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, 5-metil-2-fenil-hexenal, acetaldehído, benzaldehído, hexanal, y fenilacetaldehído [86, 87]. Algunos de estos aldehídos contribuyen a la nota de chocolate fuerte, por ejemplo, el 3-metilbutanal, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, acetaldehído, isobutiraldehído, benzaldehído, fenilacetaldehído, 5-metil-2-fenil-2-hexenal, y 2-7-furaldehído.

El 5-metil-2-fenil-2-hexenal fue identificado por primera vez en el cacao en grano tostado, y su sabor fue descrito como “un profundo sabor amargo persistente del cacao” [88]. Otros aldehídos reportados como compuestos claves responsables del aroma son el (E)-2-nonenal, (E)-2-octenal, hexanal, (E, E) -2, 4 nonadienal, (E, E) -2, 4-decadienal, (Z)-2-Decenal, fenilacetaldehído y el 3-(metiltio)propionaldehído [74, 75].

- **Pirazinas**

Las pirazinas corresponden a uno de los grupos principales formados en la reacción de Maillard durante el tostado. En una quinta parte de los 525 compuestos volátiles identificados en cacao en grano tostado, predominan las fracciones de pirazina [89]. Cinco pirazinas han sido identificados como compuestos aromáticos importantes en estudios anteriores. La 2-etil-3,5-dimetilpirazina se reportó por contribuir con un sabor de tierra y patatas, presente en el cacao en polvo, licor de cacao, y chocolate de leche. La 2-metoxi-3-isopropilpirazina y la 2,3-dietil-5-etilpirazina fueron identificadas como compuestos importantes, debido a que en muy bajas concentraciones muestran sabores a papas fritas y a habas.

**Tabla 2.** Relación de compuestos volátiles identificados en el licor de cacao

Compuestos volátiles identificados en el licor de cacao		
No.	Compuestos	Atributo descrito.
<b>Alcoholes</b>		
1	3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol	Floral, frutal
2	2-Feniletanol	Floral
3	2-Heptanol	Cítrico
4	Fenilmetanol	Floral
<b>Aldehídos</b>		
5	2-Metilpropanal	Chocolate, malta
6	3-Metilbutanal	Chocolate, malta
7	2-Metilbutanal	Chocolate, malta
8	3-(Metiltio)propionaldehído	Papa
9	Fenilacetaldéhid	Floral, miel
10	2-Fenil-2-butenal	Cacao, dulce, tostado, ron
<b>Ésteres</b>		
11	2-Fenilacetato	Floral
<b>Furanos</b>		
12	3-Fenilfurano	Cacao, verde, menta
13	4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	Caramelo
<b>Cetonas</b>		
14	2,3-Butanodiona	Mantequilla
<b>Pirazinas</b>		
15	Metilpirazina	Avellana, verde
16	2-Etil-3,5-dimetilpirazina	Tierra
17	2-Etil-3,6-Dimetilpirazina	Tierra
18	3-Isobutil-2-metoxipirazina	Pimienta
19	Etilpirazina	Verde, eter, ron
20	2,3-Dimetilpirazina	Avellana, tostado
21	Trimetilpirazina	Cacao, tostado, verde
22	2-Etenil-6-metilpirazina	Avellana, tostado
23	3(o 2),5-Dimetil-2-(o 3)-etilpirazina	Tostado, ahumado, pralina, ron
24	Tetrametilpirazina	Café de leche, moca, tostado, verde
25	2-Isopropil-3-metoxipirazina	Guisantes, verde, avellana
26	2,3-Dietil-5-metilpirazina	Tierra
27	3,5(o 6)-dietil-2-metilpirazina	Cacao, chocolate, ron, dulce, tostado
28	2,5(o 6)-Dimetil-3-(2-metilpropil)pirazina	Avellana
29	2,3,5-Trimetilpirazina	Tierra
30	2,5-Dimetil-3-(3-metilbutil)pirazina	Tostado, dulce, verde
<b>Pirroles</b>		
31	1-(1H-pirrol-2-il)etanona (acetilpirrol)	Cacao, chocolate, avellana, tostado
32	3-Etil-2,5-dimetil-1H-pirrol	Cacao, avellana, café, tostado
33	1-(2-furanilmetil)-1H-pirrol (furfurilpirrol)	Tostado, chocolate, verde
<b>Ácidos</b>		
34	Ácido acético	Ácido
35	Ácido propanoico	Rancio
36	Ácido butanoico	Húmedo
37	Ácido 2 y 3-metilbutanoico	Rancio

La 3 (ó 2), 5-dimetil-2-etilpirazina, 3, 5 (ó 6)-dietil-2-metilpirazina, y trimetilpirazinas fueron reportadas como contribuyentes al sabor praliné y chocolate, y la presencia de un grupo etilo en las dos primeras pirazinas indica la importancia de la alanina y su aldehído de Strecker, acetaldehído, en la síntesis de sabor a chocolate. Las tetrametilpirazinas fueron las pirazinas más abundantes en el chocolate oscuro, y proporcionaron un sabor de café moca tostado [11, 63].

- **Ácidos**

Los ácidos 2 y 3 metilbutanoico, fueron identificados como compuestos importantes debido a su alta intensidad de olor en el licor de cacao. Ellos son la forma ácida de 2-metilbutanal y 3 metilbutanal, que son aldehídos clave en el sabor de chocolate. Aparte de los ácidos mencionados anteriormente, el ácido butanoico, el ácido pentanoico, el ácido hexanoico, el ácido fenilacético, el ácido propanoico y el ácido metilpropanoico se reportaron como mayoría de compuestos activos al olor en chocolate de leche, granos de cacao y cacao en polvo [11].

El ácido acético es un compuesto importante que tiene un efecto significativo sobre el aroma de chocolate, ya que puede proporcionar un sabor indeseable, como el del vinagre. El ácido acético es de los olores más abundantes en el chocolate [74]. Los ácidos volátiles pueden ser eliminados mediante procesos tales como el secado, conchado y tostado [90]. También se han reportado otros compuestos importantes, entre estos están ésteres, furanos, cetonas, fenoles y pirroles.

Counet y colaboradores [91] emplearon cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y cromatografía de gases - olfatometría en el análisis de 2 chocolates oscuros. Identificaron 60 compuestos, principalmente, heterociclos de nitrógeno y de carbono, aldehídos y cetonas, ésteres, alcoholes, hidrocarburos, nitrilos y sulfuros. Ellos concluyeron, que solamente algunos compuestos volátiles en niveles por partes por millón surgían como odorantes claves.

Para la extracción de los compuestos mencionados anteriormente, se han empleado técnicas como la clásica extracción con solvente [63] y la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza [87, 92]. Por ejemplo, Schnermann y Schieberle [86], emplearon la extracción clásica para extraer los compuestos volátiles de polvo de cacao. Un total de 78 compuestos fueron identificados en dos chocolates negros. En tanto Owusuy colaboradores [89] emplearon el método *headspace* dinámico para extraer los compuestos volátiles del aroma en muestras de chocolate amargo, en las cuales variaron las condiciones de fermentación, tostado y conchado. En total, identificaron 86 compuestos volátiles.

La técnica de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (*Headspace Solid Phase Microextraction* HS-SPME) ha sido usada ampliamente en la extracción de compuestos volátiles y/o del aroma y sabor del cacao, variando el tiempo de acondicionamiento y de exposición de la fibra al espacio de cabeza, temperatura de acondicionamiento, peso y volumen del espacio de cabeza de la muestra. También se han empleado diferentes tipos de fibras tales como DVB/CAR/PDMS, PDS/DVB, CAR-PDMS, PDMS y PDM-DVB. Ducki y

colaboradores [87] examinaron la eficiencia de extracción y la sensibilidad de las anteriores fibras y concluyeron que la fibra DVB/CAR-PDMS logró la mayor eficiencia de extracción de compuestos tanto volátiles como semivolátiles.

Rodríguez-Campos y colaboradores [93] extrajeron los compuestos volátiles de muestras de cacao fermentado y seco, usando la técnica de HS-SPME y empleando una fibra de 50/30  $\mu\text{m}$  de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) e identificaron un total de 58 compuestos, entre los cuales se encontraron ésteres, alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas y pirazinas.

En la identificación y cuantificación de pirazinas en cacao, se han utilizado las fibras PDMS-DVB, CAR-DVB y CAR-PDMS [94]. Farah y colaboradores [95] emplearon HS-SPME para extraer las pirazinas del cacao tostado y compararlas con la concentración de acrilamida que se generaba en el tostado. Pini y colaboradores [82] utilizaron la fibra CAR-DVB para extraer las pirazinas presentes en muestras de licor de cacao y Torres-Moreno [94] extrajo los compuestos volátiles en chocolates negros, elaborados con cacao de distinto origen geográfico.

Ducki y colaboradores [87] cuantificaron compuestos volátiles en polvo de cacao, por el método del estándar interno, usando tolueno como estándar. La cantidad óptima de tolueno agregada al analito fue ajustada a 50  $\mu\text{g}$  para evitar la saturación del detector y también para evitar el enmascaramiento de picos de interés. Se cuantificaron 45 compuestos en polvo de cacao.

Por otra parte, Li y colaboradores [92] emplearon hexanotriol como estándar interno (50  $\mu\text{g}$  de hexanotriol en 1ml de metanol por 2g de polvo de cacao). En la determinación cuantitativa de compuestos volátiles del aroma del te Wang [96] emplearon etil octanoato como estándar interno, Counet y colaboradores [91] utilizaron 2-feniletacetato, 2,3-dietil-5-metilpirazina y 3(o 2),5-dimetil-2(o 3)-etilpirazina como estándares internos, mientras que Coleman y Dube [97] emplearon ciclohexanona para realizar la cuantificación de los compuestos volátiles extraídos de sabores artificiales. Otros autores han empleado el método del estándar interno marcado isotópicamente para determinar la concentración de los compuestos volátiles en polvo y licor de cacao [75].

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAL VEGETAL

#### ✓ Reactivos.

Los reactivos empleados para los análisis fisicoquímicos: Tabletas Kjeldahl, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, ácido bórico, ácido clorhídrico, hexano, ácido sulfúrico y alcohol isoamílico fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). Los reactivos para la determinación del perfil de ácidos grasos: hidróxido de potasio, metanol y hexano fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania) y como material de referencia certificado se empleó la mezcla Supelco™ 37 Component FAME Mix, Supelco, Bellefonte, PA, Cat. N° 47885-U. En el análisis funcional se utilizó hexano, etanol, reactivo de Folin, carbonato de sodio y ácido gálico obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania) y como sustancias de referencia: (-)epicatequina, (+)catequina, teobromina y cafeína las cuales fueron marca Sigma-Aldrich, todas grado HPLC. Para determinar la actividad antioxidante se emplearon Trolox®, fluoresceína sódica, 2,2'-Azobis (2-amidipropano) dihidrocloruro (AAPH) adquiridas de Merck (Darmstadt, Alemania).

Solventes: Metanol, acetonitrilo y ácido fórmico grado HPLC. Hexano, éter de petróleo y etanol grado analítico, todos marca Merck (Darmstadt, Alemania). El agua empleada grado HPLC se consiguió mediante un sistema de purificación de agua, (AquaSolutions, Greater Vancouver, Canadá). El hidrógeno empleado como gas de arrastre en cromatografía de gases se obtuvo a través de un sistema generador de hidrógeno Peak Scientific PH200 – 600 (PeakScientific Instruments, Ltd., Escocia), los demás gases (N<sub>2</sub> y Aire), fueron suministrados por Linde Colombia S.A (Bucaramanga, Colombia).

#### ✓ Equipos

Balanza analítica PA214 (Ohaus), baño ultrasónico LC 30H (ElmaUltrasonics), centrífuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific), placa de calentamiento MR Hei-Tec (HEIDOLPH), rota-evaporador R-210 (Büchi), vortex SG23 (SchottGeräte), espectrofotómetro GENESYS 20 (ThermoSpectronic), espectrofluorímetro FluoroskanAscent (ThermoScientific), Extractor grasas/aceites Det-Gras N (P-selecta), Sistema HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU) controlado por el software Chem Station, equipado con una columna en fase reversa (Zorbax Eclipse XDB de medidas 150 mm X 2.1 mm) con tamaño de partícula de 5 µm, acoplado a detectores de arreglo de diodos y de fluorescencia. Cromatógrafo de gases (GC) 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.), con detector de ionización en llama (FID), acoplado a una columna HP-88 (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) [88%-cianopropil)aril-polisiloxano, 60m x 0.25mm x 0.20µm]. Cromatógrafo de gases (GC) 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un espectrómetro de masas (MSD) (Agilent Technologies Modelo 5975).

### ✓ Material vegetal

Las actividades de recolección y beneficio de las muestras fueron realizadas en la finca Villa Mónica – propiedad de la Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia–, ubicada en el municipio de San Vicente de Chucurí, Santander, Colombia (693msnm, T<sub>media</sub>≈27°C). Se hicieron 3 muestreos en las épocas de cosecha correspondientes a los meses de octubre y noviembre de 2012 y marzo de 2013. Las mazorcas seleccionadas fueron aquellas que presentaron un grado de madurez homogéneo. En la **Tabla 3** se muestran los materiales a evaluar.

**Tabla 3.** Identificación, nombre y origen de los clones seleccionados para estudio.

<b>Materiales regionales promisorios</b>	<b>Origen</b>
<b>CAU-39 </b>	Caucasia
<b>FLE-2</b>	Lebrija
<b>FSA-13</b>	San Vicente
<b>FSV-155</b>	San Vicente
<b>FSV-25</b>	San Vicente
<b>FTA-2</b>	Tame
<b>SCC-61</b>	Corpoica
<b>EET 96**</b>	Ecuador

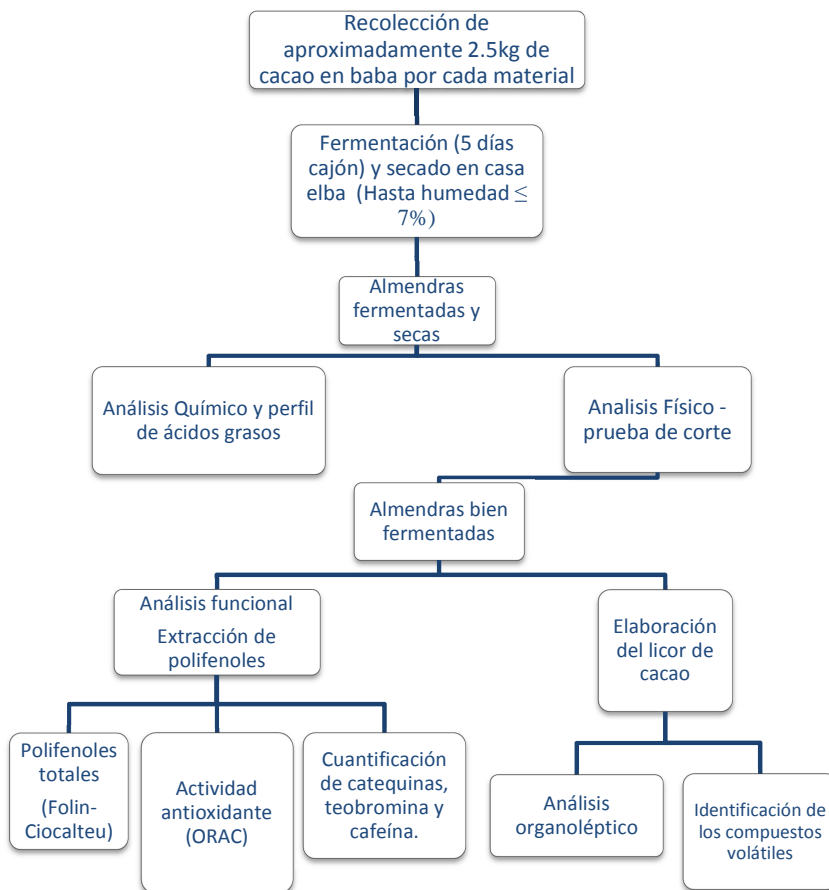
\*\* Testigo comercial universal.

## 2.2 DISEÑO METODOLÓGICO

El desarrollo de los objetivos planteados se llevó a cabo a través del diseño metodológico mostrado en el **Diagrama 1**. En la primera etapa del diseño se realizaron los procesos de recolección y beneficio de las muestras. Posteriormente las muestras se separaron en dos grupos. Sobre el primero de estos grupos se hicieron los análisis físicos y el segundo grupo fue empleado para los análisis químicos, funcionales y organolépticos.

## 2.3 MUESTREO Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

De cada material se recolectaron aproximadamente 2.5kg de cacao en baba. Los frutos recolectados y desgranados se sometieron a un proceso de microfermentación. El cacao a fermentar o masa de cacao se puso en sacos de nylon de 45cm de largo x 25 cm de ancho y se ubicó en una masa de aproximadamente 150kg de almendras frescas. La fermentación se llevó a cabo durante cinco días utilizando un cajón de madera, y realizado la remoción de la masa cada 24 horas, según lo establecido por Perea et al., [19]. Posteriormente los granos fermentados se secaron en casa elba a temperatura ambiente hasta alcanzar un contenido de humedad igual o menor a 7%, según la norma NTC 1252.



**Diagrama 1.** Diseño metodológico para la caracterización fisicoquímica, funcional y organoléptica de los materiales promisorios de cacao en Colombia.

La muestra se dividió en dos mediante un proceso de cuarteo, la primera se empleó en el análisis químico y la segunda para el análisis físico, funcional y organoléptico. Los granos de cacao de este último grupo se sometieron a una prueba de corte con guillotina, donde se seleccionaron únicamente los granos bien fermentados, con el fin de disminuir la variabilidad de los compuestos antioxidantes y del perfil del sabor, relacionados con el proceso de fermentación. Posteriormente se descascarillaron y mediante cuarteo se tomó al azar la muestra para la medición de polifenoles y de actividad antioxidante y la muestra para la elaboración de los licores de cacao y su posterior evaluación de compuestos

volátiles y del perfil del sabor. Los resultados de los análisis físico-químicos y funcionales se expresaron en base seca.

## 2.4 ANÁLISIS FÍSICO

El análisis físico se realizó según la metodología descrita por la norma técnica colombiana NTC 1252. Se determinó la masa del grano y la cascarilla.

### ✓ Masa del grano

La masa del grano se midió tomando 100 granos de cacao y pesándolos. Se expresó como los gramos de muestra en base seca de 100 granos de cacao ( $\frac{g_{mtra}}{bs}/100$  granos cacao).

### ✓ Cascarilla.

La determinación del contenido de cascarilla se llevó a cabo pesando 100 granos de cacao tomados al azar, descascarillándolos y pesando la cascarilla. El contenido de cascarilla se calculó como:

$$\% \text{ cascarilla} = \frac{\text{Peso grano con cascarilla} - \text{peso grano sin cascarilla}}{\text{Peso grano con cascarilla}} \times 100$$

## 2.5 ANÁLISIS QUÍMICO

### ✓ Cenizas

Las cenizas se determinaron siguiendo el procedimiento descrito en la norma A.O.A.C. 7.009/84 y 942.05/90. Se pesaron aproximadamente 3g de muestra en un crisol de porcelana. El crisol se llevó a una mufla a 550°C durante 4 horas, se dejó enfriar y se pesó. Se calculó el porcentaje de cenizas teniendo en cuenta el peso del residuo.

### ✓ Proteína

La determinación de proteína se realizó siguiendo el método de Kjeldahl-Gunning-Arnold adaptado (Griffin, 1995). Se pesaron 0.5 g de muestra, se depositaron en un tubo Kjeldahl, al cual se añadió una tableta de catalizador y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, se llevó al digestor y se calentó durante 3 horas, luego se dejó enfriar. A la solución obtenida se adicionaron 50 mL de agua destilada y 150 mL de NaOH 32% y se llevó al destilador, para hacer una destilación por arrastre con vapor. El hidróxido de amonio generado se recibió en 50 mL de ácido bórico y 3 gotas de indicador mixto, hasta tener un volumen de destilado de 200mL. El destilado se tituló con HCl 0.1N. Se calculó el porcentaje de nitrógeno y el contenido de proteína utilizando la siguiente relación:

$$\%P = N (total) * 6.25$$

#### ✓ Fibra cruda

La fibra cruda se determinó a partir de la muestra desengrasada. La muestra desengrasada fue transferida a un vaso de digestión de 600ml al cual se le adicionaron 100 mL de ácido sulfúrico al 1.25% y 5 gotas de alcohol isoamílico (antiespumante) y se dejó hervir por 30 minutos. Seguidamente se filtró al vacío y se lavó con agua destilada caliente hasta un pH neutro. El residuo obtenido se regresó al vaso de digestión y se adicionaron 100 mL de NaOH al 1.25% y 5 gotas de alcohol isoamílico antiespumante. Se dejó hervir por 30 minutos y se filtró en papel de filtro cuantitativo previamente pesado, se lavó hasta pH neutro y se llevó a una estufa por 2 horas, se dejó enfriar y se pesó (peso A). El residuo obtenido se calcinó a 550°C durante 4 horas, se dejó enfriar y se pesó (peso B). El porcentaje de fibra se calculó como:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{\text{Peso A} - \text{Peso B}}{P_{mi}} \times 100$$

Dónde  $P_{mi}$  = Peso inicial de la muestra.

#### ✓ Grasa

Para determinar la grasa se empleó el procedimiento descrito en la norma A.O.A.C. 7.060/84 y 920.39/90 adaptados. Se tomaron 2 g de muestra seca y se hidrolizaron durante 15 minutos con 50 mL de una solución de HCl 1: 2,5. Posteriormente se filtraron, y el residuo obtenido se lavó hasta fin de cloruros y se secó a 105 °C durante 2 horas. Seguidamente se extrajo la grasa con hexano en un extractor Soxhlet durante 7 horas, al cabo de las cuales se removió el solvente para calcular el contenido de grasa. La muestra desengrasada se guardó para el análisis de fibra.

#### ✓ Perfil de ácidos grasos

El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo mediante la obtención de sus metilésteres y cuantificación por cromatografía de gases, según las normas ISO 5509 y 5508. Como material de referencia certificado se empleó la mezcla *Supelco™ 37 Component FAME Mix, Supelco, Bellefonte, PA, Cat. N° 47885-U*. El análisis cromatográfico de la muestra se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) 7890A (*Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.*), con detector de ionización en llama (FID). En el análisis se empleó la columna HP-88 (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) [88%-cianopropil)aril-polisiloxano, 60m x 0.25mm x 0.20µm]. La inyección se realizó en modo *Split* (10:1) ( $V_{iny}$ : 2µL).

## 2.6 ANÁLISIS FUNCIONAL

### 2.6.1 Extracción polifenoles totales, flavonoides y metilxantinas

La extracción de los polifenoles, flavonoides y metilxantinas, se realizó según la metodología propuesta por Cadena y Herrera (2008). Se tomó una muestra representativa de granos bien fermentados y secos y se homogenizaron. Se pesaron  $1\pm 0,5$ g de la muestra molida, a partir de los cuales se realizó el desengrasado y la extracción. Para remover el material lipídico, se realizaron tres extracciones sucesivas con 10mL de hexano, usando baño ultrasónico, durante 15 minutos. Los polifenoles se obtuvieron de la muestra desengrasada, realizando tres extracciones sucesivas con 20mL etanol/agua 80:20 v/v, a 60°C, durante 15 minutos. Se concentraron los sobrenadantes colectados durante la extracción por rotaevaporación y se llevaron a un volumen final de 25mL en etanol/agua 50:50. Los extractos se almacenaron protegidos de la luz, a 5°C, por un tiempo no superior a 5 días.

### 2.6.2 Cuantificación de Polifenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Se empleó el ensayo de Folin-Ciocalteu propuesto por Wollgast [20]. 50  $\mu$ l de extracto y 1,5 ml de reactivo de Folin diluido diez veces se mezclaron en un tubo de ensayo y después de 5 min se adicionaran 1,5 ml de carbonato de sodio 7,5%. Los tubos se guardaron en la oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente y seguidamente se leyó la absorbancia de las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro, usando como blanco una mezcla del reactivo y agua. Como sustancia patrón para realizar la curva de calibración se empleó el ácido gálico, con diluciones entre 0,2 y 1,8mg/mL. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico sobre gramos de muestra en base seca (mg AG/g<sub>ms</sub>).

### 2.6.3 Cuantificación de flavonoides y metilxantinas por HPLC.

Para la cuantificación de estos compuestos se siguió la metodología validada en el CICTA, desarrollada con base en los procedimientos descritos por Tomas-Barbarán et al., Volsca et al., Chinela et al., y Sumo y Bordo [21, 22, 23, 24]. La identificación y cuantificación de los compuestos funcionales se efectuó a través de un sistema HPLC (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU) controlado por el software *Chem Station*, equipado con una columna en fase reversa (Zorbax Eclipse XDB de medidas 150 mm X 2.1 mm) con tamaño de partícula de 5 $\mu$ m, acoplado a detectores de arreglo de diodos y de fluorescencia. Se emplearon estándares externos y sus respectivas curvas de calibración: (-) epicatequina, (+) catequina, teobromina y cafeína. La cuantificación de la teobromina y la cafeína se efectuó a 275nm, y para la catequina y la epicatequina se llevó a cabo a 280 nm. La catequina y epicatequina también se cuantificaron, empleando detector de fluorescencia, con un  $\lambda$  de 278nm para excitación y un  $\lambda$  de 315nm para emisión.

A continuación se relacionan las condiciones cromatográficas que se emplearon para la separación de las metilxantinas y catequinas.

- Flujo	0.6ml/min
- Solvente A	Agua/ácido fórmico (955 v/v)
- Solvente B	Acetonitrilo.
- Gradiente	0-20 min, 6-10% B; 20-25 min, 10-13% B; 25-30 min, 13-15% B; 30-40 min, 15-10% B; 40-45 min, 10-6% B.
- Temperatura	35°C.
- Reequilibración	10 min

#### 2.6.4 Determinación de actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de las muestras se evaluó empleando el método ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*), siguiendo el procedimiento descrito por Huang et al., [110]. Para realizar los análisis se empleó un espectrofluorímetro Fluorskan Ascent (Thermo Scientific), acondicionado con microplacas. Para llevar a cabo la reacción, 25 µl de extracto fenólico o de la sustancia de referencia (Trolox), junto con una solución de fluoresceína de sodio, se incubaron en los pozos a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 25 µl de la solución de AAPH en cada pozo de la microplaca y se evaluó en el espectrofluorímetro el decaimiento en la señal de fluorescencia minuto a minuto, durante una hora. La  $\lambda$  para la excitación fue 485nm y para la emisión 530nm. Los resultados se calcularon a partir de la diferencia entre el área bajo la curva del blanco (Buffer Fosfato) y de las sustancias antioxidantes (Extracto o Trolox). Para calcular el área neta se empleó la siguiente ecuación:

$$AUC = 0.5 + \frac{f_1}{f_0} + \dots + \frac{f_i}{f_0} + \dots + \frac{f_{34}}{f_0} \dots + 0.5\left(\frac{f_{35}}{f_0}\right)$$

Donde  $f_0$  = lectura de fluorescencia inicial en el minuto 0

$f_1$  = Lectura de fluorescencia en el tiempo  $i$

El área neta ( $AUC_{neta}$ ) se obtuvo como  $AUC_{muestra} - AUC_{blanco}$ . A partir de las áreas netas obtenidas para el Trolox se realizó un curva de calibración, con concentraciones de Trolox entre 3.125 y 50µM. La actividad antioxidante de las muestras se expresó como como concentración micro molar de trolox por gramo de muestra en base seca. (µM Trolox/ g<sub>ms</sub>).

## 2.7 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

Para llevar a cabo los análisis descritos a continuación se emplearon únicamente granos bien fermentados, los cuales fueron seleccionados a partir de la prueba de corte con guillotina. Por cada material se seleccionaron aproximadamente 250g. Se descascarillaron y se tostaron en una estufa de secado Binder (D-78532 Tuttingen / Alemania).

La preparación del licor de cacao se realizó en un molino RESTCH GM-200 a 6000 rpm durante 8 minutos, en sesiones de 2 minutos. Los licores de cacao se almacenaron en frascos de 250ml, de vidrio, con tapa metálica, cubiertos con papel aluminio, a una temperatura 4°C, hasta su análisis (**Figura 7**). La elección de la temperatura y el tiempo de tostado se realizó con una muestra homogénea de nibs de cacao, seleccionados por estar mejor fermentados. Se varió la temperatura entre 112 y 120°C y el tiempo de tostado entre 10 y 15 minutos. Los nibs de cacao tostados se molieron empleando las condiciones descritas anteriormente y los licores de cacao fueron evaluados por una catadora nacional con formación en el Instituto de Investigación Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador (INIAP).

**Figura 7.** Tostador, molino y licor de cacao.



### 2.7.1 Extracción e identificación de los compuestos volátiles de los licores de cacao.

- ✓ ***Diseño experimental para la elección del método de extracción de los compuestos volátiles empleando micro-extracción en fase sólida en el espacio de cabeza.***

La temperatura de extracción de los compuestos volátiles se seleccionó según la literatura reportada [82, 87, 109], en la que se ha indicado que la temperatura óptima es 60°C, ya que a temperaturas menores no se logran extraer todos los compuestos y a temperaturas mayores a 60°C, posiblemente, se forman nuevos compuestos.

Para optimizar el método de extracción y cuantificación de los compuestos volátiles se empleó un diseño experimental de tres niveles con una repetición y 2 factores de variación: el efecto del *salting-out* y el tiempo de extracción, tomando como variable de respuesta la suma total de áreas extraídas.

En la **Tabla 4** se muestra el diseño experimental que se llevará a cabo para optimizar las condiciones de extracción de los compuestos volátiles.

**Tabla 4.** Diseño experimental para optimizar las condiciones de extracción de los compuestos volátiles.

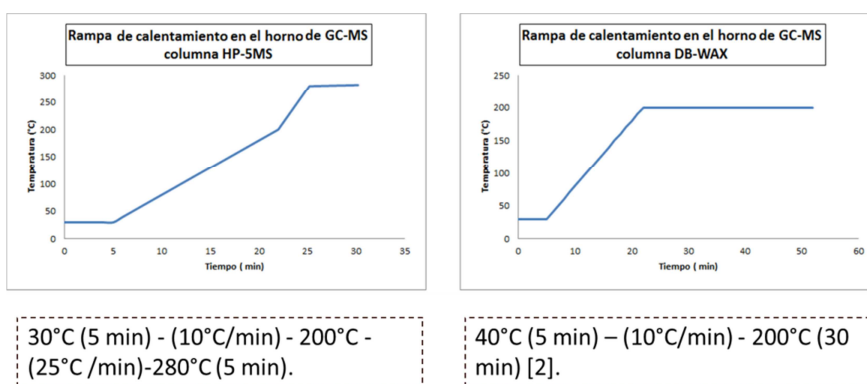
Nº de Experimento	Bloque	<i>Salting-out</i> %p/p	Tiempo (min)
1	1	30	45
2	1	10	45
3	1	0	45
4	1	0	30
5	1	10	30
6	1	10	60
7	1	0	60
8	1	30	30
9	1	30	60
10	2	30	45
11	2	30	30
12	2	0	60
13	2	10	45
14	2	10	30
15	2	0	30
16	2	0	45
17	2	10	60
18	2	30	60

✓ **Separación e identificación de los compuestos volátiles extraídos**

La separación e identificación de los compuestos volátiles y semivolátiles presentes en las muestras se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) 7890A (*Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un espectrómetro de masas (MSD) (*Agilent Technologies* Modelo 5975). La separación de los compuestos se llevó a cabo en dos columnas de polaridad "ortogonal". Se empleó una columna capilar con f.e apolar 5%-fenil poli(metilsiloxano) (HP-5MS, *J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 30m x 0.25 µm, df, y otra columna capilar con f.e polar polietilenglicol (DB-WAX, *J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 30m x 0.25mm, D.I x 0.25µm, df.

La temperatura del inyector (220°C), el modo de inyección (*splitless*) el flujo (1ml/min) y las rampas de calentamiento, para la columna HP-5MS (30°C (5min) – (10°C/min) – 200°C (25°C/min) -280°C (5 min), ( **Figura 8** ) y DB-WAX (40°C (5min) - (10°C/min) -200°C (30 min), (Figura 9) se realizarán según los reportes de la literatura [87, 93]. Se prepararon dos muestras idénticas por cada análisis y se reportó el promedio de sus resultados. Los compuestos volátiles de los licores de cacao se identificaron por comparación de los índices de Kovats calculados con los encontrados en la literatura; también se confrontaron los espectros de masas con los reportados en la librería WILEY 8 y en las bases de datos NIST y SDBS.

**Figura 8.** Rampas de calentamiento en el horno del cromatógrafo.



### 2.7.2 Cuantificación de los compuestos volátiles extraídos.

Se cuantificaron 11 de los compuestos presentes en los licores de cacao evaluados. La cuantificación se realizó por el método de adición estándar. Se efectuó en un cromatógrafo de gases (GC) 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un detector FID. Se emplearon las condiciones seleccionadas para hacer la extracción e identificación de los compuestos volátiles. partir de los promedios de las calificaciones dadas a cada atributo por los evaluadores del panel de cata, se construyeron los perfiles sensoriales para cada material. Todos los análisis de identificación y cuantificación de los compuestos volátiles se realizaron por duplicado.

### 2.8 ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

El análisis organoléptico de los materiales regionales fue realizado por un panel compuesto por 4 catadores expertos (Alexis Zambrano, Gladys Ramos, Álvaro Gómez y Juan Jiménez), pertenecientes al Laboratorio de Calidad Física y Sensorial de Cacao: Cacao Aroma C.A., en Mérida, Venezuela. El análisis se realizó mediante la técnica de análisis descriptivo cuantitativo, utilizando la escala numérica de 0 – 10, siguiendo la metodología de Braudeau y, donde 0 se refiere a un sabor ausente, 1 a 2, intensidad baja, 3 a 5, intensidad media, 6 a 8, intensidad alta y 9 a 10, intensidad muy alta o fuerte [113].

Se cuantificó la intensidad de las siguientes variables asociadas al sabor:

- **Sabores básicos del licor de cacao:** Cacao, ácido, astringente y amargo.
- **Sabores especiales del licor de cacao:** Frutal, floral, nuez, dulce, panela, hierbas secas, foresta, caramelo, y especias.

Los licores de cacao se sirvieron en vasos desechables con tapa, codificados con números de tres dígitos elegidos al azar. Para eliminar los residuos de la boca se usó agua a temperatura ambiente y galletas de soda. Los catadores recibieron muestras de aproximadamente 30 g servidas a 45 °C. Entre la degustación de cada material se dejó un tiempo de 15 minutos. Cada material se analizó 3 veces.

## 2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron analizados inicialmente mediante métodos estadísticos descriptivos (media, desviación estándar, rango y error típico) con el fin de conocer el comportamiento de cada variable.

En la caracterización físico química y funcional las diferencias estadísticamente significativas de los valores encontrados para las variables evaluadas fueron determinadas a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y su clasificación y agrupamiento se hizo empleando dendogramas.

En la caracterización organoléptica se emplearon gráficos radiales para ilustrar el perfil de sabor de cada material y análisis de varianza para identificar grupos de materiales de cacao comparables según los sabores percibidos en los licores. Se aplicó la prueba a posteriori de Tukey [115] que permitió evaluar diferencias significativas entre las medias y las diferencias fueron consideradas a un nivel  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos fueron complementados con los correspondientes diagramas de caja. Se realizó el análisis de conglomerados para agrupar los materiales tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos, y para ello se usó el método de Ward y la distancia Euclidiana cuadrada.

Se efectuó un análisis de correlación lineal de Pearson entre los compuestos volátiles cuantificados y los resultados del perfil del sabor con el propósito de identificar si existen relaciones entre estas variables.

Los programas empleados para llevar a cabo el análisis estadístico fueron INFOSTAT versión 2011 [114], *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 18.0) y STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.1.11.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación se relacionan los resultados obtenidos presentados de acuerdo al tipo de análisis. En primer se presentan los resultados de los análisis físicoquímicos, en segundo lugar los resultados del análisis funcional y en tercer lugar los correspondientes al análisis organoléptico. Finalmente se muestra una correlación de los resultados obtenidos.

#### 3.1 ANÁLISIS FÍSICO

##### 3.1.1 Masa del grano

En la **Tabla 5** se presenta la clasificación según la masa (masa de cacao por cada 100 granos) obtenida para cada material. Dentro de los resultados encontrados resalta el material SCC 61 con una masa de grano superior a 200g y el material FLE 2 con una masa de grano superior a 170g.

**Tabla 5.** Clasificación de la masa de grano de los materiales más comerciales de cacao en Colombia.

Masa de grano (gmtra-bs/100 granos de cacao)	Materiales
Alto ( $\geq 170$ )	FLE 2 y SCC 61
Medio (140 – 160)	EET 96*, FTA 2, FSV 25, FSV 155, FSA 13.
Bajo (< 130)	CAU 39

\* *Material de referencia*

Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar para n=3.

En la **Figura 9** se presenta un ejemplo comparativo de los tamaños de grano encontrados en este trabajo.

**Figura 9.** Clasificación de los materiales de cacao colombiano según el tamaño de grano.



Al examinar la calidad de un material, la masa de grano es una de las características más importantes. Según la norma técnica colombiana NTC 1252, para la comercialización del cacao fermentado y seco tipo premio, este debe presentar una masa de grano superior a 120g/100 granos

[108]. Excepto el material CAU 39, todos los materiales presentaron masas de grano superiores a la exigida por la norma. Además, los valores encontrados para la masa del grano del cacao en los materiales regionales promisorios colombianos mostraron mayores masas de grano reportadas a las de Ecuador, Costa Rica y México [105, 106, 107].

### 3.1.2 Cascarilla

En la **Tabla 6** se muestra la clasificación de los materiales regionales promisorios según el contenido de cascarilla expresado en forma porcentual. Esta clasificación se realizó a partir de análisis estadístico por dendogramas usando el método de agrupamiento del vecino más próximo y de la prueba de Kruskal-Wallis.

**Tabla 6.** Clasificación de materiales de cacao por contenido de grasa en Colombia.

% Cascarilla	Materiales
Alto (>13%)	FTA 2, CAU 39
Medio (11-12%)	EET 96, FLE 2, FSA 13, FSV 155, FSV 25
Bajo (<11%)	SCC 61

\* *Material de referencia*

Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar para  $n=3$ .

Aunque no existe un valor normalizado para la comercialización de la cascarilla, la industria prefiere aquellos materiales con bajos contenidos de cascarilla (11 – 12%) y mayor porcentaje de almendra [12]. Dentro de los materiales evaluados el material SCC 61 mostró el menor contenido de cascarilla y los materiales FTA 2 y CAU 39 presentaron los valores más altos en cuanto al contenido de cascarilla. Para los materiales FLE 2, FSA 13, FSV 155 y FSV 25 se encontraron valores similares al material de comparación EET 96.

## 3.2 ANÁLISIS QUÍMICO

### 3.2.1 Cenizas

En la **Figura 10** y en la

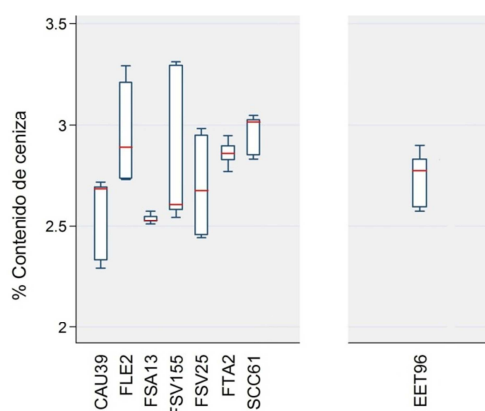
**Tabla 7** se pueden apreciar, respectivamente, los diagramas de cajas y los resultados promedio del contenido de cenizas de los materiales evaluados. En la gráfica se muestra una gran variabilidad entre los materiales, con excepción del clon FSA 13, cuyo coeficiente de variación estuvo en 0,13. En los otros materiales coeficiente de variación estuvo entre 2,1% (FTA 2) y 13,1% (FSV 155).

En la

**Tabla 7** se muestran los resultados del análisis de cenizas, los cuales variaron entre  $2,54 \pm 0,02$  y  $2,97 \pm 0,10$ . Los valores de los materiales CAU 39, FSA 13 y FSV 25 fueron menores que los valores obtenidos para el material EET 96, mientras que los resultados de los materiales FLE 2, FSV 155, FTA 2 y SCC 61 fueron mayores.

Por otra parte, al comparar los resultados del análisis de cenizas en este trabajo con los reportados en la literatura se encuentran valores inferiores en el contenido de cenizas determinado para otros materiales regionales colombianos. Por ejemplo, Perea ), en una caracterización fisicoquímica de materiales de cacao colombiano, reportaron valores para el contenido de cenizas entre 2,7 y 4,2 [19]. Otro estudio en el que se determinó la composición química de granos de cacao provenientes de Ghana, encontró que los granos de cacao procesados en condiciones similares a las empleadas en Colombia presentaron un contenido de cenizas de 2,9 [25].

**Figura 10.** Diagrama de cajas para la variable cenizas.



**Tabla 7.** Contenido de cenizas (%) de los materiales regionales de cacao.

<b>MATERIAL VEGETAL</b>	<b>Media (%)</b>
<b>CAU-39</b>	2,57 ± 0,20
<b>FLE-2</b>	2,96 ± 0,24
<b>FSA-13</b>	2,54 ± 0,02
<b>FSV-155</b>	2,83 ± 0,37
<b>FSV-25</b>	2,70 ± 0,23
<b>FTA-2</b>	2,86 ± 0,06
<b>SCC-61</b>	2,97 ± 0,10
<b>EET-96*</b>	2,74 ± 0,13

\* *Material de referencia*

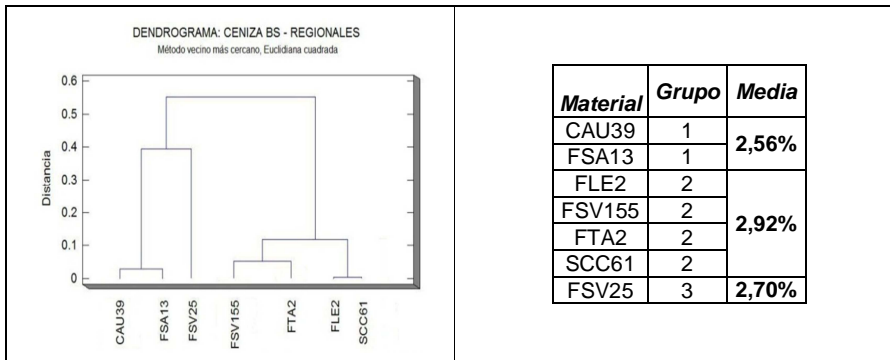
Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar para  $n=3$ .

Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis con un valor  $p = 0,0000014$  se establece que el tipo de material influye en el contenido de ceniza expresado en BS, por lo tanto, se prosigue con la clasificación, encontrándose que entre los materiales evaluados, el grupo 1, de menor contenido de ceniza BS, está conformado por los clones CAU-39, FSA-13 con media de 2,56%. El grupo 3 de contenido medio de ceniza está conformado por el clon FSV-25 con 2,7%, y los demás conforman el grupo 2 de mayor contenido de ceniza BS. Los materiales regionales FLE 2, FSV 155, FTA 2 y SCC 61 mostraron contenidos de cenizas mayores que el material de referencia EET 96 (**Tabla 8**).

En cuanto a las medias se estableció que dentro de los grupos no fueron estadísticamente significativas, sin embargo, de un grupo a otro sí las hay, pudiéndose entonces clasificar los materiales según el contenido de ceniza BS en:

- ✓ Mayor contenido de ceniza: FLE 2, FSV 155, FTA 2 y SCC 61.
- ✓ Menor contenido de ceniza BS: CAU 39 y FSA 13.
- ✓ Contenido medio de ceniza BS: FSV 25.

**Tabla 8.** Dendrogramas y subgrupos para CENIZA BS según el origen.



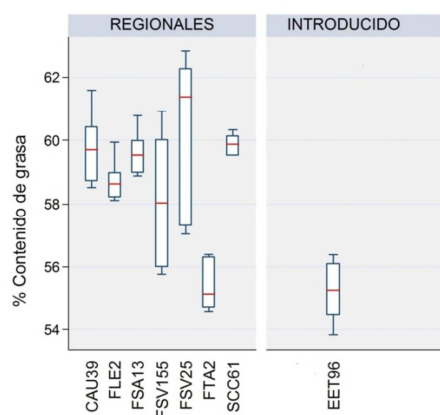
### 3.2.2 Grasa

En la **Figura 11** se puede apreciar el diagrama de cajas del contenido de grasa. Se encuentra que los coeficientes de variación para esta variable oscilaron entre el 1,1 y el 4,2%, siendo el material FSV 155 el que presenta el mayor coeficiente de variación.

En la **Tabla 9** los resultados del análisis del contenido de grasa (%) de los materiales de cacao presentan valores que oscilan entre 55,23 y 60,37. Los

valores reportados para el contenido de grasa de materiales venezolanos y de Ghana, en base seca, están entre 50,21 y 56,94 respectivamente [25, 26]. En este trabajo los materiales CAU 39, FLE 2, FSA 13, FSV 25 y SCC 61 mostraron valores de contenido de grasa más altos que los resultados reportados en análisis anteriores, lo cual sugiere que estos materiales poseen un valor agregado por su alto contenido de manteca de cacao.

**Figura 11.** Diagrama de caja para la variable grasa.



**Tabla 9.** Contenido de grasa (%) de los materiales regionales de cacao.

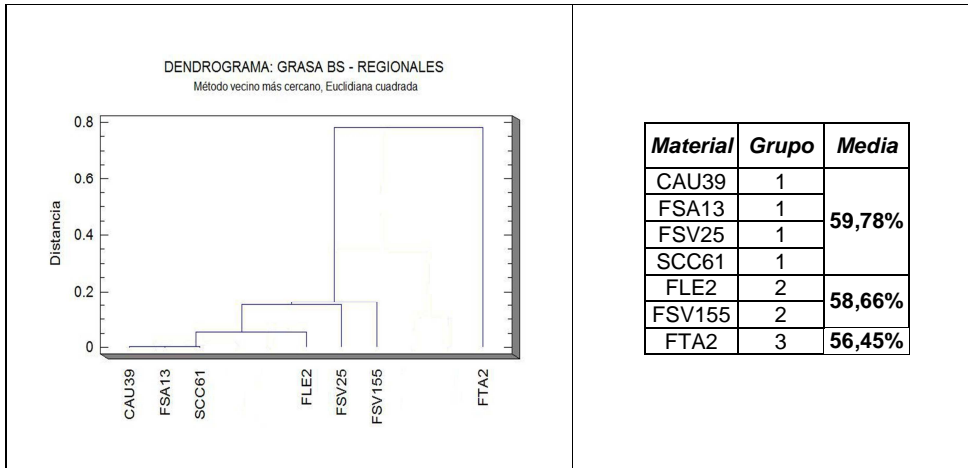
<b>REGIONALES</b>	<b>Media(%)</b>
<b>CAU39</b>	59,77 ± 1,16
<b>FLE2</b>	58,75 ± 0,67
<b>FSA13</b>	59,61 ± 0,71
<b>FSV155</b>	58,13 ± 2,08
<b>FSV25</b>	60,37 ± 2,54
<b>FTA2</b>	55,38 ± 0,78
<b>SCC61</b>	59,69 ± 0,69
<b>EET96*</b>	55,23 ± 1,05

Los resultados se expresan como el valor promedio ± desviación estándar para n=3.

\* *Material de referencia*

Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis con un valor\_p nulo se encontró que los materiales de cacao influyen en el contenido de grasa, pudiendo así clasificar los materiales evaluados en tres grupos, tal como se señala en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Dendograma y grupos para el contenido de grasa según el origen.



Dado que las medias dentro de cada grupo fueron homogéneas y las diferencias entre los grupos significativas, los materiales según el contenido de grasa se clasificaron en:

- ✓ Mayor contenido de grasa: CAU 39, FSA 13, FSV 25 y SCC 61.
- ✓ Contenido medio de grasa: FLE 2 y FSV 155.
- ✓ Menor contenido de grasa: FTA 2.

### 3.2.2.1 Composición de la manteca de cacao.

La composición de la manteca de cacao brinda información importante sobre la calidad de la grasa de cada uno de ellos. En este trabajo en las grasas de todos los materiales evaluados se encontró una mayor cantidad de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) que de insaturados (oleico y linoleico), con una proporción 2:1 (

**Tabla 11).** Esta proporción permite precisar que la grasa de todos los materiales es tipo “manteca dura o semidura”, lo cual coincide con los resultados reportados para el cacao colombiano [19].

Adicionalmente, el análisis estadístico por conglomerados según la similitud de los ácidos grasos, permitió clasificar los materiales de cacao colombiano en dos grupos. (**Tabla 12).**

**Tabla 11.** Variación de la composición de ácidos grasos de materiales regionales de cacao

Material	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	ΣAGS	ΣAGI
CAU 39	26,1±0,1	36,0±0,3	32,4±0,2	3,3±0,1	63,6±0,3 <sub>b</sub>	35,9±0,30 <sub>b</sub>
FTA 2	27,2±0,4	35,5±0,3	32,3±0,3	2,5±0,1	64,3±0,5 <sub>b</sub>	35,0±0,51 <sub>b</sub>
FLE 2	27,5±0,1	34,5±0,5	33,1±0,1	2,8±0,3	63,6±0,6 <sub>b</sub>	36,1±0,39 <sub>b</sub>
FSA 13	27,6±0,6	35,4±0,2	32,6±0,2	2,4±0,1	64,5±0,4 <sub>b</sub>	35,2±0,28 <sub>b</sub>
FSV 155	27,9±0,4	33,4±0,4	33,5±0,1	2,7±0,1	63,0±0,4 <sub>c</sub>	36,3±0,22 <sub>a</sub>
FSV 25	28,1±1,4	35,7±0,8	32,0±1,6	1,6±0,7	<b>65,6±2,2<sub>a</sub></b>	33,7±2,28 <sub>c</sub>
SCC 61	26,2±1,0	35,9±1,1	32,9±0,3	2,9±0,1	63,9±0,2 <sub>b</sub>	36,0±0,37 <sub>b</sub>
EET 96*	27,7±1,1	35,6±0,3	32,0±1,5	2,2±0,1	<b>65,1±1,4<sub>a</sub></b>	34,4±1,5 <sub>c</sub>

\* Material de comparación. Ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0); oleico (C18:1); linoleico (C18:2); ΣAGS (Sumatoria de ácidos grasos saturados); ΣAGI (sumatoria de ácidos grasos insaturados). Los resultados se presentan como la media ± desviación estándar para n=6. Las medias de diferentes letras indican diferencias significativas para p≤0,05.

**Tabla 12.** Clasificación de materiales según composición del perfil de ácidos grasos.

Grupo	Materiales	Composición promedio de ácidos grasos (%)	
1	CAU 39, FLE 2, SCC 61	Palmítico	<b>26,6</b>
		Esteárico	<b>35,5</b>
		Oleico	<b>32,8</b>
		Linoleico	<b>3,0</b>
2	EET 96, FTA 2, FSA 13, FSV 155, FSV 25,	Palmítico	<b>28,0</b>
		Esteárico	<b>34,7</b>
		Oleico	<b>32,5</b>
		Linoleico	<b>2,3</b>

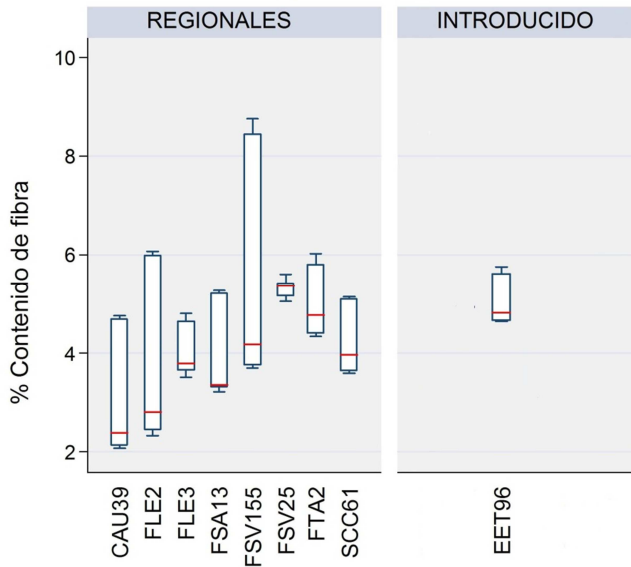
Clasificación realizada a partir de análisis estadístico de conglomerados.

### 3.2.3 Fibra

En la **Figura 12** se muestra el diagrama de cajas que refleja la evolución del contenido de fibra en los materiales evaluados, en él se puede apreciar que los materiales regionales presentan coeficientes de variación que oscilan entre 3,6%

(FSV-25) y 47,7% (FLE-2), siendo este último el de mayor coeficiente de variación entre todos, seguido en orden descendente por el coeficiente de variación 43,8% del material FSV-155.

**Figura 12.** Diagrama de caja del contenido de fibra.



En cuanto al contenido de fibra ( **Tabla 13**) los valores oscilaron entre 3,07% para el material CAU 39 y 5,50% para el material FSV 155. En la caracterización de materiales de cacao colombianos, realizada por Perea et al., se reportaron valores entre  $1,5 \pm 0,1$  y  $4,1 \pm 0,1$ %. En este trabajo el contenido de fibra de los materiales FSV 155, FSV 25, FTA 2 y SCC 61 fue mayor que los el que se reportó en dicho trabajo [19].

**Tabla 13:** Contenido de fibra (%) de los materiales regionales de cacao.

REGIONALES	Desviación
<b>CAU39</b>	3,07 ± 1,29
<b>FLE2</b>	3,73 ± 1,78
<b>FSA13</b>	3,95 ± 1,00
<b>FSV155</b>	5,50 ± 2,41
<b>FSV25</b>	5,32 ± 0,19
<b>FTA2</b>	5,01 ± 0,72

<b>SCC61</b>	4,24 ± 0,70
<b>EET96*</b>	5,05 ± 0,50

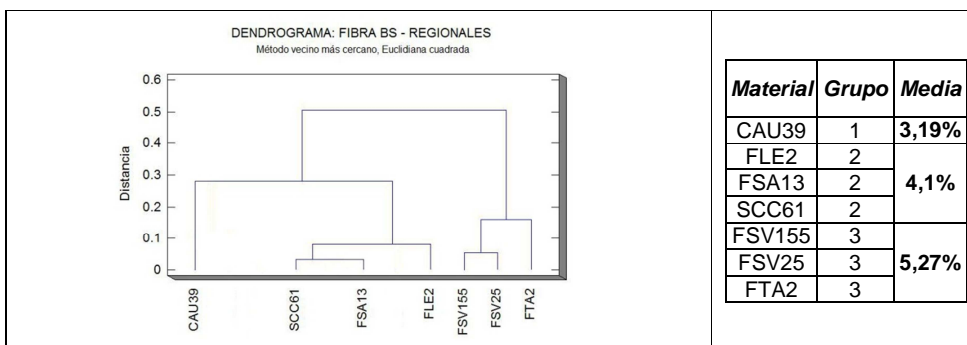
Los resultados se expresan como el valor promedio ± desviación estándar para n=3.

\* Material de referencia

La clasificación de estos materiales luego de ser aplicada la prueba de Kruskal-Wallis (valor\_p = 0,000042) permitió clasificarlos como se muestra en la **Tabla 14** en:

- ✓ Mayor contenido de fibra: FSV 155, FSV 25 y FTA 2.
- ✓ Menor contenido de fibra: CAU 39.
- ✓ Contenido medio de fibra: FLE 2, FSA 13 y SCC 61.

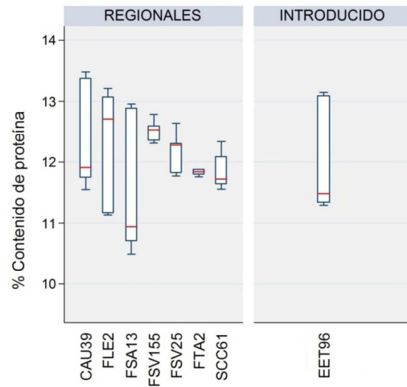
**Tabla 14.** Dendrograma y grupos para el contenido de fibra según el origen.



### 3.2.4 Proteína

En la **Figura 13** se muestra el diagrama de caja para los materiales de cacao regionales según la variable proteína BS. Para esta variable los coeficientes de variación oscilaron entre 1% (FTA 2) y 9,7% (FSA 13).

**Figura 13.** Diagrama de caja del contenido de proteína.



En la **Tabla 15** se muestran los resultados del contenido de proteína de los materiales regionales de cacao, observándose que oscilan entre  $11,49 \pm 1,12$  y  $12,52 \pm 0,18\%$ . Estos valores son inferiores a los reportados por otros autores, quienes han encontrado resultados de:  $15,92 \pm 0,92\%$  para materiales de cacao de Ambaja, Sambirano y Madagascar [27] y  $18,8 \pm 0,56$  para materiales de cacao provenientes de Ghana. De igual forma el contenido de proteína de otros materiales de cacao colombianos ha sido superior a los encontrados para los materiales evaluados en este trabajo [19].

Para la variable contenido de proteína, la prueba de Kruskal-Wallis tiene una significancia de 0,00024 por consiguiente se rechaza la hipótesis nula y se concluye que el contenido de proteína depende directamente del tipo de material.

**Tabla 15.** Contenido de proteína (%) de los materiales regionales de cacao.

REGIONALES	Media	Desviación
CAU39	12,33	$\pm 0,87$
FLE2	12,33	$\pm 0,94$
FSA13	11,49	$\pm 1,12$
FSV155	12,52	$\pm 0,18$
FSV25	12,18	$\pm 0,33$
FTA2	11,88	$\pm 0,15$
SCC61	11,84	$\pm 0,30$
EET96*	11,97	$\pm 0,89$

Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar para  $n=3$ .

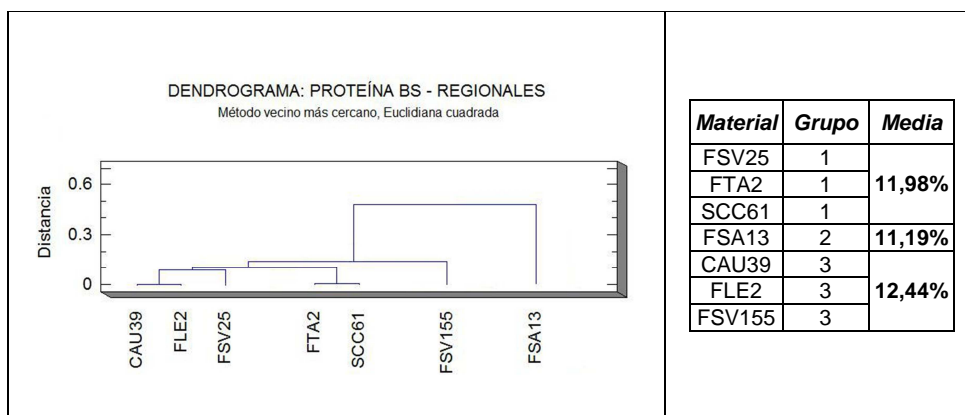
\* Material de referencia

En la **Tabla 16** se muestra el dendograma y la clasificación de los materiales en cuanto a esta variable. Corroborada la conformación de estos grupos con la

prueba de Kruskal-Wallis (valor\_p= 0,0011) los materiales según el contenido de proteínas y su origen se pueden clasificar en:

- ✓ Mayor contenido de proteína: CAU 39, FLE 2 y FSV 155.
- ✓ Menor contenido de proteína: FSA 13.
- ✓ Contenido medio de proteína: FSV 25, FTA 2 y SCC 61.

**Tabla 16:** Dendrograma y de los materiales regionales según el contenido de proteínas.



Tomando en cuenta los resultados y análisis presentados anteriormente, se puede concluir que los materiales evaluados presentan diferencias significativas entre sí en cuanto a sus propiedades físicas y químicas. Es así que en la mayoría de variables examinadas las diferencias dieron lugar a la conformación de grupos estadísticamente distintos. Sin embargo, estos grupos difieren entre sí según la característica analizada.

### 3.3 ANÁLISIS FUNCIONAL

#### 3.3.1 Determinación de polifenoles totales

En esta sección se presentan los resultados de la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en las semillas de cacao fermentado de los 7 materiales regionales evaluados y del material de comparación EET 96. El análisis estadístico mostró diferencias significativas para esta variable y así permitió su clasificación en tres grupos (**Tabla 17**). El grupo **a**, formado por el material FSV 155 con alto contenido de polifenoles (29.00 mg EAG/g<sub>ms</sub>), el grupo **b** con el material EET 96 mostró un contenido intermedio (24mg EAG/g<sub>ms</sub>), y el grupo **c** con los materiales CAU 39, FLE 2, FSA 13, FSV 25, FTA 2 y SCC 61, presentó los menores contenidos de polifenoles (19,00 – 23,00mg EAG/g<sub>ms</sub>). Es importante resaltar que el único material que superó en contenido de polifenoles al material comercial EET 96 fue el FSV 155, mientras que los otros materiales regionales mostraron bajos contenidos de polifenoles.

En los diagramas de cajas de la **Figura 14** se puede observar la dispersión, simetría o asimetría de los resultados de la cuantificación de polifenoles totales. Según se muestra en esta figura, los valores del contenido de polifenoles totales oscilaron entre 19,00 y 29,00mg/ EAG/g<sub>ms</sub>, para los materiales FTA 2 y FSV 155 respectivamente.

Considerando la simetría de población, los materiales FSV 25 y FTA 2 son simétricos porque la media aritmética coincide con la mediana, lo cual sugiere que los datos obtenidos para cada material (n = 3) son homogéneos y presentan poca variabilidad.

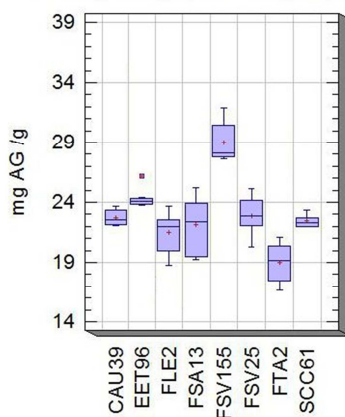
**Tabla 17.** Contenido de polifenoles totales en semillas fermentadas de materiales regionales de cacao.

<i>Material</i>	<i>Polifenoles mg EAG/g</i>
<b>CAU39</b>	23.00±0.67 <sub>c</sub>
<b>FLE2</b>	21.00±1.80 <sub>c</sub>
<b>FSA13</b>	22.00±2.40 <sub>c</sub>
<b>FSV155</b>	29.00±1.80 <sub>a</sub>
<b>FSV25</b>	23.00±1.70 <sub>c</sub>
<b>FTA2</b>	19.00±1.70 <sub>c</sub>
<b>SCC61</b>	22.00±0.56 <sub>c</sub>

\* Material de referencia. Los resultados se expresan como el valor promedio ± desviación estándar para n=3.

Los materiales CAU 39, EET 96, FSV 155 y SCC 61 presentan una asimetría positiva, con una media aritmética mayor que la mediana. Por el contrario los materiales FLE 2 y FSA 13 son asimétricos negativamente y su media aritmética es menor que la mediana. Esta asimetría podría estar relacionada con variaciones en el proceso de beneficio de los materiales FLE 2 y FSA 13 con respecto a los otros materiales. Aunque se trataron de realizar de la misma manera los tres muestreos, factores como el tiempo que tomó entre la cosecha y las condiciones ambientales en las cuales se realizó la fermentación podrían haber afectado la variación de polifenoles totales en los granos fermentados y secos evaluados.

**Figura 14.** Diagrama de cajas del contenido de polifenoles totales.



El contenido de polifenoles, tanto en los materiales regionales como en el material comercial EET96, se encuentra por debajo de los valores reportados en la bibliografía. El máximo valor para el contenido de polifenoles fue de 29,01mg/g para el material FSV 155, mientras que en la literatura se reportan concentraciones mayores o iguales a 34mg EAG/g [31]. Esto se puede explicar si se tiene en cuenta que los granos que se seleccionaron para realizar el análisis funcional fueron únicamente los que estaban bien fermentados. Según diversos autores durante la fermentación los polifenoles se oxidan por acción de la enzima polifenol oxidasa y por tanto disminuye su concentración [5, 33].

### 3.3.2 Determinación de la actividad antioxidante

A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis de la actividad antioxidante, empleando el método ORAC, en los granos fermentados de materiales de cacao regionales y del patrón de comparación EET 96 (**Tabla 18**). El análisis estadístico de los datos obtenidos reveló que existen diferencias significativas entre los materiales para esta variable, lo que permitió clasificarlos en grupos homogéneos con contenidos altos **a** (655,33  $\mu\text{M Trolox/g}_{\text{ms}}$ ), intermedios **b** (447,00 - 528  $\mu\text{M Trolox/g}_{\text{ms}}$ ) y bajos **c** (365,84 - 378,07  $\mu\text{M Trolox/g}_{\text{ms}}$ ).

**Tabla 18.** Actividad antioxidante en semillas fermentadas de materiales regionales de cacao colombiano.

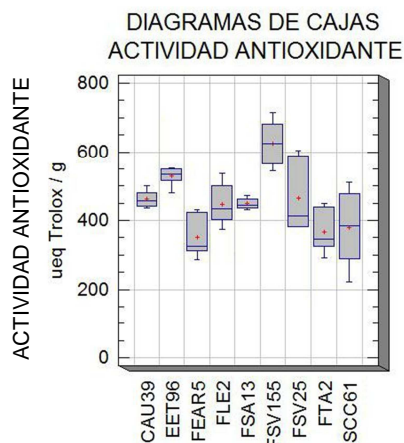
<i>Material</i>	<i>Actividad Antioxidante <math>\mu\text{M Trolox /g}</math></i>
<b>CAU39</b>	462.00±26.00 <sub>b</sub>
<b>FLE2</b>	447.00±61.00 <sub>b</sub>
<b>FSA13</b>	448.00±16.00 <sub>b</sub>
<b>FSV155</b>	625.00±70.00 <sub>a</sub>
<b>FSV25</b>	464.00±104.00 <sub>b</sub>
<b>FTA2</b>	366.00±64.00 <sub>c</sub>
<b>SCC61</b>	365.84±13.00 <sub>c</sub>
<b>EET96*</b>	528.00±26.00 <sub>b</sub>

Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  desviación estándar para n=3.

\* *Material de referencia*

En los diagramas de caja de la variable actividad antioxidante de la **Figura 15** se muestra que la media aritmética de los materiales evaluados oscila entre 365,84 $\mu\text{M Trolox/g}_{\text{ms}}$  (FTA 2) y 625,33 $\mu\text{M Trolox/g}_{\text{ms}}$  (FSV 155). También se presenta la simetría para la variable actividad antioxidante, según la cual los materiales CAU 39, FSA 13, FSV 155 y SCC 61 son simétricos, en tanto que los materiales EET 96, FLE 2, FTA 2 y FSV 25 presentan asimetría positiva.

**Figura 15.** Diagrama de cajas para la actividad antioxidante de las semillas fermentadas de los materiales regionales de cacao.



Crozier et al., empleando el método ORAC compararon la actividad antioxidante de polvo de cacao con la de frutas de reconocida capacidad antioxidante. Los valores reportados por Crozier para la actividad antioxidante de estas frutas fue menor o igual a 400  $\mu\text{M}$  Trolox/ $\text{g}_{\text{ms}}$  [36]. Los valores de la actividad antioxidante del 70% de los materiales regionales de Colombia evaluados en este trabajo son superiores a 400  $\mu\text{M}$  Trolox/ $\text{g}_{\text{ms}}$ , lo que significa que los materiales de cacao colombiano podrían tener potencial en el mercado de los alimentos funcionales. [36].

### 3.3.3 Cuantificación de (+)-catequina, (-) epicatequina y catequinas totales

El contenido de epicatequina, catequina y catequinas totales en semillas fermentadas de materiales regionales de cacao colombiano se presenta en esta sección (Tabla 19). Con base en el análisis estadístico de los resultados de epicatequina se clasificaron en dos grupos: el grupo **a** conformado por el material FSV 155, el máximo valor y el grupo **b** conformado por los materiales que presentaron los menores contenidos de catequina CAU 39, EET 96, FLE 2, FSA 13, FSV 25, FTA 2 y SCC 61.

En la Tabla 19 también se muestra el contenido de catequina. Según los resultados de la composición de catequina en los granos de cacao fermentado, los materiales se clasificaron en tres grupos, el primero, **a**, con el valor más alto de catequina, el material FSV 155, el segundo, **b**, con valores medios de catequina, SCC 61, EET 96, FSA 13 y FSV 25, y en el tercer grupo, **c**, con los menores valores de catequina se encuentran los materiales FTA 2, CAU 39 y FLE 2.

Finalmente en la Tabla 19 se muestran los resultados de catequinas totales, según los cuales los materiales se clasificaron en tres grupos, en el primero de

ellos, **a**, con los resultados más altos se encuentra el material FSV 155, en el segundo grupo, **b**, con resultados intermedios están los materiales CAU 39, FLE 2, FTA 2 y SCC 61, y en el último grupo, **c**, se encuentran los materiales con el menor contenido de catequinas, EET 96, FSA 13 y FSV 25.

En la **Figura 16** se presenta un perfil cromatográfico obtenido a partir de extractos de granos de cacao. La señal correspondiente a la (-)-epicatequina (**A**) y la que corresponde a las (±) – catequina (**B**).

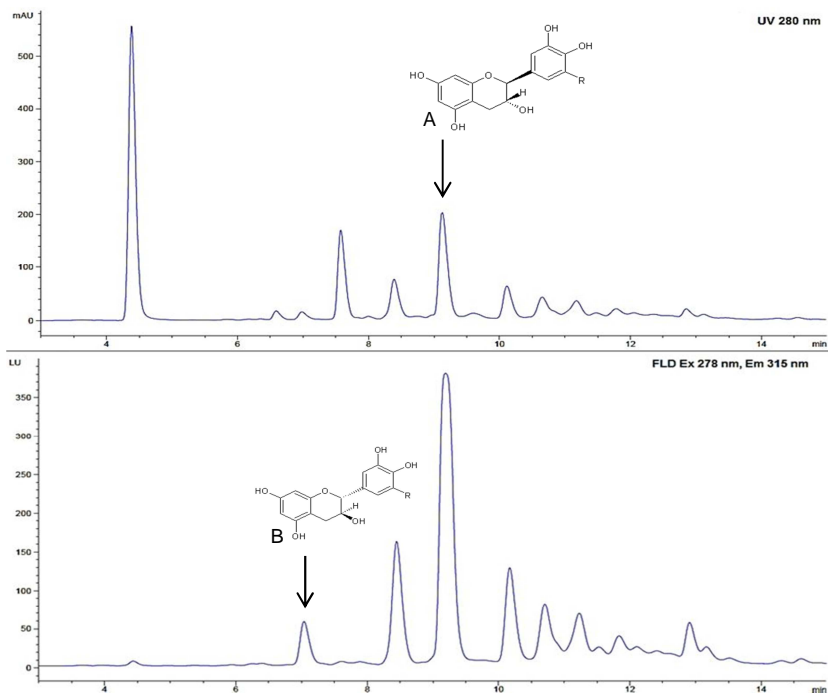
**Tabla 19.** Contenido de epicatequina, catequina y catequinas totales en semillas fermentadas de materiales regionales de cacao colombiano.

<i>Material</i>	<i>Epicatequina mg/g</i>	<i>Catequina mg/g</i>	<i>Catequinas Totales mg/g</i>
<b>CAU39</b>	0.11±0.02 <sub>b</sub>	0.07±0.01 <sub>c</sub>	0.17±0.03 <sub>b</sub>
<b>FLE2</b>	0.10±0.03 <sub>b</sub>	0.07±0.01 <sub>c</sub>	0.17±0.03 <sub>b</sub>
<b>FSA13</b>	0.14±0.02 <sub>b</sub>	0.09±0.01 <sub>b</sub>	0.23±0.02 <sub>c</sub>
<b>FSV155</b>	0.39±0.02 <sub>a</sub>	0.22±0.01 <sub>a</sub>	0.60±0.02 <sub>a</sub>
<b>FSV25</b>	0.13±0.03 <sub>b</sub>	0.10±0.02 <sub>b</sub>	0.23±0.04 <sub>c</sub>
<b>FTA2</b>	0.06±0.03 <sub>b</sub>	0.05±0.01 <sub>c</sub>	0.11±0.05 <sub>b</sub>
<b>SCC61</b>	0.14±0.07 <sub>b</sub>	0.09±0.04 <sub>b</sub>	0.23±0.10 <sub>b</sub>
<b>EET96*</b>	0.15±0.05 <sub>b</sub>	0.13±0.05 <sub>b</sub>	0.27±0.10 <sub>c</sub>

Los resultados se expresan como el valor promedio ± desviación estándar para n=3.

\* *Material de referencia*

**Figura 16.** Perfil cromatográfico de un extracto de granos de cacao: (A) (-)-epicatequina y (B) (±)-catequina.



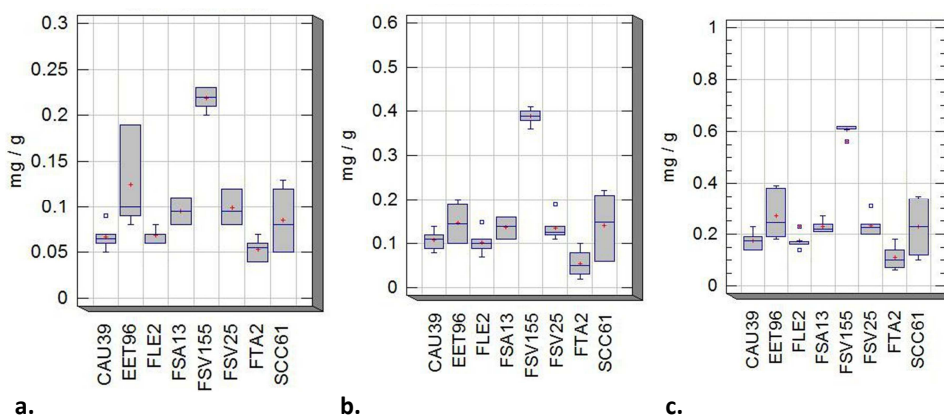
Los resultados encontrados en la determinación de epicatequina en materiales de diferentes regiones del mundo han sido superiores a los que se hallaron en este trabajo. Wollgast reportó para materiales de cacao de Costa de Marfil, Ecuador, Jamaica, Venezuela, Nigeria y Papúa Nueva Guinea valores de contenido de epicatequina entre 2,66 y 10,64mg/g, mientras que Risner reportó valores de 1,909mg/g en granos de cacao proporcionados por *Blommer Chocolate Company*, (Chicago, IL). Esto se explica por la selección única de granos de cacao bien fermentados, donde el contenido de flavonoides como la (±)-epicatequina es inferior [20, 32].

En numerosas investigaciones acerca del contenido polifenólico, la composición de flavonoides y la actividad antioxidante se ha demostrado que estas variables disminuyen a lo largo de la cadena de producción, siendo el proceso de fermentación uno de los más influyentes en la oxidación de los polifenoles [31, 34, 33]. Sin embargo, Hurst y colaboradores encontraron en muestras de cacao proveniente de Papúa Nueva Guinea y Costa de Marfil, valores de epicatequina de 0,56mg/g y 0,66mg/g respectivamente [34], los cuales son similares a los determinados en este trabajo.

En la **Figura 17** se presentan los diagramas de cajas del contenido de catequina, epicatequina y catequinas totales en los materiales regionales y su comparación con el material de referencia, el clon EET 96, originario de Ecuador. En los diagramas de cajas se muestra la dispersión, simetría y asimetría de los resultados. Según se muestra en la **Figura 17a**, los valores del contenido de catequinas oscilaron entre 0,07 y 0,22mg EAG/g<sub>ms</sub>, para los materiales CAU 39 y FSV 155.

Considerando la simetría de población de los datos de concentración de epicatequina, los materiales FSV 155 y FSA 13 son simétricos porque la media aritmética coincide con la mediana, lo cual sugiere que los datos obtenidos para cada material (n = 3) son homogéneos y presentan poca variabilidad. Los materiales CAU 39, EET 96, FLE 2, FSV 25 y SCC 61 presentan una asimetría positiva, con una media aritmética mayor que la mediana. Por el contrario los resultados para el material FTA 2 presentaron asimetría negativa y su media aritmética es menor que la mediana.

**Figura 17.** Diagrama de caja del contenido de: **a.** catequina, **b.** epicatequina, **c.** catequinas totales.



En la **Figura 17b** se muestra la simetría de los resultados del contenido de epicatequina. Los valores oscilaron entre 0,06 y 0,39mg EAG/g<sub>ms</sub> para los materiales FTA 2 y FSV 155 respectivamente. En general, la mayoría de los materiales evaluados mostraron simetría, excepto el material SCC 61, para el que se observó cierto grado de asimetría negativa.

La simetría poblacional de los resultados del análisis de contenido de catequinas totales en los materiales regionales se muestra en la **Figura 17c**. En el diagrama de cajas se observa que la composición de catequinas totales en los materiales regionales varió entre 0,11 y 0,60 EAG/g<sub>ms</sub>. Los materiales CAU 39 y SCC 61 mostraron ser simétricos, mientras que los materiales EET 96, FLE 2, FSA 13, y FTA 2 presentaron asimetría positiva y para el material FSV 155 se encontró asimetría positiva.

### 3.3.4 Determinación del contenido de cafeína y teobromina.

A continuación, en la Tabla 20, se presentan los resultados del contenido de cafeína y teobromina en los granos de cacao de los materiales de cacao regionales. Los resultados encontrados para estas variables se clasificaron en grupos homogéneos con diferencias estadísticas.

**Tabla 20.** Contenido teobromina, cafeína y relación teobromina/cafeína en los granos de cacao fermentados.

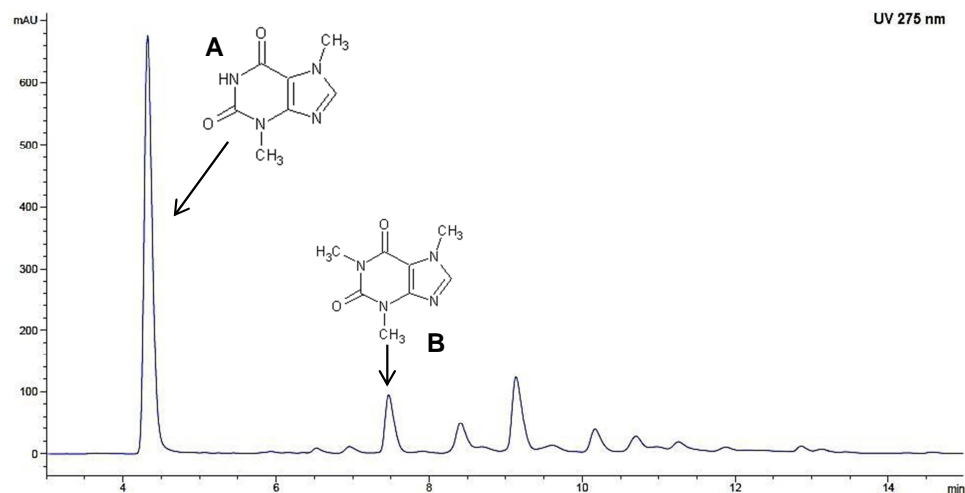
<i>Material</i>	<i>Teobromina mg/g</i>	<i>Cafeína mg/g</i>	<i>Teobromina /Cafeína</i>
<b>CAU39</b>	11.00±0.49 <sub>a</sub>	1.80±0.12 <sub>c</sub>	5.70±0.4 <sub>a</sub>
<b>FLE2</b>	8.00±0.63 <sub>b</sub>	2.80±0.87 <sub>b</sub>	3.00±0.74 <sub>b</sub>
<b>FSA13</b>	8.60±1.60 <sub>b</sub>	1.50±0.41 <sub>c</sub>	6.10±2.10 <sub>a</sub>
<b>FSV155</b>	8.90±0.23 <sub>a</sub>	3.40±0.25 <sub>a</sub>	2.60±0.15 <sub>b</sub>
<b>FSV25</b>	8.70±0.28 <sub>b</sub>	1.70±0.25 <sub>c</sub>	5.20±0.72 <sub>a</sub>
<b>FTA2</b>	8.20±1.50 <sub>b</sub>	1.70±0.68 <sub>c</sub>	5.30±2.00 <sub>a</sub>
<b>SCC61</b>	8.50±1.10 <sub>b</sub>	1.70±0.33 <sub>c</sub>	5.30±0.20 <sub>a</sub>
<b>EET96*</b>	9.10±0.92 <sub>a</sub>	1.90±0.38 <sub>c</sub>	4.80±0.54 <sub>a</sub>

Los resultados se expresan como el valor promedio ± desviación estándar para n=3.

\* *Material de referencia*

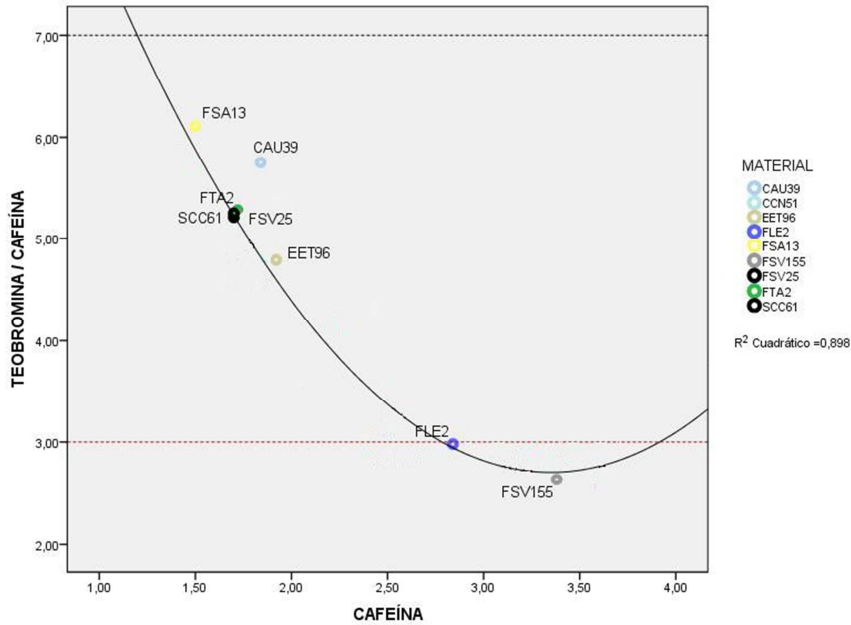
En la **Figura 18** se muestra el perfil cromatográfico de un extracto de granos de cacao regionales. Se muestran las señales correspondientes a la cafeína y la teobromina.

**Figura 18.** Perfil cromatográfico de un extracto de granos de cacao: (A) teobromina y (B) cafeína.



A partir de la relación teobromina/cafeína evaluada en los materiales de cacao, se estableció la correlación con el contenido de cafeína (**Figura 19**). Mediante este gráfico se puede inferir que la relación teobromina/cafeína en todos los materiales se encuentra entre 3 y 8, es decir, presentan valores típicos de grano trinitario, excepto el FSV 155 y FLE 2 que tienen valores menores de 3, acercándose por su características más a un material tipo criollo. El material EET 96, el cual se empleó como patrón de comparación también pertenece al grupo de los materiales trinitarios.

**Figura 19.** Relación teobromina/cafeína vs concentración de cafeína para 7 materiales regionales de cacao colombiano.



### 3.4 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

#### 3.4.1 Extracción e identificación de los compuestos volátiles.

##### 3.4.1.1 Resultados del diseño experimental para elegir las condiciones de extracción de los compuestos volátiles empleando micro-extracción en fase sólida.

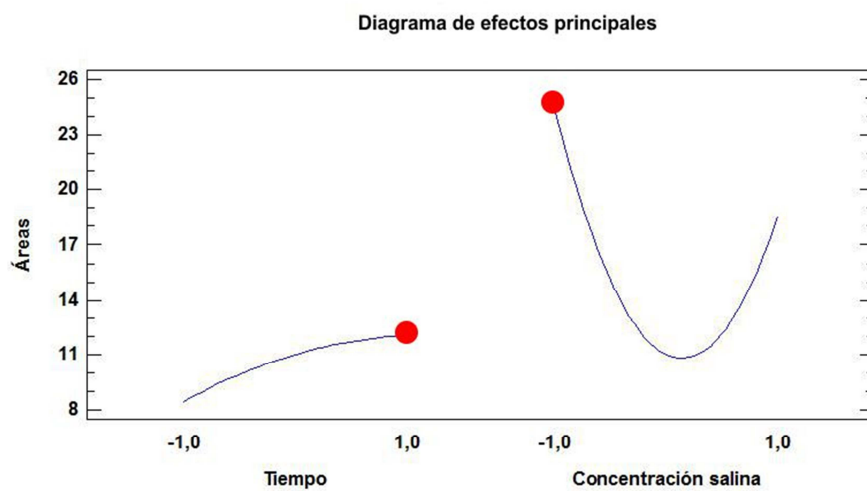
Para realizar la identificación de los compuestos volátiles presentes en los licores de cacao y su respectiva cuantificación, se eligieron las condiciones de extracción de los compuestos volátiles empleando micro-extracción en fase sólida en el espacio de cabeza. En la **Tabla 21** se muestran los resultados obtenidos de la aplicación del diseño experimental.

En la **Figura 20** se presenta el diagrama de efectos principales, en el cual se muestra la influencia que tienen las variables en forma individual sobre la variable de respuesta. Para la variable tiempo, el efecto máximo se obtiene con el nivel 1, correspondiente a 60 minutos, mientras que para la variable concentración salina el efecto máximo se obtiene con el nivel -1, correspondiente a las extracciones sobre las que no se agregó solución salina.

**Tabla 21.** Resultados del diseño experimental.

Bloque	Tiempo	Concentración salina %p/p	Área extraída
1	60	10	16.100.000
1	30	30	14.300.000
1	60	0	30.100.000
1	45	0	19.200.000
1	30	0	20.600.000
1	30	10	10.400.000
2	60	30	21.000.000
2	45	10	14.900.000
2	30	10	8.190.000
2	30	30	14.500.000
2	60	0	24.300.000
2	45	0	24.500.000
2	45	30	27.400.000
2	60	10	4.700.000
2	30	0	24.500.000

**Figura 20.** Diagrama de efectos principales.



En la **Tabla 22** se presentan los resultados del análisis de varianza ANOVA para las áreas extraídas. El efecto de las variables y su interacción se evaluó aplicando el análisis de varianza ANOVA, y se encontró que el valor **P** que determina si los valores estimados para la varianza difieren significativamente, fue menor a 0,05 para los efectos cuadráticos de la concentración salina (BB), lo que indica que este factor afecta significativamente la variable respuesta dentro de un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 22.** Análisis de varianza (ANOVA) para el valor de las áreas extraídas.

Source	SCM	CME	Valor F	Valor P
<b>A:Tiempo</b>	3,89E+13	3,89E+13	1,64	0,2261
<b>B:Concentración salina</b>	1,02E+14	1,02E+14	4,29	0,0627
<b>AA</b>	2,29E+12	2,29E+12	0,1	0,7618
<b>AB</b>	8,00E+10	8,00E+10	0	0,9547
<b>BB</b>	4,39E+14	4,39E+14	18,53	0,0012
<b>blocks</b>	1,02E+13	1,02E+13	0,43	0,5247
<b>Total error</b>	2,60E+14	2,37E+13		
<b>Total (corr.)</b>	8,52E+14			

F: Prueba de significancia, P: prueba de error, SCM: Suma de cuadrado medio, CME: Suma del cuadrado medio del error total.

Dado que el análisis de varianza ANOVA no mostró diferencias significativas en los tiempos empleados (30, 45 y 60 minutos), se mantuvieron las condiciones presentadas en la **Tabla 23** y se varió el tiempo de exposición de la fibra entre 60 y 240 minutos. Se observó que el número de compuestos se mantuvo constante y que en periodos pequeños de tiempo (60-70 minutos) las áreas no presentaban variaciones significativas. Por tanto se seleccionó 60 minutos como el tiempo óptimo de exposición de la fibra para extraer los compuestos volátiles.

**Tabla 23.** Condiciones de extracción empleadas en el análisis de compuestos volátiles.

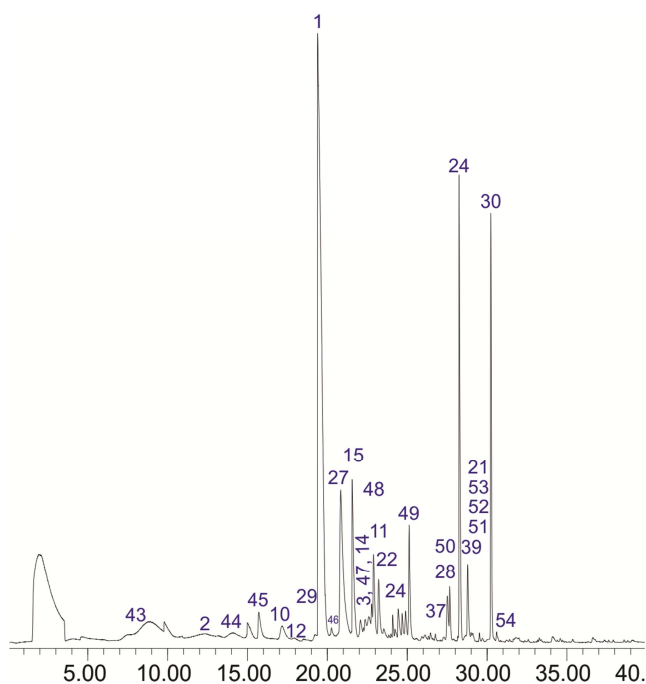
Parámetro	Valor
Volumen del vial	10mL
Tamaño de la muestra	2g
Fibra utilizada	DVB/Car/PDMS
Tiempo de acondicionamiento	15min
Temperatura de acondicionamiento y de extracción de la muestra	60°C

### 3.4.1.2 Identificación de los compuestos volátiles extraídos.

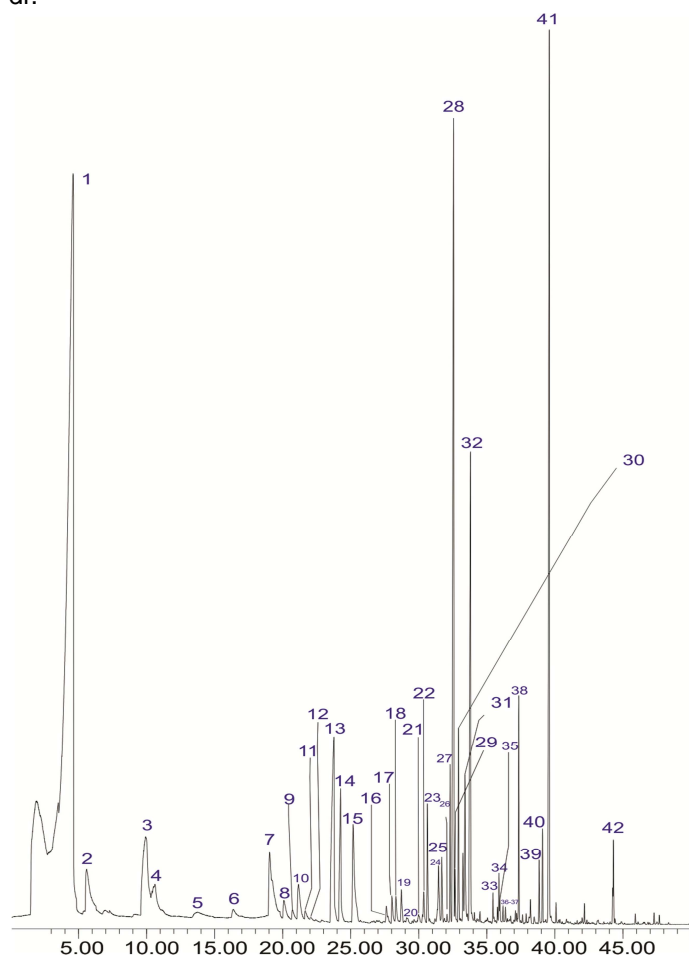
Los compuestos volátiles extraídos por HS-SPME a partir de los licores de cacao, se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para realizar la separación y la identificación.

En la **Figura 21** y la **Figura 22** se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS de la extracción por HS-SPME de compuestos volátiles del licor de cacao, obtenido empleando una columna HP-5MS, J&W *Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 30m x 0.25  $\mu$ m, df y otra columna DB-WAX, J&W *Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 30m x 0.25mm, D.I x 0.25 $\mu$ m, df según las condiciones especificadas en la **Tabla 23**. Los compuestos identificados se relacionan en la **Tabla 24**.

**Figura 21.** Perfil cromatográfico de licor de cacao obtenido por el método HS-SPME-GC-MS en columna DB-WAX, J&W *Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 30m x 0.25mm, D.I x 0.25 $\mu$ m, df.



**Figura 22.** Perfil cromatográfico de licor de cacao obtenido por el método HS-SPME-GC-MS en columna HP-5MS, J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 30m x 0.25  $\mu$ m, df.



**Tabla 24.** Composición química, obtenida por GC-MS, de los compuestos volátiles aislados por HS-SPME del licor de cacao.

No. Pico	Compuesto	Ri	
		HP-5MS	DB-WAX
1	Ácido acético	626,2	1587,6
2	3-Metil-2-butanol	705,1	1193,6
3	2,3-Butanodiol	786,8	1669,9
4	2,3-Butanodiol	795,5	-
5	No identificado	830,3	-
6	2-Pentanol acetato	855,9	-
7	3-Metil-1-butanol acetato	882,0	-
8	2-Heptanona	892,3	-
9	Dietil éter-1,1'-diacetato	898,5	-
10	2-Heptanol	903,8	1531,3
11	2(3H)-Dihidrofuranona	910,5	1718,1
12	2,3-Dimetilpirazina	916,0	1561,6
13	No identificado	939,1	-
14	No identificado	945,8	-
15	Benzaldehído	958,2	1647,7
16	7-Metil-3-metileno-1,6-octadieno	991,4	-
17	2,3,5-Trimetilpirazina	997,0	-
18	Hexanoato de etilo	1001,4	-
19	No identificado	1009,2	-
20	Acetato de hexilo	1016,9	-
21	Fenilmetanol	1034,1	1881,2
22	Fenilacetaldehído	1045,5	1729,4
23	1-Metilpropilacetato	1046,8	-
24	1-Feniletanona	1062,9	1734,9
25	2,3-Butanodiol diacetato	1067,7	-
26	2,3-Butanodiol diacetato	1079,8	-
27	2,3,5,6-Tetrametilpirazina	1084,7	1627,4
28	Óxido de linalool	1086,8	-
29	2-Nonanona	1091,9	1611,8
30	Linalool	1098,4	-
31	2-Octanol	1101,5	-
32	2-Feniletanol	1111,1	-
33	2-Etil-3,5,6-Trimetilpirazina	1158,3	-
34	Fenil metil acetato	1162,6	1785,6
35	Benzoato de etilo	1168,0	-
36	Epoxilinalool	1172,2	-
37	Metilfenil acetato	1175,7	-
38	Octanoato de etilo	1195,6	-
39	Etil fenil acetato	1222,3	1822,3
40	Fenilacetato	1229,4	1840,9

**Tabla 24.** (Continuación).

No. Pico	Compuesto	Ri	
		HP-5MS	DB-WAX
41	1-Fenilacetaldehído	1236,5	-
42	Decanoato de etilo	1296,8	-
43	2,3-Butanodiona	-	1041,6
44	3-Metil butil acetato	-	1192,1
45	3-Hidroxi-2-butanona	-	1474,5
46	2-Furancarboxaldehído	-	1611,4
47	Ácido 2-metilpropanoico	-	1681,1
48	3-Hidroxi-2-butanona	-	1693,2
49	Ácido 3-metil butanoico	-	1747,5
50	Metoxi fenil oxima	-	1817,6
51	Propilbenzoato	-	1857,8
52	Ácido hexanoico	-	1864,6
53	Ácido dodecanoico	-	1867,8
54	2-Fenilacetaldehído	-	1914,6

Empleando HS-SPME se obtuvieron aproximadamente 60 compuestos volátiles y semivolátiles de los licores de cacao, en cantidades superiores al 0,1%. Se identificaron positivamente 20 compuestos comunes a todos los materiales evaluados (**Tabla 25**). Las cantidades relativas de los compuestos mayoritarios extraídos por este método fueron: Ácido acético (30 – 50%), 2,3-butanodiol (3 – 4%), 3-metil-1-butanol (1 – 3%), benzaldehído (1 – 4%), tetrametilpirazina (3 – 7%), 2-octanol (1%), 2-feniletanol (3,5 – 8%), 2-fenilacetato (4,5 – 10%), 3-hidroxi-2-butanona (1 – 6,2%), fenilpropanoato (3,4 – 10,21%) y ácido pentanoico (0,5 – 3,72). Las cantidades relativas variaron dependiendo del material evaluado.

**Tabla 25.** Compuestos volátiles presentes en todos los materiales de cacao

COMPUESTOS QUÍMICOS	
2(3H)-Dihidrofuranona	Ácido acético
2,3,5-Trimetilpirazina	Benzaldehído
2,3-Butanodiol	Benzoato de etilo
2-Heptanol	Acetofenona
2-Heptanona	Hexil acetato
2-Metil propil acetato	Octanoato de etilo
2-Nonanona	Tetrametilpirazina
3-Hidroxi-2-butanona	Acetato de etilo
Fenilacetaldehído	2-Feniletanol
Fenil acetato	Acetilpirrol

### 3.4.1.3 Cuantificación de los compuestos volátiles extraídos.

En la **Tabla 26** se muestran los compuestos volátiles presentes en los licores de los materiales regionales de cacao, con las concentraciones determinadas en la cuantificación empleando Cromatografía de Gases acoplada a un detector de ionización en llama. Los valores encontrados en la cuantificación se correlacionaron con el perfil sensorial y se hallaron relaciones con un nivel de confianza  $p < 0.05$ .

**Tabla 26.** Compuestos volátiles presentes en el licor de cacao, cuantificados por GC-FID.

COMPUESTOS	MATERIALES							
	Concentración (µg/g)							
	CAU 39	FTA 2	FLE 2	FSA 13	FSV 25	FSV 155	SCC 61	EET* 96
Acetato de etilo	111,29	108,23	195,83	210,36	111,99	110,72	112,27	107,83
Tetrametilpirazina	46,74	47,25	44,22	44,44	48,99	45,48	44,64	46,41
Benzaldehído	22,38	22,55	19,48	19,54	21,81	20,47	19,20	20,32
2,3-Butanodiol	29,01	28,61	28,18	27,81	29,14	28,28	28,16	29,07
Fenilacetaldehído	5,95	7,817	5,860	4,29	8,66	8,54	4,44	16,14
Acetofenona	18,73	18,62	18,27	18,21	18,68	18,55	18,20	19,15
Fenetilacetato	15,99	15,95	15,98	15,94	15,27	17,19	14,94	15,62
2-Feniletanol	23,44	22,05	21,87	21,57	21,92	22,97	21,44	22,55
Acetilpirrol	29,817	29,769	29,60	28,74	29,38	29,11	28,24	34,75

\* Material de referencia.

## 3.5 ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

### 3.5.1 Perfil del sabor

En la **Tabla 27** se presentan los valores medios de las variables de sabor en cada uno de los materiales de cacao que conforman el estudio. Se puede apreciar que los sabores comunes a todos los materiales son los sabores a cacao, ácido, astringente, amargo, crudo/verde y afrutado, mientras que los sabores a especies, cítricos, forestal, acético, hierbas secas y sobre fermentado se perciben en un solo material, por ejemplo el sabor a especies únicamente fue identificado en el material SCC 61 y el sabor foresta solamente en el material FTA 2.

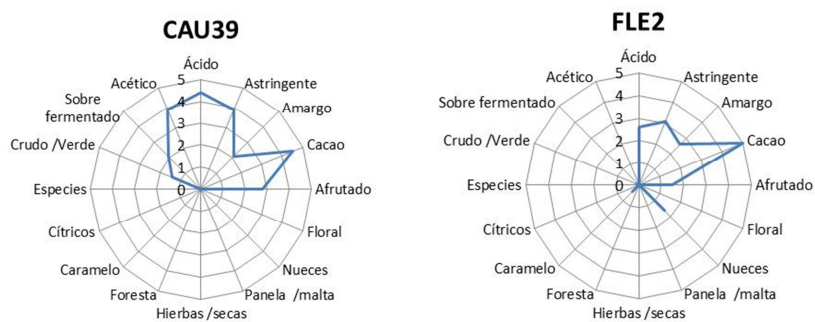
**Tabla 27.** Promedio de la calificación de los sabores identificados en los 7 materiales regionales de cacao.

Material de cacao	SABORES															
	Cacao	Ácido	Astringente	Amargo	Afrutado	Floral	Nueces	Panela /malta	Crudo /Verde	Hierbas /secas	Sobre fermentado	Foresta	Caramelo	Cítricos	Acético	Espesies
CAU39	4.5	4.4	3.9	2.1	2.8	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	<b>2.1</b>	0.0	0.0	0.0	<b>3.9</b>	0.0
FLE2	5.0	2.6	3.1	2.6	1.5	0.0	1.6	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0
FSA13	5.5	4.9	2.9	2.3	3.6	0.0	0.0	1.5	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FSV155	2.6	4.9	2.6	2.6	2.6	0.0	2.6	1.4	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FSV25	4.6	3.0	3.6	2.9	1.8	1.1	1.0	0.0	1.4	<b>2.5</b>	0.0	0.0	0.0	<b>3.1</b>	0.0	0.0
FTA 2	4.4	4.1	2.3	1.9	2.9	0.1	1.6	0.4	0.5	0.0	0.0	<b>1.5</b>	0.0	0.0	0.0	0.0
SCC61	5.4	3.6	3.6	3.8	2.1	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	<b>1.1</b>	0.0	0.0	<b>0.8</b>
EET96*	5.1	3.1	2.9	1.6	2.4	1.0	1.3	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

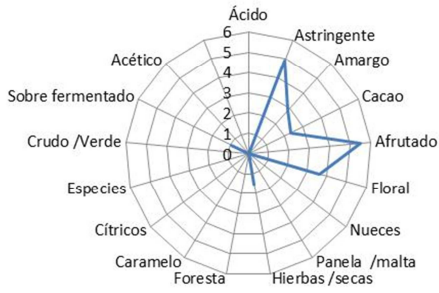
\*Material de referencia.

En la **Figura 23** se presentan los diagramas radiales que permiten visualizar los perfiles sensoriales de los materiales de cacao evaluados.

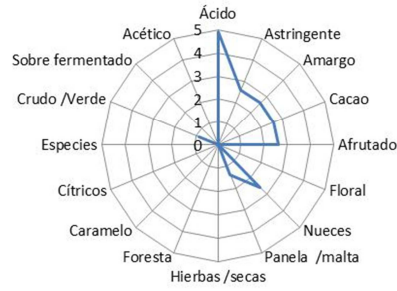
**Figura 23.** Diagrama radial de las variables de sabor.



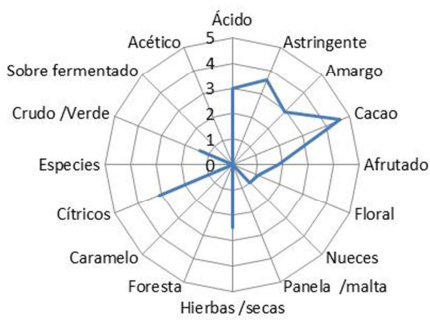
**FSA 13**



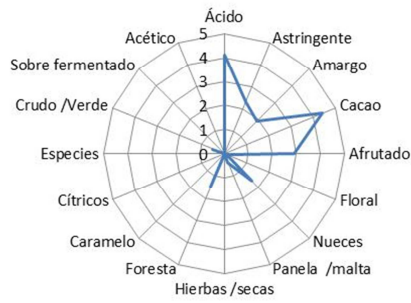
**FSV155**



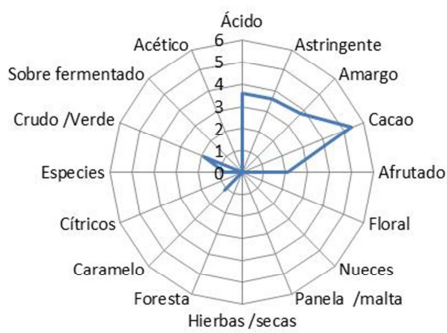
**FSV25**



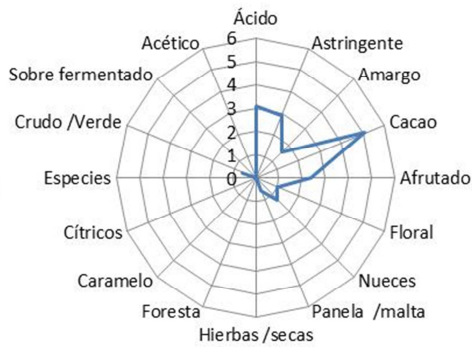
**FTA 2**



**SCC61**



**EET96\***



En los diagramas radiales presentados en la **Figura 23** se observa que en todos los materiales evaluados hay seis sabores comunes: cacao, ácido, astringente, amargo, afrutado y crudo verde; y que el sabor a nuez está presente en todos los materiales excepto en el CAU 39 y en el SCC 61. En los diagramas radiales los sabores se encuentran ordenados desde los que representan defectos en los materiales (Crudo/verde, sobrefermentado, acético) a los sabores básicos (ácido, astringente, amargo y cacao), y finalmente se presentan los sabores especiales (afrutado, floral, nueces, panela/malta, hierbas secas, foresta, caramelo, cítricos y especias) que podrían dar un valor agregado al material. Un material con sabores especiales mostraría valores más altos de la mitad hacia abajo del diagrama radial que en la parte de arriba.

En este orden de ideas se resaltan los materiales FLE 2, FSA 13, FSV 25, FSV 155, FTA 2 y SCC 61, los cuales mostraron notas agradables que favorecen su perfil del sabor. Y entre estos, los materiales FSA 13, FSV 25, FTA 2 y FSV 155 presentaron mayor cantidad de sabores especiales y con mayor puntuación en la escala empleada que el material de referencia EET 96 el cual es reconocido a nivel mundial por su delicado perfil del sabor.

Según la **Figura 23** los materiales con mayor valor en el sabor a cacao fueron FSA 13, FLE 2, SCC 61 y EET 96 con promedios de más de 5. En el sabor ácido todos los materiales presentaron valores relativamente altos de acidez (de 2,1 en adelante) y el material con el mayor promedio fue el FSV 155. En los otros sabores básicos, astringente y amargo se presentaron resultados variables.

Con respecto a los sabores específicos en todos los materiales se presentaron notas frutales (cítricos y fruta madura), siendo el de mayor valor el material FSA 13.

De acuerdo con el perfil sensorial presentado por el material FSV 155 y las características morfológicas evaluadas, este material puede ser clasificado como un material típico de cacao criollo.

En general, se encontró que todos los materiales presentaron atributos especiales, permitiendo demostrar que el cacao de Colombia tiene el potencial para ser catalogado como fino en el mercado internacional.

Empleando el análisis de varianza se compararon los sabores comunes a todos los materiales con el fin de establecer tanto semejanzas como diferencias significativas entre los perfiles del sabor de los materiales evaluados.

En todos los casos como resultado del análisis de varianza se estableció que hay diferencias significativas del sabor entre los materiales evaluados. Con base en estos resultados y el análisis de los diagramas de cajas se establece la clasificación por grupos para cada tipo de sabor: cacao, ácido, astringente, amargo, crudo verde, afrutado, nueces.

Los resultados obtenidos para cada sabor fueron analizados aplicando la prueba de Tukey las cuales junto con los diagramas de caja permitieron configurar en cada caso los materiales por grupos.

A continuación se describen los resultados obtenidos por sabor.

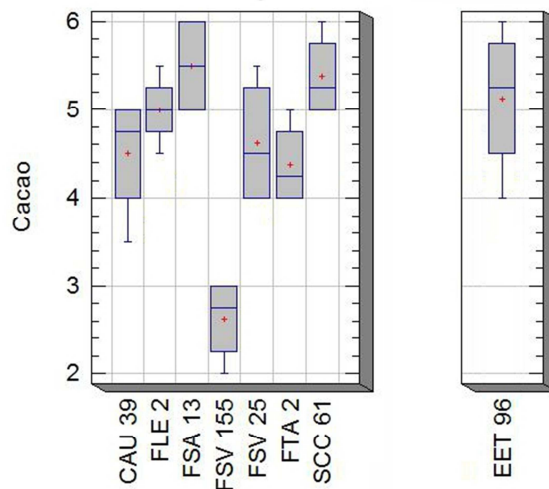
### 3.5.1.1 Cacao

En la **Figura 24** se muestra el diagrama de caja para el sabor cacao. En este caso se lograron tres grupos claramente diferenciados:

- Primer grupo: FSV 155 con un valor menor a 2,7
- Segundo grupo: FTA 2, CAU 39, y FSV 25 con valores en el intervalo (4,5 - 4,6).
- Tercer grupo: FLE 2, EET 96, SCC 61 y FSA13 con valores en el intervalo (5,0 - 5.5).

Adicionalmente, es importante resaltar en este diagrama la diferencia entre el material FSV 155 con respecto a los otros materiales. El siguiente material con un sabor más fuerte a cacao que el FSV 155 es el FTA 2 con un valor de 4,5. Según la literatura reportada los materiales finos de sabor y aroma son los que poseen los valores más bajos en cuanto al sabor a cacao [103]. Al comparar los materiales regionales con el material de referencia EET 96, se aprecia que los materiales CAU 39, FSV 155, FSV 25 y FTA 2 poseen menores valores de sabor a cacao que el material referencia EET 96.

**Figura 24.** Diagrama de cajas para la variable cacao.

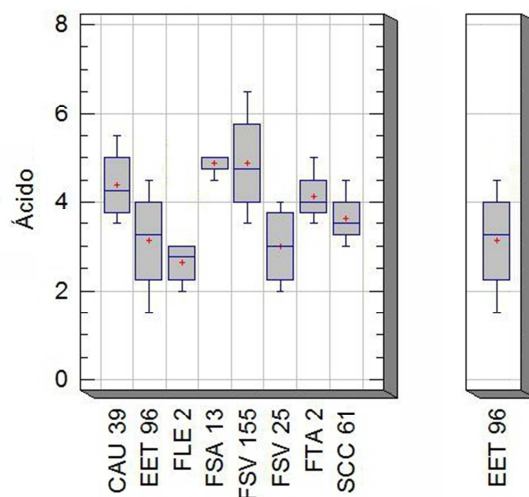


### 3.5.1.2 Ácido

En la **Figura 25** se indica la formación de tres grupos estadísticamente distintos:

- Primer grupo de valores bajos: FLE2, FSV25, EET96 con valores medios en el intervalos (2.6 - 3.1).
- Segundo grupo de valores medios: SCC61 con un valor de 3.6.
- Tercer grupo de valores altos: CAU39, FTA 2, FSA13, FSV155, con valores medios en el intervalo (4,1 – 4,9)

**Figura 25.** Diagrama de caja de la variable ácido.



Los resultados reportados en este trabajo muestran altos contenidos de acidez con valores entre 2,6 y 4,9. Estos valores denotan un proceso de beneficio deficiente en el que no se eliminaron los compuestos ácidos, especialmente durante la etapa del secado que es donde los ácidos disminuyen [116]. Es importante mencionar que el proceso de beneficio se realizó según la metodología que se había planteado. Sin embargo, ya que no había una diferenciación clara entre materiales, no se tuvo en cuenta la clasificación de trinitarios, criollos y forasteros, los cuales necesitan tiempos diferentes de fermentación y secado [16].

Por otra parte es importante tener en cuenta que valores altos en el contenido de acidez dificultan la identificación de los sabores especiales que eventualmente podrían dar un valor agregado a los materiales evaluados y es de resaltar que aún en estas condiciones se hayan encontrado materiales con sabores especiales.

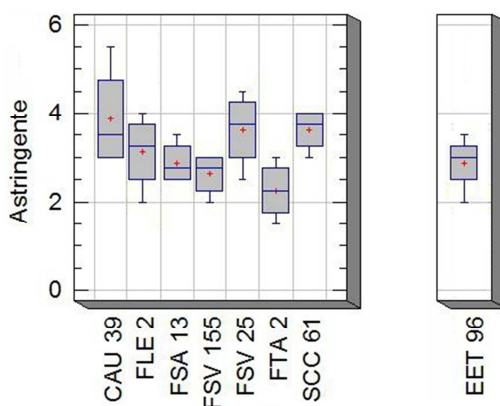
### 3.5.1.3 Astringente

El test de Tukey señala dos materiales que se separan estadísticamente de los demás, con valores de astringencia que variaron entre un mínimo de 2.3 en el clon FSA 13 y un máximo de 3.9 en el material CAU 39. En este caso los grupos formados son: (

**Figura 26):**

- Primer grupo constituido por el material FTA 2 con el menor valor (1,9).
- Segundo grupo conformado por valores medios bajos: FSV 155, FSA 13, EET 96 y FLE 2 con valores medios en el intervalo (2,6 – 3,1).
- Tercer grupo conformado por valores medios: SCC61, FSV25 y CAU39 con valores medios en el intervalo (3,6 – 3,9).

**Figura 26.** Diagrama de cajas de la variable astringente.



La astringencia es un parámetro con alto valor para los materiales evaluados, con medias entre 1,9 y 3,9. En todos los materiales se detectó el sabor conocido como “verde” originado por almendras que no han completado su fermentación, o porque el proceso de secado no fue óptimo. Según Jiménez un menor tiempo de fermentación al debido hace que la acidez, la astringencia y el amargor se expresen con mayor intensidad [104].

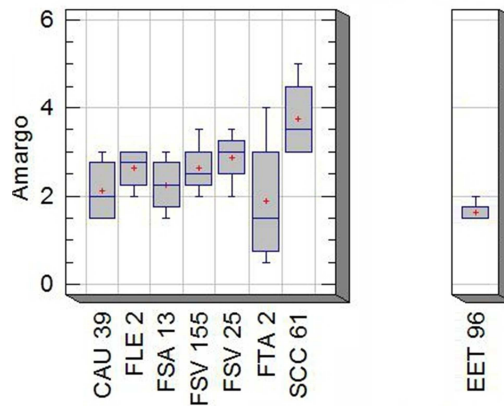
### 3.5.1.4 Amargo.

Los valores de amargo fluctuaron entre un mínimo de 1,6 para el material EET 96 y un máximo de 3,8 para el material SCC 61. Con base en estos resultados y el análisis gráfico que proporcionan los diagramas de caja (**Figura 27**), los materiales se pueden clasificar en los siguientes 3 grupos cuyos valores de sabor amargo tienen diferencias significativas:

- Primer grupo, con valores bajos: EET 96, FTA 2, CAU 39 y FSA 13 con valores medios en el intervalo (1,6 – 2,3).
- Segundo grupo: FLE 2, FSV 155 y FSV 25 con valores medios en el intervalo (2,63, 2,88).
- Tercer grupo conformado exclusivamente por el material SCC 61 que tiene valor alto 3,8.

En la caracterización del perfil del sabor amargo, el material SCC 61 tuvo el valor más alto mostrando una fermentación deficiente, mientras que el material EET 96, de referencia presentó menos amargor que el resto de materiales.

**Figura 27.** Diagrama de cajas para el sabor amargo.

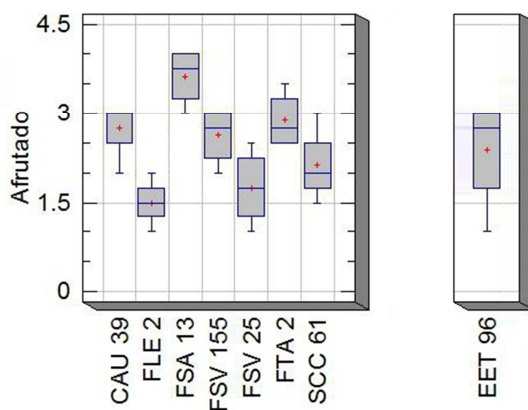


### 3.5.1.5 Afruitado

Para el sabor frutal (**Figura 28**) se generaron tres grupos:

- Primer grupo, conformado por los materiales con valores medios bajos: FLE2 y FSV25 con valores medios en el intervalo (1,5 – 1,8).
- Segundo grupo, conformado por los materiales con medias de tamaño medio: SCC61, EET96, FTA 2, FSV155 y CAU39 cuyas medias están en el intervalo (2,1 – 2,9).
- Tercer grupo, conformado por el material con un valor de 3,63.

**Figura 28.** Diagrama de cajas para la variable afrutado.



Según la literatura reportada, el sabor afrutado es característico de los materiales trinitarios [103] y es un sabor que estuvo presente en todos los materiales evaluados. Estos resultados están de acuerdo con la clasificación realizada a partir de la relación teobromina/cafeína según la cual todos los materiales que se analizaron se encuentran dentro del grupo de los trinitarios. Resalta el material FSA 13 con sus notas altas en el sabor afrutado y con un sabor afrutado más notorio que material EET 96 de referencia.

### 3.5.1.6 Nueces

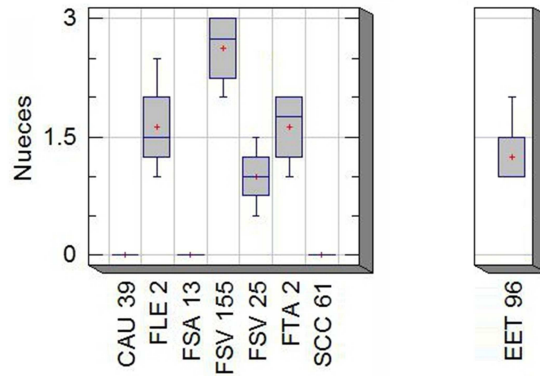
En la **Figura 29**, se presenta la clasificación de los materiales con respecto a este sabor:

- Primer grupo, conformado por el material FSV 25, con un valor medio bajo de 0,63.
- Segundo grupo, conformado por los materiales FLE 2 y FTA 2, con valores relativamente alto (1,0 – 1,6).
- Tercer grupo al cual pertenece solamente el material FSV155 que obtuvo el máximo valor en el sabor nueces: 2.63.
- Los materiales: FSA13, CAU39 y SCC61 mostraron un valor nulo en esta variable.

En este punto es importante mencionar que el sabor a nuez es típico de los materiales criollos y el material con el sabor más alto es el FSV 155. Este resultado está de acuerdo con el valor que se obtuvo para la relación teobromina/cafeína, en la que el resultado más bajo se encontró en el material

FSV 155. Tanto el análisis sensorial como la relación teobromina cafeína indican que el material FSV 155 es el que más se asemeja a los materiales criollos.

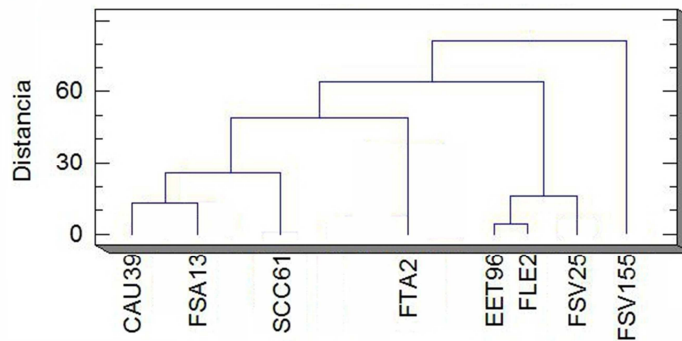
**Figura 29.** Diagrama de cajas para el sabor nueces.



### 3.5.2 Análisis de conglomerados

Para realizar el análisis de conglomerados se tuvieron en cuenta los sabores identificados en la mayoría de los materiales: cacao, ácido, astringente, amargo, crudo/verde, afrutado y nueces. En la **Figura 30** se muestra la clasificación realizada empleando el método de Ward y la distancia Euclidiana cuadrada. Se aprecian claramente cuatro grupos que permiten conocer el grado de similitud entre los materiales estudiados con relación a las variables organolépticas incluidas en el análisis.

**Figura 30.** Dendograma para los sabores identificados en los licores de cacao de los materiales regionales promisorios colombianos.



Del dendograma de la figura se observan los siguientes grupos:

- Un primer grupo conformado por tres clones: CAU 39, FSA 13 y SCC 61.

El sabor a cacao, a crudo/verde y la astringencia son los parámetros con la mayor intensidad en este grupo, con promedios de 5,1, 1,4 y 3,5. En el material SCC 61 se detectó la nota más alta en el sabor conocido como “verde” originado en la presencia de almendras tipo violeta que no han completado su fermentación, o bien porque el proceso de secado no fue el mejor. Jiménez señala que si la fermentación es más corta que lo normal la astringencia y el amargor se expresan con mayor intensidad [2004]. Es importante mencionar que a todos los materiales se les dio el tiempo de fermentación y secado recomendados, sin embargo, para el material SCC 61, el que presentó la mayor masa de grano, es posible que se requieran tiempos más largos de fermentación y un proceso de secado más lento que el que comúnmente se utiliza.

En la **Tabla 28** se pueden apreciar los valores medios de las variables en cada uno de los cuatro grupos y los respectivos materiales que hacen parte de cada uno de ellos.

- Un segundo grupo establecido por tres clones: EET96, FLE2 y FSV25.

En este conglomerado el sabor a cacao, la acidez, la astringencia, el amargor, el crudo y el sabor afrutado empiezan a disminuir y esta disminución es acompañada de la manifestación del sabor a nueces. Se infiere que valores altos de acidez, astringencia y amargor dificultan la identificación de estos sabores especiales. Este fue el grupo en el que la acidez se manifestó con menor intensidad y otros sabores especiales como el floral también se presentan en el material EET 96, que es la variable que identifica a este clon en el mundo entero.

- El tercer grupo constituido por el clon: FTA 2.

El sabor a cacao, la astringencia y el amargor continúan disminuyendo su intensidad en este grupo, en el que sabores especiales como panela y foresta se pueden apreciar.

- El cuarto grupo integrado por un solo clon, FSV155.

Como se mencionó anteriormente este material ha mostrado características que lo relacionan con los materiales criollos. En el análisis de conglomerados según el perfil sensorial, nuevamente se observa que valores en las variables cacao y nueces, lo separan de los otros materiales.

**Tabla 28.** Resultados del análisis de conglomerados para los cuatro grupos de materiales regionales promisorios.

Material de cacao	Conglomerado	Sabor	Media
CAU39 FSA 13 SCC 61	1	Cacao	5,1
		Ácido	4,3
		Astringente	3,5
		Amargo	2,7
		Crudo/Verde	1,4
		Afrutado	2,8
		Nueces	0
EET96 FLE 2 FSV 25	2	Cacao	4,9
		Ácido	2,9
		Astringente	3,2
		Amargo	2,4
		Crudo/Verde	0,7
		Afrutado	1,9
		Nueces	1,3
FTA 2	3	Cacao	4,4
		Ácido	4,1
		Astringente	2,3
		Amargo	1,9
		Crudo/Verde	0,5
		Afrutado	2,9
		Nueces	1,6
FSV155	4	Cacao	2.63
		Ácido	4.88
		Astringente	2.63
		Amargo	2.63
		Crudo/Verde	0.88
		Afrutado	2.63
		Nueces	2.63

Como se mostró previamente en la **Tabla 25** se encontraron 20 compuestos químicos que son comunes a todos los materiales de cacao (y que no aportan valor discriminante al análisis).

Seguidamente, partiendo de los grupos establecidos en el análisis de conglomerados, se buscaron los compuestos que están presentes en todos los materiales que conforman cada uno de estos conjuntos. Obtenidos los compuestos químicos que son comunes a los materiales de licor de cacao dentro de cada uno de los cuatro grupos resultado del análisis de conglomerados, el

interés está en identificar cuáles compuestos diferencian estos grupos. El resumen de esta información se presenta en la **Tabla 29**.

**Tabla 29.** Compuestos volátiles comunes a los cuatro conglomerados conformados.

COMPUESTOS	CONGLOMERADOS			
	1	2	3	4
2,3-Butanodiol diacetato	1	1	1	1
2-undecanona	1	1	0	1
Ácido 3-fenil-2-propenoico	1	0	1	1
Dodecanoato de etilo	1	0	1	1
Etil 2-fenil acetato	1	0	1	1
Fenil metil acetato	1	0	1	1
Linalol	1	0	1	1
2-feniletanol	1	1	1	1
2-furanmetanol-5-eteniltetrahidro	1	0	0	1
2-Pentanol acetato	1	0	1	1
6-Eteniltetrahidro-2H-Piran-3-ol	1	0	0	1
Ácido 3-metilbutanoico	1	0	0	1
Hexadecanoato de etilo	1	0	1	0
2-Fenil acetato	1	1	1	1
Alfa-etil-bencenoacetaldehído	0	1	1	1
1-Feniletil acetato	1	0	0	1
2-Metil fenilacetato	1	0	0	1
3-Metil-1-butanol acetato	1	0	0	0
1H-indol-2-amina, n-hidroxi-1-metil-n-fenil-3- [(fenilimino)metil]-, (e)-	0	0	0	1
1-Metilpropil acetato	0	0	0	1
3-Metil-1-butanol	0	0	0	1
Fenilmetanol	0	0	0	1
Tetradecanoic acid, etil ester	0	0	1	0
2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	0	1	0	1
(2e)-5-metil-2-fenil-2-hexenal	0	0	1	1
2-ciclohexen-1-ona, 3-metil-	0	0	1	1
7-Metil-3-metileno-1,6-octadieno	0	0	1	1
Ácido pentanoico	0	0	1	1
Etenil benceno	0	0	1	1
Etanol, 1,1'-oxibis-, diacetato	0	0	1	1
Hidrazina, 1,1-dimetil-	0	0	1	1
Undecanal	0	0	1	1

**Tabla 29.** (Continuación).

COMPUESTOS	CONGLOMERADOS			
	1	2	3	4
1-butanol, 2,3-epoxi-, trans-	0	0	0	0
Ácido 2-metilpropanoico	0	0	0	0
5-decina-4,7-diol, 2,4,7,9-tetrametil	0	0	1	0
Feniletanal	1	1	1	1
(2Z)-4-Metil-2-fenil-2-pental	0	0	0	1
(3-metil-2-oxiranyl)metanol; (3-metil-oxiran-2-il)-metanol	0	0	0	1
1,2,6-hexanetriol	0	0	0	1
1,3-dihidroxi-6-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroquinolin-2-ona	0	0	0	1
1a,9b-dihidro-1a-(metilsulfinil)-1h-ciclopropa[1]fenantreno	0	0	0	1
1-Metilester del ácido fórmico	0	0	0	1
2,3-Dimetil pirazina	0	0	0	1
ácido 2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutanoico.y.-lactona	0	0	0	1
2-Etil-1H-isoindola-1,3(2H)-diona	0	0	0	1
2-feniloxirano	0	0	0	1
2h-piran-2-ona, tetrahydro-6-propil-	0	0	0	1
2-metilpropilbenzoato	0	0	0	1
2-nonanol	0	0	0	1
2-pentanol	0	0	0	1
3,7-dimetil-1h-purina-2,6-diona	0	0	0	1
3-Fenil propanoato de etilo	0	0	0	1
5-Eteniltetrahydro-2-furanmetanol	0	0	0	1
6-aza-5,7,12,14-tetratiapentaceno	0	0	0	1
Ácido octanoico	0	0	0	1
Ácido pirúvico	0	0	0	1
Benzonitrilo	0	0	0	1
Ácido 2-etil butanoico	0	0	0	1
Decanoato de etilo	0	0	0	1
Ácido dodecanoico	0	0	0	0
Isopentil acetato	0	0	0	1
Metil metoxi acetato	0	0	0	1
Octilacetato	0	0	0	1
Pentil acetato	0	0	0	1
Propilbenceno	0	0	0	1

De la **Tabla 29** se puede inferir que:

- El conglomerado 1, conformado por los materiales CAU 39, FSA 13 y SCC 61, se diferencia de los demás grupos por la ausencia del compuesto Alfa-etil-bencenoacetaldehído y por la presencia del 3-Metil-1-butanol acetato.
- El conglomerado 2 conformado por los materiales EET 96, FLE 2 y FSV 25 se distancia de los otros por la ausencia de los compuestos: Ácido 3-fenil-2-propenoico, Dodecanoato de etilo, Etil 2-fenil acetato, Fenil metil acetato y Linalol.
- El conglomerado 3, con un único material, FTA 2, se diferencia de los otros por la ausencia del compuesto químico 2-undecanona y la presencia de los compuestos, 2,4,7,9-tetrametil-4,7-diol.-5-decina.
- El conglomerado 4, el cual corresponde al material FSV 155 difiere de los otros por la presencia de los compuestos químicos que se detallan a continuación: (2Z)-4-Metil-2-fenil-2-pental, (3-metil-2-oxiranil) metanol, 1,3-dihidroxi-6-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroquinolin-2-ona, 1 $\alpha$ ,9 $\beta$ -dihidro-1 $\alpha$ -(metilsulfinil)-1H-ciclopropa[1]fenantreno, 1-Metilestere del ácido fórmico, 2,3-Dimetil pirazina, Ácido 2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutanoico  $\gamma$ -lactona, 2-Etil-1H-isoindola-1,3(2H)-diona, 2-feniloxirano, tetrahydro-6-propil-2H-piran-2-ona, 2-metilpropilbenzoato, 2-nonanol, 2-pentanol, 3,7-dimetil-1H-purina-2,6-diona, 3-Fenil propanoato de etilo, 5-Eteniltetrahydro-2-furanmetanol, 6-aza-5,7,12,14-tetratiapentaceno, Ácido octanoico, Ácido pirúvico, Benzonitrilo, Ácido 2-Etil butanoico, Decanoato de etilo, Ácido dodecanoico, Isopentil acetato, Metil metoxi acetato, Octilacetato, Pentil acetate, Propilbenceno.

Los valores encontrados en la cuantificación de los compuestos volátiles se correlacionaron con el perfil sensorial y se hallaron relaciones con un nivel de confianza  $p < 0.05$ .

- Floral: 2,3-Butanodiol y acetofenona.
- Especies y caramelo: Benzaldehído.
- Sobrefermentado: 2-Feniletanol.
- Ácido: Fenetilacetato.

En el análisis de comparación entre los compuestos volátiles y el perfil sensorial, se encontró una correlación positiva entre el 2-feniletanol y las variables “sobrefermentado” y “acético”. Lo cual está de acuerdo con el trabajo de Rodríguez-Campos y colaboradores [102]. Estos investigadores estudiaron el efecto del tiempo de fermentación sobre la concentración de compuestos volátiles, encontrando que el 2-feniletanol se producía en los compuestos que tenían mayor tiempo de fermentación.

Por otra parte, el butanodiol y la acetofenona mostraron estar correlacionadas positivamente con el sabor floral. Lo anterior está de acuerdo con un estudio

realizado, por Frauendorfer y Schieberle en el año 2008 [75]. Ellos reportaron una relación entre los compuestos 2,3-butanodiol y la acetofenona con la variable “floral”. Otros autores también han encontrado una correspondencia entre el sabor floral y los alcoholes en general [11, 89].

En los estudios reportados el benzaldehído ha sido señalado como el responsable del sabor a nuez, a pasto y a vegetales [101]. En este trabajo en la comparación del perfil sensorial de los materiales de cacao con los compuestos volátiles se halló una relación entre las variables “especies” y “caramelo” con el benzaldehído.

#### 4. CONCLUSIONES

Los materiales evaluados presentaron diferencias significativas entre sí en cuanto a sus propiedades físicas, químicas, funcionales y organolépticas, y estas diferencias dieron lugar a la conformación de grupos estadísticamente distintos. Estos grupos difieren entre sí según la característica analizada.

De acuerdo con la norma NTC 1252 la cual establece la clasificación y los requisitos que debe cumplir el cacao en grano, el peso (g/100 granos) de los materiales evaluados, excepto el material CAU 39, corresponde a la denominación cacao premio, es decir de mejor calidad.

Los materiales FLE 2, FSV 25 y SCC 61 sobresalieron en los análisis físicos por tener simultáneamente tamaño de grano superiores y altos contenido de grasa, lo cual es favorable en términos de su comercialización. En estos materiales se encontró una masa de grano superior a la establecida para los granos tipo premio y contenidos de grasa superiores a los reportados en la literatura.

En los materiales CAU 39, FSA 13, FLE 2, FSV 25, FSV 155 y SCC 61 se resalta el contenido de grasa (expresado en base seca) superior al 58% y a los reportes realizados en otros países. El elevado contenido de grasa en estos materiales es un buen criterio para su comercialización, debido al elevado valor comercial de la manteca de cacao.

El perfil de ácidos grasos de las mantecas de cacao evaluadas permitió clasificarlas como mantecas “duras” o “semiduras”. La industria tiene gran interés sobre esta materia prima puesto que permanece sólida a temperatura ambiente y su punto de fusión coincide con la temperatura corporal humana.

De acuerdo con los valores encontrados para las variables cenizas, fibra y proteína en los materiales regionales evaluados, se demuestra una vez más que el cacao es fuente significativa de macronutrientes: grasa, proteína y carbohidratos.

En el análisis funcional, se encontró que todos los materiales presentan cantidades apreciables de polifenoles con actividad antioxidante y antirradicalaria, que generan un valor agregado desde el punto de vista nutricional, por el beneficio que estos productos puede tener en la salud de los consumidores, especialmente el material FSV 155 que mostró los valores más altos.

Se encontró que la relación teobromina/cafeína en todos los materiales varía entre 2 y 8, lo que indica que la mayoría de los materiales presentan valores típicos de grano trinitario. Es importante resaltar que el material FSV 155 en esta evaluación es el que muestra el menor valor y el que se relaciona más con los materiales criollos.

En todos los licores de cacao evaluados se identificaron los compuestos volátiles 2(3H)-Dihidrofuranona, ácido acético, 2,3,5-trimetilpirazina, benzaldehído, 2,3-butanodiol, benzoato de etilo, 2-heptanol, acetofenona, 2-heptanona, hexil acetato, 2-metil propil acetato, octanoato de etilo, 2-nonanona, tetrametilpirazina, 3-hidroxi-2-butanona, acetato de etilo, fenilacetaldehído, 2-feniletanol, fenetilacetato y

**Comentario [J1]:** Todas estas conclusiones fueron modificadas de acuerdo con las recomendaciones de la profesora Yajaira y la segunda y la tercera están de acuerdo con lo que ella sugirió.

acetilpirro. El material FSV 155, presentó 27 compuestos que no se identificaron en los otros materiales.

De acuerdo a los perfiles sensoriales obtenidos, se demostró la calidad de los materiales estudiados, dado que se encontraron características específicas como notas frutales, caramelo y nuez. El material FSV 155 presentó un perfil sensorial característico de cacao criollo.

La correlación de los compuestos volátiles presentes en los licores de cacao con sus respectivos perfiles sensoriales, permitió relacionar el sabor floral con los compuestos 2,3-butanodiol y acetofenona, el sabor a especias y caramelo con el benzaldehído, el sabor a sobre fermentado con el 2-fenil etanol y el sabor ácido con el fenetilacetato.

## 5. RECOMENDACIONES

Dado el gran contenido de manteca de cacao identificado en los materiales evaluados se recomienda repetir el análisis de contenido de grasas empleando prensas industriales para verificar los resultados encontrados y de esta manera promover la comercialización del cacao colombiano, especialmente el material FSV 25.

**Comentario [J2]:** Recomendación  
maria cristina

Tomando en cuenta las características de cacao criollo identificadas en el material FSV 155 y las características de trinitarios en los materiales CAU 39, FSA 13, FLE 2, FSV 25 y FTA 2, se recomienda fermentar dichos materiales según los tiempos de fermentación sugeridos por la literatura: 3 días para los materiales criollos y 5 para los materiales trinitarios.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] MOTAMAYOR, J.C., *et al.* Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. En: *Heredity*, 2002, vol. 89, p. 380 – 386.
- [2] COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL y FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS. Guía Técnica para el Cultivo del Cacao. 5 ed. Bogotá D.C.: Suministros y Ediciones LCB Ltda., 2012. 11 p.
- [3] DE BEENHOUWER, Matthias; AERTS, Raf y HONNAY, Olivier. A global meta-analysis of the biodiversity and ecosystem service benefits of coffee and cacao agroforestry. En: *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2013, vol. 175, p. 1–7.
- [4] REED, Stacy. Sensory analysis of chocolate liquor. En: *The manufacturing Confectioner*, 2010, vol. 1, p. 43 – 52.
- [5] AFOAKWA, Emmanuel. *Chocolate Science and Technology*. 1 ed. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010.
- [6] Disponible en version HTML en [http://www.unodc.org/colombia/es/comunicados11/com11\\_jul18.html](http://www.unodc.org/colombia/es/comunicados11/com11_jul18.html)
- [7] Disponible en version HTML en <http://www.unodc.org/colombia/es/press/exportacioncacaoaustria.html>
- [8] Disponible en <http://www.contextoganadero.com/agricultura/colombia-buscar-jugador-clave-en-mercado-mundial-del-cacao>
- [9] JARGORET, Patrick, *et al.* Afforestation of savannah with cocoa agroforestry systems: a small-farmer innovation in central Cameroon. En: *Agroforestry Systems*, 2013, vol. 87, p. 1043-1052.
- [10] ARANZAZU, Fabio, *et al.* Manejo del recurso genético para incrementar la producción y productividad del sistema de cacao en Colombia. 1 ed. Santander, Colombia: SAS INDUSTRIAS GRÁFICAS, 2010.
- [11] AFOAKWA, Emmanuel, *et al.* Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, vol. 48, p. 840 – 857.
- [12] COLOMBIA. FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS. El beneficio y características físico químicas del cacao (*Theobroma cacao* L.). 1 ed. Bogotá DC.: Produmedios, 2004.

- [13] ORTIZ de BERTORELLI, Ligia; GRAZIANI de FARIÑAS, Lucía y ROVEDAS, Gervaise. Influencia de varios factores sobre índices físicos del grano de cacao en fermentación. En: Agronomía Tropical, 2009, vol. 59, p. 81–88.
- [14] ENRÍQUEZ, Gustavo. Cacao orgánico, guía para productores ecuatorianos. 2 ed. Quito:
- [15] MOTAMAYOR, J.C., *et al.* Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. En: Heredity, 2003, vol. 91, p. 322 – 330.
- [16] SÁNCHEZ-CAMPUZANO, Viviana. Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. Trabajo de grado Ingeniero Agrónomo. Quevedo: Universidad Técnica Estatal. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería Agronómica, 2007. 23 p.
- [17] FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS y UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. Características de Calidad del Cacao de Colombia. 1 ed. Bucaramanga: División de Publicaciones UIS, 2013.
- [18] GARCÍA, Celso. Cacao (*Theobroma cacao* L.). 1 ed. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, 1997.
- [19] PEREA, Janeth; VILLAMIZAR, Arley, y RAMÍREZ, Olga. Caracterización fisicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano. En: Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 2011, vol. 9, p. 35 – 42.
- [20] WOLLGAST, Jan. The contents and effects of polyphenols in chocolate. Trabajo para obtener el título de Doctor en Ciencias de la Nutrición y la Agricultura. Nutritional Science Institute, Gieben University, 2004. 93 p.
- [21] TOMAS-BARBERÁN, Francisco A., *et al.* A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, vol. 55, no 10, p. 3926-3935.
- [22] BELŠČAK, Ana, *et al.* Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. En: Food research international, 2009, vol. 42, no 5, p. 707-716.
- [23] Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., *et al.* Antioxidant Properties Of Polyphenol-Rich Cocoa Products Industrially Processed. (2010). *Food Research International*, 43, 1614-1623.
- [24] SHUMOW, Laura; BODOR, Alison. An industry consensus study on an HPLC fluorescence method for the determination of (±)-catechin and (±)-epicatechin in cocoa and chocolate products. En: Chemistry Central Journal, 2011, vol. 5, no 1, p. 1-7.

- [25] AFOAKWA, Emmanuel Ohene, *et al.* Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. En: Journal of food science and technology, 2013, vol. 50, no 6, p. 1097-1105.
- [26] PADILLA, Fanny C.; LIENDO, Rigel; QUINTANA, Agricia. Characterization of cocoa butter extracted from hybrid cultivars of *Theobroma cacao* L. En: Archivos latinoamericanos de nutricion, 2000, vol. 50, no 2, p. 200-205.
- [27] BERTAZZO, Antonella, *et al.* The protein profile of *Theobroma cacao* L. seeds as obtained by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. En: Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011, vol. 25, no 14, p. 2035-2042.
- [28] ROBERFROID, Marcel B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. En: The American journal of clinical nutrition, 2000, vol. 71, no 6, p. 1660s-1664s.
- [29] PÉREZ TRUEBA, Gilberto. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. En: Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 2003, vol. 22, no 1, p. 48-57.
- [30] CLYDESDALE, Fergus M. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. En: Nutrition reviews, 1997, vol. 55, no 12, p. 413-422.
- [31] PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; CADENA-CALA, Tatiana; HERRERA-ARDILA, Jenny. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. En: Revista Salud UIS, 2009, vol. 41, no 2.
- [32] RISNER, Charles H. Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (–)-epicatechin in standard reference material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans, and cocoa butter. En: Journal of chromatographic science, 2008, vol. 46, no 10, p. 892-899.
- [33] MAZOR JOLIĆ, Slavica, *et al.* Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. En: International Journal of Food Science & Technology, 2011, vol. 46, no 9, p. 1793-1800.
- [34] HURST, W. Jeffrey, *et al.* Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. En: Chemistry Central Journal, 2011, vol. 5, no 1, p. 1-8.
- [35] SALTINI, Rolando; AKKERMAN, Renzo; FROSCH, Stina. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. En: Food Control, 2013, vol. 29, no 1, p. 167-187.

- [36] CROZIER, Stephen J., *et al.* Cacao seeds are a "Super Fruit": A comparative analysis of various fruit powders and products. En: Chemistry Central Journal, 2011, vol. 5, no 5.
- [37] DAVRIEUX, F., *et al.* Determination of cocoa purine content by near infrared spectroscopy. En XIV international conference of investigation of the cocoa, Ghana, Poster Presentation. 2004.
- [38] MARTÍNEZ, R., *et al.* Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. En: Food Research International, 2012, vol. 49, no 1, p. 39-45.
- [39] BRUNETTO, María del Rosario, *et al.* Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. En: Food Chemistry, 2007, vol. 100, no 2, p. 459-467.
- [40] INIAP, Boletín Técnico. 135: Entorno Ambiental. Genética, Atributos de Calidad y Singularización del cacao en el Nororiente de la Provincia de Esmeraldas, Quevedo-Ecuador, 2009.
- [41] VILLALOBOS RODRÍGUEZ, Marilyn., OROZCO ESTRADA, Shirley. Calidad de cacao en Centroamérica: un vistazo a la situación en 2009. (Costa Rica). 2009.
- [42] LUNA, Fabienne, *et al.* Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, vol. 50, no 12, p. 3527-3532.
- [43] Cacao en grano. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 1252. 2003.
- [44] PÉREZ ZÚÑIGA, J. I., *et al.* Evaluación y caracterización de selecciones clonales de cacao (*Theobroma cacao* L.) del Programa de Mejoramiento del CATIE. En: Serie Técnica. Manual Técnico (CATIE), 2009, no 51.
- [45] SALINAS, Nancy; BOLIVAR, Wilmer. Ácidos grasos en chocolates venezolanos y sus análogos. En: Anales Venezolanos de Nutrición. 2012.
- [46] RIBEIRO, A. P. B., *et al.* Physico-chemical properties of Brazilian cocoa butter and industrial blends. Part I-Chemical composition, solid fat content and consistency. En: Grasas y Aceites, 2012, vol. 63, no 1.
- [47] ASEP, E. K., *et al.* The effects of particle size, fermentation and roasting of cocoa nibs on supercritical fluid extraction of cocoa butter. En: Journal of food engineering, 2008, vol. 85, no 3, p. 450-458.

- [48] SHITTU, T. A.; BADMUS, B. A. Statistical correlations between mineral element composition, product information and retail price of powdered cocoa beverages in Nigeria. En: Journal of food composition and analysis, 2009, vol. 22, no 3, p. 212-217.
- [49] LECUMBERRI, Elena, *et al.* Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). En: Food Chemistry, 2007, vol. 104, no 3, p. 948-954.
- [50] RAHOMA, M.; MARLENYD, A.; MAZZAFERA, P. Extraction of Cocoa Butter from Brazilian Cocoa Beans and Ethane using Supercritical CO<sub>2</sub>. En: Fluid Phase Equilibria, 2001, vol. 194, p. 885-889.
- [51] TUCCI, Maria Luiza, *et al.* Evaluation of Genotypes for Cocoa Butter Production in the "Vale do Ribeira", São Paulo, Brazil. En: Brazilian Journal of Food Technology, 2002, vol. 5, p. 1-9.
- [52] CHIN, A. H. G.; ZAINUDDIN, Nushirwan. Characteristics of Malaysian cocoa butter. En: International Conference on Cocoa and Coconuts: Progress and Outlook. Kuala Lumpur (Malaysia). 15-17 Oct 1984. 1986.
- [53] BAGCHI, Debasis, *et al.* Protection against chemically-induced oxidative gastrointestinal tissue injury in rats by bismuth salts. En: Digestive diseases and sciences, 1997, vol. 42, no 9, p. 1890-1900.
- [54] CACCETTA, Rima Abu-Amsha, *et al.* Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. En: The American journal of clinical nutrition, 2000, vol. 71, no 1, p. 67-74.
- [55] DONOVAN, Jennifer L., *et al.* Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. En: The Journal of nutrition, 1999, vol. 129, no 9, p. 1662-1668.
- [56] RICHELLE, M., *et al.* Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. En: European journal of clinical nutrition, 1999, vol. 53, no 1, p. 22-26.
- [57] WATERHOUSE, Andrew L.; SHIRLEY, Joseph R.; DONOVAN, Jennifer L. Antioxidants in chocolate. En: The Lancet, 1996, vol. 348, no 9030, p. 834.
- [58] KIM, H.; KEENEY, P. G. (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. En: Journal of Food Science, 1984, vol. 49, no 4, p. 1090-1092.

- [59] ABRIL-GIL, Mar, *et al.* A diet enriched with cocoa prevents IgE synthesis in a rat allergy model. En: Pharmacological Research, 2012, vol. 65, no 6, p. 603-608.
- [60] YAMAGISHI, M., *et al.* Anticlastogenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liquor polyphenols against mitomycin C-induced DNA damage. En: Food and chemical toxicology, 2001, vol. 39, no 12, p. 1279-1283.
- [61] PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2005, vol. 53, no 10, p. 4290-4302.
- [62] HIL, C. L., *et al.* Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). En: Asian Journal of Food and Agro-Industry. King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT), 2009. p. 702-722.
- [63] COUNET, Christine, *et al.* Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2004, vol. 52, no 20, p. 6243-6249.
- [64] ELWERS, Silke, *et al.* Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). En: European Food Research and Technology, 2009, vol. 229, no 6, p. 937-948.
- [65] EFRAIM, Priscilla, *et al.* Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. En: Food Science and Technology (Campinas), 2010, vol. 30, p. 142-150.
- [66] NOOR-SOFFALINA, S. S., *et al.* Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavour precursors in a lipidic model system. En: International journal of food science & technology, 2009, vol. 44, no 1, p. 168-180.
- [67] REED, Stacy. Sensory analysis of chocolate liquor. En: Manufacturing Confectioner, 2010, p. 43.
- [68] FISHER, Carolyn; SCOTT, Thomas. Flavores de los alimentos: biología y química. Acribia, 2000.
- [69] SÁNCHEZ CAMPUZANO, Viviana Anabel. Caracterización Organoléptica del Cacao (*Theobroma cacao* L.) Para la Selección de Arboles con Perfiles de Sabor de Interés Comercial. 2012.
- [70] ESCOBAR, Raúl. Comportamiento de seis clones de "cacao" (*Theobroma cacao* L.) en Guasaganda, provincia de Cotopaxi, Ecuador. La Granja. Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador, 2008, p. 9-12.

- [71] RIVERA FERNÁNDEZ, Rubén Darío, *et al.* Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao* L.) Tipo nacional. En: Ciencia y Tecnología, 2012, vol. 5, p. 7-12.
- [72] SUKHA, Darin A., *et al.* The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. En: European Food Research and Technology, 2008, vol. 226, no 3, p. 405-413.
- [73] PINO, Jorge A., LLERA, Lumey, RONCAL, Elda. Caracterización del perfil de compuestos volátiles de licores de cacao cubanos. En: Ciencia y Tecnología de Alimentos, 2011, vol. 21, no 3, p. 41-49.
- [74] FRAUENDORFER, Felix; SCHIEBERLE, Peter. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2006, vol. 54, no 15, p. 5521-5529.
- [75] FRAUENDORFER, Felix; SCHIEBERLE, Peter. Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2008, vol. 56, no 21, p. 10244-10251.
- [76] SOLORZANO CHAVEZ, Eddyn Gabriel. Evaluación Sensorial del Cacao (*Theobroma cacao* L.), Nacional Fino o de Aroma Procedente de Diferentes Zonas del País. 2012.
- [77] Disponible en [http://www.ptp.com.co/contenido/contenido\\_imprimir.aspx?-conID=576&catID=1](http://www.ptp.com.co/contenido/contenido_imprimir.aspx?-conID=576&catID=1)
- [78] Disponible en: [http://revistadiners.com.co/gastronomia/14824\\_cacao-la-joya-de-colombia/](http://revistadiners.com.co/gastronomia/14824_cacao-la-joya-de-colombia/)
- [79] Disponible en: [http://www.swisscontact.org/fileadmin/media/Medienberichte/1213\\_diariodelhuila.pdf](http://www.swisscontact.org/fileadmin/media/Medienberichte/1213_diariodelhuila.pdf)
- [80] Disponible en: <http://www.unipymes.com/cacao-colombiano-se-somete-a-prueba-de-calidad/#sthash.XivmBdlq.dpuf>
- [81] Disponible en: <http://www.lukeringredients.com/index.php/es/>
- [82] PINI, Gláucia F., *et al.* A Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) method for the chromatographic determination of alkylpyrazines in cocoa samples. En: Journal of the Brazilian Chemical Society, 2004, vol. 15, no 2, p. 267-271.
- [83] ANVOH, Koutoua, *et al.* Comparison of biochemical changes during alcoholic fermentation of cocoa juice conducted by spontaneous and induced processes for

the production of ethanol. En: African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development, 2010, vol. 10, no 6, p. 2740-2754.

[84] OBERPARLEITER, Sabine; ZIEGLEDER, Gottfried. Amyl alcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality. En: Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 1997, vol. 204, no 2, p. 156-160.

[85] RAMLI, Nazaruiddin, *et al.* Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. En: Journal of food processing and preservation, 2006, vol. 30, no 3, p. 280-298.

[86] SCHNERMANN, Petra; SCHIEBERLE, Peter. Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, vol. 45, no 3, p. 867-872.

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

[88] VAN PRAAG, Michel; STEIN, Herbert S., TIBBETTS, Merrick S. Steam volatile aroma constituents of roasted cocoa beans. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1968, vol. 16, no 6, p. 1005-1008.

[89] OWUSU, Margaret; PETERSEN, Mikael Agerlin; HEIMDAL, Hanne. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. En: Journal of Food Processing and Preservation, 2012, vol. 36, no 5, p. 446-456.

[90] HOSKIN, Jonathan C. Sensory properties of chocolate and their development. En: The American journal of clinical nutrition, 1994, vol. 60, no 6, p. 1068S-1070S.

[91] COUNET, Christine, *et al.* Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2002, vol. 50, no 8, p. 2385-2391.

[92] LI, Yue, *et al.* The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, vol. 25, no 1, p. 17-23.

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

- [94] MORENO, Míriam Torres. Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro: tesis doctoral. 2012. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili.
- [95] FARAH, D. M. H., *et al.* Optimization of cocoa beans roasting process using Response Surface Methodology based on concentration of pyrazine and acrylamide. En: International Food Research Journal, 2012, vol. 19, no 4.
- [96] WANG, Xiujuan, *et al.* Aroma characteristics of cocoa tea (*Camellia ptilophylla* Chang). Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2009, vol. 74, no 5, p. 946-953.
- [97] COLEMAN, William M.; DUBE, Michael F. Headspace solid-phase microextraction analysis of artificial flavors. En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, vol. 85, no 15, p. 2645-2654.
- [98] ROUSSEAU, Beno Tt. Sensory evaluation techniques. En: Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-, 2004, vol. 138, no 1, p. 21
- [99] ZAWIRSKA-WOJTASIAK, Renata. 19 Methods for Sensory Analysis. Food Flavors: Chemical, Sensory and Technological Properties. CRC Press, 2011, p. 439.
- [100] JIMÉNEZ, Juan, *et al.* Micro fermentación y análisis sensorial para la selección de árboles superiores de cacao. Estación Experimental Tropical Pichilingue. 2011.
- [101] OWUSU, Margaret; PETERSEN, Mikael Agerlin; HEIMDAL, Hanne. Assessment of aroma of chocolate produced from two ghanaiian cocoa fermentation types. En: The 12th International Weurman Flavour Research Symposium. p. 363-366.
- [102] RODRIGUEZ-CAMPOS, J., *et al.* Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. En: Food Chemistry, 2012, vol. 132, no 1, p. 277-288.
- [103] AMORES, Freddy. Diferenciación de variedades de cacao. En: 1, abril 6 del 2006 (Guayaquil). Primera conferencia sobre competitividad y desarrollo del sector cacaotero. Estación Experimental Tropical Pichilingue.
- [104] JIMÉNEZ BARRAGÁN, Juan Carlos. Efecto de dos métodos de fermentación sobre la calidad de tres grupos de cacao *Theobroma cacao* L. cultivados en la zona de Quevedo provincia de Los Ríos. Trabajo de grado Ingeniero Agrónomo. Guaranda: Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Ingeniería Agronómica, 2000. 48 p.

- [105] INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS, QUEVEDO (ECUADOR). ESTACION EXPERIMENTAL TROPICAL PICHILINGUE. Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nor oriente de la provincia de Esmeraldas. 2009.
- [106] PHILLIPS MORA, Wilbert; ARCINIEGAS LEAL, Adriana; MATA QUIRÓS, Allan. Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. 2013.
- [107] CUETO-MORENO, J., *et al.* El mejoramiento del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental "Rosario Izapa", Tuxtla Chico. Chiapas, México, 2007.
- [108] CACAO EN GRANO. NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 1252. 2003.
- [109] DE BRITO, Edy S., *et al.* Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, vol. 81, no 2, p. 281-288.
- [110] HUANG, Dejian, *et al.* High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, vol. 50, no 16, p. 4437-4444.
- [111] DE INDUSTRIA, Superintendencia, *et al.* Estudio Sobre El Sector Cacaotero (Cocoa Sector: The Colombian Case). Disponible en SSRN 2322848, 2012.
- [112] BONVEHÍ, J. Serra. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. En: European Food Research and Technology, 2005, vol. 221, no 1-2, p. 19-29.
- [113] BRAUDEAU, Jean. El Cacao. 1 ed. Barcelona: Blume, 1970.
- [114] DI RIENZO, J. A., *et al.* InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>, 2011.
- [115] HINKELMAN, K.; KEMPTHORNE, Oscar; KSHIVSAGAR, A. M. Design and analysis of experiments. Volume I: Introduction to experimental design. Statistical Methods in Medical Research, 1996, vol. 5, no 1, p. 101-101.
- [116] MORENO, N.; DURÁN, T.; PEREA, J. Evaluación de la variación del perfil ácido del grano de cacao durante los procesos de fermentación y secado. Trabajo de pregrado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Bucaramanga, 1999.