

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



Comparación del perfil de ácidos grasos (ESI-MS y RMN) y el contenido de metilxantinas (HPLC-DAD) en granos de *Theobroma cacao* de siete regiones del Perú.

Tesis para optar el grado de Magíster en Química que presenta

Nieves María Flores March

Dirigido por

DRA HELENA MARUENDA CASTILLO

San Miguel, 2015

RESUMEN

Perú hoy en día es el segundo productor de cacao orgánico del mundo. Los granos de cacao peruano y productos derivados son muy cotizados a nivel mundial, sobretodo la variedad criollo, pues esta se encuentra catalogada como cacao fino y de aroma. Los biomarcadores más importantes asociados con sabor, aroma y textura del cacao son la teobromina, la cafeína y ácidos grasos diversos.

En este trabajo, financiado por el CONCYTEC (FONDECYT-012-2013) y la PUCP (DGI-2013-0075) se ha implementado curvas de calibración HPLC-DAD para cuantificar teobromina y cafeína en 15 muestras de cacao pertenecientes a las variedades criollo y trinitario provenientes de 7 departamentos del Perú. Se determinó la razón teobromina/cafeína y se la relacionó con origen siguiendo lo sugerido en la literatura. La metodología HPLC-DAD y LC-MS implementada permitió confirmar la presencia de compuestos comúnmente presentes en el cacao (ácido cinámico, ácido protocatéquico, aspartato de ácido cafeico, catequina, aspartato de ácido cumárico, procianidina B, deoxiclovamida, epicatequina, procianidina C, pentámero de catequina y clovamida).

Además, en este trabajo se presenta un estudio de análisis de masas tándem-inyección directa-electrospray para la identificación de ácidos grasos en la manteca de cacao de las 15 muestras bajo estudio. Cabe resaltar que este tipo de estudio es el primero que se reporta en la literatura del cacao. Se confirma la presencia mediante masas tándem de los 10 ácidos grasos mayoritarios dentro de las 15 muestras.

El perfil metabolómico basado en espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) del extracto metanólico del cacao y de la manteca también se reporta. Se comprueba la presencia de varios de los compuestos arriba listados, así como también ácidos orgánicos y aminoácidos diversos. Se registra el porcentaje de grasas saturadas, insaturadas, mono-insaturadas, poli-insaturadas, así como también, el ácido linoleico (C18:2) y el ácido linolénico (C18:3), calculados todos en base al perfil de ^1H -RMN del extracto apolar.

Palabras Clave: Cacao, criollo, trinitario, HPLC-DAD, LC-MS, ESI-MS, ^1H -RMN, metilxantinas, ácidos grasos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios (Santiago 1:5).

A la Dra. Helena Maruenda mi asesora, por guiarme en la realización de la presente tesis y por el tiempo brindado.

A mi familia y amigos que siempre tenían un consejo y oración para mí.

A Mg. Ana González, Dr. Juan López, Mg Alex Nieva, Rodrigo Cabrera, José Montero, Linda Soto, Anastasia Gant, Rubén Manrique, Álvaro Zevallos por su compañía y enseñanzas en el laboratorio de Productos Naturales, con lo que se pudo presentar un poster en el mes de la investigación PUCP.

Al Ing Humberto Martínez por la ayuda incondicional.

A Franco Centurión, Yenny Allcca, José Monteza, Betty Tevez, Jean Pier, Glibver Vasquez, Deivy Quiroz y Alexis Uechi por la amistad estos dos años de estudio.

Al personal docente y administrativo de la Sección Química PUCP por el tiempo compartido.

A las cooperativas cacaoteras presentes en el 5to Salón de Cacao y Chocolate (SCCH), en el Salón del Cacao Peruano de la 6ta Expoalimentaria y en la 4ta edición Expo Café Perú por las muestras de granos de cacao obsequiados.

Al CONCYTEC, organismo que ha financiado mis estudios de maestría dentro del marco del CONVENIO DE GESTIÓN N° 012-2013-FONDECYT.



Nieves María Flores March

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN: EL CACAO	1
1.1 Cultivo y granos de cacao	2
1.2 Situación del cacao a nivel global.....	4
1.3 Cacao peruano	6
1.3.1 Situación de cacao a nivel nacional.....	7
1.3.2 Exportaciones de granos y derivados del cacao en el Perú.....	9
1.4 Formulación del problema y objetivos	11
2. CACAO: PROCESAMIENTO, COMPOSICIÓN Y BENEFICIOS A LA SALUD	12
2.1 Procesos de pos-cosecha del grano de cacao	12
2.1.1 Apertura de mazorcas	12
2.1.2 Fermentación del cacao	12
2.1.3 Secado	14
2.2 Composición de granos de cacao	15
2.2.1 Carbohidratos.....	15
2.2.2 Ácidos orgánicos	16
2.2.3 Proteínas y aminoácidos	16
2.2.4 Polifenoles	17
2.2.5 Metilxantinas	18
2.2.6 Lípidos.....	20
2.3 Beneficios del cacao.....	22
2.4 Metodología cuantitativa en el análisis químico de cacao	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Reactivos, materiales, equipos e instrumentos	25
3.1.1 Reactivos	25
3.1.2 Materiales	25
3.1.3 Instrumentación.....	25
3.2 Metodología.....	26
3.2.1 Determinación de humedad y pH de granos de cacao	26
3.2.2 Extracción de manteca de cacao	26
3.2.3 Preparación de extracto metanólico de cacao	27
3.2.4 Análisis HPLC del extracto metanólico de cacao	28
3.2.4.1 Análisis Cualitativo	28

3.2.4.2	Análisis Cuantitativo	29
3.2.5	Espectros de emisión y excitación	29
3.2.6	Análisis cualitativo de extracto metanólico por LC-MS	29
3.2.7	Preparación de muestra de manteca de cacao para análisis ESI-MS.....	30
3.2.8	Análisis de manteca de cacao por ESI-MS.....	30
3.2.9	Preparación del extracto metanólico para RMN	30
3.2.10	Preparación del extracto lipídico para RMN	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1	Preparación de los extractos bajo estudio: grasas y metilxantinas.....	32
4.1.1	Secado y pelado	32
4.1.2	Extracción de grasas.....	34
4.1.3	Extracción de metilxantinas.....	35
4.2	Análisis químico de las muestras de cacao: metilxantinas y grasas.....	36
4.2.1	Estudio cualitativo y cuantitativo del extracto metanólico mediante HPLC-DAD-FD y LC-MS	36
4.2.2	Estudio cualitativo del extracto de grasa mediante ESI-MS.....	47
4.2.3	Perfil metabólico de cacao mediante resonancia magnética nuclear	52
4.2.3.1	Estudio del perfil metabólico del extracto metanólico de cacao	52
4.2.3.2	Determinación de porcentaje de insaturación de la manteca mediante ¹ H-RMN.	59
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
6.	REFERENCIAS.....	64
7.	ANEXOS.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1	Exportación e importación de granos de cacao (código arancelario 180100) por países en el 2014.....	5
Tabla 1.2	Producción de cacao por departamento en el Perú.....	9
Tabla 1.3	Exportación de cacao peruano en el año 2014.....	10
Tabla 2.1	Composición química de cacao en grano fermentado y secado al sol.....	15
Tabla 2.2	Contenido de teobromina y cafeína en granos de cacao de diversos países.....	19
Tabla 2.3	Ácidos grasos de granos de <i>Theobroma cacao</i>	21
Tabla 4.1	Humedad, porcentaje de cáscara y grasa en granos de <i>Theobroma cacao</i>	33
Tabla 4.2	Grasa extraída de 10 g de granos de cacao seco mediante tres procesos consecutivos (E1, E2, E3) de extracción por sonicado empleando hexano.....	34
Tabla 4.3	Evaluación de la eficiencia de tres métodos de extracción de cacao mediante HPLC-DAD ($\lambda = 270 \text{ nm}$) ^a	35
Tabla 4.4	Comparación de longitudes de onda de excitación y emisión de estándares, obtenidos en el espectrofluorímetro Perkin Elmer y por detección HPLC-FD	38
Tabla 4.5	Tabla de rango de tiempo y detección (con PMT=10) de los 10 compuestos posiblemente presentes en las muestras de cacao bajo estudio.....	39
Tabla 4.6	Compuestos confirmados por LC-MS/MS en extracto metanólico de cacao	41
Tabla 4.7	Curva estándar de la teobromina y cafeína validadas según linealidad y precisión	43
Tabla 4.8	Contenido (g /100 g) ^a de teobromina (T) y cafeína (C) en granos de cacao de diferentes departamentos y cooperativas del Perú.....	43
Tabla 4.9	Ácidos de grasos presentes en las 15 muestras de cacao identificados mediante MS y confirmados con MS/MS.....	48
Tabla 4.10	Ácidos grasos identificados en muestras de cacao mediante ESI MS/MS	50
Tabla 4.11	Grado de insaturación de 15 muestras de granos peruanos de <i>Theobroma cacao</i> mediante ESI-MS/MS.....	51
Tabla 4.12	Metabolitos presentes en extracto metanólico de cacao confirmado mediante desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (H_z) en estudio de RMN.....	56
Tabla 4.13	Porcentaje de grasas: saturadas, insaturadas, mono-insaturadas, poli-insaturadas y C18:2 y C18:3 mediante análisis RMN de protón.....	60

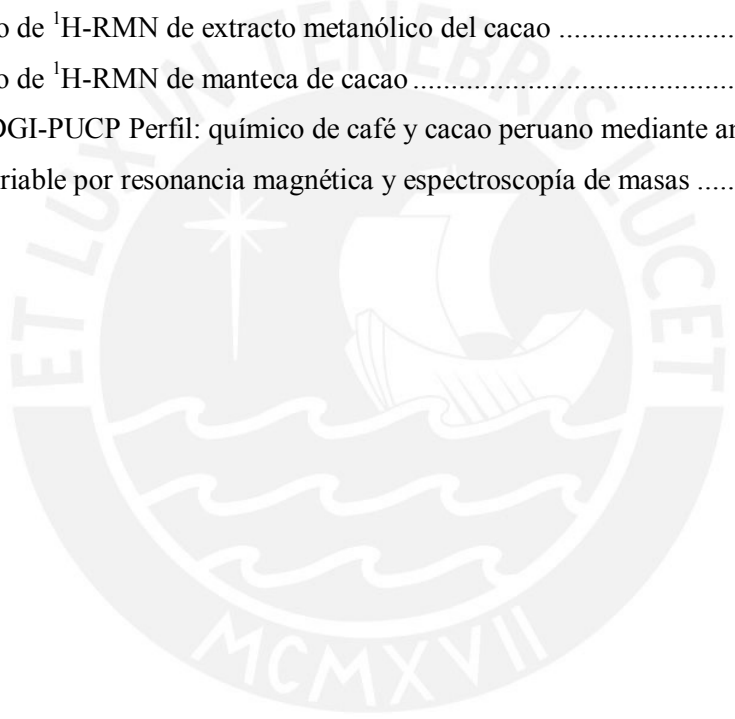
LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Granos de cacao diversos (foto adaptada de referencia (16)).....	2
Figura 1.2	Prueba de corte en granos de cacao criollo, trinitario y forastero (23).	4
Figura 1.3	Principales zonas productoras de cacao en el Perú (39).....	8
Figura 1.4	Destino de la exportación de cacao en grano del Perú 2013 - 2014	10
Figura 2.1	Estructura química de la teobromina y la cafeína.....	18
Figura 2.2	Relación entre el contenido de metilxantinas y el genotipo de cacao (44)	19
Figura 2.3	Estructura química del glicerol, ácido graso libre y triglicérido.	20
Figura 4.1	Cromatograma de separación de 10 estándares a 270 nm en 50 min a 30 °C (Hitachi).....	36
Figura 4.2	Efecto de la temperatura en la separación de los 10 compuestos de interés (20 °C, 30 °C y 40 °C).....	37
Figura 4.3	Cromatogramas de estándares por detección FD y DAD 270 nm.	39
Figura 4.4	Cromatograma representativo del extracto metanólico de cacao mediante HPLC- DAD. a) 270 nm; b) 260 nm; c) 320 nm y d) mediante HPLC-FD, PMT 10 bajo condiciones definidas en la Tabla 4.5.....	40
Figura 4.5	Separación cromatográfica de teobromina y cafeína en 13 min mediante HPLC- DAD a $\lambda = 270$ nm.	42
Figura 4.6	Relación entre el contenido de metilxantinas y el genotipo del cacao.....	46
Figura 4.7	Espectro de ^1H -RMN del extracto metanólico de cacao.	54
Figura 4.8	Espectro COSY del extracto metanólico de cacao.	55
Figura 4.9	Espectro de ^1H -RMN de la fase lipídica de cacao en CDCl_3 obtenido a 25°C.....	59

LISTA DE ANEXOS

A. 1	Cromatograma HPLC-DAD 70 min, equipo Hitachi, de estándares.	75
A. 2	Cromatograma HPLC-DAD-FLD 50 min, equipo Agilent, de estándares.	76
A. 3	Cromatograma mediante HPLC-DAD 70 min, equipo Hitachi, de un extracto metanólico de cacao representativo.	79
A. 4	Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M3).	81
A. 5	Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M4).	85
A. 6	Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M5).	90
A. 7	Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M7).	95
A. 8	Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M8).	100
A. 9	Cromatograma HPLC-DAD 13 min, equipo Agilent, de teobromina y cafeína.	105
A. 10	Espectro de excitación de ácido gálico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	107
A. 11	Espectros de emisión de ácido gálico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	107
A. 12	Espectro de excitación de ácido protocatéquico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	108
A. 13	Espectros de emisión de ácido protocatéquico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	108
A. 14	Espectro de excitación de ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	109
A. 15	Espectros de emisión de ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	109
A. 16	Espectro de excitación de ácido vanílico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	110
A. 17	Espectros de emisión de ácido vanílico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	110
A. 18	Espectro de excitación de ácido cafeico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	111
A. 19	Espectros de emisión de ácido cafeico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	111
A. 20	Espectro de excitación de ácido clorogénico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.	112

A. 21	Espectros de emisión de ácido clorogénico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70	112
A. 22	Espectro de excitación de ácido <i>p</i> -cumárico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70	113
A. 23	Espectros de emisión de ácido <i>p</i> -cumárico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70	113
A. 24	Espectro de excitación de ácido ferúlico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70 ...	114
A. 25	Espectros de emisión de ácido ferúlico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70.....	114
A. 26	Espectro ESI-MS de muestra representativa de manteca de cacao M6 en modo negativo	115
A. 27	Espectro de ¹ H-RMN de extracto metanólico del cacao	118
A. 28	Espectro de ¹ H-RMN de manteca de cacao	119
A. 29	Poster DGI-PUCP Perfil: químico de café y cacao peruano mediante análisis multivariable por resonancia magnética y espectroscopía de masas	120



LISTA DE ABREVIATURAS

C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
%AS	Porcentaje de ácidos saturados
%API	Porcentaje de ácidos poli-insaturados
%AMI	Porcentaje de ácidos mono-insaturados
%AI	Porcentaje de ácidos insaturados
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
ESI	Ionización mediante electroaspersión
ESI-MS	Ionización mediante electroaspersión por espectrometría de masas
FD	Detector de fluorescencia
FID	Decaimiento de inducción libre
GABA	Ácido γ -aminobutírico
ha	Hectárea
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta performance con detector de arreglo de diodos

ICCO	Organización Internacional del Cacao
INDECOPI	Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual
ISO	Organización Internacional de Normalización
ITC	Centro de Comercio Internacional
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
m/z	Relación masa/carga
MINAGRI	Ministerio de Agricultura y Riego
mM	Milimolar
NTP	Normas Técnicas Peruanas
S/N	(Relación) Señal/ Ruido
T	Toneladas
w/w	Relación peso/peso
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
λ_{em}	Longitud de onda de emisión

1. INTRODUCCIÓN: EL CACAO

Theobroma cacao (familia Malvaceae subfamilia Sterculioideae) es una especie nativa de las regiones tropicales de América. Las semillas fermentadas y secas de este árbol son la materia prima para la elaboración de pasta de cacao, cocoa y chocolates. El género *Theobroma* incluye un total de 22 especies (1).

La especie *Theobroma cacao* comprende una gran variedad de formas (2 – 4). Se originó probablemente en el Alto Amazonas (5), pero fue domesticado primero en Mesoamérica (6). Para la caracterización de las formas se utilizan hoy en día, aparte de las características morfológicas (flores), características agronómicas (resistencia a enfermedades, forma del fruto y tamaño del grano) y moleculares (isoenzimas), así como también marcadores genéticos (3).

Las formas de cacao se clasifican tradicionalmente en tres grupos genéticos: criollo, forastero y trinitario, **Figura 1.1**. Sin embargo, nuevos estudios han mostrado que esta clasificación no describe suficientemente la variabilidad de la especie (5). Particularmente, el grupo forastero abarca una alta variabilidad genética, mientras que las formas criollo son genéticamente más cercanas entre sí. La delimitación clásica de grupos, sin base científica, puede resumirse de la siguiente manera: el nombre forastero aparentemente deriva de la palabra inglesa “forest”. Este designa variedades originarias de la cuenca superior del Amazonas y comprenden las formas de cacao que no son, ni criollo ni de origen híbrido. Se caracteriza principalmente por su fruto verde, una cubierta del fruto (pericarpio) gruesa, un mesocarpio fuertemente lignificado, semillas redondeadas, ligeramente aplanadas y cotiledones de color violeta (7). Por su vigor y resistencia a las enfermedades da origen al cacao ordinario, que constituye el grueso de la producción mundial. Al ser llevado de América a África y al sureste de Asia en el siglo XIX da origen a las variedades West African y Far Eastern (8). Así, con cerca del 80 % de la producción mundial de cacao, el grupo de cultivares forastero es el grupo comercialmente más importante. La mayoría del cacao cultivado en Brasil, África Occidental pertenece a este grupo (9).

El cacao super forastero o nacional se caracteriza por su sabor particular y aroma floral (10); corresponde a variedades provenientes de la zona selvática tropical de los Andes colombianos y ecuatorianos, en particular la zona del valle del río Guayas en Ecuador, donde se le conoce como “de arriba”. Este cacao es genéticamente diferente a los conocidos como forastero, criollo y trinitario (11).

entre 4 a 8 m (2). Estos árboles son plantados bajo la sombra de árboles más grandes como bananos, cocoteros y árboles maderables, generándose lo que se denomina sistemas agroforestales.

Las flores crecen en los tallos de forma aislada. Su polinización suele ser cruzada y la realizan los insectos (8). El cultivo de cacao es del tipo permanente y la primera fructificación tiene lugar a los 2 años de la instalación del cultivo. Los frutos se cosechan dos veces al año, antes y después de la temporada de lluvia. Los frutos completamente maduros se cosechan generalmente 5 - 6 meses después de la floración. La maduración se identifica a través del cambio de color en el fruto.

El fruto que deriva de las flores es una baya grande (mazorca) en forma de vaina donde radican entre 20 y 50 semillas unidas a una placenta central. Al madurar las semillas se rodean de un mucílago ácido que contiene ácido cítrico y azúcares, lo que facilita la acción posterior de las levaduras (principalmente *Saccharomyces*) durante el proceso de fermentación. Las almendras son café-rojizas, ovaladas, ligeramente comprimidas de 20 - 30 mm de largo, 12 - 16 mm de ancho y 7 - 12 mm de grosor. Los granos de cacao pesan alrededor de 1 g después de secarse. Para propósitos de comercio internacional y de la norma ISO 2451:2014 el término grano de cacao se refiere a una semilla entera, fermentada y seca. Según la norma ISO los granos de cacao deben tener un contenido de humedad que no exceda el 7.5 % (18), mientras que para Minifie (19) el valor ideal de humedad es de 6 % a 6.5%.

La calidad del grano de cacao se determina por su sabor. En este influye en un 40 % la variedad de la planta, en un 10 % el medio de cultivo, en un 30 % la postcosecha y en un 20 % el proceso industrial. El sabor del cacao es desarrollado durante el curado por los agricultores y durante el procesado por las chocolateras. Los procesos principales en el curado de los granos de cacao son la fermentación y el secado (20). Con el fin de evaluar el grado de fermentación, los granos de cacao pueden ser divididos en cuatro categorías por el color de sus cotiledones (8): granos completamente fermentados con color marrón; granos parcialmente marrones parcialmente púrpuras; granos completamente púrpuras y granos pizarrosos (secos sin surcos) (**Figura 1.2**). El color de los granos fermentados está relacionado con el contenido inicial de polifenoles (21,22). Granos blancos saben a nuez, así como también los marrones bien fermentados, granos violetas (parcialmente fermentados) tienen sabor amargo y áspero mientras que los granos pizarrosos, granos secos sin fermentar, son de sabor astringente.

La calidad también se mide a través del tamaño. Este se expresa por número de granos que pesen un total de 100 gramos. Son considerados granos grandes aquellos que tienen igual o menos de 100

granos por 100 gramos; granos medianos tienen de 101 - 120 unidades en 100 gramos y granos pequeños comprenden 120 unidades o más por cada 100 gramos (18).

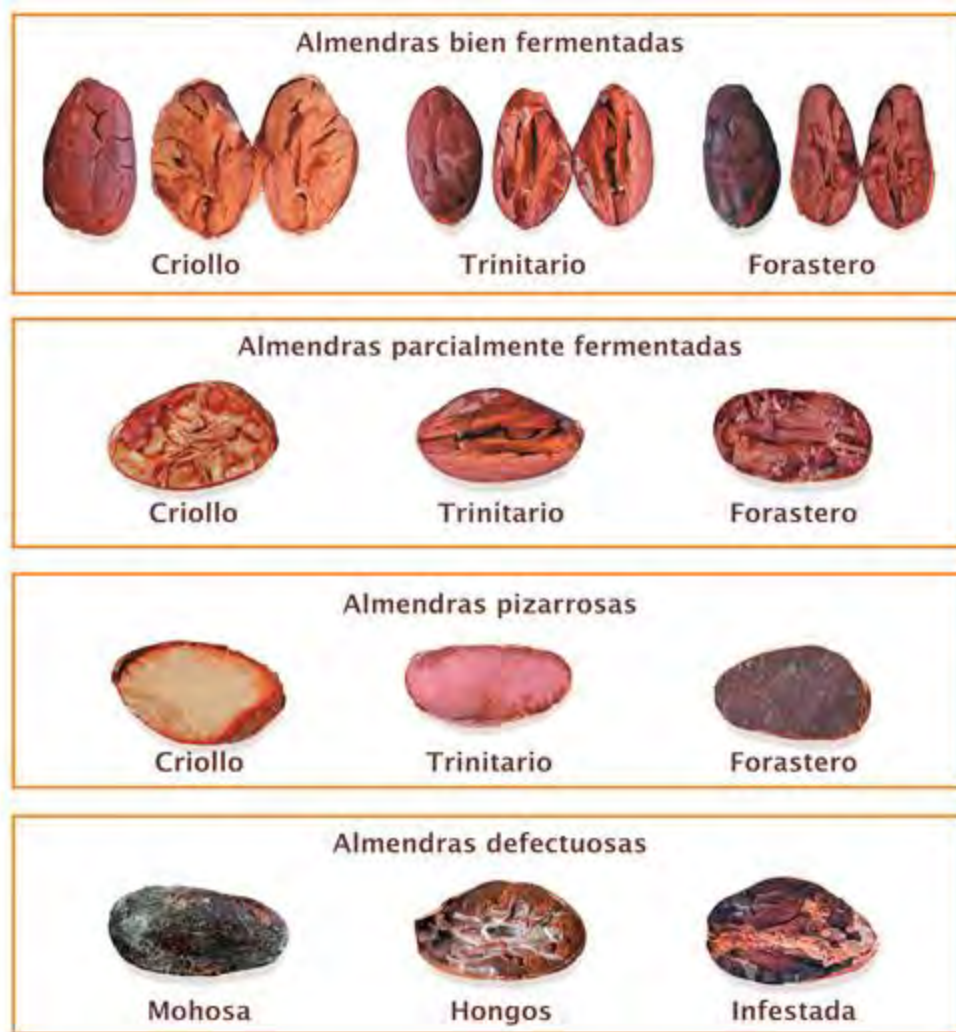


Figura 1.2 Prueba de corte en granos de cacao criollo, trinitario y forastero (23).

1.2 Situación del cacao a nivel global

Actualmente, en el mundo se consumen más de 3.5 millones de toneladas de granos de cacao (semillas fermentadas y secas del árbol *Theobroma cacao*) al año, principalmente como ingrediente clave en la producción de chocolate (24). Se estima que la demanda mundial del cacao para el 2020 va a bordear los cinco millones de toneladas y la oferta no superará los 4.1 millones de toneladas (25).

El cacao es un *commodity* cuyo precio se establece por oferta y la demanda en los mercados de capitales. En el mercado ordinario de cacao el rango se encuentra entre US \$ 2000 - 2500 por tonelada. En el caso de los productores con certificación de comercio justo y cacao orgánico, estos obtienen una prima adicional sobre el precio de US \$ 500 por tonelada. En el nicho de fino y de aroma los precios se encuentran entre US \$ 2500 - 5000 por tonelada (26).

Tabla 1.1 Exportación e importación de granos de cacao (código arancelario 180100) por países en el 2014.

Exportaciones				Importaciones				
	País	Valor ^a	Volumen ^b	% P	País	Valor ^a	Volumen ^b	% P
1	Costa de Marfil	3045.1	1117000	30.5	Países Bajos	1897.7	667503	19.6
2	Ghana	2411.5	790524	24.1	EEUU	1312.3	437366	13.6
3	Nigeria	658	218062	6.6	Alemania	943.1	307230	9.7
4	Países Bajos	611.6	202248	6.1	Malasia	916.7	298524	9.5
5	Ecuador	587.8	198777	5.9	Bélgica	873.2	263605	9
6	Camerún	563.6	192637	5.6	Francia	436.1	137724	4.5
7	Bélgica	435.3	135441	4.4	Indonesia	341.4	109410	3.5
8	Malasia	293	93557	2.9	España	341	109001	3.5
9	República Dominicana	212.1	68196	2.1	Italia	296.3	91746	3.1
10	Indonesia	196.5	63334	2	Singapur	269.6	91119	2.8
11	Perú	152.8	47217	1.5	Turquía	266.7	81072	2.8
12	EEUU	143.8	47378	1.4	Rusia	213.1	65008	2.2
13	Papua Nueva Guinea	128.6	41371	1.3	Canadá	202.1	60873	2.1
14	Estonia	122.7	42252	1.2	Reino Unido	178.2	60187	1.8
15	Uganda	59.4	25939	0.6	Suiza	142.4	43294	1.5
16	Alemania	57.8	17805	0.6	Estonia	114.2	39504	1.2
17	Francia	34.5	8655	0.3	Brasil	107.6	38301	1.1
18	Sierra Leona	31.9	10215	0.3	China	106.4	38042	1.1
19	Liberia	25.9	9454	0.3	India	102.7	31813	1.1
20	Colombia	24.3	8018	0.2	Japón	101.5	31760	1
21	Tanzanía	22.1	11026	0.2	México	90.1	28659	0.9
22	Venezuela	19.1	6854	0.2	Ucrania	64.8	17880	0.7
23	Madagascar	16.7	8231	0.2	Tailandia	57	17539	0.6
24	Guinea	8.92		0.1	Austria	49	15048	0.5

^a Millones de dólares, ^b Toneladas, % P Participación por montos de exportación

Adaptado de: International Trade Centre (27)

Los principales exportadores de cacao se encuentran en África, Asia y América Latina. Dentro de los mayores exportadores de cacao algunos son países con gobiernos inestables como Costa de Marfil, Ghana y Nigeria. Dentro de estos, Costa de Marfil resalta como el mayor exportador, concentrando el 30.5 % de los envíos globales (**Tabla 1.1** (27)). Entre los principales importadores, Países Bajos y Estados Unidos representan el primer mercado de cacao. Se sabe que los excedentes que no procesan los re-exportan a otros países (**Tabla 1.1** (27)).

1.3 Cacao peruano

El cultivo de cacao en Perú comenzó en el siglo XVIII, época durante la cual se introdujeron en el país cultivares desde el Caribe, América Central y Ecuador. Los genotipos de cacao actualmente cultivados en el Perú consisten de variedades tradicionales e híbridos derivados de los germoplasmas introducidos (4,28,29)

En el 2011, el cultivo de las variedades de cacao se distribuyó en: 44% criollo (criollo + nativo), 54% trinitario (CCN51) y un máximo de 2%, forastero (30). Por ello, dado el alto porcentaje de cacao criollo y trinitario, en el 2008 el Perú fue calificado por la Organización Internacional del Cacao (ICCO) como un país productor y exportador de cacao fino y de aroma (31). Los cacaos de fino y aroma son buscados por los fabricantes de chocolate debido a sus sabores frutales a nueces/malta y aromas florales únicos.

En la zona norte del país existe una variedad denominada “porcelana” por el color blanco de las semillas (cacao blanco). Esta variedad se caracteriza por: presentar una marcada uniformidad fenotípica en el color de la mazorca, ser un árbol con arquitectura típica, poseer un grano con sabor a panela/malta, y mostrar susceptibilidad a la “putrefacción parda” y “moniliasis” (32). Esta variedad se cultiva en las provincias de Morropón y Huancabamba (Piura), y su origen probablemente se remonta a una variedad criolla que se cultiva en la zona vecina de San Ignacio (Cajamarca). Esta hipótesis se apoya en las similitudes morfológicas de frutos y semillas de ambos cultivares, así como por argumentos históricos y de comportamiento migratorio del poblador andino - amazónico (30).

En Cuzco existe otra variedad conocida como “Chuncho”, nativo de las selvas de la Chunchada, en la provincia de La Convención, Cuzco. El nombre proviene del sitio, puesto que la zona está habitada por los indígenas chunchos de las etnias Machinguengas. Esta variedad produce un cacao de mayor aromaticidad (33).

En el 2008 se encontraron en Jaén dos árboles dentro de la finca de Faustino Colala, el denominado Fortunato n°4. Estos fueron identificados como los únicos sobrevivientes del cacao Nacional, estrella del cacaotal ecuatoriano declarado extinto a comienzos del siglo XX (34, 35).

El 90% del cacao peruano y sus preparaciones se destinan a la exportación. Los productores buscan posicionarse en el mercado interno impulsados por las ediciones del Salón de Cacao y Chocolate en Perú, y sus intervenciones en el Salon Du Chocolat de París. En el 2013 el cacao fue declarado un “producto bandera” (36). La contribución al producto interno bruto del 2013 por concepto de exportaciones de productos derivados del cacao fue de 0.075%.

1.3.1 Situación de cacao a nivel nacional

Perú es el segundo productor mundial de cacao orgánico (31), participando en su cultivo más de 45000 familias minifundistas con un promedio de 1.5 hectáreas por parcela (37). La siembra de cacao se incrementó en la década pasada debido a los mejores precios del mercado internacional y los esfuerzos para el desarrollo agrícola implementados para reducir el área de las plantaciones de coca (38).

Los departamentos con mayor producción de cacao: San Martín (32 mil T), Cuzco (10 mil T), Ayacucho (9 mil T) y Junín (6 mil T) (**Figura 1.2** (39)). Durante el periodo 2011 - 2013, San Martín y Cuzco concentraron el 60% del volumen de la producción nacional (**Tabla 1.2** (39)).

La productividad se define como kilogramo de grano seco por hectárea de cacao cultivado, y el rendimiento típico de un cultivo comercial varían de 100 a más de 3000 kg/ha, dependiendo del método de cultivo, el espacio entre los árboles y la naturaleza del híbrido (19). La media mundial se ubica entre 240 y 450 kg/ha (40). En los últimos años, la productividad del país ha aumentado de 671 a 736 kg/ha (2011 al 2013) (**Tabla 1.2** (39)) y en el 2014 el país obtuvo una productividad de 760 kg/ha. La productividad de San Martín llegó en el 2014 a 1000 kg/ha, según declaraciones de Alianza Cacao (26). Con respecto a la calidad del grano de cacao, sobresale el cacao de Palo Blanco y Pucacaca en Piura, además de los de Santa Rosa, Villa Prado y Schambira en San Martín (41).

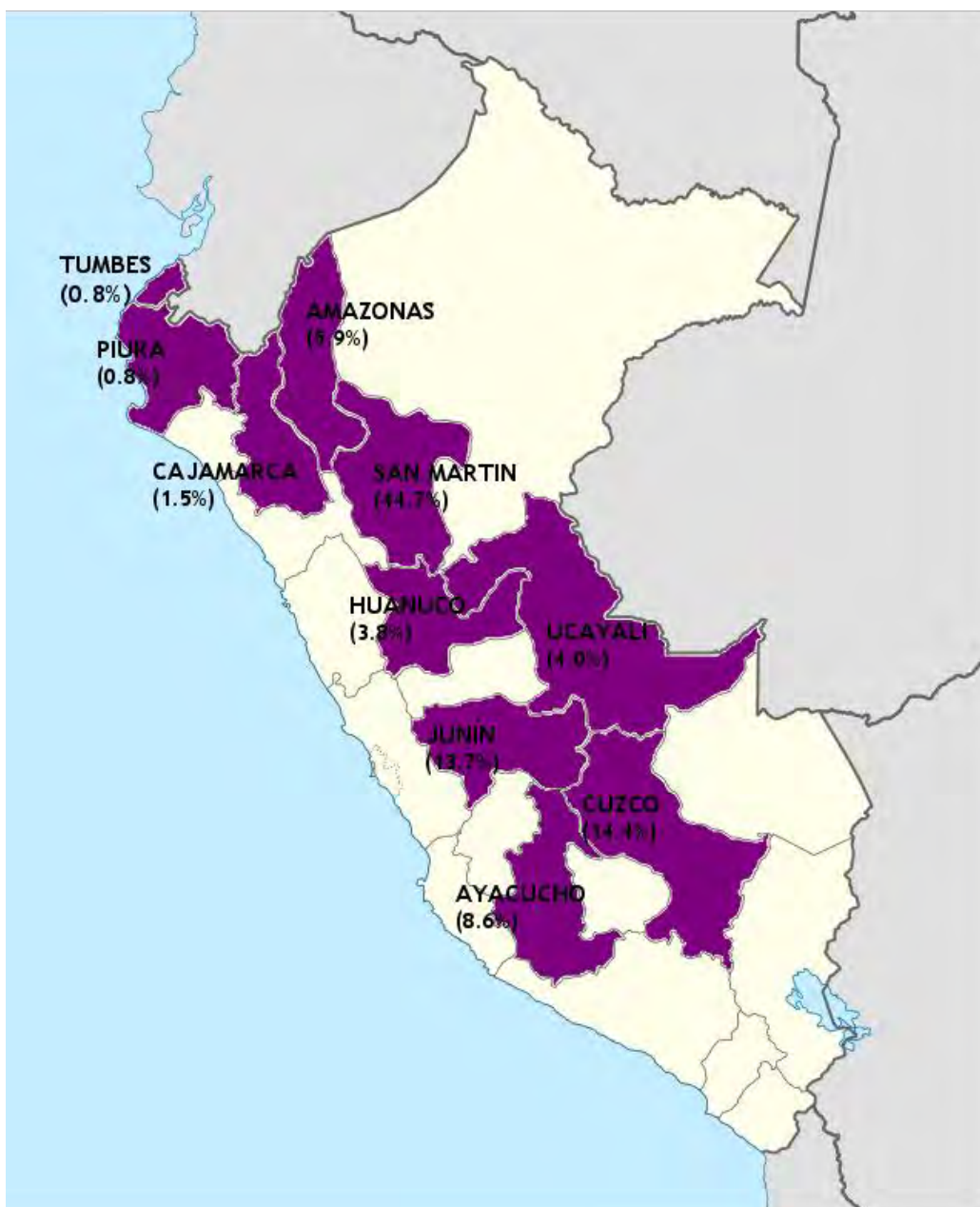


Figura 1.3 Principales zonas productoras de cacao en el Perú (39)

Tabla 1.2 Producción de cacao por departamento en el Perú

	Región	Producción (toneladas)			Superficie Cosechada (ha)			Rendimiento (kg/ha)		
		2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013
1	San Martín	25,817	26,737	32,126	28,984	29,039	34,649	891	921	927
2	Cuzco	8,083	9,227	10,351	21,740	25,362	21,831	372	364	474
3	Junín	6,178	7,557	9,835	9,356	10,288	12,704	660	735	774
4	Ayacucho	6,180	6,186	6,188	8,784	8,790	8,780	704	704	705
5	Amazonas	4,275	4,484	4,269	6,370	6,655	6,778	671	674	630
6	Ucayali	1,598	2,568	2,888	1,854	2,968	3,255	862	865	887
7	Huánuco	2,092	2,463	2,744	4,201	4,775	5,175	498	516	530
8	Cajamarca	993	1,030	1,046	1,212	1,215	1,242	819	848	842
9	Piura	258	594	546	408	970	1,160	632	612	471
10	Loreto	254	583	377	324	471	470	784	1,238	803
11	Tumbes	327	408	574	345	356	546	948	1,146	1,052
12	Pasco	241	394	575	342	260	578	705	1,515	996
13	Puno	90	148	149	123	199	199	732	744	749
14	La Libertad	56	56	59	45	45	45	1,244	1,244	1,305
15	Madre de Dios	38	46	95	57	78	172	667	590	553
16	Lambayeque	20	11	16	30	27	29	667	407	552
	Total	56,500	62,492	71,838	84,175	91,498	97,613	671	683	736

Fuente: MINAGRI- Series Históricas de Producción Agrícola – Compendio Estadístico (39)

1.3.2 Exportaciones de granos y derivados del cacao en el Perú

En cuanto al rubro de exportación, se sabe que el Perú en el año 2014 destacó por su notable crecimiento, registrando volúmenes negociados de US\$ 153 millones, US\$ 64 millones más respecto a lo exportado en el mismo período del 2013, lo que representó un incremento del 72 %. El volumen exportado creció en 47% al pasar de 32000 mil toneladas en el 2013 a 47100 mil toneladas en el 2014 (27).

De un total de 38 países que adquirieron cacao en grano del Perú, Holanda fue el principal mercado de destino con US\$ 40 millones (26% del total de las ventas). En el segundo lugar se encuentra Bélgica con US\$ 26.1 millones (17%), le sigue Alemania (12%), Italia (11%) y Estados Unidos (7%), entre otros (**Figura 1.4** (27)).

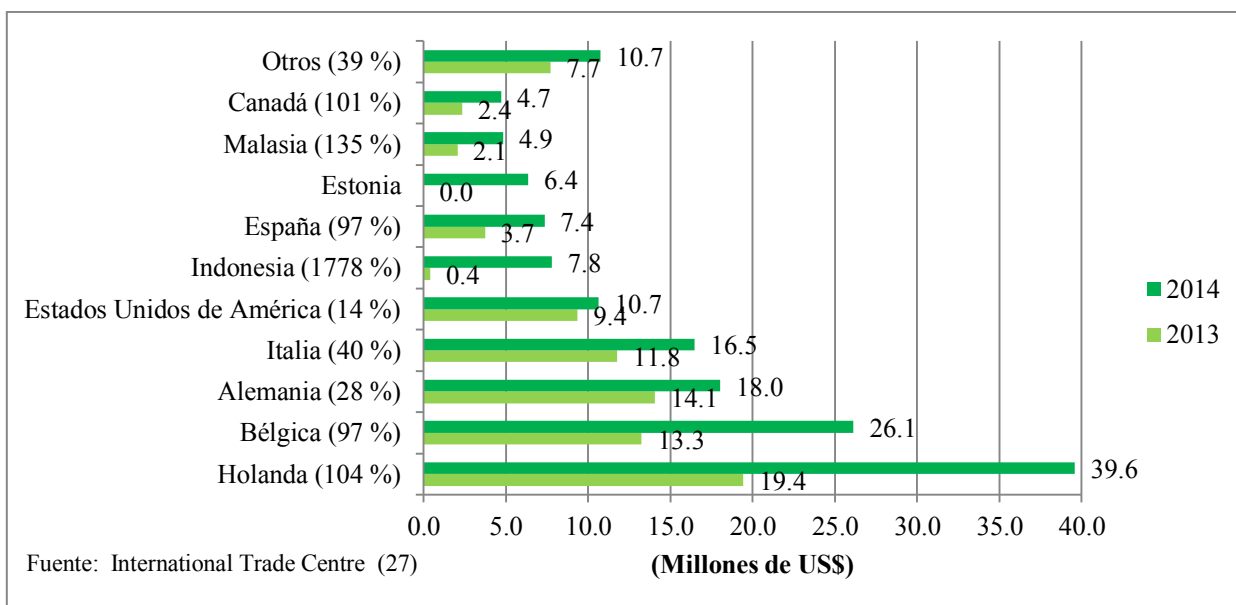


Figura 1.4 Destino de la exportación de cacao en grano del Perú 2013 - 2014

En el 2014 el 65% de la exportación de cacao corresponde a granos de cacao (152.7 millones de dólares) y el 21% la manteca de cacao con 48.6 millones de dólares (**Tabla 1.3** (27)). La pasta de cacao y la manteca de cacao son productos procesados del cacao, usados para la elaboración de chocolate o como materia prima en la industria cosmética y farmacéutica.

De un total de 66 empresas que exportaron cacao en grano, Amazonas Trading Perú S.A.C. destacó como líder al representar el 17% de la negociaciones, seguido por Exportadora Romex SA (13%), Sumaqaq Sociedad Anónima Cerrada (12%), Armajaro Perú SAC (11%), Cooperativa Agraria Cacaotera – ACOPAGRO (10%), Machu Picchu Foods SAC (7%), Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo (4%), todas juntas representan el 74% del total exportado (42,43).

Tabla 1.3 Exportación de cacao peruano en el año 2014

Por Producto	Millones \$	%	US \$/TM	TM	%
Grano	152.7	65.3	3236.32	47186	72.98
Manteca de cacao	48.6	20.8	6906.95	7039	10.89
Pasta de cacao	6.9	2.9	1856.42	3733	5.77
Cocoa	12.2	5.2	3084.01	3952	6.11
Cáscara	0.04	0.02	2666.67	15	0.02
Chocolates	13.4	5.7	4916.85	2730	4.22
Total	233.9	100.0		64655	100.00

Fuente: International Trade Centre (27)

1.4 Formulación del problema y objetivos

Dado que la calidad, el sabor y el precio del cacao dependen de la variedad y del proceso pos-cosecha, factores que afectan la composición química del grano, es vital contar con metodología química cuantitativa que permita discriminar el cacao de acuerdo a biomarcadores específicos asociados con variedad, origen y calidad. Este tipo de estudios no se han realizados en el Perú y por ello el objetivo de esta tesis es el desarrollo de métodos analíticos basados en las espectroscopías ultravioleta - visible, fluorescencia, masas y resonancia magnética nuclear

En las siguientes secciones se describirá la composición química del cacao, los cambios fisicoquímicos que tienen lugar durante la pos-cosecha del grano de cacao, con especial énfasis en la evolución de compuestos de interés y las metodologías que se utilizan para el análisis de este tipo de metabolitos.



2. CACAO: PROCESAMIENTO, COMPOSICIÓN Y BENEFICIOS A LA SALUD

2.1 Procesos de pos-cosecha del grano de cacao

La calidad de los granos de cacao depende de muchos factores como son el genotipo, manejo agronómico, factores edafológicos, condiciones climáticas y buenas prácticas pos-cosecha (44), etapa que se inicia con la remoción de las mazorcas maduras de cacao de los árboles. Ese proceso incluye la separación de las mazorcas sanas de las enfermas, la separación de las semillas del interior de las mazorcas, de la fermentación y el secado de éstas.

2.1.1 Apertura de mazorcas

Después de la cosecha las mazorcas se deben abrir inmediatamente. Ello se realiza mediante una variedad de medios dependiendo de la ubicación, incluyendo el uso de machetes o un mazo de madera. La práctica de cortar con machete requiere una considerable habilidad ya que las semillas se pueden dañar fácilmente durante esta operación y puede penetrar moho y plagas durante el almacenamiento. Al abrirse los granos permanecen unidos a la placenta, las semillas son removidas y se excluyen los granos germinados, negros o con enfermedad (45).

2.1.2 Fermentación del cacao

La pulpa mucilaginosa del cacao fresco representa el 40% del grano en peso húmedo (46), es rica en azúcares fermentables como glucosa, fructosa, sacarosa, y sales inorgánicas y mantiene un pH de 3.0 a 3.5, en parte debido a la presencia de ácido cítrico. Este medio es ideal para el crecimiento de levaduras y bacterias ácido lácticas (47). El grano está constituido de células blancas de grasa y proteína y células púrpuras de polifenoles. La cáscara provee una barrera para la penetración dentro del grano y la difusión de compuestos (48). La fermentación de los granos ocurre en dos etapas, una anaeróbica y otra aeróbica. La primera dura 48 horas y en esta etapa las levaduras fermentan anaeróticamente los azúcares de la pulpa convirtiéndolos en etanol y CO₂. Algunas levaduras producen ácidos orgánicos débiles incluidos ácido acético, oxálico, fosfórico, succínico y málico que tienen capacidad amortiguadora de cambios de pH, además producen compuestos volátiles (isopropil acetato, etilacetato, metanol, 1-propanol, 2,3-butanodiol, 2-fenil etanol) (46). Las levaduras consumen ácido cítrico y junto con el drenado de la pulpa por despolimerización de la pectina (por la acción de enzimas) genera el aumento del pH de la pulpa, permitiendo el crecimiento

de bacterias. Las bacterias ácido lácticas convierten a los azúcares en ácido cítrico, luego consumen a este ácido, al igual que al ácido málico, produciendo productos no ácidos.

En la segunda etapa, las bacterias ácido acéticas aeróbicas oxidan exotérmicamente el etanol en ácido acético, e incrementan la temperatura del grano a 50 °C (49). El etanol y el ácido acético migran a través de la cáscara hacia los cotiledones generando la disminución del pH de 6.5 a 4.8 (48). La temperatura y el pH promueven la muerte del grano y un daño de la estructura interna, eliminando la separación espacial entre las enzimas y los sustratos, dando lugar a la formación de los precursores de sabor (48). En esta etapa ocurren varios tipos de hidrólisis catalizadas por enzimas externas: las invertasas hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa (50), las glicosidasas hidrolizan las antocianinas en antocianidinas y azúcares (51), proteasas hidrolizan proteínas en péptidos hidrofóbicos y las polifeniloxidasas convierten los flavonoides en quinonas. Durante este proceso las quinonas se acomplejan con aminoácidos y proteínas y polimerizan con otros flavonoides para formar los taninos (48). Si los granos de cacao después de la fermentación registran un pH alto (5.5 - 5.8), estos son considerados granos mal fermentados, mientras que un pH bajo (4.8 - 5.2) significa fermentación óptima (45). Después de la fermentación y secado los granos forasteros se caracterizan por presentar un pH alto comparado con los granos criollos (52).

El tiempo de fermentación varía de acuerdo a la variedad del grano: para criollo de 2 - 4 días y para la variedad forastero de 4 a 7 días. La duración se debe controlar por el promedio de pruebas de corte. Mientras más oscura (violeta) sean las almendras de cacao, caso de los granos forastero, mayor tiempo se requerirá para fermentar.

Existen diferentes métodos para realizar la fermentación de los granos de cacao. Este varía de acuerdo al país, zona dentro del país, y preferencia del agricultor (53). Los métodos son de cuatro estilos: en plataforma, montón, canastas y en cajas. En el Perú se usa la técnica de fermentación en cajas. Las cajas de madera pueden contener entre 1 tonelada y 2 toneladas de granos. Su diseño incluye agujeros usualmente en la base con el objeto de permitir el drenaje de las sustancias que desprenden de granos y pulpa. En la fermentación en cajas, los granos son cubiertos con hojas de plátano para conservar el calor generado durante el proceso de fermentación. Los granos son movidos de una caja a otra cada día para incrementar la aireación y dar un tratamiento más uniforme, permitiendo que los granos del exterior de la masa estén expuestos a las temperaturas del interior. Buenas prácticas en fermentación son importantes para evitar la formación de micotoxinas.

2.1.3 Secado

Los granos son secados antes de ser transportados a la fábrica de chocolates. Una falla observada es el crecimiento de hongos en los granos si no se llega a la humedad adecuada durante el secado. Esto genera en los chocolates un sabor desagradable fuerte.

El proceso de secado de los granos reduce la humedad a menos de un 8 % (45,50). Un porcentaje menor al 6 % no es recomendable, pues dificulta el procesamiento del grano. El secado se lleva a cabo bajo el sol o por métodos artificiales. Durante el secado se reduce el nivel de acidez y de la astringencia del cacao, disminuyendo también el contenido de compuestos volátiles (46). Durante el secado y tostado, los péptidos y aminoácidos, juntos con los azúcares reductores presentes en granos fermentados de cacao, experimentan reacciones de Maillard, proceso al que se le adjudica el color y aroma típico del cacao. Las reacciones de Maillard forman los primeros compuestos de Amadori, los cuales son productos de condensación de aminoácidos y azúcares reductores como fructosa (54). Los azúcares reductores son el reactivo limitante de esta reacción (55). Otra forma de oscurecimiento es el enzimático, que involucra la transformación de compuestos fenólicos primero a quinonas y luego a polímeros marrones o negros bajo la influencia catalítica de la enzima polifenoloxidasasa (56). El aroma específico de la cocoa también se genera durante el proceso de secado y se ha demostrado que se encuentra asociado a la presencia de múltiples compuestos químicos como lo son: pentanal, 2,3-butanodiona, acetoina, fenil acetaldehído, acetofenona, 2-metil-1-propanol, 3-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 2,3-butanodiol, 1,3-butanodiol, alcohol bencílico, alcohol fenilético, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de isobutilo, 3-metil-2-butanol acetate, etilfenil acetato, laurato de etilo, palmitato de etilo, ácido acético, ácido isobutírico, ácido isovalerico, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, tetrametilpirazina (55).

La velocidad del secado es crucial para la calidad final del grano. Si la velocidad de secado es muy rápida, los granos tenderán a retener una cantidad excesiva de ácidos, incluyendo el ácido acético, que es perjudicial para el sabor. Pero si la velocidad es muy lenta, resulta una baja acidez, un color pobre y la presencia de hongos (57,58). Un buen secado reduce la astringencia, amargor y acidez de los granos (46). Durante este proceso se forma el característico color marrón, asociado con la oxidación enzimática de los polifenoles a taninos insolubles.

2.2 Composición de granos de cacao

La composición química de los granos de cacao es compleja y cambia a lo largo del desarrollo de los granos (59,60). En granos de cacao maduros y bien fermentados, las variaciones en la composición son pequeñas, pero en granos inmaduros y mal fermentados, el contenido de manteca de cacao disminuye mientras aumenta la proporción de cáscara (19). Es importante remover la cáscara, pues su sabor no es placentero y además causa erosión en equipos de molienda y mezclado de las chocolateras fabricados en hierro.

La composición química del cacao fermentado y seco se presenta en la **Tabla 2.1**. El grano está compuesto principalmente de grasa llegando a representar más del 50 % en peso. Luego le sigue las proteínas (12 %) y carbohidratos 20 a 25 % del peso del grano.

Tabla 2.1 Composición química de cacao en grano fermentado y secado al sol

Constituyentes		%
	Grasa	54.0
	Agua	5.0
	Cenizas	2.6
Compuestos nitrogenados	Proteína Cruda	11.5
	Teobromina	1.2
	Cafeína	0.2
	Polifenoles	6.0
Carbohidratos	Mono y oligosacáridos	1.0
	Almidón	6.0
	Pentosas	1.5
	Celulosas	9.0
	Ácidos Carboxílicos	1.5
	Otros Compuestos	0.5

Fuente: Belitz (61)

2.2.1 Carbohidratos

El almidón es el carbohidrato predominante. Se encuentra presente en el “nib” (grano de cacao sin cáscara, tostado y en trozos), pero no en la cáscara. Como componentes de la fibra dietética se encuentran pentosas, galactanos, mucinas que contienen ácido galacturónico y celulosa. Los carbohidratos solubles presentes incluyen estaquiosa, rafinosa y sacarosa (0.1 - 1.5%), glucosa y fructosa (17).

En los granos de cacao sin fermentar, la sacarosa representa cerca del 95 % de los azúcares totales (18.78 g/kg). La fructosa y glucosa representan cerca de 2.7 % y con una concentración de 0.33

g/kg y 0.21 g/kg. Manitol e inositol se encontraron en bajas concentraciones (0.26 g/kg y 0.18 g/kg, respectivamente). Durante la fermentación, la sacarosa y azúcares totales disminuyen significativamente a 2.03 g/kg y 5.02 g/kg. La sacarosa se hidroliza a glucosa y fructosa por invertasas. La velocidad de disminución de sacarosa se desacelera al final de la fermentación. En contraste, fructosa, glucosa, manitol, inositol y los azúcares reductores se incrementan hacia el cuarto día de la fermentación. Luego, la concentración empieza a disminuir (55). Existen grandes diferencias entre el contenido de fructosa y glucosa en muestras de cocoa de cacao bien fermentado (desde 7:1 a 16:1), parcialmente fermentado (2:1) y no fermentado (1:1) (50).

2.2.2 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos constituyen el 1 – 2 % del peso del grano. Contribuyen al sabor a través de los ácidos cítrico, acético, succínico, y málico, todos los cuales se forman durante la fermentación. La cantidad de ácido acético liberado por la pulpa y parcialmente retenido por los cotiledones de los granos depende de la duración de la fermentación y el método de secado usado (17). Este ácido es el principal ácido volátil presente en granos fermentados y secos (62).

No hay cambios significativos en la concentración de ácido oxálico y málico durante la fermentación y secado. El ácido láctico tiene un incremento significativo durante la fermentación y el proceso de secado (55). La mayor concentración de ácido láctico se observa al tercer día de fermentación (55). El ácido cítrico es el principal ácido orgánico no volátil en granos fermentados y secos (62). La concentración de este ácido baja durante el proceso de fermentación y secado, debido a que es metabolizado en ácido acético, dióxido de carbono y ácido láctico (55).

2.2.3 Proteínas y aminoácidos

Cerca del 60 % del contenido de nitrógeno total de los granos fermentados es proteína y constituye entre 10 – 15 % del peso seco del grano (17). El nitrógeno no proteico es encontrado en aminoácidos, cerca del 0.3 % en forma de amida y un 0.02 % como amoníaco, el cual se forma durante la fermentación de los granos. Además se encuentra en forma de metilxantinas como teobromina y cafeína. En granos de cacao sin fermentar, son detectadas muchas enzimas, pero la mayoría se desactiva durante el procesado (17). Las proteínas en los granos de cacao se hidrolizan en dos momentos: al comienzo de la fermentación cuando el pH disminuye a un valor menor a 4 y durante la fermentación aeróbica cuando el pH es mayor a 5. Se sabe que los aminoácidos libres hidrofóbicos, como leucina, fenilalanina, alanina y tirosina, contribuyen a la formación del sabor a cacao (63).

2.2.4 Polifenoles

Los granos de cacao son ricos en polifenoles, los cuales contribuyen al 12 – 18 % del peso seco del grano de cacao (64). En los granos de cacao sin fermentar, la cantidad de polifenoles es de alrededor del 12 % en peso, mientras que en los granos fermentados es de 6 %. Los polifenoles son utilizados para la defensa y protección de la planta, la cual los utiliza para repeler animales y microorganismos. Los polifenoles de los granos de cacao también se encuentran asociados con el color del chocolate y con su sabor astringente y amargo (65).

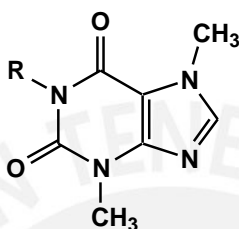
Los compuestos fenólicos astringentes están contenidos en las células pigmentarias de los cotiledones de cacao. Dependiendo de la cantidad de antocianinas de estas células pigmentarias, estas pueden ser blancas o morado oscuro (66), lo que proporciona el color al grano de cacao sin fermentar (**Figura 1.1**).

El grupo polifenólico más abundante en el cacao es el de las procianidinas (flavan-3-ol), cuyo peso molecular varía de monómeros ((-)-epicatequina, (+)-catequina) a cadenas largas de polímeros con grados de polimerización tan altos como decámeros. Además, se han cuantificado en pequeñas cantidades, (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina. Las procianidinas son descritas como los compuestos responsables de la actividad antioxidante de los granos de cacao. Dicha actividad puede estar relacionada a su grado de polimerización (67). Su concentración depende de la temperatura durante el proceso de tostado (68). Los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos son componentes minoritarios que también se encuentran presentes en el cacao (67).

El proceso de fermentación reduce el contenido de polifenoles (51,56) y en consecuencia también la actividad antioxidante de los granos de cacao y su astringencia. Asimismo también, la (-)-epicatequina y la (+)-catequina disminuyen dependiendo de la extensión de la fermentación del grano (48,51,68). A su vez, la degradación de antocianinas durante la fermentación modifica el color de los granos, de púrpuras a marrones. El contenido de polifenoles en los granos puede variar de acuerdo a la variedad u origen del grano de cacao (67). El cacao de la variedad criollo, por ejemplo, contiene entre el 30 – 60% de la cantidad de polifenoles del grano forastero. Este menor contenido de polifenoles en los granos criollos se debe en parte a que el tejido del cotiledón de sus granos permite la invasión rápida de los productos de degradación de la pulpa de cacao y facilita la fuga de compuestos fenólicos durante la fermentación (69). Además, una alta actividad residual de polifenoloxidasas y peroxidasas (tiempo más corto de fermentación) facilita una tasa de oxidación mayor de los compuestos fenólicos en los granos de cacao criollo.

2.2.5 Metilxantinas

Las metilxantinas de mayor importancia, no solo por sus características organolépticas (sabor amargo) (44,69,70) sino además por el alto contenido en el que existen en el grano de cacao, son la teobromina (1 – 2 %) y la cafeína (0.2 %) (71,72), cuyas estructuras se muestran en la **Figura 2.1**. Otra metilxantina de interés, por su efecto al sabor amargo del cacao, es la teofilina pero esta se encuentra a nivel de trazas en el grano de cacao.



Teobromina R = H
Cafeína R = CH₃

Figura 2.1 Estructura química de la teobromina y la cafeína.

Es sabido que la teobromina se acumula en el grano durante el desarrollo final del fruto (60,71). Las metilxantinas de los granos de cacao son liberadas junto con el ácido acético que se forma durante la fermentación de los granos, difundiéndose del cotiledón a la cáscara, ya que se encuentran débilmente enlazadas a los taninos (69,71). Los porcentajes de teobromina y cafeína disminuyen de un 20 – 25 % entre granos fermentados y sin fermentar, y con ello disminuye la astringencia y amargor durante la fermentación. Se ha demostrado, sin embargo, que la razón teobromina/cafeína para un mismo genotipo es estable a través de diferentes tiempos de fermentación y también durante el tostado (73,74).

Es importante añadir que la razón teobromina/cafeína varía según el genotipo del cacao (44,75) y ello permite la distinción entre criollo, trinitario y forastero. El estudio de Brunetto del 2007 (44), que se enfocó en determinar esta relación en un grupo de muchas muestras, permitió la discriminación entre estos tres tipos de cacao. Esta relación resulta del hecho de que el cacao forastero tiene más teobromina y mucho menos cafeína que el criollo (71). La variedad trinitario, como producto del cruce forastero y criollo, al ser un híbrido, presenta un comportamiento intermedio entre los anteriores, como se puede observar en la **Figura 2.2**.

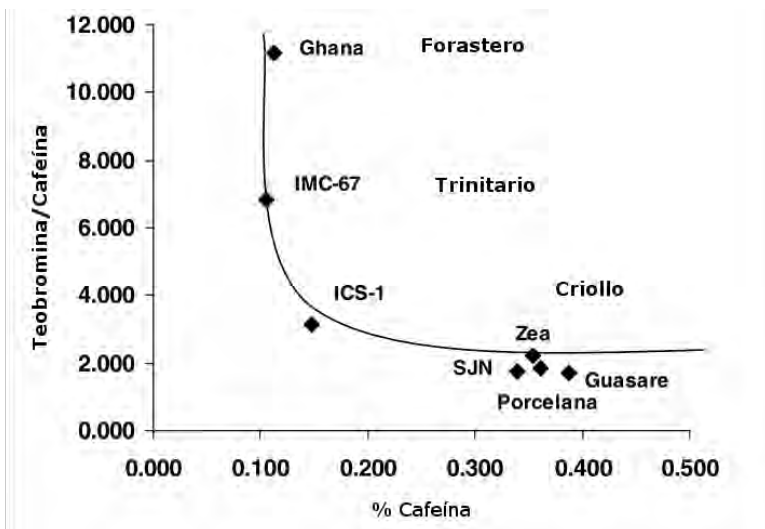


Figura 2.2 Relación entre el contenido de metilxantinas y el genotipo de cacao (44)

En la **Tabla 2.2** publicada por la industria de confitería alemana (76) se reporta el contenido de estas dos metilxantinas en granos fermentados, secos, descascarados y desgrasados de diferentes zonas geográficas (44). En ella se evidencia la magnitud y variabilidad entre estos dos contenidos.

Tabla 2.2 Contenido de teobromina y cafeína en granos de cacao de diversos países

	Teobromina %	Cafeína %
Costa de Marfil	2.64 - 3.14	0.20 - 0.35
Ghana	2.65 - 3.21	0.21 - 0.29
Nigeria	2.65 - 3.44	0.10 - 0.28
Indonesia	1.83 - 3.12	0.21 - 0.83
Malasia	2.32	0.29
Papúa y Nueva Guinea	1.93 - 2.47	0.38 - 0.56
Camerún	3.48	0.15
Ecuador	2.04 - 3.40	0.22 - 0.78
Venezuela	2.43 - 2.87	0.63 - 0.8

Fuente: German Cocoa and Chocolate Foundation (76)

La importancia del cuantificar el contenido de estas dos metilxantinas también se justifica pues a través de este dato, utilizando un factor de conversión, se obtiene el contenido de los componentes no grasos de los sólidos de cacao en el chocolate (77). Con este valor y el contenido de la manteca se determina el porcentaje de sólidos de cacao (78,79). La cuantificación de estas metilxantinas es clave para la industria cacaotera pues los productos de cacao y chocolate deben indicar el contenido mínimo de sólidos de cacao en su etiquetado por regulación de la Unión Europea con la directiva 2000/36/CE (80).

2.2.6 Lípidos

La manteca de cacao es la grasa obtenida de los productos del cacao mediante: prensado (torsión de los granos de cacao) y extracción con solventes. Su contenido en los granos se encuentra en un rango de 50 - 58 % (w/w). La manteca de cacao es de color amarillo pálido y posee el olor y sabor característico de mazorcas de *Theobroma cacao*. Su consistencia es quebradiza a temperaturas inferiores a 26 °C, pero por encima de este valor reblandece y funde. Puesto que el sabor característico natural del cacao es deseable en la industria, la manteca de cacao solo se somete a un proceso de neutralización y desodorización cuando la calidad de la manteca es mala, y esto solo ocurre con materia prima, mazorcas de cacao, viejas o deterioradas. La manteca de cacao es resistente a la oxidación y al enranciamiento (81).

La manteca de cacao es una grasa sólida de 32 a 35 °C (82), es considerada el compuesto más importante extraído de los granos de cacao. Es responsable de las características de fusión del chocolate, genera la dispersión de los otros constituyentes, y es responsable de la textura suave, viscosidad, plasticidad y brillo (83,84) del mismo. La manteca de cacao está constituida por un 75 % de triglicéridos, un 17.5 % fosfolípidos y un 7.5 % glicolípidos (17). Las propiedades físicas de la manteca de cacao están determinadas por los tipos de ácidos grasos y su posición en el triglicérido.

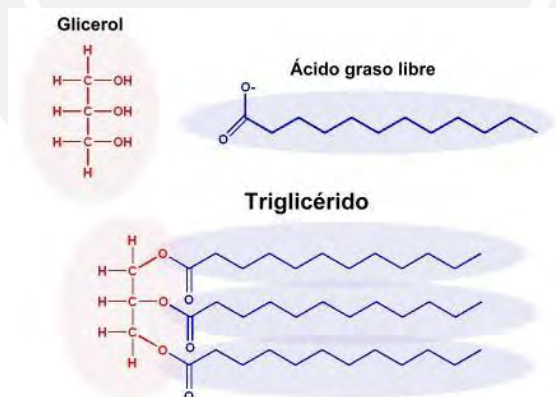


Figura 2.3 Estructura química del glicerol, ácido graso libre y triglicérido.

Estudios demuestran que las mantecas de cacao originarias de regiones con climas fríos tienen mayor cantidad de triglicéridos insaturados, responsable de un incremento en la “suavidad” de la manteca de cacao que compromete su comportamiento de cristalización, especialmente durante la industrialización y distribución del chocolate en áreas tropicales (84–86).

En la manteca de cacao hay tres ácidos grasos principales que suponen cerca de un 95 % de los ácidos grasos presentes: 35 % de ácido oleico (C18:1), 34 % ácido esteárico (C18:0) y 26 % ácido palmítico (C16:0). Un contenido alto de ácidos grasos insaturados está relacionado con una textura suave (87).

Dado que el contenido de manteca de cacao no es afectado por el grado de fermentación (73), su perfil puede asociarse a origen (88). En el 2015 se acaba de demostrar, por ejemplo, que las variaciones en el contenido de ácido láurico, mirístico, palmítico, margárico, heptadecenoico y esteárico pueden relacionarse con el origen geográfico de la muestra (89). De igual forma la investigación de Lipp y Anklam (84) muestra que la manteca de cacao producida en Suramérica contiene niveles significativamente más altos de ácido oleico en comparación a la de África y Asia.

En la **Tabla 2.3** se observan ácidos grasos identificados en la manteca de cacao de granos provenientes de Venezuela, Ecuador, Ghana y Brasil.

Tabla 2.3 Ácidos grasos de granos de *Theobroma cacao*

ElKhorl (90)(Venezuela)	Ribeiro (91) (Brasil)	Torres (89)(Ecuador y Ghana)	Ácidos grasos de granos de <i>Theobroma cacao</i>	
				Ácidos grasos
			C10:0	Ácido cáprico
			C12:0	Ácido láurico
			C14:0	Ácido mirístico
			C15:0	Ácido pentadecanoico
			C15:1	Ácido pentadecenoico
			C16:0	Ácido palmítico
			C16:1	Ácido palmitoleico
			C17:0	Ácido margárico
			C17:1	Ácido heptadecenoico
			C18:0	Ácido esteárico
			C18:1	Ácido oleico
			C18:2	Ácido linoleico
			C18:3	Ácido linolénico
			C20:0	Ácido araquídico
			C20:1	Ácido eicosenoico
			C22:0	Ácido behénico
			C24:0	Ácido lignocérico

2.3 Beneficios del cacao

En los últimos años, se ha determinado que el cacao y los productos del cacao, como el polvo de cacao, chocolate oscuro y pasta de cacao, eliminan el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (92,93), ayudan a la disminución de plaquetas (94), a incrementar el flujo sanguíneo (95) e inhibir la proliferación de células humanas de cáncer de mama (96) y tiene propiedades hipoglicémicas (97). Además tiene un efecto protector contra las modificaciones por estrés oxidativo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (67) previniendo el daño solar, incluyendo formación de arrugas y alteraciones histológicas (tejido conectivo y acumulación de colágeno) (98,99).

En un estudio de intervención dietética se proporcionó evidencia de que el consumo regular de flavonoles de cacao puede reducir la disfunción cognitiva relacionada con la edad, posiblemente a través de una mejora en la sensibilidad a la insulina (100).

Se sabe que las xantinas estimulan el sistema nervioso central, pueden afectar el sistema circulatorio y tienen efectos broncodilatadores (asma). Las xantinas son absorbidas por el cuerpo humano casi en un 100 % y aparecen en la sangre tras minutos después de la ingestión (101). Por ello, la teobromina puede disminuir la presión arterial tras una hora de consumo (102). También se ha reportado que fortalece el esmalte de los dientes, remineralizándolos (103). La cafeína, por otro lado es una metilxantina que tras su digestión llega con facilidad al sistema nervioso central e induce el estado de alerta por su interacción con los receptores de adenosina (104).

Entre los beneficios que podemos resaltar dentro de los ácidos grasos que se encuentran presentes en el cacao en altas concentraciones, tenemos un estudio clínico reciente que sugiere que el ácido estéarico (C18:0), es un tipo de grasa saturada no colesterómica ni aterogénica (105). Con respecto a los ácidos mono-insaturados, el ácido oleico (C18:1), por ejemplo, se lo asocia con la disminución de los niveles de colesterol LDL. Evidencia científica demuestra que el ácido oleico presente en los alimentos tiene un efecto preventivo en enfermedades crónicas (como cardiovasculares, cáncer, decaimiento cognitivo relacionado con la edad) y puede incrementar la longevidad (106). Hay evidencia científica que demuestra que el consumo diario de ácidos grasos C18:2 y C18:3 tiene un efecto protector contra el cáncer, diabetes y funciones inmunes (107,108).

2.4 Metodología cuantitativa en el análisis químico de cacao

La metodología utilizada en el análisis de metabolitos en productos de cacao es diversa. Las técnicas usuales de cuantificación son cromatografía líquida de alta performance (HPLC) acoplado a un detector. La fase estacionaria suele ser una columna de fase reversa (C8, C12, C18) y, la fase móvil, por lo general es una mezcla de solvente acuoso (buffer ácido, neutro o básico) y solvente orgánico (acetoniitrilo o metanol). Esta técnica separativa se asocia con detectores, como el arreglo de diodos (DAD), detector de fluorescencia (FD) y espectrómetro de masas (MS). Una nueva alternativa recientemente utilizada en el estudio del cacao es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (109).

Particularmente, los carbohidratos y ácidos orgánicos presentes en el cacao han sido estudiados mediante HPLC-DAD (110) y HPLC acoplado a un detector de índice de refracción diferencial (111,112). También, son comunes el análisis por cromatografía de intercambio iónico con detección electroquímica en productos de cacao (59,113). Además, pueden ser cuantificados por cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS) (21,114), previa sililación. Recientemente, ácidos orgánicos en granos de cacao han podido ser evaluados por espectroscopía de infrarojo cercano (NIR) (115) y RMN (109,116), ambas técnicas no separativas.

En el caso de los polifenoles, su presencia ha sido evaluada también por HPLC-DAD (117,118,79,119–121), así como HPLC-FD (48,122–124) y HPLC-MS (56,67,125–128). Se han desarrollado métodos basados en NIR (75,115,129) y recientemente espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (109) para su identificación.

De igual forma, en productos de cacao, la metodología oficial para la cuantificación de alcaloides (teobromina y cafeína) es la cromatografía líquida (HPLC-DAD) (130). La detección suele ser por espectroscopía de absorción ultravioleta (44,69,131,132), por espectrometría de masas (60,67,112) y por amperimetría (133). Se han desarrollado métodos cuantitativos alternativos para la cuantificación de metilxantinas en este tipo de muestras como: espectroscopía de absorción ultravioleta (134), NIR (75,115,135), espectrofotometría cinética (136) y de RMN (109).

Por otro lado, los ácidos grasos en el cacao han sido estudiados mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC/FID), previa metilación (59,137) o analizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC - MS) (138). El primero es el método oficial de análisis (139), aunque es considerado largo y difícil de automatizar. Una alternativa válida

para el caso de los lípidos es la espectrometría de masas por electroaspersión (ESI-MS). El proceso de ionización en esta variante es más suave y permite obtener información estructural más completa que GC-MS, sin la necesidad de la derivatización química. Esta técnica ya ha demostrado ser muy útil en la caracterización de aceites (140), biodiésel (141,142) y la determinación de la composición de ácidos grasos en aceites y grasas (143). Otra alternativa que ha demostrado ser útil en la determinación del grado de insaturación en grasas (144–147), en el monitoreo de oxidación de margarinas (148) y en la identificación de adulteraciones (149) en aceites, es la resonancia magnética nuclear. Este método cuenta con la ventaja de no requerir mayor tratamiento de la muestra para su análisis (RMN).

Teniendo en cuenta la importancia de la cafeína y la teobromina, así como la composición relativa de los ácidos grasos en el grano de cacao, tanto como biomarcadores de 1) propiedades organolépticas, 2) de origen y 3) de nutrición, en este trabajo se propone cuantificar a estas dos metilxantinas mayoritarias empleando metodología HPLC-DAD basada en parte en el método oficial para este tipo de muestra (130). La identificación del perfil metabólico de ácidos grasos de la manteca de cacao a través de espectrometría de masas (ESI-MS) en muestras de cacao criollo y trinitario. También se abordará el estudio mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos, materiales, equipos e instrumentos

3.1.1 Reactivos

Todos los solventes y reactivos fueron grado HPLC, a menos que se indique lo contrario. Metanol, etanol, acetato de amonio (grado ACS), KOH (grado ACS), HCl fueron suministrados por JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El agua fue purificada (calidad $18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) con un sistema Milli-Q (Thermo Scientific, Barnstead Nanopure). La teobromina, cafeína, ácido gálico, ácido protocatéuico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO), mientras que el ácido fórmico fue adquirido de Merck. El heptano fue suplido por TEDIA (Fairfield, OH).

3.1.2 Materiales

Los granos de cacao (*Theobroma cacao*) secos fermentados estudiados provienen de 12 cooperativas de agricultores productores de cacao, colectadas en siete departamentos distintos del país: Ayacucho, Huánuco, Junín, Piura, San Martín, Tumbes y Ucayali. Estas muestras fueron adquiridas en Lima en los eventos 5to Salón de Cacao y Chocolate (SCCH), en el Salón del Cacao Peruano de la 6ta Expoalimentaria (EA), 4ta edición Expo Café Perú (EC).

3.1.3 Instrumentación

Los espectros de fluorescencia fueron realizados con el espectrofluorímetro-Perkin Elmer LS 55 utilizando las celdas de cuarzo Perkin Elmer modelo B0631118.

Los análisis de HPLC fueron realizados con un equipo Agilent Technologies 1200 Series: degasificador (G1379B), bomba binaria (G1312A), portador de muestra (G1329B), horno de columna (G1316A), detector UV-VIS (G1315D), detector de fluorescencia (G1321A), controlado por el software OpenLAB. La columna usada fue la Zorbax Eclipse C18 de dimensiones 4.6 x 150 mm y 5 μm de tamaño de partícula. Además se usó un sistema de HPLC LaChrom D-7000 Merck-Hitachi, con software HSM 7000 (versión 4.0, Merck-Hitachi) y columna Zorbax Eclipse. Los componentes con los que cuenta el equipo son: degasificador de solvente en línea Merck L-7612, interfase D-7000 Merck-Hitachi, bomba cuaternaria LaChrom L-7100 Merck-Hitachi, horno para columna L-7350, inyector Rheodyne 9125 y detector de arreglo de diodos UV-VIS L-7450A.

Los experimentos ESI-MS se llevaron a cabo en un equipo Bruker Daltonics Esquire 6000 Ion Trap, controlado con el software Compass 1.3 para Esquire/HCT software (Bruker Daltonic GmbH) para la ionización electrospray (ESI). El sistema HPLC es el mismo que el descrito para el HPLC-DAD Agilent.

Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en un equipo Bruker AscendTm 500, consola Avance III HD, y controlador de temperatura BCU 140 - 50.

3.2 Metodología

3.2.1 Determinación de humedad y pH de granos de cacao

El contenido de humedad fue determinado empleando el método oficial de la AOAC 931.04, en una sola muestra de cacao. Dos gramos (2 g) de la muestra molida sin cáscara fueron secados a 100 °C en un horno (Binder) hasta peso constante (24 h). El contenido de pH fue determinado empleando el método oficial de la AOAC 970.21, en todas las muestras de cacao. Diez gramos (10 g) de la muestra molida sin cáscara se extrajeron con 90 mL de agua hirviendo, se filtró e inmediatamente después de alcanzar 20 °C, se determinó el pH (pHmetro Orion modelo 420 A, electrodo triode Orion modelo 91 - 07 BN).

3.2.2 Extracción de manteca de cacao

Los granos de cacao se congelaron en N₂ líquido por 30 min y se liofilizaron (liofilizador LABCONCO, Freeze Dry System/FreeZone 4.5) por 72 horas a 50 x 10⁻³ mbar. Se reportó la humedad. Seguidamente, se procedió a descascarar manualmente los granos y se reportó el porcentaje de cáscara. Por último, se procedió a pulverizar en molino eléctrico (Sigma Aldrich, modelo Z278181) previo congelado en N₂ líquido. Cinco gramos (5 g) de la muestra seca y molida fueron macerados y sonicados (Symphony VWR) con hexano o heptano (50 mL, 15 min x 3 veces). Los tres extractos, una vez separados por filtración del marco, fueron combinados y rotaevaporados bajo presión reducida a 40 °C y 100 mbar quedando la manteca de cacao (aprox 1.8 a 2.5 gramos) libre de solvente. Tanto el marco (polvo de cacao) como la manteca de cacao se almacenaron a -30 °C hasta su uso. Para la prueba de reproducibilidad del método (n = 5) se utilizó 10 g de muestra y hexano como solvente. Para la extracción de las 15 muestras el procedimiento se realizó tres veces, y con heptano como solvente.

3.2.3

3.2.4 Preparación de extracto metanólico de cacao

Se implementaron 4 protocolos para la extracción de metilxantinas, del marco obtenido después del desengrasado, empleando metanol:agua (70:30) de solvente y guardando una relación sólido solvente de 1 a 10.

Método 1 (Clásico)

Un gramo (1 g) del marco o polvo de cacao fue macerado y extraído por agitación (Agitador Unimax 1010 Heidolph Instruments) con metanol:agua (70:30) (10 mL, 5 min x 3 veces 24 horas a 200 RPM). Los tres extractos una vez separados por centrifugado a 1000 g x 10 min, fueron combinados y se enrasaron en una fiola de 50 mL con mezcla metanol:agua (70:30). Se filtró con Millex HV (PVDF) de 0.45 µm. Se almacenó a - 30 °C hasta el día de su análisis por HPLC-DAD (acápite 3.2.4.1 método 2).

Método 2 (Microonda)

Un gramo (1 g) del marco o polvo de cacao fue macerado y extraído por microonda (Microondas Monowave 300 Anton Paar GmbH) con metanol:agua (70:30) (10 mL, 5 min x 3 veces a 98 °C y 1000 RPM). Los tres extractos una vez separados por centrifugado a 1000 g x 10 min, fueron combinados y se enrasaron en una fiola de 50 mL con mezcla metanol:agua (70:30). Se filtró con Millex HV (PVDF) de 0.45 µm. Se almacenó a - 30 °C hasta el día de su análisis por HPLC-DAD (acápite 3.2.4.1 método 2).

Método 3 (Sonicado)

Un gramo (1 g) del marco o polvo de cacao fue macerado y sonicado con metanol:agua (70:30) (10 mL, 30 min x 3 veces). Los tres extractos una vez separados por centrifugado a 1000 g x 10 min, fueron combinados y se enrasaron en una fiola de 50 mL con mezcla metanol:agua (70:30). Se filtró con Millex HV (PVDF) de 0.45 µm. Se almacenó a - 30 °C hasta el día de su análisis por HPLC-DAD (acápite 3.2.4.1 método 2).

Método 4 (Sonicado proceso acortado)

El marco o polvo de cacao (0.7 g) se resuspendió y sonicó en metanol:agua (70:30) (7 mL, 30 min). Se centrifugó la suspensión (centrífuga Sorvall Biofuge Stratos) a 10000 x g por 10 min. El extracto fue enrasado en una fiola 10 mL con mezcla de metanol:agua (70:30). Se filtró con Millex Hv

(PVDF) de 0.45 μm y se preparó una dilución 1/10 con mezcla de metanol:agua (70:30). Se almacenó a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de su análisis por HPLC-DAD (acápites 3.2.4.2).

3.2.5 Análisis HPLC del extracto metanólico de cacao

3.2.4.1 Análisis Cualitativo

Se desarrollaron 3 métodos para la separación de metilxantinas, todos empleando como columna a la Zorbax Eclipse C18 (4.6 x 150 mm, 5 μm). La fase móvil empleada para la separación fue una mezcla de dos solventes: A (ácido fórmico al 0.1%, pH 2.7) y B (metanol con 0.1% de ácido fórmico), a un flujo de 1.0 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 μL y la temperatura de separación $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se identificaron los picos cromatográficos adquiridos a 254 nm (ac. protocatéquico, ac. *p*-hidrozibenzoico y ac. vanílico), a 270 nm (ac. gálico, teobromina, cafeína) y 320 nm (ac. clorogénico, ac. cafeico, ac. *p*-cumárico, ac. ferúlico) por inyección previa de los estándares. Además, se recolectó el espectro UV de 220 a 400 nm. En las muestras todos los compuestos, se identificaron por comparación de tiempos de retención y data espectral de los estándares.

Método 1 (70 minutos):

Las muestras se analizaron con un sistema HPLC Hitachi que comprende una bomba cuaternaria, inyector y detector de arreglo de diodos. El programa de gradiente de elución fue: 5 % B a 5 % B en 20 min, 5 % B a 10 % B en 15 min, 10 % B a 10 % B en 5 min, 10 % B a 15 % B en 10 min, 15 % B a 15 % B en 5 min, 15 % B a 25 % B en 5 min, 25 % B a 25 % B en 10 min.

Método 2 (50 minutos):

Las muestras se analizaron con un sistema HPLC Agilent que comprende una bomba binaria, autosampler, detector UV-VIS y un detector de fluorescencia. El programa de gradiente de elución fue: 0 % B a 5 % B en 10 min, 5 % B a 10 % B en 10 min, 10 % B a 10 % B en 10 min, 10 % B a 25 % B en 10 min, 25 % B a 25 % B en 10 min. Se configuró una tabla de tiempo para identificar algunos compuestos por fluorescencia (150).

Método 3 (13 minutos):

Las muestras se analizaron con un sistema HPLC Agilent que comprende una bomba binaria, portador de muestra, DAD y un detector de fluorescencia. Se escogió un método isocrático de 13

min con 20 % de fase B (metanol con 0.1 % de ácido fórmico), a un flujo de 1.0 mL/min y temperatura 30 °C.

3.2.4.2 Análisis Cuantitativo

Las curvas estándar de teobromina y cafeína se prepararon con seis puntos empleando el método 3 del acápite anterior. Para ello, se disolvió teobromina (0.05 g) en 50 mL de agua hirviendo, se le agregó cafeína (0.02 g) disuelta en 40 mL de agua y se sónico la mezcla hasta disolución. La mezcla se enrasó en una fiola de 100 mL. La solución madre se preparó de la siguiente manera: 15 mL de la solución acuosa se lleva a un volumen de 50 mL en fiola con metanol. A partir de esta solución se preparan las 5 soluciones restantes: 3 mL en 10 mL, 2 mL en 10 mL, 1 mL en 10 mL, 0.5 mL en 10 mL y 0.5 mL en 100 mL. Se enrasa, en cada caso, con metanol agua 70:30. Las soluciones se analizaron por HPLC a 270 nm. El volumen inyectado fue de 10 µL. La preparación de la curva se repitió cinco veces (n=5). La linealidad fue verificada con un análisis de regresión lineal. La precisión, intradía e interdía (n=5) fue confirmada con una concentración de 44.325 µg/mL para la teobromina y de 18 µg/mL para la cafeína.

Los 15 extractos metanólicos de cacao (preparados en acápite 3.2.2 método 4) fueron analizados por triplicado. La concentración de teobromina y cafeína en cada una de las muestras fue calculada del área promedio empleando las curvas estándar correspondientes.

3.2.6 Espectros de emisión y excitación

Se usó un espectrofluorímetro-Perkin Elmer LS 55 para obtener los espectros de emisión y excitación de los compuestos de interés disueltos en 20% metanol con ácido fórmico al 0.1% pH 2.7. La velocidad de escaneo fue de 500 nm/min, el ancho de rendija de excitación y emisión fue de 15 nm. Los compuestos se evaluaron a concentraciones entre 1.1×10^{-5} Molar y 8.9×10^{-6} Molar. El blanco utilizado contiene metanol, agua y ácido fórmico en la siguiente proporción en volumen 20:79.9:0.1

3.2.7 Análisis cualitativo de extracto metanólico por LC-MS

Se hizo un análisis LC-MS de un extracto metanólico de cacao utilizando las condiciones del método 2 - Agilent en el apartado 3.2.4. Para separar los componentes, se usó una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y se llevó a cabo el análisis con una columna Zorbax Eclipse C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm). La temperatura de separación fue de 40 °C. Se usó un separador para regular el flujo de entrada al masas a 0.3 mL/min. El espectro de masas fue obtenido en el modo negativo con un

masa objetivo de 300 m/z y rango de escaneo de 100 a 1000 m/z. Las condiciones de ionización fueron: gas de secado (N₂) flujo 540 L/h; presión del nebulizador 400 psi, y temperatura de nebulización 365 °C. Se usó el método de ionización negativa para la detección de los ácidos fenólicos y el modo positivo para la detección de metilxantinas.

3.2.8 Preparación de muestra de manteca de cacao para análisis ESI-MS

La manteca de cacao, se trató de acuerdo a lo reportado por Kurata, Yamaguchi y Nagai (143), con algunas modificaciones. Se fundió la manteca de cacao. Se pesó 0.1 g de la manteca fundida en un tubo microonda G10 al cual se le añadió 2 mL de KOH etanólico 0.5 M (al 95 % etanólico) y se agitó (Vortex) a 1800 rpm por 1 min. La muestra fue saponificada en microondas (equipo Monowave 300 Anton Paar GmbH) a 130 °C, temperatura que se mantuvo por 10 min. La muestra se dejó que enfriará hasta 40 °C bajo agitación de 1000 rpm. Se añadió 2 mL de HCl 0.5 M. La muestra fue agitada por 1 min a 1800 rpm y luego fue enrasada con etanol en una fiola de 5 mL. Se filtró con filtro de PTFE de 0.2 µm. Se tomaron 100 µL de esta solución para enrasar en fiola de 1 mL con etanol. Esta muestra fue utilizada para el análisis ESI-MS, discutido en el apartado siguiente.

3.2.9 Análisis de manteca de cacao por ESI-MS

Para los experimentos de infusión directa se colocaron 200 µL, de cada una de las muestras preparadas en el acápite anterior, en un vial con inserto. Se inyectaron 2 µL directamente al espectrómetro de masas a un flujo de 0.2 mL/min isocrático: 90 % metanol con acetato de amonio 8 mM (B) y 10% acetato de amonio 8 mM (A). La duración del método fue de 2 min. Las condiciones de ionización fueron: gas de secado (N₂) flujo 540 L / h; presión del nebulizador 400 psi y temperatura de nebulización 365 °C. Se usó el método de ionización negativa para la detección de los ácidos grasos. Los espectros de masas fueron obtenidos bajo las siguientes condiciones: modo negativo con una masa objetivo de 300 m/z en un rango de escaneo de 100 a 600 m/z.

3.2.10 Preparación del extracto metanólico para RMN

El marco o polvo de cacao generado en el apartado 3.2.1 (0.7 g) fue extraído bajo sonicación con metanol:agua 70:30 (7 mL, 30 min x 3 veces consecutivas). El sobrenadante se recuperó centrifugando a 7000 g x 10 min, los extractos fueron combinados y el metanol rotovaporado bajo presión reducida a 40 °C y 100 mbar. Este extracto acuoso se congeló en N₂ líquido y liofilizó. Se obtuvo un polvo color crema (aprox. 200 mg). Cuarenta miligramos (40 mg) de muestra fue

disuelta en 600 μL de una solución de $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}$ (4:1). El espectro de ^1H -RMN fue adquirido con una ganancia del receptor (RG) constante de 64 con un tiempo de relajamiento (d1) de 1 segundo. Se adquirieron 16 escaneos además de los 8 escaneos de señuelo y el pulso usado fue de 30 grados. El procesamiento se realizó con una transformada de Fourier empleando un ensanchamiento de banda (LB) de 0.3 Hz por cada FID obtenida. La corrección de fase se llevó a cabo manualmente y la corrección de línea base fue automática. Los espectros bidimensionales fueron adquiridos con los parámetros predeterminados.

3.2.11 Preparación del extracto lipídico para RMN

La muestra de grasa generada en el apartado 3.2.1 (120 mg) fue disuelta en cloroformo deuterado (600 μL). El espectro de ^1H -RMN fue adquirido con una ganancia del receptor (RG) constante de 1 con un tiempo de relajamiento (d1) de 1 segundo. Se adquirieron 176 escaneos además de los 8 escaneos de señuelo y un pulso de 30 grados. El procesamiento se realizó con una transformada de Fourier empleando un ensanchamiento de banda (LB) de 0.3 Hz por cada FID obtenida. La corrección de fase se llevó a cabo manualmente y la corrección de línea base fue automática. Los espectros bidimensionales fueron adquiridos con los parámetros predeterminados. El cálculo del grado de insaturación se realizó a través de las siguientes fórmulas (151) empleando las áreas de los hidrógenos según asignación en **Figura 4.9**.

$$\text{Porcentaje de ácidos saturados (\% AS)} = \left(1 - \frac{H_d}{3H_g}\right) \times 100\%$$

$$\text{Porcentaje de ácido linoleico (\% C18:2)} = \frac{2H_f}{3H_g} \times 100\%$$

$$\text{Porcentaje de ácido linolénico (\% C18:3)} = \frac{H_{f'}}{3H_g} \times 100\%$$

$$\text{Porcentaje de ácidos polinsaturados (\% API)} = \% \text{ C18:2} + \% \text{ C18:3}$$

$$\text{Porcentaje de ácidos monoinsaturados (\% AMI)} = \frac{H_d}{3H_g} \times 100\%$$

$$\text{Porcentaje de ácidos insaturados (\% AI)} = \% \text{ AMI} + \% \text{ API}$$

donde:

H_d = área de átomos de hidrógeno del metileno asociado al grupo etileno.

H_g = área de átomos de hidrógeno de los metilenos asociados al grupo glicerol.

H_f = área de átomos de hidrógeno del metileno puente entre unidades etilénicas de ácido linoleico.

$H_{f'}$ = área de átomos de hidrógeno del metileno puente entre unidades etilénicas de ácido linolénico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este estudio comprende el análisis químico, basado en HPLC-DAD-FD y espectroscopía de masas – electrospray, de 15 muestras de cacao provenientes de diversas regiones y sometidas a diferentes procesos de pos-cosecha, **Tabla 4.1**. También se evaluaron las muestras mediante resonancia magnética de protón. El trabajo consta de dos etapas, preparación del extracto (grasas y metilxantinas), que involucra etapas previas como el secado y el pelado, y el análisis químico de los extractos de interés.

4.1 Preparación de los extractos bajo estudio: grasas y metilxantinas.

4.1.1 Secado y pelado

El proceso de secado se realizó mediante liofilización a 72 h y 96 h, demostrándose que con 72 h se lograba constancia en el peso. La humedad de todas las muestras fue determinada a esas condiciones, ver **Tabla 4.1**. Existe un método para la determinación de la humedad, AOAC 931.04, el cual establece moler 10 g de granos de *Theobroma cacao* hasta un tamaño de partícula menor de 5 mm y colocar el material en una estufa a 103 °C por 16 horas. Dado que este método emplea temperatura y tiempo de exposición altos es probable que algunos compuestos (como el ácido acético, por ejemplo) se evaporen y otros se oxiden. Por ello, se optó por un método de secado más suave. Sin embargo, como ejercicio, se aplicó el método AOAC 931.04 a una sola muestra de cacao (M10) y se registró el valor de humedad de esta, 6.2 % (n=5). Este valor difiere del reportado en la **Tabla 4.1**, pero permite catalogar al grano dentro del rango ideal de 6.5 – 6 % (19).

En cuanto al porcentaje de cáscara, este parámetro es importante, pues se ha demostrado que se encuentra asociado a la operaciones pos-cosecha: sin fermentar 14.3%, fermentado 13.5%, sobre-fermentado 12.3% y germinado 5% (152). Nuestros resultados, también presentados en la **Tabla 4.1** sugieren diferencias.

Se observó que de las cuatro muestras de grano criollo evaluadas, solo los granos de Piura (M7 y M8) y Tumbes (M12), tienen un porcentaje de cáscara del 16%. El criollo de Junín (M6) no cumple con esta observación. Se sabe que el proceso de fermentación y secado del grano criollo es más suave que el del trinitario y forastero (69,153), lo cual explica en cierta medida los resultados aquí presentados. Sin embargo, dado que no se conoce mayor detalle de las etapas por las que cada una de estas muestras ha pasado es difícil concluir.

Tabla 4.1 Humedad, porcentaje de cáscara y grasa en granos de *Theobroma cacao*

M	Lugar de Procedencia	COO	F ^a (Días)	S ^a (Días)	Variedad	% Humedad	% Cáscara ^b	% Grasa ^b
1	Ayacucho	COO1	6	5	Chuncho	3.41	10.39	51.93
2	Huánuco	COO2	7	4 a 5	Injerto	3.25	9.31	48.11
3	Huánuco	COO3	5	4 a 5	CCN51	3.06	9.11	40.86
4	Huánuco	COO3	6	4 a 5	CCN51	3.02	10.34	48.06
5	Huánuco	COO3	7	4 a 5	CCN51	3.5	11.83	47.88
6	Junín	COO4	7	4 a 5	Criollo	2.44	10.37	44.88
7	Piura	COO5	D	D	Criollo	2.63	16.09	37.5
8	Piura	COO6	D	D	Criollo	2.76	16.37	43.23
9	San Martín	COO7	7 a 8	4	CYP99	3.17	10.95	41.9
10	San Martín	COO7	7 a 8	4	CYP99	4.33	10.17	44.6
11	San Martín	COO8	6 a 7	5	Mezcla	4.53	11.08	44.38
12	Tumbes	COO9	7	7	Criollo	4.39	16.25	40.52
13	Ucayali	COO10	D	D	-	3.98	10.08	38.46
14	Ucayali	COO11	6	4 a 5	CCN51	4.52	12.2	44.7
15	Ucayali	COO12	D	D	-	3.63	10.06	42.58

^a F = fermentado, S = secado; ^b en base a peso seco, COO= Cooperativa

CCN51 y CYP99 son cultivares de cacao trinitario según lo indicado por el proveedor.

4.1.2 Extracción de grasas

La separación de la manteca de cacao se realizó empleando un solvente apolar como el hexano, según lo descrito en el acápite 3.2.2. Dado que varios laboratorios emplean extracción por sonicación (124,126,154) se adaptó este procedimiento en nuestro estudio empleando las proporciones clásicas de 1 g con 10 mL, por tres veces consecutivas, a temperatura ambiente por 15 min. Los resultados, **Tabla 4.2** indican un porcentaje de grasa ligeramente mayor al 40 %. Los valores esperados de grasa en cacao oscilan entre el rango de 40 a 50 % (84). Dada el alto valor de E3, con respecto a E2, es claro que el proceso de extracción no ha sido exhaustivo. Este resultado no interfiere con el propósito del estudio y por ello no se ha invertido más tiempo en optimizar estas condiciones.

Tabla 4.2 Grasa extraída de 10 g de granos de cacao seco mediante tres procesos consecutivos (E1, E2, E3) de extracción por sonicated empleando hexano

	E1	E2	E3	Total (g/100 g)
n				
1	3.45	0.37	0.28	41.1
2	3.38	0.46	0.36	42.1
3	3.46	0.35	0.39	42.2

Solvente= hexano

Habiendo decidido por el protocolo de extracción se demostró reproducibilidad repitiendo el proceso cinco veces, con esta misma muestra, obteniéndose un porcentaje de grasa promedio de 41.2 % con una desviación estándar de 0.86 y un porcentaje de varianza de 2 %.

Dado que no se contaba con suficiente hexano para el procesamiento de todas las muestras se optó por usar heptano, un solvente empleado por otros en la extracción de grasas del cacao (128,155) y reportado como menos tóxico (156). El uso de heptano también es una alternativa atractiva pues no es un reactivo fiscalizado por el estado, por lo tanto se encuentra más accesible. Sin embargo, se debe tener en cuenta que su punto de ebullición es más alto que el del hexano (cerca de 20 grados centígrados de diferencia) y es un líquido más denso (156). Debido a estas diferencias fisicoquímicas se decidió comparar la capacidad extractiva de ambos solventes, extrayendo una misma muestra de cacao (E1+E2+E3). Con el hexano se extrajo el 41.2 % de grasa mientras que, con el heptano tan solo 37.5 % de grasa. Esta menor capacidad extractiva ya ha sido reportada por

otros (157). Teniendo esto en cuenta, todas las 15 muestras fueron extraídas con heptano tres veces para así poder ser comparadas entre sí.

Resultados en la literatura confirman que la grasa es el principal componente de los granos de cacao. El contenido de manteca de cacao de granos secos sin fermentar y fermentados de China, Indonesia y Papua Nueva Guinea varía de 39.24 % a 53.67 %, extraídos con soxhlet y éter de petróleo como solvente (63). En este estudio (**Tabla 4.1**), las muestras de granos de cacao reportan un porcentaje de grasa que varía de 38.46 % a 51.93 %. Resalta el bajo contenido de grasa (37.5 %) de la muestra de grano criollo de Piura-Alto Piura, valor que coincide con la información disponible para cacao criollo: contenido de grasa entre 33.2 % a 54.9 % (75).

4.1.3 Extracción de metilxantinas

El proceso de extracción de metilxantinas se realizó extrayendo el marco obtenido después del desengrasado, también guardando la relación de 1 a 10 según acápite 3.2.3. Se evaluaron tres métodos: clásico (3 veces consecutivas x 24 h), sonicado (3 veces consecutivas x 30 min) y micro ondas (3 veces consecutivas x 5 min a 98 °C). La eficiencia de estos métodos en extraer teobromina y cafeína fue evaluada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a arreglo de diodos (DAD), descrita en el acápite 3.2.4, haciendo uso del área bajo cada una de las señales. Este estudio previo se realizó con una muestra de cacao de prueba.

Tabla 4.3 Evaluación de la eficiencia de tres métodos de extracción de cacao mediante HPLC-DAD ($\lambda = 270 \text{ nm}$)^a

n	Áreas de teobromina			Áreas de cafeína		
	Clásico	Sonicado	Microondas	Clásico	Sonicado	Microondas
1	5476315	5521863	5341895	1543365	1561110	1512790
2	5312885	5429217	5470900	1516147	1538227	1549800
3	5366470	5588635	5297590	1545490	1590825	1494040
Promedio	5385223	5513238	5370128	1535001	1563387	1518877
% CV	1.5	1.5	1.7	1.1	1.7	1.9

^a Equipo HPLC Lacrom Hitachi: Gradiente: 0 % B a 5 % B en 10 min, 5 % B a 10 % B en 10 min, 10 % B a 10 % B en 10 min, 10 % B a 25 % B en 10 min, 25 % B a 25 % B en 10 min. 50 min; % CV = Coeficiente de variación

De estos resultados se concluye que nuestros procesos son reproducibles (% CV < 2) y que con cualquiera de ellos la extracción es comparable. Se optó por el método de sonicado (158) para la preparación de todas las muestras de cacao, ya que este es el método más rápido y sencillo.

Además, en un afán de acortar tiempos, se evaluó la eficiencia de la extracción de teobromina y cafeína por sonicado, y se demostró que con una sola extracción (159) se logra obtener el 61% de lo extraído con las tres extracciones consecutivas. Se optó por esta modalidad (sonicado 30 min una sola extracción) para el tratamiento de las 15 muestras de cacao.

4.2 Análisis químico de las muestras de cacao: metilxantinas y grasas.

4.2.1 Estudio cualitativo y cuantitativo del extracto metanólico mediante HPLC-DAD-FD y LC-MS

El gradiente optimizado de HPLC-DAD (Tabla 4.3, Figura 4.1) permitió la separación en 50 min no tan solo de teobromina y cafeína sino también del ácido gálico, ácido protocatequico, ácido *p*-hidrozibenzoico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico, todo ellos compuestos reportados en el cacao, y por ello considerados en nuestro análisis. Para la detección de estos compuestos se escogieron longitudes de onda de 270, 254 y 320 nm.

En la Figura 4.1 se muestra el cromatograma obtenido usando como fase móvil: A: Agua al 0.1 % de ácido fórmico y B: Metanol al 0.1 % de ácido fórmico. Ambas soluciones fueron ajustadas a un pH de 2.70 (131).

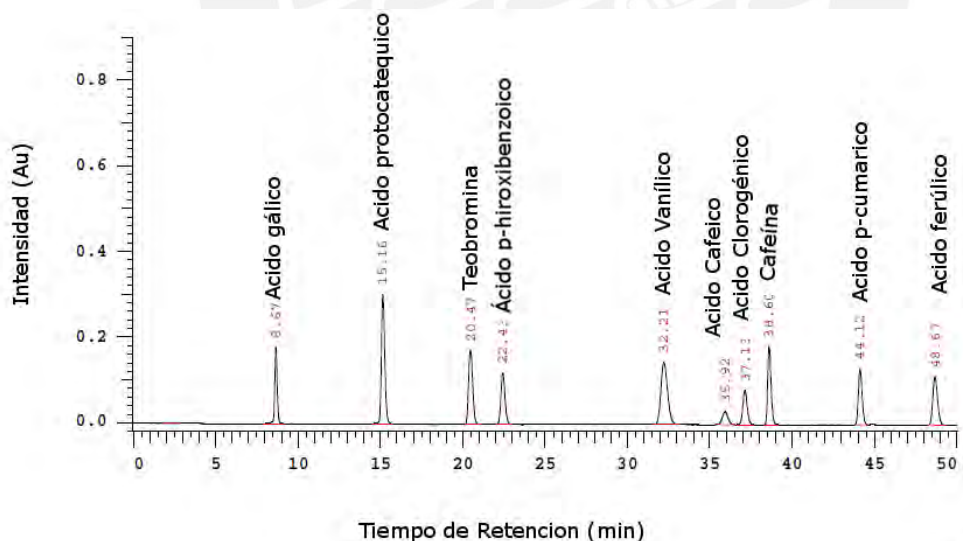


Figura 4.1 Cromatograma de separación de 10 estándares a 270 nm en 50 min a 30 °C (Hitachi)

Para definir las condiciones óptimas se varió tanto la gradiente como la temperatura. Solo se logró separar a los 10 compuestos con dos gradientes distintas, una de 50 min y otra de 70 min. Se

probaron cerca de seis otras combinaciones de gradiente y con todas ellas se observó solapamiento. Se optó por tanto por la gradiente de 50 min: 0 % B a 5 % B en 10 min, 5 % B a 10 % B en 10 min, 10 % B a 10 % B en 10 min, 10 % B a 25 % B en 10 min, 25 % B a 25 % B en 10 min.

Ya habiendo definido la gradiente se evaluó el efecto de la temperatura a 20, 30 y 40 °C en la definición de los picos. Los resultados se muestran en la **Figura 4.2**. Se observa que a 20 °C se superpone el pico de ácido cafeico y el del ácido clorogénico ($t_r = 40.372$ min, $\lambda = 270$) mientras que con el método a 40 °C se obtuvo una separación entre los picos mayor a 2.6 min (ácido cafeico, $t_r = 30.978$ min, y el ácido clorogénico, $t_r = 33.664$ min, ambos medidos a $\lambda = 270$).

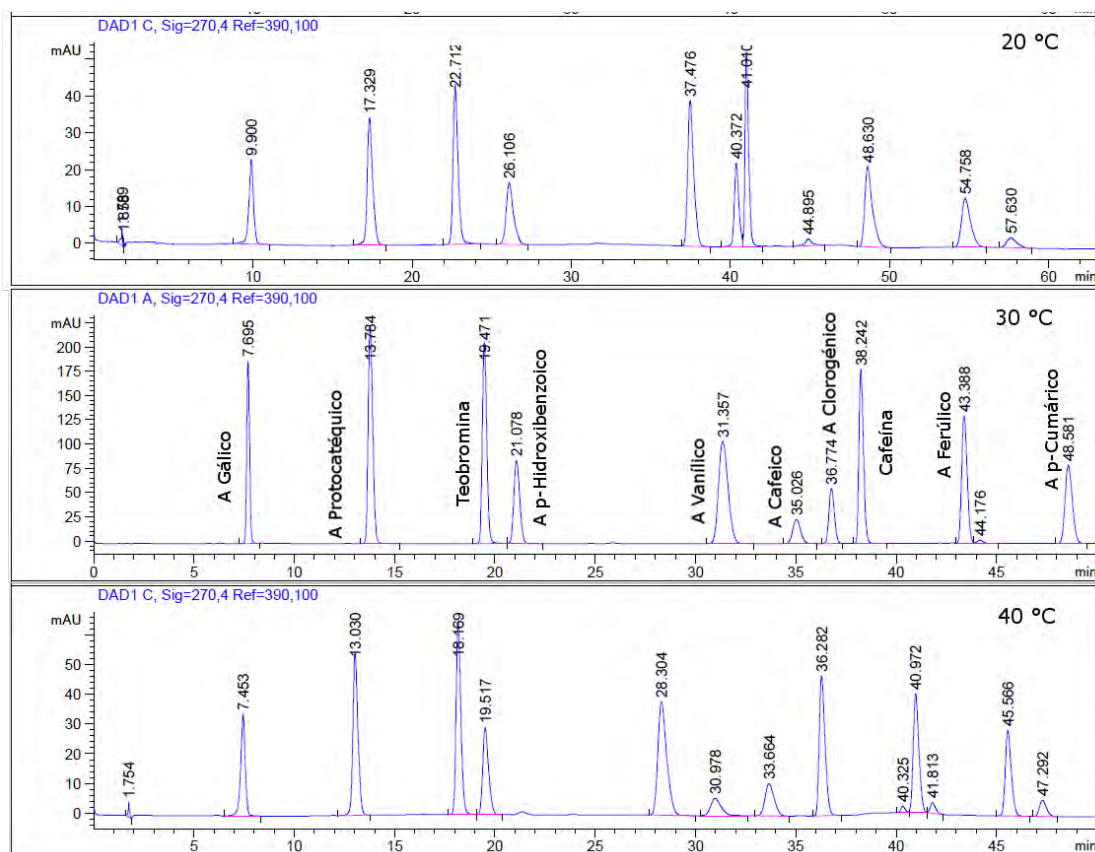


Figura 4.2 Efecto de la temperatura en la separación de los 10 compuestos de interés (20 °C, 30 °C y 40 °C)

Dado que el método a 30 °C produce resoluciones similares a las obtenidas a 40 °C, para los compuestos de interés, se optó por esta temperatura, en parte para garantizar la vida útil de la columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (160) y también por el bajo punto de ebullición del metanol (p.eb. 65°C). Sin embargo, es importante resaltar que a 40 °C se observa mejor separación entre impurezas inherentes a los estándares ($t_r = 40.32$, 41.81 y 47.29 min).

Habiendo establecido el proceso de extracción y el método de separación cromatográfica óptimo se procedió a analizar las 15 muestras. Las longitudes de onda máximas de absorción empleadas fueron 270, 254, 320 nm. Dado que se observó que tan solo la teobromina y cafeína se encontraban en cantidades detectables por UV, se decidió monitorear a los otros ocho compuestos por fluorescencia, técnica de mejor límite de detección y selectividad.

Para definir las condiciones óptimas de fluorescencia de cada uno de los compuestos de interés se procedió a registrar el espectro de emisión y excitación de cada uno de los estándares. Los valores de longitudes de onda máximas de emisión (λ_{em}) y de máxima excitación (λ_{ex}) obtenidos en el espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55 se compararon con los obtenidos de las gráficas de isoabsorbancia registradas a través detector de fluorescencia G1321A del instrumento de HPLC.

En la **Tabla 4.4**, se observa que los resultados obtenidos en los distintos espectrofluorímetros son similares. Asimismo, se observó que no todos los compuestos fenólicos de interés fluorescen con la misma intensidad. El ácido vanílico es más fluorescente (10^{-7} M) que los otros y se demostró además que los menos fluorescentes son el ácido clorogénico (10^{-5} M) y las metilxantinas (10^{-5} M). Asimismo se comprueba que ninguno de estos compuestos es altamente fluorescente. Sin embargo, los valores tienen utilidad desde el punto de vista de identificación. Los espectros están en los **Anexos A.10-A.25**.

Tabla 4.4 Comparación de longitudes de onda de excitación y emisión de estándares, obtenidos en el espectrofluorímetro Perkin Elmer y por detección HPLC-FD

Compuesto	Perkin-Elmer LS 55		HPLC-FD	
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Ácido gálico	270	375	274	380
Ácido protocatéquico	228	344	262	368
Teobromina	-	-	275	314
4-Ácido hidrozibenzoico	260	324	262	328
Ácido vanílico	260	358	262	360
Ácido cafeico	322.5	446	342	444
Ácido clorogénico	324	448	338	444
Cafeína	-	-	275	342
Ácido p-cumárico	312	411	314	410
Ácido ferúlico	321	447	334	440

Con esta información disponible se configuró una tabla de tiempos para monitorear a todos los compuestos, ya sea detectables por espectroscopía ultravioleta-visible o por fluorescencia en una sola corrida, utilizando la gradiente optimizada de 50 min. En la **Figura 4.3**, se muestra el

cromatograma de los 10 estándares a los valores de longitudes de onda λ_{ex} y λ_{em} fijadas, ver **Tabla 4.5**.

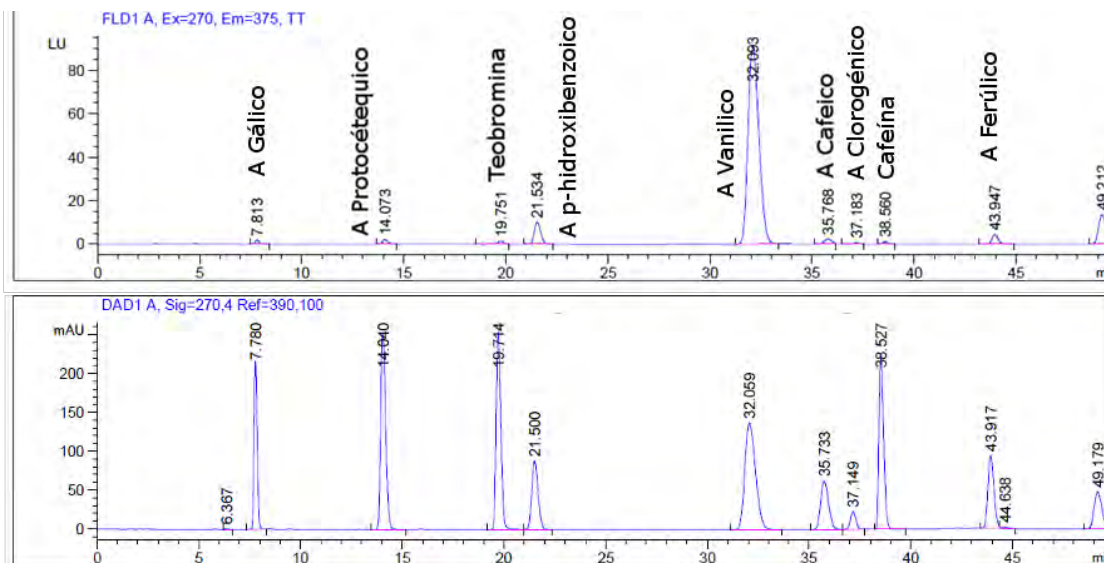


Figura 4.3 Cromatogramas de estándares por detección FD y DAD 270 nm.

Tabla 4.5 Tabla de rango de tiempo y detección (con PMT=10) de los 10 compuestos posiblemente presentes en las muestras de cacao bajo estudio.

	Tiempo (min)	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Ácido gálico	0 - 10	270	375
Ácido protocatéquico	10 - 17	228	344
Teobromina ^b	17 - 20	275	314
Ácido hidroxi benzoico	20 - 28	260	324
Ácido vanílico	28 - 34	260	358
Ácido cafeico	34 - 36.5	324	448
Ácido clorogénico ^a	36.5 - 37.5	260	427
Cafeína ^b	37.5 - 41	275	342
Ácido <i>p</i> -cumárico	41 - 47	312	411
Ácido ferúlico	47 - 50	321	447

^a Los valores utilizados fueron optimizados después del experimento a ($\lambda_{excitación} = 324$ nm y el $\lambda_{emisión} = 448$ nm.), ^b Valores obtenidos por HPLC-FD

A evaluar las muestras de cacao se observó que todos los compuestos estándar de interés menos la teobromina y cafeína se encontraban en concentraciones muy bajas inclusive para detección por fluorescencia **Figura 4.4** y por ello se decidió corroborar su presencia realizando cromatografía acoplada a masas. Sin embargo, mediante DAD, por co-inyección, se demostró la presencia de ácido protocatéquico y ácido *p*-hidroxi benzoico. El detector por fluorescencia (FD) permitió confirmar por co-inyección y aumentando la capacidad del detector fotomultiplicador de 10 a 18, la presencia de ácido gálico, ácido ferúlico y ácido cúmarico. Con LC-MS se confirmó la presencia de

aspartato de ácido cafeico, procianidina B, catequina y epicatequina, visibles también por DAD a 320 nm, **Figura 4.4**.

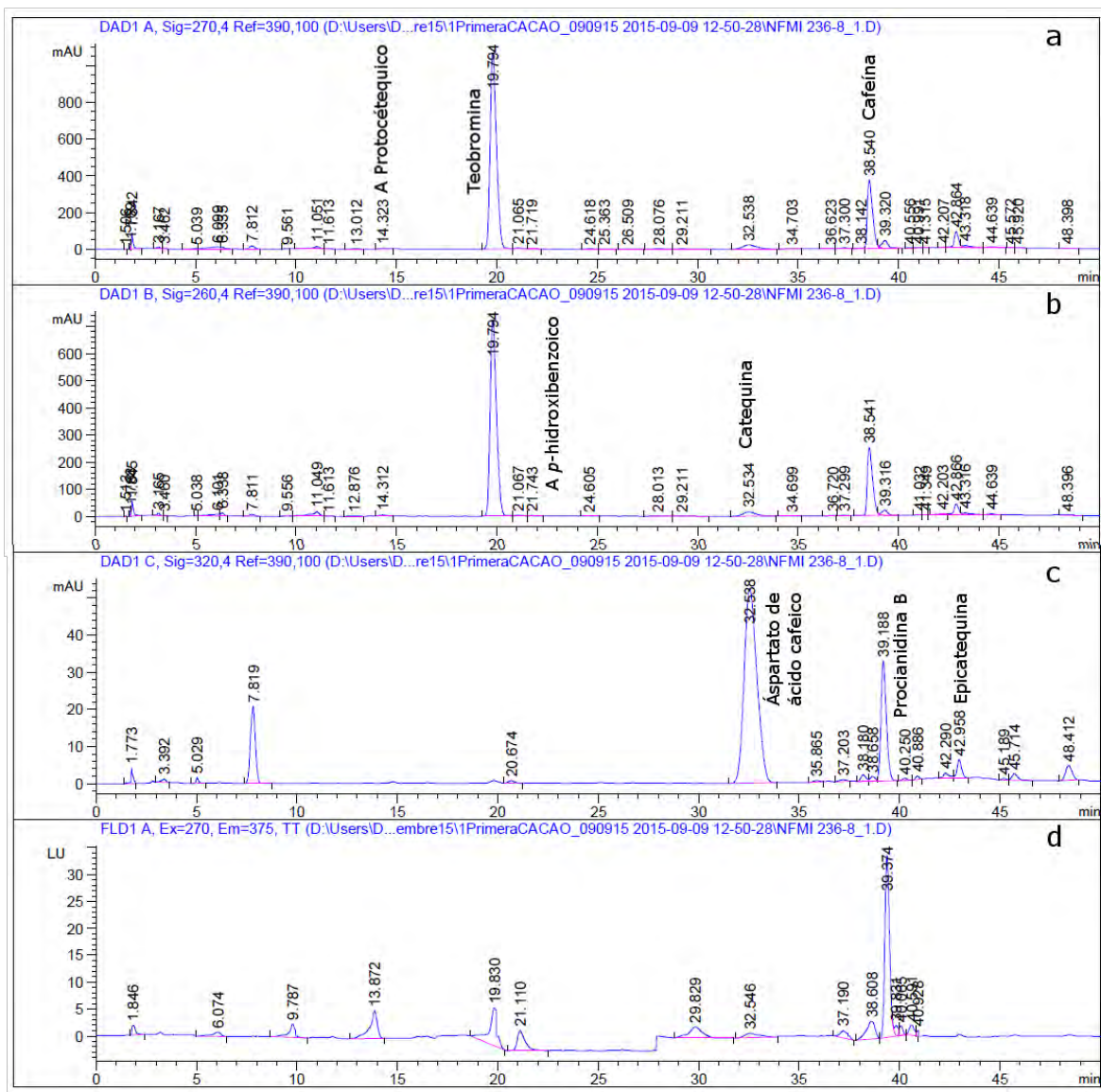


Figura 4.4 Cromatograma representativo del extracto metanólico de cacao mediante HPLC-DAD. a) 270 nm; b) 260 nm; c) 320 nm y d) mediante HPLC-FD, PMT 10 bajo condiciones definidas en la Tabla 4.5.

La metodología LC MS/MS implementada con una muestra representativa de cacao, Piura (M8), permitió corroborar la presencia de los 10 estándares considerados por HPLC-DAD, además de otros 10 compuestos, todos los cuales se resumen en la **Tabla 4.6**. Los resultados coinciden con la literatura (60,67,161).

Tabla 4.6 Compuestos confirmados por LC MS/MS en extracto metanólico de cacao

	t_r (min)	Compuesto	$[M-H]^-$ m/z	MS/MS m/z (ref)
1	6.3	Ácido gálico	169	125 (67)
2	10.4	Ácido cinámico	147	103 (67) ; 118.9
3	12.6	Ácido protocatéuico	153	109.1 (67)
4	16.9	Teobromina	181*	163.1(67)
5	19.0	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	137	93.1(67)
6	26.7	Catequina	289	245 (60) , 205 (60)
7	26.7	Aspartato de ácido cafeico	294	132; 179 (60);206; 250; 276 (60)
8	27.7	Ácido vanílico	167	151.9; 123.1 (67) ;108
9	30.6	Ácido cafeico	179	135 (67)
10	33.6	Ácido clorogénico	353.1	190.9 (67)
11	35.7	Aspartato de ácido cumárico	278.1	132(60); 163(60); 190; 216; 234; 259.9
12	36.4	Cafeína	195*	138.1(67) ; 110.2
13	37.0	Procianidina B	577.2	559.1; 533; 451; 425.1; 407.1;381.2; 331; 289.1 (67); 245.1
14	39.3	Deoxiclovamida	326.2	282.2(60); 227; 183.1; 130.1
15	40.4	Epicatequina	289	245 (67); 205; 125.1
16	41.2	Ácido cumárico	162.8	119 (67)
17	41.4	Procianidina C	865.2	847.2; 739.2; 713.2; 695.2; 577.1(60); 451.1(60); 407.1(60); 340.2; 287.1
18	42.8	Pentámero de catequina	720.1	711.2; 635.2; 577.2 (161); 451.2; 406.9; 289
19	45.1	Clovamida	358.1	221.9 (60); 178; 161; 135
20	47.5	Ácido ferúlico	193	177.9; 149; 134 (67)

* Detección en modo positivo, m/z $[M + H]^+$

Tres compuestos observables por DAD en concentración adecuada, compuestos no disponibles como estándares, fueron el aspartato de ácido cafeico ($t_r = 32.54$ min), la procianidina B ($t_r = 39.19$ min), y la epicatequina ($t_r = 42.86$ min). Los resultados indicaron que estos decrecen durante el proceso de fermentación y por lo tanto pueden ser utilizados como biomarcadores del proceso de fermentación (69,162,163). Estos compuestos fueron monitoreados en las muestras M3, M4 y M5, todas las cuales provienen de la misma muestra de cacao (COO3, tabla 4.8) con diferente tiempo de fermentación: 5, 6 y 7 días, respectivamente. Los resultados, obtenidos empleando la gradiente HPLC optimizada de 50 min, indican, para el caso del aspartato de ácido cafeico que su área a 320 nm decrece con el tiempo de fermentación (1040.4, 5 días), (1036.8, 6 días) y (985.2, 7 días), mientras que para la procianidina B, la disminución observada en el área es mucho más pronunciada (503, 5 días), (362, 6 días) y (325, 7 días) (ver **A4 – A6**). Dado que la epicatequina no resuelve adecuadamente de otras señales a su alrededor no se la analiza su decrecimiento.

Dentro del grupo de muestras de cacao, resaltan dos muestras de cacao criollo de Piura (M7 y M8), de tiempo de fermentación desconocido, por su alto contenido de aspartato de ácido cafeico (área a 320 nm 2314 y 2046 respectivamente, **A7** y **A8**). Este asociación: cacao criollo-aspartato de ácido cafeico, ya ha sido reportado por otros (56). Este valor también sugiere que el grado de fermentación de estas muestras ha sido suave, lo cual coincide con el tratamiento acostumbrado para un cacao criollo (153).

Habiendo ya identificado el perfil metabolómico del cacao mediante HPLC-DAD-FD y LC-MS, y dado que ninguno de los compuestos estándar, salvo teobromina y cafeína, se encuentran en cantidades comparables a estas dos metilxantinas, se decidió buscar un método cromatográfico más corto que facilitara la resolución de ambas moléculas en menos de 15 minutos y permitiera su rápida cuantificación. El método de separación óptimo resultó ser una corrida isocrática con 20 % de fase B (MeOH 0.1 % ácido fórmico) en 13 min., **Figura 4.5**.

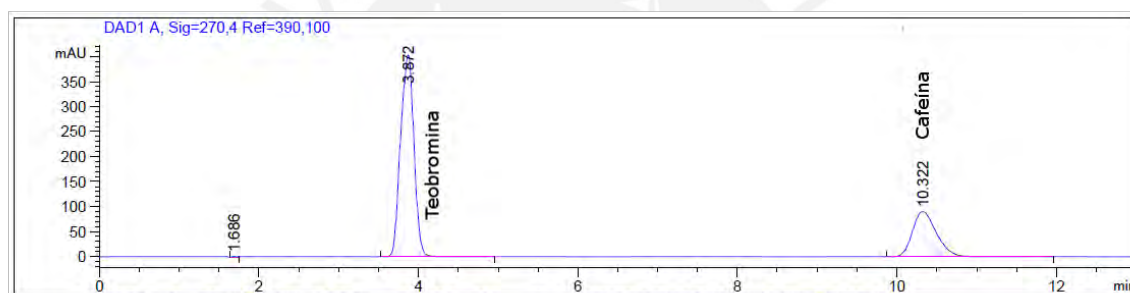


Figura 4.5 Separación cromatográfica de teobromina y cafeína en 13 min mediante HPLC-DAD a $\lambda = 270$ nm.

Con esta metodología HPLC - DAD se obtuvieron las curvas estándar de teobromina (0.73 - 147.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cafeína (0.03 - 60.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las curvas fueron validadas según linealidad ($n = 4$) y precisión (intradía e interdía, con $n = 5$). En la **Tabla 4.7** se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 4.7 Curva estándar de la teobromina y cafeína validadas según linealidad y precisión

	Teobromina	Cafeína
Recta y = mx+b^a		
m	6043.24 ± 201.43	5463.41 ± 4.59
b	14.33 ± 1.79	4.59 ± 0.22
R ²	0.9999	0.9998
Rango (µg/ml)	0.73 - 147.7	0.03 – 60.0
Precisión^b		
	Intradía (% CV)^b	
Tiempo de retención (min)	0.20	0.38
Área	0.25	0.28
	Interdía (% CV)^b	
Tiempo de retención (min)	0.39	0.75
Área	1.12	4.08

^a La recta es el resultado de 4 curvas preparadas de forma independiente (n = 4). ^b % CV = coeficiente de varianza obtenido con un análisis de 5 soluciones a una concentración de teobromina de 44.33 µg/mL y cafeína de 18.00 µg/mL.

Empleando la gradiente HPLC - DAD implementada, tiempo total de análisis de 13 minutos, se evaluaron las 15 muestras de cacao. Cada una de las muestras fue analizada por triplicado. De los resultados presentados en la **Tabla 4.8**, se observa que los granos de cacao peruano evaluados contienen teobromina (T) dentro del rango de 0.4 - 0.8 g /100 g peso grano fresco y cafeína (C) de 0.1 a 0.2 g /100 g peso grano fresco.

Los resultados obtenidos para el caso de los granos de cacao trinitario y criollo, en cuanto al contenido de teobromina y cafeína, coinciden con lo reportado en la literatura (44).

Tabla 4.8 Contenido (g /100 g)^a de teobromina (T) y cafeína (C) en granos de cacao de diferentes departamentos y cooperativas del Perú.

M	Código	Muestra	Metadata ^b (F, S)	%T ^c	%C ^c	R ^d	pH ^e
1	NFMI 275_2	Ayacucho, COO1	Chuncho (6,5)	0.40	0.09	4.60	4.91
2	NFMI 275_9	Huánuco, COO2	Injerto Común (7,5)	0.57	0.13	4.52	4.86
3	NFMI 275_10	Huánuco, COO3	CCN51 (5,5)	0.76	0.14	5.53	6.05
4	NFMI 275_13	Huánuco, COO3	CCN51 (6,5)	0.75	0.14	5.27	5.36
5	NFMI 275_11	Huánuco, COO3	CCN51 (7,5)	0.59	0.09	6.51	5.35
6	NFMI 275_16	Junín, COO4	Criollo (7,5)	0.61	0.14	4.31	4.89
7	NFMI 275_8	Piura, COO5	Criollo (D,D)	0.49	0.16	2.99	4.83
8	NFMI 275_14	Piura, COO6	Criollo (D,D)	0.49	0.19	2.63	4.79
9	NFMI 275_12	San Martín, COO7	CYP99 (7,4)	0.68	0.14	4.69	5.16
10	NFMI 275_7	San Martín, COO7	CYP99 (7,4)	0.66	0.11	6.26	5.16
11	NFMI 275_6	San Martín, COO8	Mezcla (6,5)	0.61	0.11	5.61	5.67
12	NFMI 275_15	Tumbes, COO9	Criollo (7,7)	0.39	0.11	3.54	5.32
13	NFMI 275_4	Ucayali, COO10	-	0.67	0.11	6.07	5.54
14	NFMI 275_5	Ucayali, COO11	CCN51 (6,5)	0.63	0.10	6.57	5.05
15	NFMI 275_3	Ucayali, COO12	-	0.76	0.11	7.13	6.06

^a Promedio de tres mediciones; ^b F=días de fermentado, S=días de secado, D= tiempo desconocido; ^c % en base a grano húmedo; ^d R = %T/%C; ^e promedio de tres mediciones

En el estudio de Brunetto (44) se demostró que los granos de cacao trinitario registran valores de R entre 3 - 9, mientras que el cacao criollo registran valores de R menor a 3. De la **Tabla 4.8** queda claro que las muestras aquí identificadas como criollo y trinitario encajan adecuadamente en la escala de Brunetto. Específicamente, en nuestro estudio, las muestras de cacao clasificadas como criollo, Piura (M8), Piura (M7) y Tumbes (M12) reportan un R entre 2.63 - 3.54. El único caso de cacao criollo con un valor de R claramente mayor a 3 ($R = 4.31$) es la muestra de Junín (M6), cacao que mostró un porcentaje de cáscara muy inferior (10%, **Tabla 4.1**) al esperado para un grano expuesto a tiempos de fermentación cortos, típico de un cacao criollo (14%). En el caso de los trinitarios, los cultivares CCN51 y CYP99, se registran valores de R entre 4.5 - 7.1. En este estudio no se incluye forastero pues este cultivo hasta hace poco representaba tan solo el 2% de total del cacao producido en el país (30) y por tanto es difícil de conseguir.

Ubicando los valores de R presentados en la **Tabla 4.8** versus el porcentaje de cafeína dentro de la escala de Brunetto (44), **Figura 4.6**, se puede discernir una marcada diferencia entre las muestras criollo peruanas y las criollo utilizadas por Brunetto (Porcelana, Guasare, Zea, SJN de Venezuela). En el cacao trinitario no se observa tanta diferencia. Las diferencias en el caso del cacao criollo peruano probablemente estén relacionadas por el hecho de que estos no son cacao criollo puro como los utilizados del estudio de Brunetto (cacao criollo venezolano).

En cuanto al pH del grano fermentado y seco, este parámetro es importante, pues se ha demostrado que se encuentra asociado a las operaciones pos-cosecha: sin fermentar (5.50 - 5.80), bien fermentado (4.75 - 5.19), sobre fermentado (5.20 - 5.49) (62). Nuestros resultados, presentados en la **Tabla 4.8**, sugieren diferencias en esta operación. Son similares a los reportados en granos fermentados y secos de nueve países (4.64 a 5.97) (164) y a lo descrito en granos fermentados y secos de Cumboto Venezuela (5.98 a 6.23) (52). En este estudio se encontraron cuatro muestras (M3, M11, M13, M15) en el rango de pH sin fermentar, de las cuales dos resaltaban con pH 6.05 y 6.06 (M3 y M15). De igual forma se encontraron siete muestras que clasifican como “bien fermentadas” usando el criterio de pH (M1, M2, M6, M7, M8, M9, M10), entre ellas tres muestras de grano criollo, con un pH menor a 4.9 Junín (M6), Piura (M7, M8). Cuatro muestras (M4, M5, M12 y M14) se clasificaron como “sobref fermentadas” dado el pH alcanzado, entre ellas, el cacao criollo de Tumbes (M12), por el tiempo de fermentación de 7 días, tiempo muy superior a lo convencional (recomendado) para el cacao de esta variedad. Al evaluar el pH de la muestra de Huánuco (trinitario) M3, M4 y M5 con 5, 6 y 7 días de fermentación, se observa que el pH decrece siendo estas muestras clasificadas como sin fermentar (M3) y “sobref fermentadas” (M4 y M5). Esta

observación corrobora lo discutido anteriormente en cuanto a las áreas de aspartato de ácido cafeico y procianidina B.



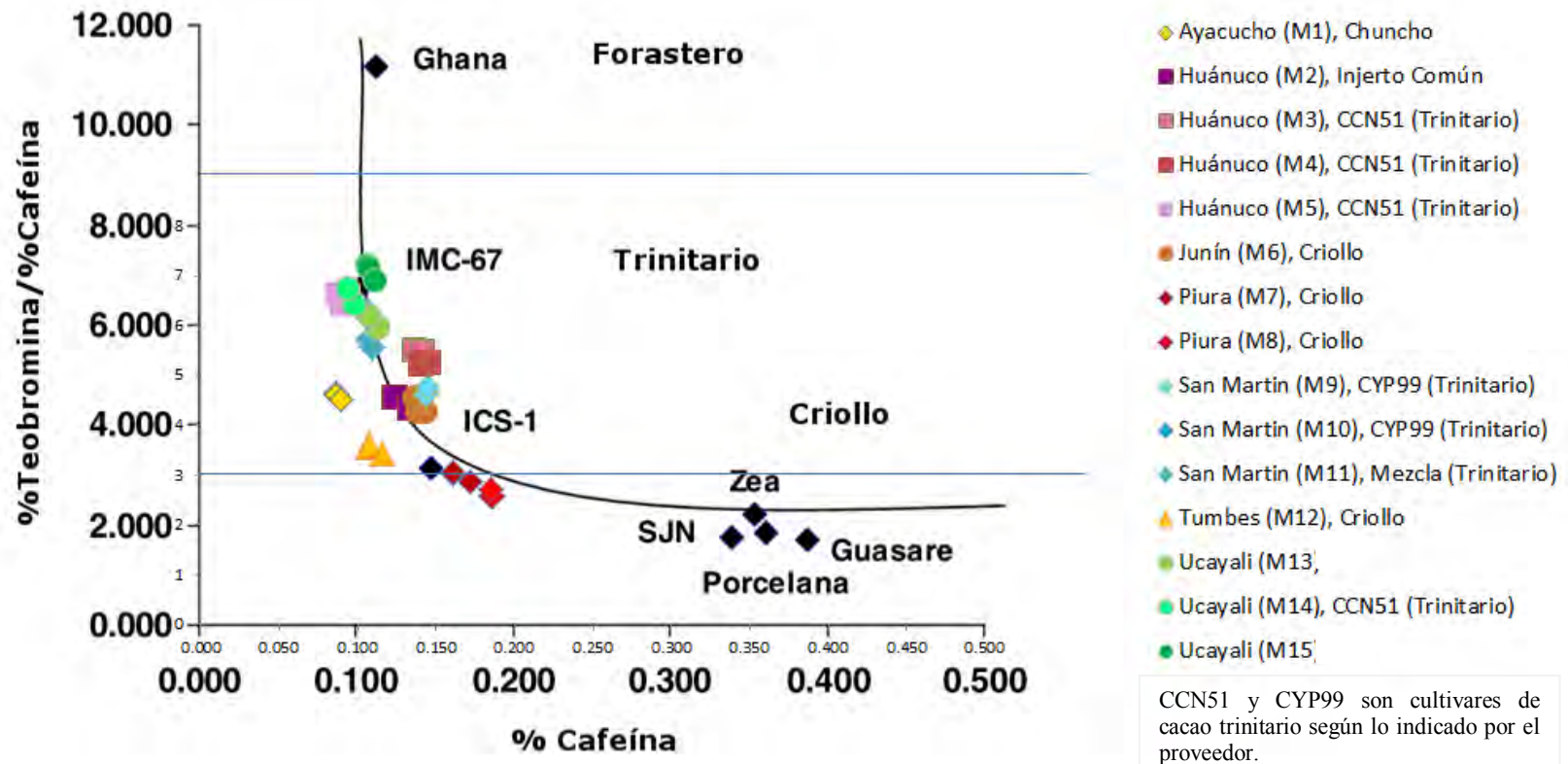


Figura 4.6 Relación entre el contenido de metilxantinas y el genotipo del cacao.

4.2.2 Estudio cualitativo del extracto de grasa mediante ESI-MS

El análisis químico de grasas mediante espectrometría de masas basado en ionización por electrospray, inyección directa (ESI-MS) requiere que los ácidos orgánicos sean hidrolizados. Se saponificó la manteca de cacao siguiendo el protocolo en acápite 3.2.7, empleando calentamiento por microondas. Se empleó metanol con acetato de amonio 8 mM como medio para la solución a inyectar al espectrómetro de masas. Este medio es recomendado para el análisis de ácidos grasos mediante ionización electrospray pues facilita una nebulización más eficiente (165,140). En nuestro estudio quedó claro que neutralizando la solución del saponificado con HCl, seguido de un tratamiento con metanol y acetato de amonio se logra observar un mayor número de ácidos grasos en cada muestra. Esta metodología (acápites 3.2.7 y 3.2.8.) se empleó para el análisis de inyección directa ESI-MS de las 15 muestras de cacao. Cabe resaltar que este tipo de estudio aún no ha sido reportado en la literatura.

En la **Tabla 4.9** se muestran todos los ácidos grasos presentes e identificados mediante el ion molecular en las 15 muestras de cacao. Diez de ellos fueron confirmados a través de masas tándem. Dada la baja intensidad de todos los otros ácidos grasos estos no fueron sometidos al estudio MS/MS, sin embargo se confirma su presencia con las referencias respectivas. Gran parte de las fragmentaciones observadas corresponde a la pérdida característica de agua (166).

Tabla 4.9 Ácidos de grasos presentes en las 15 muestras de cacao identificados mediante MS y confirmados con MS/MS

Ácidos grasos	Modo Negativo	Fragmento	Reportado en cacao
	[M-H] ⁻	(m/z)	Referencia
Ácido láurico	C12:0	199	(89–91)
Ácido mirístico	C14:0	227	(89,90)
Ácido pentadecanoico	C15:0	241.2	(59,89)
Ácido pentadecenoico	C15:1	239	(89,90)
Ácido palmítico	C16:0	255.2	237.2, 209,170.9 (89–91,138)
Ácido palmitoleico	C16:1	253.3	235 (89–91,166)
Ácido margárico	C17:0	269	225 (89,91, 138, 166)
Ácido heptadecenoico	C17:1	267	-ND- (89,90)
Ácido esteárico	C18:0	283.2	265.1 (89–91, 138)
Ácido oleico	C18:1	281.2	263 (89–91, 166)
Ácido linoleico	C18:2	279	261, 235 (89–91, 166)
Ácido linolénico	C18:3	277	259, 233 , 205 (89–91,166, 167)
Ácido nonadecanoico	C19:0	297	-ND-
Ácido nonadecenoico	C19:1	295	-ND-
Ácido araquídico	C20:0	311	182.9 (89, 138)
Ácido eicosenoico	C20:1	309.0	182.8 (89)
Ácido eicosatrienoico	C20:3	305.2	-ND-
Ácido eicosohexaenoico	C20:6	299.2	-ND-
Ácido heneicosanoico	C21:0	325.3	-ND-
Ácido behénico	C22:0	339	183 (89–91, 138)
Ácido erúxico	C22:1	337.3	-ND-
Ácido docosadienoico	C22:2	335.2	-ND-
Ácido docosatetraenoico	C22:4	331.2	-ND-
Ácido docosapentaenoico	C22:5	329.2	-ND-
Ácido docosahexanoico	C22:6	327.2	-ND-
Ácido tricosenoico	C23:0	353.3	-ND-
Ácido lignocérico	C24:0	357.3	-ND- (90, 91)
Ácido nervónico	C24:1	365.3	-ND- (143)
Ácido cerótico	C26:0	395.3	-ND-

ND = No Determinado

En la **Tabla 4.10** se muestran los resultados obtenidos en este estudio ESI-MS con cada una de las 15 muestras. Los ácidos grasos confirmados mediante MS/MS han sido resaltados en negro. Se observa que los ácidos esteárico (C18:0) y palmítico (C16:0) son los ácidos grasos saturados que se encuentran en mayor proporción en todas las muestras. Los ácidos grasos insaturados predominantes son el ácido oleico (C18:1) y el ácido linolénico (C18:2).

La composición reportada en la literatura para los ácidos grasos, palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1) es de 24.8 - 26.9 %, 32.9 - 37.7 % y 33.2 - 38.6 %, respectivamente, valores que coinciden con lo registrado en nuestros estudios salvo en el caso de la muestra 9 (San Martín, trinitario) que posee un porcentaje muy bajo de ácido esteárico C18:0 (10.9 %) y muy alto

de ácido oleico C18:1 (62.9 %) en comparación al resto de muestras. La muestra 1, de Ayacucho, también se sale del rango con ambos ácidos, 19.5 % y 55.3 %. Es importante hacer notar que esta muestra resalta además por poseer el mayor porcentaje de ácido pentadecanoico (C15:0) y tricosanoico (C23:0). La muestra 7 (Piura, criollo) posee el porcentaje más bajo de ácido palmítico (C16:0) (16.7 %), presentando valores normales de ácidos esteárico y oleico (C18:0 y C18:1) (31.36 y 44.17 %).

Estas tres muestras M1, M7 y M9 tienen en común un contenido de ácido tricosanoico (C23:0) mayor a 0.8 %. Entre M1 y M7 resalta el contenido de ácido pentadecanoico (C15:0) compuesto que se asocia con granos cacao inmaduros, se sabe que el ácido pentadecanoico desaparece al madurar (59).

El ácido linoleico (C18:2) se encuentra presente en la mayoría de muestras de cacao estudiadas vía (GC) (59, 83-84, 89-90,137,168-173). Se sabe que este es un indicador de origen geográfico. Muestras de Suramérica tienen contenidos mayores a 3 %, mientras que Asia registra contenidos menores a 2.5 % y África occidental un valor intermedio entre 3 – 2.5 % (169). En este estudio el contenido de C18:2 cumple con lo reportado en la literatura un porcentaje mayor al 3 %. Sin embargo se observa que de las 15 muestras solo dos muestras lo contienen, Junín M6 (4.36 %) y San Martín M10 (4.81 %). Estos valores concuerdan con lo reportado para granos de origen peruano, Iquitos y Río Nanay, cultivados en Brasil (4.02 % y 4.7 %)(173).

Otro ácido de importancia es el C18:3. En el estudio solo lo contienen cuatro muestras: M12 (Tumbes), M9 (San Martín), M6 (Junín) y M4 (Huánuco), con valores que oscilan entre (0.13 % - 0.45 %). En la literatura los valores registrados para este ácido se encuentran en el rango de (0.1 - 0.2 %) en la mayoría de los casos (84,89,90), a excepción de cacao criollo de Ocumare, Venezuela, con un valor de 1.3 % (83).

Tabla 4.10 Ácidos grasos identificados en muestras de cacao mediante ESI MS/MS

Muestra	Ácidos grasos (% molar en mezcla) ^a
1	C15:0 (0.80), C16:0 (20.93), C16:1 (0.16) C17:0 (0.08), C18:0 (19.48), C18:1 (55.31), C19:0 (0.32), C20:0 (0.22), C21:0(0.08), C22:6 (0.19), C23:0 (1.49), C24:0 (0.15), C24:1 (0.44), C26:0 (0.36)
2	C16:0 (20.40), C18:0 (33.57), C18:1 (43.94), C19:0:(0.13), C19:1(0.24), C20:0 (1.45), C21:0 (0.09), C22:0 (0.40), C22:1 (0.30), C24:0 (0.17)
3	C16:0 (21.28), C18:0 (31.56), C18:1 (41.53), C19:0(0.07), C19:1 (0.11), C20:0 (2.40), C20:6 (0.07), C22:0 (1.71), C22:1 (0.12), C22:6 (0.26), C23:0 (0.20), C24:1 (0.30), C26:0 (0.38)
4	C14:0 (0.12), C15:0 (0.07), C15:1 (0.10), C16:0 (21.52), C17:1 (0.17), C18:0 (29.23), C18:1 (45.28), C18:3 (0.23), C19:1 (0.20), C20:0 (1.14), C22:0 (0.29), C22:1 (0.16), C22:2 (0.38), C22:4 (0.07), C23:0 (0.10), C24:0 (0.29), C24:1 (0.40), C26 (0.27)
5	C15:0 (0.43), C15:1 (0.18), C16:0 (20.95), C17:1 (0.08), C18:0 (31.12), C18:1 (42.70), C19:0 (0.53), C20:0 (1.92), C22:0 (0.98), C22:5 (0.25), C22:6 (0.09), C24:0 (0.39), C24:1 (0.36)
6	C16:0 (18.49), C16:1 (0.44), C18:0 (35.01), C18:1 (38.06), C18:2 (4.36), C18:3 (0.23), C19:1 (0.09), C20:0 (1.72), C20:1 (0.15), C22:0 (0.31), C22:5 (0.41), C23:0(0.12), C26:0 (0.33)
7	C14:0 (0.39), C15:0 (0.67), C16:0 (16.76), C16:1 (0.49), C18:0 (31.36), C18:1 (44.17), C19:0 (0.29), C20:0 (0.68), C20:1 (0.11), C22:0 (0.33), C22:1 (1.26), C23:0 (1.09), C24:1 (1.99), C26:0 (0.11).
8	C16:0 (19.38), C16:1 (3.00), C18:0 (37.18), C18:1 (39.27), C19:0 (0.14), C20:0 (1.84), C20:1 (0.36), C22:0 (0.37), C22:1 (0.13), C22:5 (0.17), C23:0 (0.11), C24:0 (0.33), C24:1 (0.60), C26:0 (0.11)
9	C15:1 (0.18), C16:0 (17.78), C16:1 (0.56), C18:0 (10.93), C18:1 (67.93), C18:3 (0.45), C19:0 (0.34), C20:0 (0.27), C22:0 (0.15), C22:1 (0.17), C22:2 (0.22), C22:4 (0.12), C23:0 (0.91)
10	C15:1 (0.10), C16:0 (18.94), C17:1 (0.33), C18:0 (26.87), C18:1 (44.92), C18:2 (4.81), C19:0 (0.38), C19:1 (0.19), C20:0 (1.89), C21:0 (0.11), C22:0 (0.33), C22:1 (0.12), C23:0 (0.22), C24:0 (0.24),C24:1 (0.55)
11	C16:0 (23.51), C16:1 (0.40), C18:0 (29.40), C18:1 (43.18), C19:0 (0.14), C19:1 (0.40), C20:0 (1.44), C20:1 (0.27), C22:0 (0.25), C22:1 (0.14), C23:0 (0.63), C24:0 (0.25)
12	C16:0 (17.67), C18:0 (39.20), C18:1 (39:24), C18:3 (0.13), C19:0 (0.27), C19:1 (0.45), C20:0 (0.98), C20:6 (0.10), C22:0 (0.56), C22:1 (0.10), C22:2 (0.06), C22:5 (0.06), C22:6 (0.13), C23:0 (0.14), C24:0 (0.73), C26:0 (0.18)
13	C12:0 (0.10), C14:0 (0.19), C16:0 (25.76), C16:1 (0.64), C17:0 (0.23), C17:1 (0.14), C18:0 (29.67), C18:1 (39.11), C19:0 (0.16), C20:0 (0.54), C21:0 (0.10), C22:0 (0.71), C22:1 (0.59), C22:2 (0.25), C22:5 (0.29), C23:0 (0.40), C24:0 (0.31), C24:1 (0.82)
14	C16:0 (17.75), C16:1 (0.47), C17:1 (0.10), C18:0 (38.21), C18:1 (40.02), C20:0 (1.20), C20:3 (0.27), C21:0 (0.23), C22:0 (0.56), C22:2 (0.22), C22:5 (0.16), C23:0 (0.19), C24:0 (0.61)
15	C16:0 (22.36), C16:1 (0.30), C18:0 (33.95), C18:1 (39.90), C19:0 (0.64), C19:1 (0.14), C20:0 (0.17), C22:0 (0.56), C22:1 (0.08), C22:4 (0.45), C22:5 (0.31), C23:0 (0.37), C24:1 (0.77)

^a El porcentaje se calcula de la intensidad relativa del ion molecular sobre el total de los ácidos grasos detectados por muestra. Se denota la confirmación del ácido graso mediante MS/MS resaltado el nombre en negro.

A partir del porcentaje de cada uno de estos ácidos, se calcula el grado de saturación, insaturación, poli-insaturación y mono-insaturación, **Tabla 4.11**. En la literatura se registra un rango 62–64 % (saturado), 33 - 38% (insaturado), 2 – 4 % (poli-insaturado), 30 – 33 % (mono-insaturado) y 1.65 - 1.92 % (relación saturado/insaturado). Queda claro de los resultados desplegados en la **Tabla 4.11**, que nuestros valores no encajan con los reportados en la literatura. Se observa una mayor cantidad

de insaturados y mucho menos porcentaje de ácidos grasos saturados (relación saturado/insaturados 0.44 - 1.48 %). Estas desviaciones probablemente se deban a que estamos comparando valores obtenidos mediante GC con resultados de inyección directa basada en electrospray, ambos procesos muy distintos. Indica además, probablemente, que el método empleado aún puede optimizarse.

Tabla 4.11 Grado de insaturación de 15 muestras de granos peruanos de *Theobroma cacao* mediante ESI-MS/MS.

	Porcentaje de ácidos grasos (%)				
	Insaturados	Saturados	Poli-Insaturados	Mono-insaturados	Saturado/Insaturados
1	56.11	43.89	0.20	55.91	0.78
2	43.79	56.21	0	43.79	1.28
3	42.39	57.61	0.33	42.05	1.36
4	46.97	53.03	0.68	46.30	1.13
5	43.67	56.33	0.34	43.32	1.29
6	43.74	56.26	5.00	38.74	1.29
7	48.03	51.97	0	48.03	1.08
8	43.53	59.47	0.17	43.36	1.37
9	69.63	30.37	0.79	68.84	0.44
10	51.02	48.98	4.81	46.21	0.96
11	44.38	55.62	0	44.38	1.25
12	40.26	59.74	0.47	39.79	1.48
13	41.84	58.16	0.54	41.30	1.39
14	41.25	58.75	0.66	40.59	0.66
15	41.96	58.04	0.77	41.20	1.38

Se observa, que el porcentaje de ácidos grasos saturados, salvo excepciones M1 Ayacucho, M9 San Martín y M10 San Martín, es mayor que el porcentaje de insaturados lo cual coincide con lo reportado en la bibliografía (**Tabla 4.11**).

4.2.3 Perfil metabolómico de cacao mediante resonancia magnética nuclear

4.2.3.1 Estudio del perfil metabolómico del extracto metanólico de cacao

El perfil metabolómico basado en RMN también fue estudiado con una muestra representativa de cacao desengrasado con la finalidad de observar la complejidad de la muestra e identificar la factibilidad de que esta técnica sea utilizada en el futuro para el análisis químico de cacao (calidad, variedad).

En la **Figura 4.7** se muestra el espectro de ^1H -RMN obtenido con una muestra de cacao y en la **Tabla 4.12** la asignación de una buena parte de los metabolitos presentes en el extracto. Dicha asignación ha sido realizada empleando RMN bidimensional (COSY), **Figura 4.8** y, además utilizando como referencia los valores reportados en la literatura (116,174).

Se corrobora que las señales dominantes del espectro de ^1H RMN (entre 7.5 ppm a 8 ppm y de 3 ppm a 4 ppm) son las de teobromina, todas ellas singuletes (**Figura 4.7**). El protón C_8H de la teobromina (Teo) muestra su distintivo singulete a 7.76 ppm. Esta señal se correlaciona a larga distancia, en el espectro COSY (**Figura 4.8** círculo verde) con la señal singulete del grupo metilo enlazado covalentemente al heteroátomo N_7CH_3 a 3.80 ppm. Queda claro que el acoplamiento existente es menor que la resolución del espectro (menor a 1 Hz) por ser este a larga distancia.

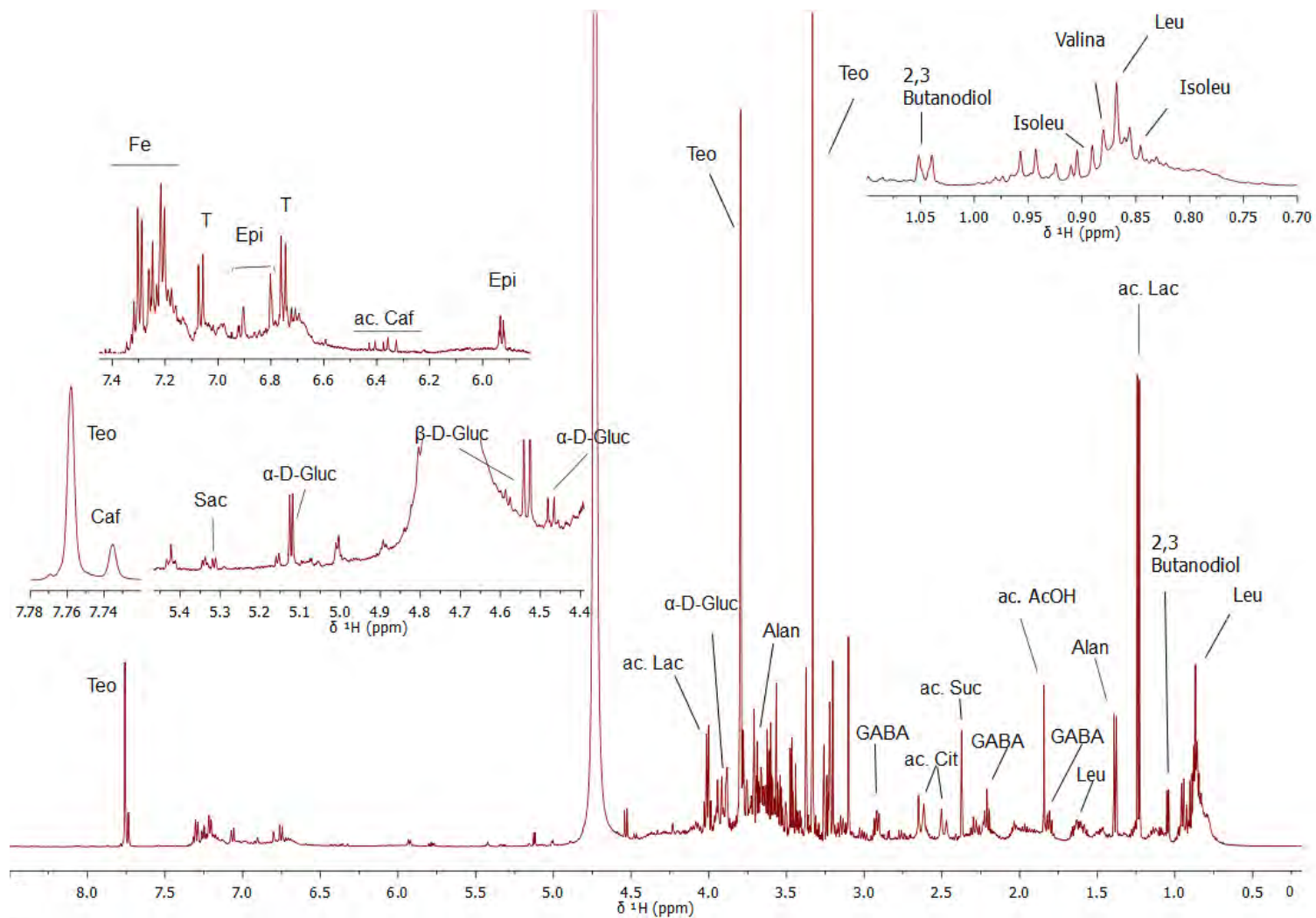
La tirosina (T) fue identificada por sus característicos y bien definidos dobletes en 7.07 ppm y 6.87 ppm (**Figura 4.7**), correspondiente a los protones equivalentes $\text{C}_2\text{H}/\text{C}_6\text{H}$ y $\text{C}_3\text{H}/\text{C}_5\text{H}$. La asignación de estos protones fue confirmada por correlación con los protones aromáticos usando el espectro COSY (**Figura 4.8** círculo naranja). Se espera, dado el efecto que ejerce del heteroátomo sobre el desplazamiento de los hidrógenos orto, que esta asignación ($\text{C}_2\text{H}/\text{C}_6\text{H}$) sea la correcta.

Los grupos metileno del ácido γ -aminobutírico (GABA) fueron identificados en la región de 1.7 ppm – 3.0 ppm: triplete a 2.90 ppm (C_4H), triplete a 2.21 ppm (C_2H) y multiplete a 1.81 ppm (C_3H). Estas señales se correlacionan en el espectro COSY (**Figura 4.8** círculos: azul y rojo).

Asimismo, varios compuestos considerados como biomarcadores de sabor (aminoácidos aromáticos, polifenoles como epicatequina, ácidos orgánicos y aminoácidos apolares) presentan señales bien definidas que correlacionan a través del COSY. Los resultados obtenidos confirman los resultados obtenidos mediante HPLC-DAD y LC-MS asociados con la detección de epicatequina, ácido cafeico, teobromina y cafeína.

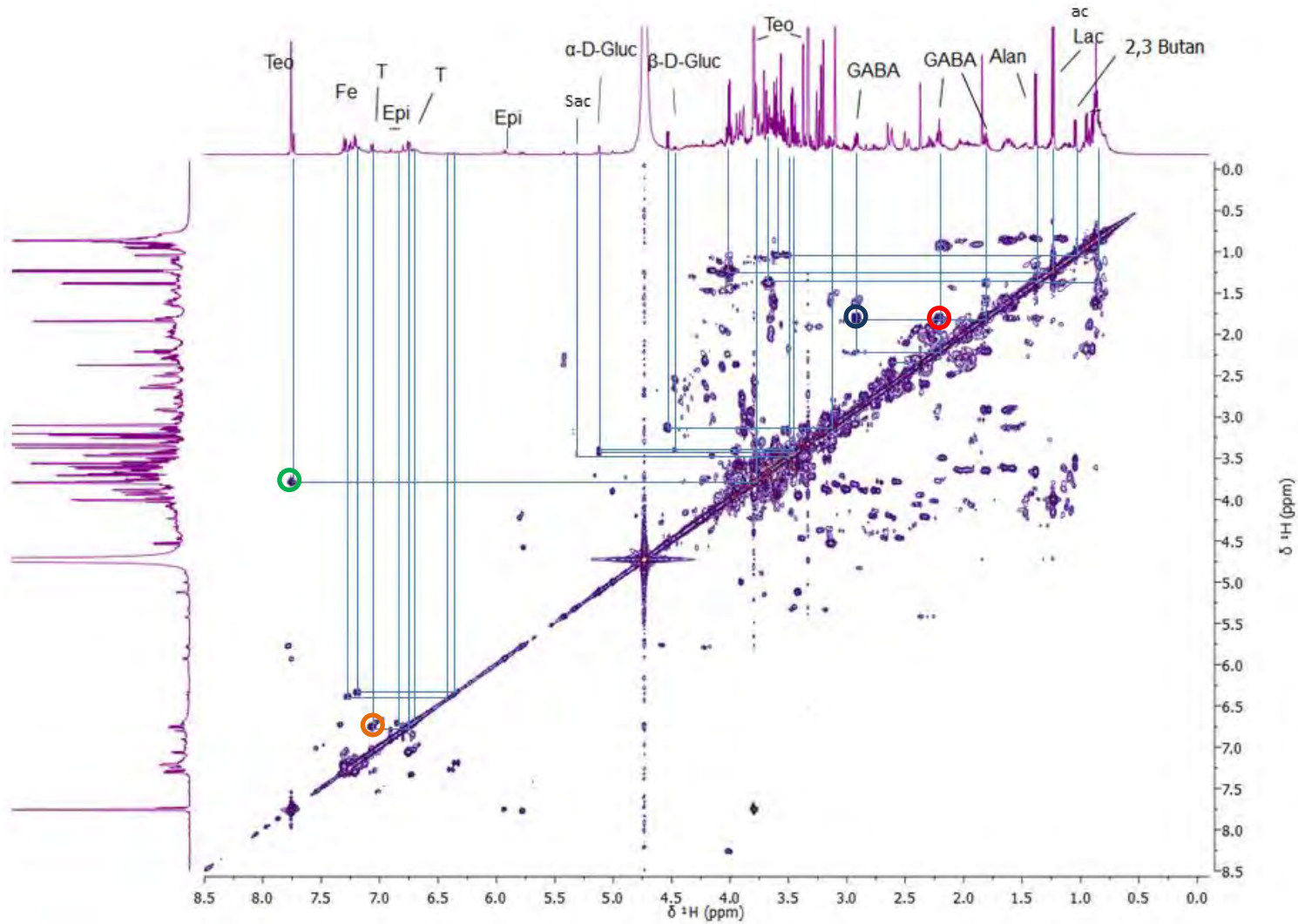
La complejidad de estos espectros exige la confirmación de estas asignaciones mediante un mayor número de estudios bidimensionales como HSQC, HMBC, TOCSY. Por razones de tiempo no se realizaron dichos experimentos en este trabajo. Este estudio preliminar sin embargo confirma que el perfil metabólico basado en RMN puede ser de gran utilidad para la mejora de la calidad de procesos pos-cosecha del grano de cacao pues las señales de los biomarcadores de interés son identificables dentro de la mezcla.





Teo = Teobromina, Fe = Fenilalanina, T = Tirosina, Epi = Epicatequina, ac. Caf = Ácido Cafeico, Sac = Sacarosa, $\alpha\text{-D-Gluc}$ = $\alpha\text{-D-Glucopiranos}$, $\beta\text{-D-Gluc}$ = $\beta\text{-D-Glucopiranos}$, ac. Cit = Ácido cítrico, ac. Suc = Ácido succínico, GABA = Ácido γ -aminobutírico, ac. AcOH = Ácido acético, Alan = Alanina, ac. Lac = Ácido láctico, 2,3 Butan = 2,3 Butanodiol, Leu = Leucina, Isoleu = Isoleucina

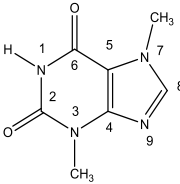
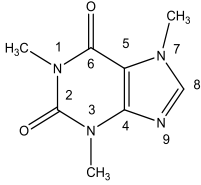
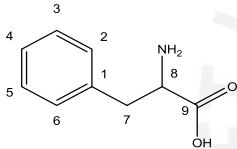
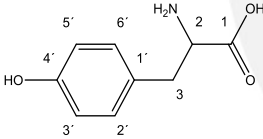
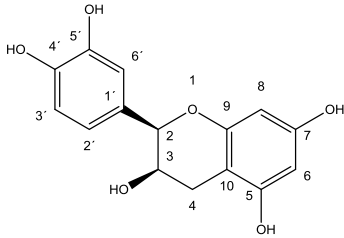
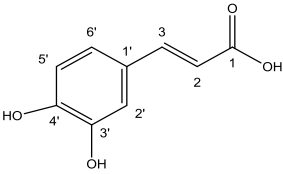
Figura 4.7 Espectro de $^1\text{H-NMR}$ del extracto metanólico de cacao.

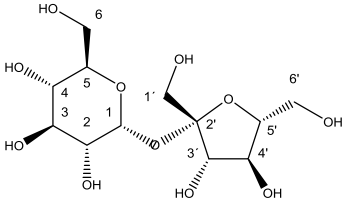
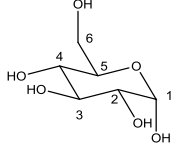
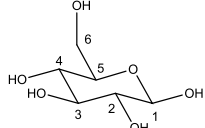
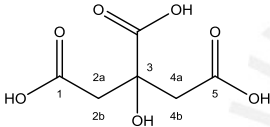
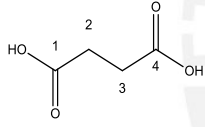
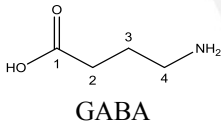
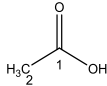
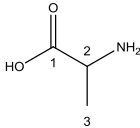
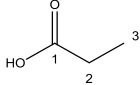
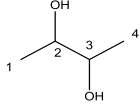


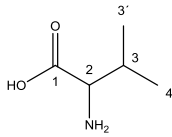
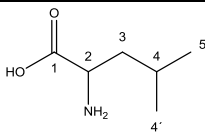
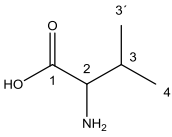
Teo = Teobromina, Fe = Fenilalanina, T = Tirosina, Cat = Epicatequina, Sac = Sacarosa, α -D-Gluc= α -D-Glucopiranososa
 β -D-Gluc= β -D-Glucopiranososa, GABA = Ácido γ -aminobutírico, Alan = Alanina, ac. Lac = Ácido láctico, 2,3 Butan = 2,3 Butanodiol, Leu = Leucina

Figura 4.8 Espectro COSY del extracto metanólico de cacao.

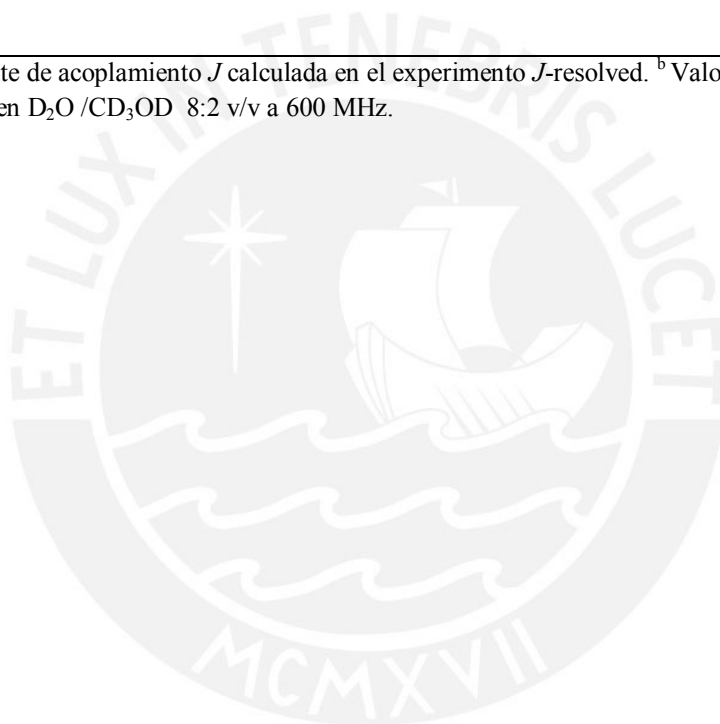
Tabla 4.12 Metabolitos presentes en extracto metanólico de cacao confirmado mediante desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (Hz) en estudio de RMN.

Estructura y numeración	Asignamiento	δ (multiplicidad, J) experimentales en la mezcla ^a	δ (multiplicidad, J) reportados experimentalmente en la literatura ^b
 <p>Theobromina</p>	N_3CH_3 N_7CH_3 C_8H	3.33 (s) 3.80 (s) 7.76 (s)	3.46 (s) 3.91 (s) 7.88 (s)
 <p>Cafeína</p>	N_3CH_3 C_8H	3.37 (s) 7.74 (s)	3.33 (s) 7.86(s)
 <p>Fenilalanina</p>	C_2H, C_6H C_4H	7.22 (dd, 8.0, 1.5) 7.28 (t, 7.39)	7.32 (dd, 7.20, 1.46) 7.35 (t, 7.53)
 <p>Tirosina</p>	C_3H, C_5H C_2H, C_6, H	6.76 (d, 8.64) 7.07 (d, 8.64)	6.87 (d, 8.40) 7.18 (d, 8.43)
 <p>Epicatequina</p>	C_6H C_8H C_3H, C_2H C_6H	5.91 (d, 2.29) 5.94 (d, 2.29) 6.80 (m) 6.91 (d, 3.0)	6.05 (d, 1.96) 6.07 (d, 1.98) 6.92 (m) 7.03 (s)
 <p>Ácido cafeico</p>	C_2H C_3H	6.40 (d, 15.76) 7.28 (d, 15.76)	6.33 (d, 15.92) 7.29 (d, 15.97)

 <p>Sacarosa</p>	C_1H	5.31 (d, 3.75 Hz)	5.41 (d, 3.84)
 <p>α-D-Glucopiranososa</p>	C_1H	5.13 (d, 3.9)	5.21 (d, 3.75)
 <p>β-D-Glucopiranososa</p>	C_1H	4.54 (d, 7.9 Hz)	4.62 (d, 7.90)
 <p>Ácido cítrico</p>	C_2H_{2b}, C_4H_{2b} C_2H_{2a}, C_4H_{2a}	2.64(d, 15.74) 2.49 (d, 15.60)	2.71 (d, 16.81) 2.55 (d, 16.74)
 <p>Ácido succínico</p>	C_2H_2, C_3H_2	2.34 (s)	2.45 (s)
 <p>GABA</p>	C_4H_2 C_2H_2 C_3H_2	2.90 (t, 7.4) 2.21 (t, 7.4) 1.81 (m)	3.02 (t, 7.30) 2.30 (t, 7.29) 1.90 (m)
 <p>Ácido acético</p>	C_2H_3	1.84 (s)	1.93 (s)
 <p>Alanina</p>	C_3H_3	1.40 (d, 7.25)	1.48 (d, 7.24)
 <p>Ácido láctico</p>	C_3H_3	1.23 (d, 6.9)	1.33 (d, 6.9)
 <p>2,3 Butanodiol</p>	C_1H_3, C_4H_3	1.00 (d, 5.95)	1.14 (d, 5.16)

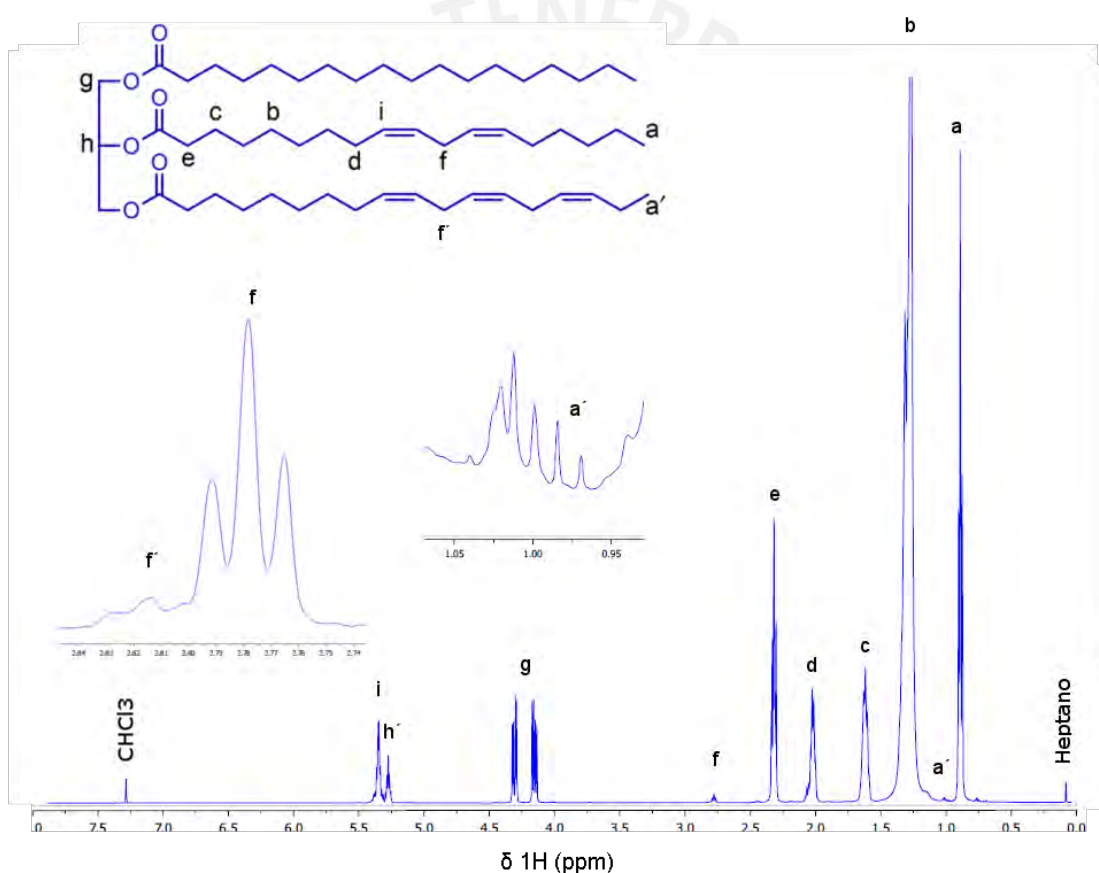
 <p>Valina</p>	C_4H_3 C_3H_3	0.95 (d, 7.17) 0.89 (d, 7.17)	1.05 (d, 7.05) 0.99 (d, 7.01)
 <p>Leucina</p>	C_4H_3, C_5H_3	0.87 (d, 6.2)	0.97 (bt)
 <p>Isoleucina</p>	C_3H_3 C_5H_3	0.92 (d, 7.05) 0.85 (t, 7.48)	1.02 (d, 7.05) 0.95 (t, 7.42)

^a Valores de la constante de acoplamiento J calculada en el experimento J -resolved. ^b Valores reportados en Caligiani, 2010 (174) en D_2O/CD_3OD 8:2 v/v a 600 MHz.



4.2.3.2 Determinación de porcentaje de insaturación de la manteca mediante ^1H -RMN.

Dado que la técnica electrospray MS no proporcionó resultados comparables con los de la literatura, el porcentaje de insaturación fue evaluado mediante espectroscopía de RMN, tal como fue realizado en un estudio previo asociado con ácidos grasos diversos (151). La gran ventaja de la RMN sobre las otras técnicas es el hecho que el área de los picos es directamente proporcional a la fracción molar de los componentes. La relación saturados/insaturados se obtuvo a partir de las integrales de los protones H_a , $\text{H}_{a'}$, H_d , H_e , H_f (**Figura 4.9**), según ecuaciones presentadas en el acápite 3.2.10. El estudio preliminar se realizó con las quince muestras.



donde $a = 0.80 - 0.96$ ppm (t, 7.17 Hz); $a' = 0.96 - 0.98$ ppm (t, 7.40 Hz); $b = 1.06 - 1.503$ ppm (m); $c = 1.52 - 1.70$ ppm (m); $d = 1.96 - 2.05$ ppm (m); $e = 2.25 - 2.37$ ppm (dt); $f = 2.74 - 2.78$ ppm (m); $f' = 2.82 - 2.84$ ppm; $g = 4.10 - 4.36$ ppm (dd dd, 6.06 Hz; 4.33 Hz); $h' = 5.24 - 5.30$ ppm (m); $i = 5.30 - 5.43$ ppm (m); para las áreas de integración ver la figura en el A28.

Figura 4.9 Espectro de ^1H -RMN de la fase lipídica de cacao en CDCl_3 obtenido a 25°C

De la **Tabla 4.13** queda claro que los porcentajes obtenidos para los distintos grupos de grasas son comparables, con los resultados reportados en la literatura 60-71 % (saturado), 29-40 % (insaturado), 2-4 % (poli-insaturado), 27 - 37 % (mono-insaturado) y relación saturado/insaturado (1.49-2.45 %), basados en cuantificación mediante metodología tradicional como GC (83-84, 89, 170). En nuestro caso, el porcentaje de ácidos saturados vario entre 64-68 %, ácidos insaturados 32-34 %, ácidos poli-insaturados 2.6-3.7 %, ácidos mono-insaturados 29-32% y relación saturado/insaturado 1.73-1.85 %.

Tabla 4.13 Porcentaje de grasas: saturadas, insaturadas, mono-insaturadas, poli-insaturadas y C18:2 y C18:3 mediante análisis RMN de protón.

	Porcentaje molar de grasa (%)					Porcentaje molar específico (%)	
	%AS	%AI	%API	%AMI	%AS/%AI	%C18:2	%C18:3
M1, Ayacucho	66.34	33.66	3.33	30.33	1.79	3.09	0.24
M2, Huánuco	66.73	33.27	3.18	30.10	1.83	2.95	0.23
M3, Huánuco	66.80	33.20	3.47	29.73	1.82	3.26	0.21
M4, Huánuco	66.26	33.74	3.28	30.46	1.79	3.04	0.24
M5, Huánuco	66.47	33.53	3.71	29.82	1.78	3.44	0.27
M6, Junín	66.44	33.56	3.23	30.33	1.81	3.00	0.23
M7, Piura	64.31	35.69	3.77	31.92	1.63	3.42	0.34
M8, Piura	65.31	34.69	3.09	31.61	1.73	2.81	0.28
M9, San Martín	67.12	32.88	3.27	29.61	1.86	3.04	0.23
M10, San Martín	66.63	33.37	3.46	29.92	1.81	3.27	0.19
M11, San Martín	66.95	33.05	3.68	29.37	1.82	3.47	0.21
M12, Tumbes	66.67	33.33	2.66	30.67	1.85	2.42	0.23
M13, Ucayali	67.41	32.59	3.49	29.09	1.87	3.29	0.20
M14, Ucayali	66.74	33.26	3.41	29.85	1.82	3.19	0.22
M15, Ucayali	67.63	33.37	3.46	29.91	1.81	3.24	0.22
Valores medidos en GC							
Venezuela (83)	63.99	36.01	2.68	33.33	1.78	2.51	0.17
Ecuador (89)	62.28	37.69	2.57	35.12	1.65	2.43	0.14
Ghana (89)	63.24	36.74	2.15	34.59	1.72	2.02	0.13
Brasil (84)	59.80	40.20	3.70	36.50	1.49	3.50	0.20
Malasia (170)	70.98	29.02	2.26	26.76	2.45	2.23	0

%AS= Porcentaje de ácidos saturados, %AI= Porcentaje de ácidos insaturados, %C18:2= Porcentaje de ácido linoleico, %C18:3= Porcentaje de ácido linolénico, %API= Porcentaje de ácido insaturado, %AMI=Porcentaje de ácido mono-insaturados, %AS/%AI= Relación de ácidos grasos saturados/insaturados.

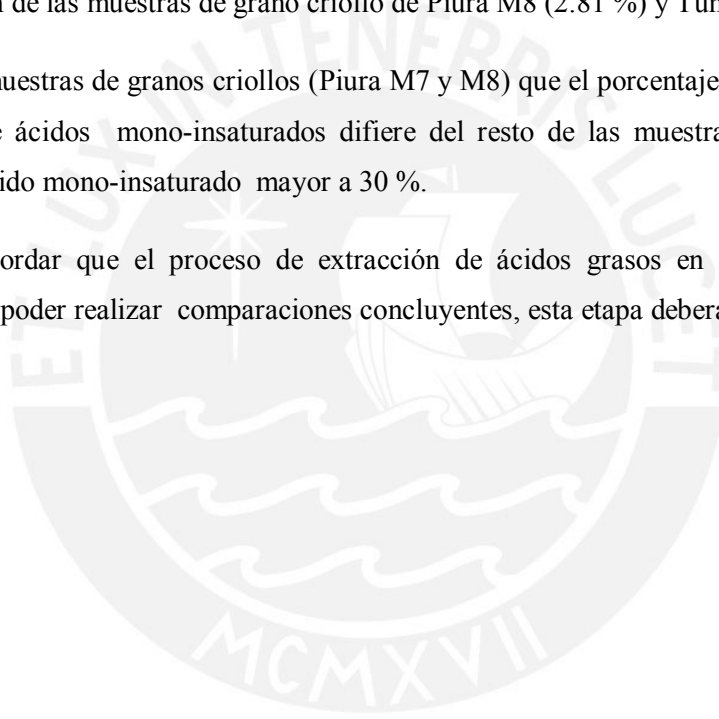
En la literatura (59, 83-84, 89-90, 137, 168-173) los únicos ácidos grasos reportados en manteca de cacao como poli-insaturados de tres y dos enlaces son el ácido linolénico (C18:3) y linoleico

(C18:2). En todas las muestras evaluadas mediante la metodología de RMN se detectaron estos dos ácidos grasos, en un porcentaje que coincide con el reportado en la literatura basada en GC, a saber de 0.19 % a 0.34 % para el ácido linolénico (C18:3) y de 2.42 % a 3.47 % para el ácido linoleico (C18:2). Comparando estos resultados con los obtenidos por ESI-MS (sólo algunas muestras de manteca de cacao presentaron una cantidad medible de C18:3 y C18:2), es claro que el método ESI-MS debe aún optimizarse para poder ser utilizado en el análisis de manteca de cacao de manera precisa.

En este estudio el contenido de C18:2 cumple con lo reportado en la literatura, es decir presenta un porcentaje mayor al 3 %. Se observa que de las quince muestras, trece contienen más del 3 % de C18:2, a excepción de las muestras de grano criollo de Piura M8 (2.81 %) y Tumbes M12 (2.42 %).

Resalta entre las muestras de granos criollos (Piura M7 y M8) que el porcentaje de ácidos saturados y el porcentaje de ácidos mono-insaturados difiere del resto de las muestras: ácidos saturados menor a 65 % y ácido mono-insaturado mayor a 30 %.

Es importante recordar que el proceso de extracción de ácidos grasos en este trabajo no fue exhaustivo y, para poder realizar comparaciones concluyentes, esta etapa deberá ser optimizada.



5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este estudio el objetivo fue desarrollar métodos analíticos basados en espectroscopías ultravioleta-visible, fluorescencia, masas y resonancia magnética nuclear que permitan discriminar el cacao de acuerdo a variedad (teobromina/cafeína) y origen (porcentaje de grasa) y calidad (procianidina B y aspartato de ácido cafeico).

- De acuerdo al pH de las 15 muestras de cacao bajo estudio, 7 muestras estuvieron bien fermentadas, 4 se encuentran sobre-fermentadas y 4 clasifican como no-fermentadas.
- Los granos de cacao clasificados como criollos, todos menos uno, cumplieron con el porcentaje de cáscara superior a 14 %. El resto de las muestras de granos trinitarios presentaron valores menores 12 %, valor que confirma su mayor tiempo de fermentación.
- El método de extracción de manteca implementado se basó en extracción por sonicado mediante heptano, proceso que demostró no ser exhaustivo. Se recomienda optimizar la extracción de la grasa sonicando un mayor tiempo y empleando hexano como solvente.
- El método de extracción de la cocoa mediante sonicado con metanol:agua (70:30), permitió extraer un gran número de compuestos polifenólicos, además de las metilxantinas, teobromina y cafeína.
- Se implementó metodología de cromatografía líquida que permitió cuantificar teobromina y cafeína, así como separar al ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido *p*-hidrozibenzoico, ácido vanílico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, epicatequina, catequina, procianidina B, aspartato de ácido cafeico, ácido cinámico, aspartato de ácido cumárico, clovamida, deoxiclovamida, procianidina C y pentámero de catequina.
- El método analítico HPLC-DAD de 13 minutos que permitió cuantificar a la teobromina y cafeína fue validado en cuanto a linealidad (m , b y R^2 ; $n = 4$) y a precisión (tiempo de retención y área; $n = 5$).
- El contenido de teobromina en las 15 muestras varió entre 0.39 - 0.76 % y el de cafeína entre 0.09 - 0.19 %. Los granos criollos (Piura M7, M8 y Tumbes M12) demostraron una razón teobromina/cafeína menor o cercano a 3, tal como ha sido reportado en la literatura y, las otras muestras clasificaron como trinitarias con una razón mayor a 4.
- Se desarrolló un método analítico HPLC-DAD, método de 50 minutos que permitió la discriminación de calidad a través de la evaluación de biomarcadores de fermentación (procianidina B y aspartato de ácido cafeico). La disminución de sus áreas a 320 nm indica

degradación de estos polifenoles a causa del avance del proceso de fermentación. Dado los resultados obtenidos, se recomienda implementar metodología HPLC-DAD para evaluar al aspartato de ácido cafeico, procianidina B, catequina y epicatequina como biomarcadores de fermentación.

- Se implementó una nueva metodología inyección directa-electrospray-masas tándem-modo negativo para la identificación de 29 ácidos grasos en la manteca de cacao, 10 de los cuales fueron confirmados mediante masas tándem. Se recomienda, hacer lo mismo pero en positivo, en búsqueda de otros compuestos polares que faciliten la discriminación geográfica.
- Los porcentajes de saturación, insaturación, mono-insaturación y poli-insaturación hallados mediante ESI-MS, no se comparan con los reportados en la literatura, cálculos basados en GC.
- El perfil metabólico basado en RMN de protón permitió identificar a la teobromina, cafeína, además de la fenilalanina, tirosina, epicatequina, ácido cafeico, sacarosa, catequina, α -D-glucopiranososa, β -D-glucopiranososa, ácido cítrico, ácido succínico, GABA, ácido acético, alanina, ácido láctico, 2,3 butanodiol, valina, leucina e isoleucina.
- Se implementó metodología de RMN basada en protón para determinar el porcentaje de grasas en la manteca de cacao de las 15 muestras bajo estudio. Los resultados obtenidos son comparables a lo reportado en la literatura en cuanto a la relación de ácidos saturados e insaturados.
- El perfil de grasa del cacao peruano, obtenido mediante RMN, permite, de forma preliminar, discriminarlos frente a cacao de Venezuela, Ecuador, Ghana, Brazil y Malasia (cuantificación basada en GC). Dado que este estudio representa el primero en analizar manteca de cacao mediante RMN no se cuenta aún con datos basados en RMN que faciliten la comparación. La discriminación entre variedad, criollo versus trinitario, también ha podido realizarse a través de estos porcentajes.

6. REFERENCIAS

1. Silva CRS, Venturieri GA, Figueira A. Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification, and characterization of interspecific hybrids. *Acta Bot Brasilica* **2004**, 18 (2): 333 – 341.
2. De la Cruz M, Whitkus R, Gómez-Pompa A, Mota-Bravo L. Origins of cacao cultivation. *Nature* **1995**, 375: 542 – 543.
3. Whitkus R, De La Cruz M, Mota-Bravo L, Gómez-Pompa A. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theor Appl Genet* **1998**, 96 (5): 621 – 627.
4. Zhang D, Gardini EA, Motilal L A, Baligar V, Bailey B, Zuñiga-Cernades L, Arevalo-Arevalo C, Meinhardt. Dissecting Genetic Structure in Farmer Selections of *Theobroma Cacao* in the Peruvian Amazon: Implications for on Farm Conservation and Rehabilitation. *Trop Plant Biol* **2011**, 4 (2): 106 – 116.
5. Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Loor R, Kuhn DN, Brown JS, Schnell, RJ. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS One* **2008**, 3(10): e3311.
6. Motamayor JC, Risterucci A M, Lopez P A, Ortiz CF, Moreno A, Lanaud C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* **2002**, 89(5): 380 – 386.
7. Lass A. *Cocoa growing and harvesting practices*, En: CHOCOLATE & COCOA: HEALTH AND NUTRITION, Ian Knight, Ed., Blackwell Publishing Ltd, 1999, p. 12-42.
8. Toxopus H. *Botany, types and populations*, En: COCOA. G A R Wood, R A Lass, Eds. Fourth Edition, London: Blackwell Science, 1985, p. 25-36.
9. Kongor JE, Hinneh M, de Walle D Van, Afoakwa EO, Boeckx P, Dewettinck K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - a review. *Food Res Int* **2016**, 82 (2016): 44-52.
10. Loor Solorzano RG, Fouet O, Lemainque A, Pavek S, Boccara M, Argout X, Amores F, Courtois B, Risterucci A, Lanaud C. Insight into the Wild Origin, Migration and Domestication History of the Fine Flavour Nacional *Theobroma cacao* L. Variety from Ecuador. *PLoS One* **2012**, 7 (11): e48438.
11. Lerceteau E, Robert T, Pétiard V, Crouzillat D. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor Appl Genet* **1997**, 95 (1-2):10 - 19.
12. Henderson JS, Joyce RA, Hall GR, Hurst WJ, McGovern PE. Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *Proc Natl Acad Sci USA* **2007**, 104 (48):18937 - 18940.
13. Gómez-Pompa A, Flores JS, Fernández MA. The Sacred Cacao Groves of the Maya. *Society for American Archaeology* **1990**,1(3):247 - 257.
14. Schmitz H, Shapiro H-Y. The Future of Chocolate. *Sci Am* **2012**, 306 (2) : 60 – 65.
15. Yang JY, Scascitelli M, Motilal L A., Sveinsson S, Engels JMM, Kane NC, Dempewolf H, Zhang Dappeng, Maharaj K, Cronk Q. Complex origin of Trinitario-type *Theobroma cacao* (Malvaceae) from Trinidad and Tobago revealed using plastid genomics. *Tree Genet Genomes* **2013**, 9: 829 – 840.
16. Ramos G, Gómez A. Caracteres Morfológicos en Cacao. <http://www.capecve.org/literatura.html> (Consultada en Septiembre 2015).
17. Bertazzo A, Comai S, Mangiarini F, Chen S. *Composition of Cacao Beans* en CHOCOLATE IN HEALTH AND NUTRITION. Ronald Watson, Victor Preedy, Sherma Zibadi, Eds. First Edition, Humana Press, 2013, p. 105-117.
18. ISO 2451:2014(E). Cocoa beans-Specification, Second Edition, Geneva, Switzerland, 2014.

19. Minifie B. *History and Development* en Chocolate, cocoa, and confectionery: Science and technology. Third Edition, New York: Van Nostrand Reinhold, 1989, p. 3-32.
20. Ilangantileke SG, Wahyudi T, Bailon MG. Assessment Methodology To Predict Quality of Cocoa Beans for Export. *J Food Qual* **1991**, 14: 481 – 496.
21. Caligiani A, Cirlini M; Palla G, Ravaglia R, Arlorio M. GC-MS Detection of Chiral Markers in Cocoa Beans of Different Quality and Geographic Origin. *Chirality* **2007**, 19: 329 - 334.
22. Cakier M. *Color as an Indicator of flavanol content in the fresh seeds of Theobroma Cacao L. Regulation*. Tesis de Maestría. The Pennsylvania State University, 2003.
23. Flor de Baba. Flor de Baba <http://www.grancolombia.com.co/flor-de-baba> (Consultada en Septiembre 2014).
24. Goodyear D. The future of chocolate: why cocoa production is at risk. The Guardian <http://www.theguardian.com/sustainable-business/fairtrade-partner-zone/chocolate-cocoa-production-risk> (Consultada en Septiembre 2015).
25. Agencia Peruana de Noticias. Al 2024 Perú será el primer productor de cacao fino y de aroma en el mundo. America economía. <http://americaeconomia.com/negocios-industrias/al-2024-peru-sera-el-primero-productor-de-cacao-fino-y-de-aroma-en-el-mundo> (Consultada en Agosto 2015).
26. Pekic V. Inca empire strikes back : Peru could dethrone Ecuador as leading global producer of ‘Fino de Aroma’ cocoa by 2020. Confectionery News. <http://www.confectionerynews.com/Commodities/Peru-could-overtake-Ecuador-as-fine-flavor-cocoa-king> (Consultada en Septiembre 2015).
27. ITC. Estadísticas de comercio para el desarrollo internacional de las empresas. <http://www.trademap.org/> (Consultada en Julio 2015).
28. García Carrión LF, Guarda Sotelo D, Chávez Matías J, Ríos Ruiz R, Chía Wong J, Nauca J, García P, Castillo W, Durán Z, Dávila D, Luna H. Improvement of Productivity and Quality of Cocoa : FINAL REPORT. Tingo Maria - Huanuco, Perú; 2010.
29. García Carrión LF, Guarda Sotelo D, Chávez Matías J, Ríos Ruiz R, Chía Wong J. Farmer participatory and on-station selection activities carried out at Universidad Nacional Agraria de la Selva, Peru. En *Collaborative and Participatory Approaches to Cocoa Variety Improvement. Final report of the CFC/ICCO/Bioversity project on “Cocoa Productivity and Quality Improvement: a Participatory Approach” (2004-2010)*. CFC/ICCO/Bioversity International: Amsterdam/London/Rome; 2011. 206 p.
30. García Carrión LF. *Catálogo de cultivares de cacao del Perú*. Ministerio de Agricultura; Lima, 2014, p. 8.
31. Andina. Perú es el segundo productor mundial de cacao orgánico. <http://gestion.pe/economia/peru-segundo-productor-mundial-cacao-organico-2013475> (Consultada en Septiembre 2015).
32. Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. Hoja botánica : Cacao. *Theobroma cacao L*. Lima: Botconsult GmbH; 2012. p. 1-20.
33. Dirección General de Competitividad Agraria. Superárboles de Cacao Chuncho del Cusco. MINAGRI. http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales_boletines/cacao-/superarboles_cacao_chuncho.pdf (Consultada en Septiembre 2015).
34. Florence F. Rare Cacao Beans Discovered in Peru. The New York Times. http://www.nytimes.com/2011/01/12/dining/12chocolate.html?_r=0 (Consultada en Agosto 2015)
35. Medina I. La lengua común del cacao. El País. http://elpais.com/elpais/2015/06/25/estilo/1435260500_278211.html (Consultada en Septiembre 2015).
36. Perú21. El cacao fue declarado producto de bandera de Perú. Perú21 <http://peru21.pe/economia/cacao-fue-declarado-producto-bandera-peru-2156601> (Consultada en Septiembre 2015).

37. Andina. Cadena de valor del cacao beneficia indirectamente a 250000 peruanos. <http://www.andina.com.pe/agencia/noticia-cadena-valor-del-cacao-beneficia-indirectamente-a-250000-peruanos-518155.aspx> (Consultada en Septiembre 2015).
38. Bean C, Nolte GE. Cocoa Update and Outlook . [http://gain.fas.usda.gov/Recent GAIN Publications/Cocoa Update and Outlook_Lima_Peru_10-28-2014.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Cocoa%20Update%20and%20Outlook_Lima_Peru_10-28-2014.pdf) (Consultada en Septiembre 2015).
39. MINAGRI. Series Históricas de Producción Agrícola - Compendio Estadístico. http://frenteweb.minag.gob.pe/sisca/?mod=consulta_cult (Consultada en Septiembre 2015).
40. Britannica E. Cacao. <http://www.britannica.com/print/article/87750> (Consultada en Septiembre 2015).
41. Ramos Carranza G. Programa de formación de catadores de cacao intermedios y avanzado, y talleres de capacitación a personal de asociaciones de productores <http://www.mincetur.gob.pe/Comercio/ueperu/licitacion/pdfs/Informes/22.pdf> (Consultada en Septiembre 2015).
42. MINAG. Cacao: Un campo fértil para sus inversiones y el desarrollo de sus exportaciones. 2011. http://www.salondelcacaoychocolate.pe/2012/archivos/ficha_cacao.pdf (Consultada en Septiembre 2015).
43. Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior. Ficha comercial Cacao. http://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?_page_=172.17100&_portletid_=sfichaproducto_init&scriptdo=cc_fp_init&pproducto=49&pnomproducto=Cacao (Consultada en Septiembre 2015).
44. Brunetto MDR, Gutiérrez L, Delgado Y, Gallignani M, Zambrano A, Gómez Á, Ramos G, Romero C. 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. *Food Chem* **2007**, 100: 459 - 467.
45. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2008**, 48(January 2014): 840 - 857.
46. Schwan RF, Wheals AE. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2004**, 44(4): 205 - 221.
47. Ardhana MM, Fleet GH. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol.* **2003**, 86(1-2): 87 - 99.
48. Camu N, De Winter T, Addo S, Takrama J, Bernaert H, De Vuyst L. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *J Agric Food Chem* **2008**, 88: 2288 - 2297.
49. Lagunes Gálvez S, Loiseau G, Paredes JL, Barel M, Guiraud JP. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *Int J Food Microbiol* **2007**, 114: 124 - 130.
50. Hashim P, Selamat J, Muhammad SKS, Ali A. Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *J Sci Food Agric.* **1998**, 78(4):535 - 542.
51. Afoakwa EO, Quao J, Takrama FS, Budu a. S, Saalia FK. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Int Food Res J* **2012**, 19(3): 1071 - 1077.
52. Ortiz de Bertorelli L, Graziani de Fariñas L, Rovedas G. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agron Trop* **2009**, 59(2): 119 - 27.
53. Saltini R, Akkerman R, Frosch S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control* **2013**, 29(1): 167 - 187.
54. Harrington W. *The Effects of Roasting Time and Temperature on the Antioxidant Capacity of Cocoa Beans from Dominican Republic, Ecuador, Haiti, Indonesia, and Ivory Coast.*

- Tesis de Maestría. University of Tennessee, 2011.
55. Rodriguez-Campos J, Escalona-Buendía HB, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E, Jaramillo-Flores ME. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao L.*) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res Int* **2011**, 44(1): 250 – 258.
 56. Andres-Lacueva C, Monagas M, Khan N, Izqueterdo-Pulido M, Urpi-Sarda M, Permanyer J, Lamuela-Raventós R. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: Influence of the manufacturing process. *J Agric Food Chem* **2008**, 56(June): 3111 - 3117.
 57. Jinap S, Thien J. Effect of Drying on Acidity and Volatile Fatty Acids Content of Cocoa Beans. *Food Agric* **1994**; 65(1): 67 - 75.
 58. Zahouli GIB, Guehi ST, Fae a M, Nemlin JG. Effect of Drying Methods on the Chemical Quality Traits of Cocoa Raw Material. *Adv J Food Sci Technol* **2010**, 2(4): 184 - 190.
 59. Bucheli P, Rousseau G, Alvarez M, Laloi M, McCarthy J. Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao L.* Seeds. *J Agric Food Chem* **2001**, 49: 5046 - 5551.
 60. Pereira-Caro G, Borges G, Nagai C, Jackson MC, Yokota T, Crozier A, Ashhara H. Profiles of phenolic compounds and purine alkaloids during the development of seeds of *Theobroma cacao* cv. Trinitario. *J Agric Food Chem* **2013**, 61(2): 427 - 434.
 61. Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. Food Chemistry. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg; 2009. 217 p.
 62. Jinap S, Dimick PS. Acidic Characteristics of Fermented and Dried Cocoa Beans from Different Countries of Origin. *J Food Sci* **1990**, 55(2):547.
 63. Gu F, Tan L, Wu H, Fang Y, Xu F, Chu Z, Wang Q. Comparison of Cocoa Beans from China, Indonesia and Papua New Guinea. *Foods* **2013**, 2: 183 - 197.
 64. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* **1998**, 56(11): 317 - 333.
 65. Ziegler G, Biehl B. *Analysis of Cocoa Flavour Components and Flavour Precursors* En: MODERN METHODS OF PLANT ANALYSIS, Linskens H, Jackson J, Eds. 1988, p. 321-93.
 66. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int* **2000**, 33: 423-447.
 67. Ortega N, Romero MP, MacIà A, Reguant J, Anglès N, Morelló JR, Motilva M. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *J Agric Food Chem* **2008**, 56: 9621 - 9627.
 68. Payne MJ, Hurst WJ, Miller KB, Rank C, Stuart D A. Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *J Agric Food Chem* **2010**, 58:10518 - 10527.
 69. Elwers S, Zambrano A, Rohsius C, Lieberei R. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao L.*). *Eur Food Res Technol* **2009**, 229: 937 - 948.
 70. Stark T, Bareuther S, Hofmann T. Molecular definition of the taste of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) by means of quantitative studies and sensory experiments. *J Agric Food Chem*. **2006**, 54:5530-5539.
 71. Timbie DJ, Sechrist L, Keeney PG. Application of High-Pressure Liquid Chromatography To the Study of Variables Affecting Theobromine and Caffeine Concentrations in Cocoa Beans. *J Food Sci* **1978**, 43(2): 560 - 565.
 72. Marx F, Maia JGS. Purine alkaloids in seeds of *Theobroma* species from the Amazon. *Z Lebensm Unters Forsch* **1991**, 193:460-461.
 73. Amores F, Butler D, Ramos G, Sukha D, Espin S, Gomez A, Zambrano A, Holliwood N, van Loo R, Seguíne E. Project to determine the physical, chemical and organoleptic

- parameters to differentiate between fine and bulk cocoa. http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/doc_download/198-the-difference-between-fine-and-bulk-cocoa.html (Consultado en enero del 2016).
74. Rivera R, Mencías F, Guzmán Á, Peña M, Medina H, Cassanova L, Barrera A, Nivelá P. Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao L.*) tipo nacional. *Cienc y Tecnol* **2012**, 5: 7 - 12.
 75. Álvarez C, Pérez E, Cros E, Lares M, Assemat S, Boulanger R, Davrieux F. The use of near infrared spectroscopy to determine the fat, caffeine, theobromine and (-)-epicatechin contents in unfermented and sun-dried beans of Criollo cocoa. *J Near Infrared Spectrosc* **2012**, 20: 307 - 315.
 76. German Cocoa and Chocolate Foundation. Cocoa Atlas <http://www.thecocoa-atlas.eu/download/index.html> (Consultada en Septiembre 2015).
 77. Richards A, Wailes B. Estimation of Fat-Free Cocoa Solids in Chocolate and Cocoa Products – Global Survey of Typical Concentrations of Theobromine and Caffeine Determined by HPLC Method Development and Ring Trial Survey of Theobromine and Caffeine Concentrations. *J Assoc Public Anal* **2012**, 40:1-12.
 78. Dóka O, Bicanic D, Kulcsár R. Direct Estimate of Cocoa Powder Content in Cakes by Colorimetry and Photoacoustic Spectroscopy. *Int J Thermophys* **2014**, 35(12): 2206 - 2214.
 79. Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Gačina T, Horžić D, Franekić J, Komes D. Comparative study of cytotoxic and cytoprotective activities of cocoa products affected by their cocoa solids content and bioactive composition. *Eur Food Res Technol* **2012**, 234(1): 173 - 186.
 80. Directive 2000/36/EC of the European Parliament and of the Council of 23 June 2000 relating to cocoa and chocolate products intended for human consumption. Off J Eur Communities. 2000; L197:19 - 25.
 81. Bailey AE. *Composición y características*, En: ACEITES Y GRASAS INDUSTRIALES, Ed. Reverte, 1984, p. 114-115.
 82. Beckett.T.Stephen. *Cocoa Bean Processing*, En: THE SCIENCE OF CHOCOLATE, The Royal Society of Chemistry, 2008, p. 104-124.
 83. Liendo R, Padilla FC, Quintana A. Characterization of cocoa butter extracted from hybrid cultivars of *Theobroma cacao L.* *Arch Latinoam Nutr* **1997**, 30(9): 727 - 731.
 84. Lipp M, Anklam E. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate—Part B. Analytical approaches for identification and determination. *Food Chem* **1998**, 62(1): 99 - 108.
 85. Lehrian DW, Keeney PG, Butler DR. Triglyceride characteristics of cocoa butter from cacao fruit matured in a microclimate of elevated temperature1. *J Am Oil Chem Soc* **1980**, 57(2): 66 - 69.
 86. Lannes BSCS, Medeiros ML, Gioielli L A, Prof A, Prestes L, Paulo-sp S. Physical interactions between cupuassu and cocoa fats. *Grasas Y Aceites* **2003**, 54:253 - 258.
 87. Chaiseri S, Dimick PS. Lipid and hardness characteristics of cocoa butters from different geographic regions. *J Am Oil Chem Soc* **1989**, 66(12): 1771 - 1776.
 88. Heather W, Vishak S, S AK. A new Proposal: Calculating Density Factors for Drugs Using Cocoa Butter as the Standard. *Int J Pharm Compd* **2011**, 15(6): 3398.
 89. Torres-Moreno M, Torrescasana E, Salas-Salvadó J, Blanch C. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chem* **2015**, 166: 125 - 132.
 90. ElKhorí S, Paré JRJ, Bélanger JMR, Pérez E. The microwave-assisted process (MAPTM1): Extraction and determination of fat from cocoa powder and cocoa nibs. *J Food Eng* **2007**, 79: 1110 - 1114.
 91. Ribeiro A. PB, Corrêa Basso R, Gonçalves L A. G, Gioielli L a., Oliveira dos Santos A., Pavie Cardoso L, Guenter Kieckbusch T. Physicochemical properties of Brazilian cocoa butter and industrial blends. Part II Microstructure, polymorphic behavior and crystallization

- characteristics. *Grasas y Aceites* **2012**, 63(1): 89 - 99.
92. Kurosawa T, Itoh F, Nozaki A, Nakano Y, Katsuda S-I, Osakabe N, Tsubone H, Kondo K, Itakura H. Suppressive effect of cocoa powder on atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *J Atheroscler Thromb* **2005**,12(1): 20 - 28.
 93. Mellor DD, Sathyapalan T, Kilpatrick ES, Beckett S, Atkin SL. High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients. *Diabet Med* **2010**, 27(11):1318 - 1321.
 94. Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis M a., Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann N, Sinclair A. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr* **2003**, 77(6):1466 - 1473.
 95. Neukam K, Stahl W, Tronnier H, Sies H, Heinrich U. Consumption of flavanol-rich cocoa acutely increases microcirculation in human skin. *Eur J Nutr* **2007**, 46(1): 53 - 56.
 96. Ramljak D, Romanczyk LJ, Metheny-Barlow LJ, Thompson N, Knezevic V, Galperin M, Ramesh A, Dickson R. Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2005**, 4(4): 537 - 546.
 97. Tomaru M, Takano H, Osakabe N, Yasuda A, Inoue KI, Yanagisawa R, Ohwatari T, Uematsu H. Dietary supplementation with cacao liquor proanthocyanidins prevents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. *Nutrition* **2007**, 23(4): 351 - 355.
 98. Hatano T, Miyatake H, Natsume M, Osakabe N, Takizawa T, Ito H, Yoshida T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry* **2002**, 59(7): 749 - 758.
 99. Mitani H, Ryu A, Suzuki T, Yamashita M, Arakane K, Koide C. Topical application of plant extracts containing xanthine derivatives can prevent UV-induced wrinkle formation in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **2007**, 23(2-3): 86 - 94.
 100. Mastroiacovo D, Kwik-uribe C, Grassi D, Necozone S, Raffaele A, Pistacchio L, Righetti R, Bocale R, Lechiara M, Marini C, Ferri C, Desideri G.. Cocoa flavanol consumption improves cognitive function, blood pressure control, and metabolic profile in elderly subjects : the Cocoa, Cognition, and Aging (Cocoa) Study — a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* **2014**,101(3):538 - 548.
 101. Henderson JW, Majors RE. High Throughput Separation of Xanthines by Rapid Resolution HPLC. Application Note <http://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-4857EN.pdf> (Consultada en Septiembre 2015).
 102. Mitchell ES, Slettenaar M, vd Meer N, Transler C, Jans L, Quadt F, Berry M. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. *Physiol Behav* **2011**, 104(5): 816 - 822.
 103. Anderson K. Theobromine for Tooth Decay Prevention. *Cosmet Toilet Mag* **2012**, 4: 1 - 2.
 104. Volkow ND, Wang G-J, Logan J, Alexoff D, Fowler JS, Thanos PK, Wong C, Casado V, Ferre S y Tomasi D. Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. *Transl Psychiatry* **2015**, 5(4): e549.
 105. Thijssen M a, Mensink RP. Small differences in the effects of stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on the serum lipoprotein profile of humans. *Am J Clin Nutr* **2005**, 82(3): 510 - 516.
 106. Solfrizzi V, Colacicco AM, D’Introno A, Capurso C, Torres F, Rizzo C, Capurso A, Panza F. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: A 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiol Aging* **2006**, 27(11): 1694 - 1704.
 107. Jiang R, Manson JE, Stampfer MJ, Liu S, Willett WC, Hu FB. Nut and peanut butter consumption and risk of type 2 diabetes in women. *JAMA* **2002**, 288(20): 2554 - 2560.
 108. García-Lorda P, Megias Rangil I, Salas-Salvadó J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur J Clin Nutr* **2003**, 57 Suppl: S8-S11.
 109. Caligiani A, Palla L, Acquotti D, Marseglia A, Palla G. Application of ¹H NMR for the

- characterisation of cocoa beans of different geographical origins and fermentation levels. *Food Chem* **2014**, 157: 94-99.
110. Holm CS, Astong JW, Douglas K. The effects of the organic acids in cocoa on the flavor of chocolate. *J Sci Food Agric* **1993**, 61: 65 - 71.
 111. Tomlins KI, Baker DM, McDowell IJ. HPLC method for the analysis of organic acids, sugars, and alcohol in extracts of fermenting cocoa beans. *Chromatographia* **1990**, 29(11): 557-561.
 112. Li Y, Feng Y, Zhu S, Luo C, Ma J, Zhong F. The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *J Food Compos Anal* **2012**, 25(1): 17 - 23.
 113. Luna F, Crouzillat D, Cirou L, Bucheli P. Chemical Composition and Flavor of Ecuadorian Cocoa Liquor. *J Agric Food Chem* **2002**, 50: 3527 - 3532.
 114. Reineccius G, Andersen D, Kavanagh T, Keeney P. Identification and Quantification of the Free Sugars in Cocoa Beans. *Agric food Chem* **1972**, 20(2): 199 - 202.
 115. Krämer A, Engel A, Kadow D, Ali N, Umaharan P, Kroh LW, Ali N, Umaharan P. Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chem* **2015**, 181: 152 - 159.
 116. Figueiredo IM, Pereira NR, Efraim P, García NHP, Rodrigues NR, Marsaioli A, Marsaioli A. ¹H NMR, a rapid method to monitor organic acids during cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Spreng) processing. *J Agric Food Chem* **2006**, 54: 4102 - 4106.
 117. Natsume M, Osakabe N, Yamagishi M, Takizawa T, Nakamura T, Miyatake H, Hatano T, Yoshida T. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2000**. 2581-2587.
 118. Radojic Redovnikovic I, Delonga K, Mazor S, Dragovic-Uzelac V, Caric M, Vorkapic-Furac J. Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech J Food Sci* **2009**, 27(5): 330 - 337.
 119. Alemanno L, Ramos T, Gargadene a., Andary C, Ferriere N. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Ann Bot* **2003**, 92: 613 - 623.
 120. Counet C, Collin S. Effect of the Number of Flavanol Units on the Antioxidant Activity of Procyanidin Fractions Isolated from Chocolate. *J Agric Food Chem* **2003**, 51: 6816 - 6822.
 121. Hu S, Kim B-Y, Baik M-Y. Physicochemical properties and antioxidant capacity of raw, roasted and puffed cacao beans. *Food Chem* **2016**, 194:1089 - 1094.
 122. Miller KB, Stuart D a., Smith NL, Lee CY, Mchale NL, Flanagan J A,. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *J Agric Food Chem* **2006**, 54: 4062 - 4068.
 123. Kelm M, Johnson JC, Robbins RJ, Hammerstone JF, Schmitz HH. High-Performance Liquid Chromatography Separation and Purification of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Procyanidins According to Degree of Polymerization Using a Diol Stationary Phase. *J Agric Food Chem* **2006**, 54: 1571 - 1576.
 124. Robbins RJ, Leonczak J, Johnson JC, Li J, Kwik-Urbe C, Prior RL, Gu L. Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography-fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. *J Chromatogr A* **2009**, 1216: 4831 - 4840.
 125. Sánchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Casals I, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventós RM. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J Mass Spectrom* **2003**, 38: 35 - 42.
 126. Nelson BC, Sharpless KE. Quantification of the predominant monomeric catechins in baking

- chocolate standard reference material by LC/APCI-MS. *J Agric Food Che* **2003**,51: 531 - 537.
127. Ortega N, Romero MP, Macià A, Reguant J, Anglès N, Morelló JR, Motilva MJ. Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *J Food Compos Anal* **2010**, 23: 298 - 305.
 128. Patras M A., Milev BP, Vrancken G, Kuhnert N. Identification of novel cocoa flavonoids from raw fermented cocoa beans by HPLC-MSⁿ. *Food Res Int* **2014**, 63(C): 353 - 359.
 129. Hue C, Brat P, Gunata Z, Samaniego I, Servent A, Morel G, et al. Near Infra-red Characterization of Changes in Flavan-3-ol Derivatives in Cocoa (*Theobroma cacao L.*) as a Function of Fermentation Temperature. *J Agric Food Chem* **2014**, 62(62): 10136 - 10142.
 130. AOAC Official Method 980.14. Theobromine and caffeine in cacao products. Liquid Chromatography method, 31.5. En: Gaithersburg M, editor. 17 th. 2000. p. 1-8.
 131. Bispo MS, Veloso MCC, Pinheiro HLC, De Oliveira RFS, Reis JON, De Andrade JB. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* **2002**, 40(1): 45 - 48.
 132. Thomas JB, Yen JH, Schantz MM, Porter BJ, Sharpless KE. Determination of caffeine, theobromine, and theophylline in standard reference material 2384, baking chocolate, using reversed-phase liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* **2004**, 52: 3259 - 3263.
 133. Kenyhercz T, Kissinger P. Determination of selected acidic , neutral , and basic natural products in cacao beans and processed cocoa. Liquid chromatography with electrochemical detection. *Lloydia* **1978**, 41(2): 130 - 139.
 134. Li S, Berger J, Hartland S. UV spectrophotometric determination of theobromine and caffeine in cocoa beans. *Anal Chim Acta* **1990**, 232: 409 - 412.
 135. Huck CW, Guggenbichler W, Bonn GK. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **2005**, 538(1-2): 195 - 203.
 136. Xia Z, Ni Y, Kokot S. Simultaneous determination of caffeine, theophylline and theobromine in food samples by a kinetic spectrophotometric method. *Food Chem* **2013**, 141(4): 4087 - 4093.
 137. Żyżelewicz D, Budryn G, Krysiak W, Oracz J, Nebesny E, Bojczuk M. Influence of roasting conditions on fatty acid composition and oxidative changes of cocoa butter extracted from cocoa bean of Forastero variety cultivated in Togo. *Food Res Int* **2014**, 63: 328 - 343.
 138. Perret D, Gentili A, Marchese S, Sergi M, Caporossi L. Determination of free fatty acids in chocolate by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, 18(17): 1989 - 1994.
 139. ISO. ISO 12966-1:2014. Animal and vegetable fats and oils -- Gas chromatography of fatty acid methyl esters -- Part 1 : Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters. Second edi Geneva Switz 2014.
 140. Catharino RR, Haddad R, Cabrini LG, Cunha IBS, Sawaya ACHF, Eberlin MN. Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: Classification, quality, adulteration, and aging. *Anal Chem* **2005**, 77(22): 7429 - 7433.
 141. Eide I, Zahlsten K. Chemical fingerprinting of biodiesel using electrospray mass spectrometry and chemometrics: Characterization, discrimination, identification, and quantification in petrodiesel. *Energy and Fuels* **2007**, 21(9): 3702 - 3708.
 142. Eide I, Neverdal G, Westad F. Detection of 5 ppm fatty acid methyl ester (FAME) in jet fuel using electrospray ionization mass spectrometry and chemometrics. *Energy and Fuels* **2010**, 24:3661 - 3664.
 143. Kurata S, Yamaguchi K, Nagai M. Rapid discrimination of fatty acid composition in fats and oils by electrospray ionization mass spectrometry *Anal Sci.* **2005**, 21(December):1457 -

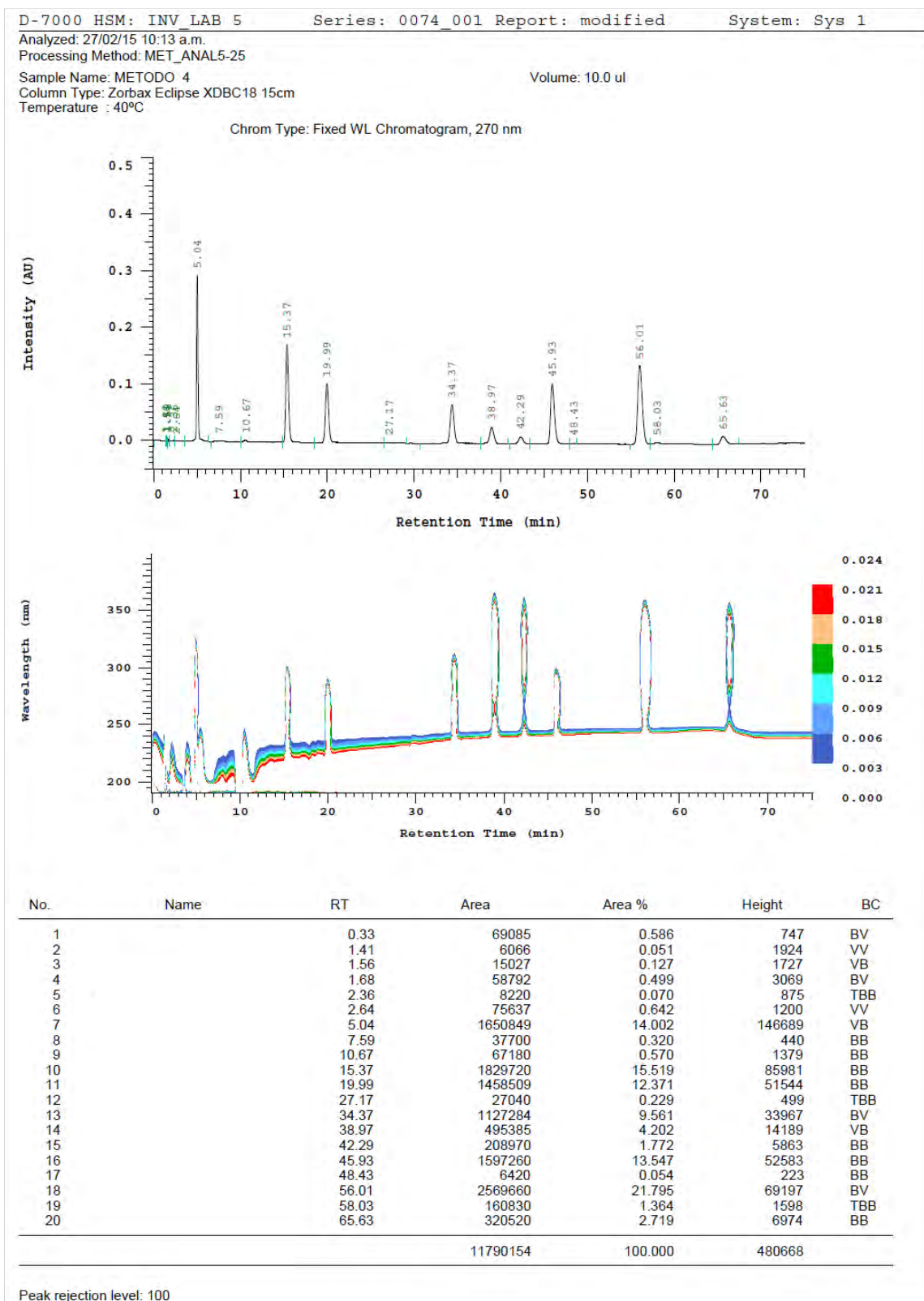
- 1465.
144. Crowther MW. NMR and IR Spectroscopy for the Structural Characterization of Edible Fats and Oils. An Instrumental Analysis Laboratory. *J Chem Educ* **2008**, 85(11): 1550 - 1554.
 145. Hartel AM, Moore AC. Extraction and ¹H NMR Analysis of Fats from Convenience Foods: Laboratory Experiment for Organic Chemistry. *J Chem Educ* **2014**, 91(10): 1702 - 1705.
 146. Knothe G, Kenar J a. Determination of the fatty acid profile by ¹H-NMR spectroscopy. *Eur J Lipid Sci Technol* **2004**, 106: 88 - 96.
 147. Knothe G, Bagby MO, Weisleder D. Evaluation of the olefinic proton signals in the ¹H-NMR spectra of allylic hydroxy groups in long-chain compounds. *Chem Phys Lipids* **1996**, 82(1): 33 - 37.
 148. Sopelana P, Ibargoitia ML, Guillén MD. Influence of fat and phytosterols concentration in margarines on their degradation at high temperature . A study by ¹H Nuclear Magnetic Resonance. *Food Chem* **2016**, 197: 1256 - 1263.
 149. Fang G, Goh JY, Tay M, Lau HF, Li SFY. Characterization of oils and fats by ¹H NMR and GC/MS fingerprinting: Classification, prediction and detection of adulteration. *Food Chem* **2013**, 138(2-3): 1461 - 1469.
 150. Maruenda H, González A, Nieva A, Leyva V, Cañari C, Gant A, Zevallos J, Flores N. Perfil químico de café y cacao peruano mediante análisis multivariable por resonancia magnética y espectroscopía de masas. Perfil químico de café y cacao peruano mediante análisis multivariable por resonancia magnética y espectroscopía de masas. Mes de la Investigación. Lima; 2015. Presentación de Poster.
 151. Martínez-Yusta A, Goicoechea E, Guillén MD. A Review of Thermo-Oxidative Degradation of Food Lipids Studied by ¹ H NMR Spectroscopy: Influence of Degradative Conditions and Food Lipid Nature. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2014**, 13(5): 838 - 859.
 152. Knapp A, McLellan B. The estimation of cacao shell. *Analyst* **1919**, 44(514): 2 - 22.
 153. Elwers S, Zambrano A, Rohsius C, Lieberei R. Histological features of phenolic compounds in fine and bulk cocoa seed (*Theobroma cacao L.*). *J Appl Bot Food Qual* **2010**, 83: 182 - 188.
 154. Machonis PR, Jones M a., Schaneberg BT, Kwik-Urbe CL. Method for the Determination of Catechin and Epicatechin Enantiomers in Cocoa-Based Ingredients and Products by High-Performance Liquid Chromatography: Single-Laboratory Validation. *J AOAC Int* **2012**, 95(10): 500 - 507.
 155. Edwards HGM, Villar SEJ, De Oliveira LFC, Le Hyaric M. Analytical Raman spectroscopic study of cacao seeds and their chemical extracts. *Anal Chim Acta* **2005**, 538(1-2): 175 - 180.
 156. Conkerton EJ, Wan PJ, Richard O a. Hexane and heptane as extraction solvents for cottonseed: a laboratory-scale study. *J Am Oil Chem Soc* **1995**, 72(8): 963 - 965.
 157. Johnson L a., Lusas EW. Comparison of alternative solvents for oils extraction. *J Am Oil Chem Soc* **1983**, 60(2): 229 - 242.
 158. Slavica Mazor Jolic, Ivana Radojic Redovnikovic, Ksenija Markovic, Durdica Ivanec Sipusic, Karmela Delonga. Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *Int J Food Sci Technol* **2011**, 46:1793 - 1800.
 159. Belščak A, Komes D, Horžić D, Ganić KK, Karlović D. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Res Int* **2009**, 42: 707 - 716.
 160. Kirkland JJ, Henderson JW, Destefano J., Van Straten M a., Claessens H a. Stability of silica-based , endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1997**;762:97 - 112.
 161. Cádiz-Gurrea MDLL, Lozano-Sánchez J, Contreras-Gámez MDM, Legeai-Mallet L, Fernández-Arroyo S, Segura-Carretero A. Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of *Theobroma cacao* extract. *J Funct Foods* **2014**;10: 485 - 498.
 162. Counet C, Ouwerx C, Rosoux D, Collin S. Relationship between procyanidin and flavor

- contents of cocoa liquors from different origins. *J Agric Food Chem* **2004**, 52: 6243 - 6249.
163. Hurst J, Krake S, Bergmeier S, Payne MJ, Miller KB, Rank C, Stuart D. Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *J Chemistry Central* **2011**, 53(5): 10518 - 10527.
 164. Jinap S, Dimick PS, Hollender R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control* **1995**, 6(2):105 - 110.
 165. Goodacre R, Vaidyanathan S, Bianchi G, Kell DB. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils. *Analyst* **2002**, 127:1457 - 1462.
 166. Kerwin JL, Torvik JJ. Identification of monohydroxy fatty acids by electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **1996**, 237(1): 56 - 64.
 167. Villalobos Solis MI, Patel A, Orsat V, Singh J, Lefsrud M. Fatty acid profiling of the seed oils of some varieties of field peas (*Pisum sativum*) by RP-LC/ESI-MS/MS: towards the development of an oilseed pea. *Food Chem* **2013**, 139(1-4): 986 - 993.
 168. Gilbert-Escrivá MV, Gonçalves a L a G, Silva CRS, Figueira A. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. *J Sci Food Agric* **2002**, 82:1425-1431.
 169. Lipp M, Simoneau C, Ulberth F, Anklam E, Crews C, Brereton P, de Greyt W, Schwack W, Wiedmaier Composition of Genuine Cocoa Butter and Cocoa Butter Equivalents. *J Food Compos Anal* **2001**, 14: 399 - 408.
 170. Asep EK, Jinap S, Tan TJ, Russly A. R, Harcharan S, Nazimah S A H. The effects of particle size, fermentation and roasting of cocoa nibs on supercritical fluid extraction of cocoa butter. *J Food Eng* **2008**, 85: 450 - 458.
 171. Bruni R, Bianchini E, Bettarello L, Sacchetti G. Lipid composition of wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* Mart. seeds and comparison with two varieties of *Theobroma cacao* L. *J Agric Food Chem* **2000**, 48: 691 - 694.
 172. Bruni R, Medici A., Guerrini A., Scalia S, Poli F, Romagnoli C, Muzzoli M, Sacchetti G. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. *Food Chem* **2002**, 77: 337 - 341.
 173. Tucci MLS. Composición de Ácidos Grasos y Contenido de Manteca de Cacao de Frutos Producidos en Distintas Condiciones Climáticas. *Braz J Food Technol* **1999**, 2:103 - 110.
 174. Caligiani A, Acquotti D, Cirilini M, Palla G. ¹H NMR study of fermented cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *J Agric Food Chem* **2010**, 58:12105-12011.

7. ANEXOS



A. 1 Cromatograma HPLC-DAD 70 min, equipo Hitachi, de estándares.

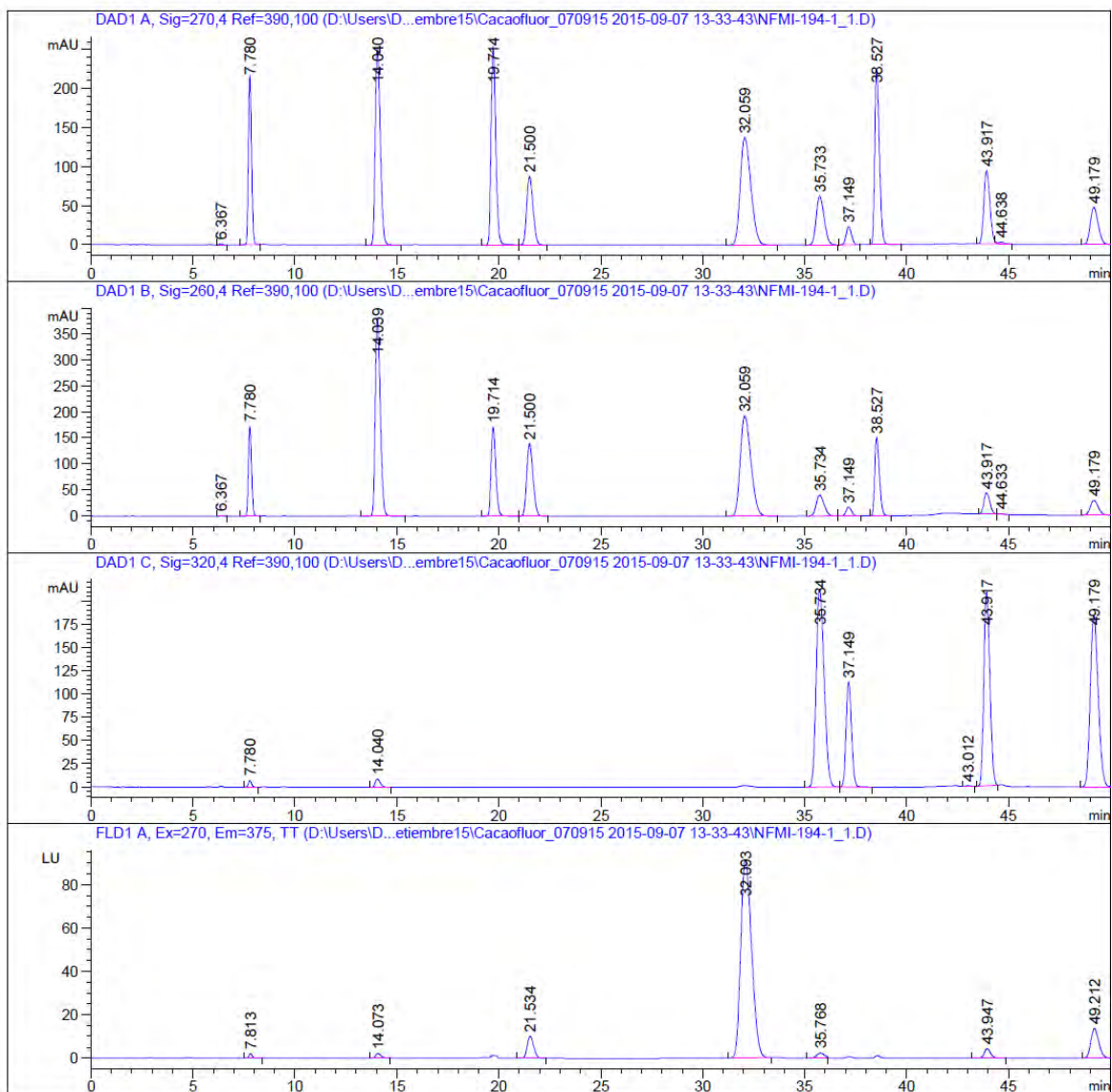


A. 2 Cromatograma HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de estándares.

Data File D:\Users\D...\09Setiembre15\Cacaofluor_070915 2015-09-07 13-33-43\NFMI-194-1_1.D
 Sample Name: NFMI-194-1

```

=====
Acq. Operator   : Ana Gonzalez           Seq. Line :    4
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD FLD      Location  :    1
Injection Date  : 9/7/2015 2:52:01 PM   Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.0 µl
Method          : D:\Users\Data\NIEVESF\09Setiembre15\Cacaofluor_070915 2015-09-07 13-33-43
                  \cacaofluor070915.M (Sequence Method)
Last changed    : 9/7/2015 1:33:43 PM by Ana Gonzalez
Method Info     : Método cacao: Metilxantinas y Ácidos fénolicos con timetable FLD
  
```



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=390,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.367	BB	0.1525	9.94987	1.01346	0.0373
2	7.780	BB	0.1673	2342.87793	218.13350	8.7899
3	14.040	BB	0.2706	4350.04102	253.00432	16.3203
4	19.714	BB	0.2506	4072.47754	254.57565	15.2790
5	21.500	BB	0.3386	1890.01062	87.99143	7.0909
6	32.059	BB	0.5731	5015.04688	137.64665	18.8153
7	35.733	BB	0.4259	1691.52869	62.46645	6.3462
8	37.149	BB	0.2915	429.07742	23.23237	1.6098
9	38.527	BB	0.2504	3578.93286	223.96889	13.4273
10	43.917	BV R	0.3230	1938.46594	93.85748	7.2727
11	44.638	VB E	0.3121	45.71420	2.22111	0.1715
12	49.179	BBA	0.4211	1289.98950	47.76432	4.8397

Totals : 2.66541e4 1405.87564

Signal 2: DAD1 B, Sig=260,4 Ref=390,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.367	BB	0.1570	10.48641	1.06371	0.0394
2	7.780	BB	0.1673	1861.47864	173.27882	6.9954
3	14.039	BB	0.2707	6574.54492	382.17224	24.7068
4	19.714	BB	0.2506	2745.93359	171.66534	10.3191
5	21.500	BB	0.3367	2993.54956	139.31828	11.2496
6	32.059	BB	0.5729	7028.95264	192.99187	26.4145
7	35.734	BB	0.4240	1077.85657	39.79658	4.0505
8	37.149	BB	0.2892	306.13599	16.59747	1.1504
9	38.527	BB	0.2501	2400.60034	150.47780	9.0213
10	43.917	BB	0.3182	824.70740	40.73435	3.0992
11	44.633	BB	0.2732	19.81459	1.11548	0.0745
12	49.179	BBA	0.4189	766.16785	28.38378	2.8792

Totals : 2.66102e4 1337.59571

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=390,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.780	BB	0.1677	77.85263	7.22485	0.4481
2	14.040	BB	0.2688	154.38214	8.97039	0.8887
3	35.734	BB	0.4261	5779.88428	213.32265	33.2712
4	37.149	BB	0.2906	2100.83057	113.15755	12.0932
5	43.012	BB	0.2217	14.85195	1.04560	0.0855
6	43.917	BB	0.3208	4273.23096	208.79433	24.5983
7	49.179	BBA	0.4231	4970.99609	184.07616	28.6149

Totals : 1.73720e4 736.59152

Signal 4: FLD1 A, Ex=270, Em=375, TT

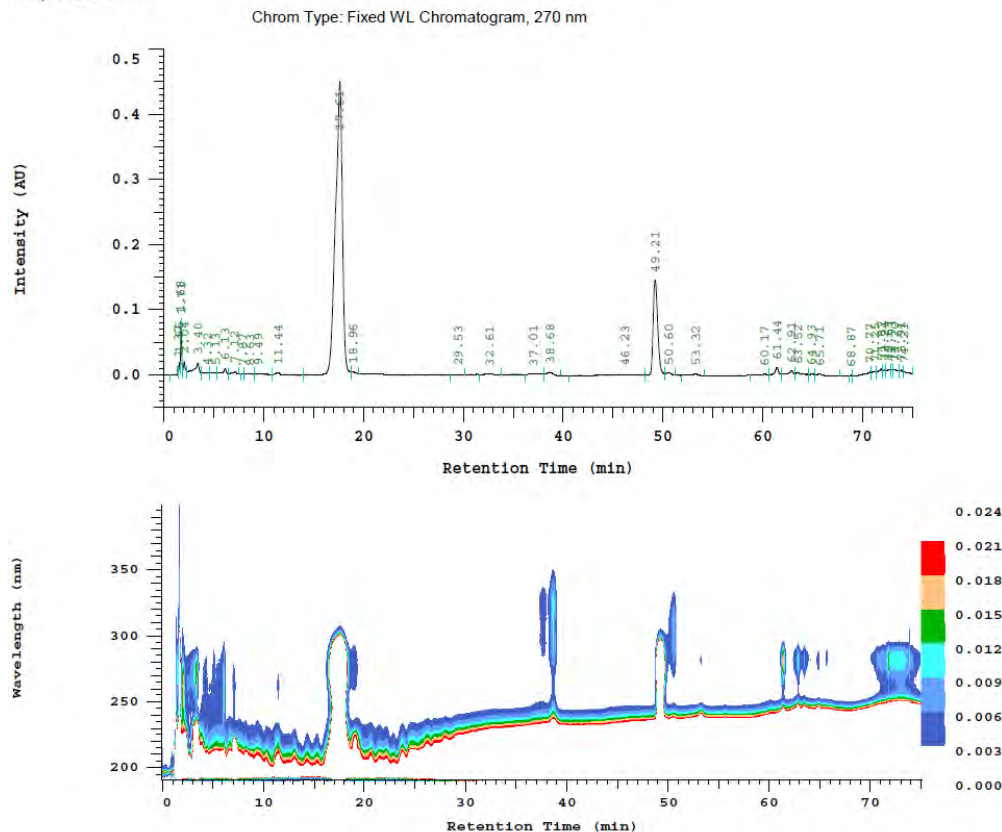
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU*s	Height [LU]	Area %
1	7.813	BB	0.1797	22.68787	1.96999	0.5439
2	14.073	BB	0.2765	36.78041	2.09132	0.8818
3	21.534	BB	0.3441	221.10988	10.09299	5.3010
4	32.093	BB	0.5789	3374.45630	91.12769	80.9003
5	35.768	BB	0.4137	60.16576	2.29600	1.4424
6	43.947	BB	0.3300	91.37862	4.29981	2.1907
7	49.212	BBA	0.4240	364.55133	13.46040	8.7399

Totals : 4171.13017 125.33820

=====
 *** End of Report ***

A. 3 Cromatograma mediante HPLC-DAD 70 min, equipo Hitachi, de un extracto metanólico de cacao representativo.

D-7000 HSM: INV LAB 5 Series: 0082 Report: modified System: Sys 1
 Analyzed: 02/03/15 11:52 a.m.
 Processing Method: MET_ANAL5-40_1
 Sample Name: METODO2 Volume: 10.0 ul
 Column Type: Zorbax Eclipse XDBC18 15cm
 Temperature : 40°C



No.	Name	RT	Area	Area %	Height	BC
1		1.37	28451	0.174	7311	BV
2		1.55	52417	0.320	9716	VV
3		1.68	115594	0.705	41025	VV
4		1.71	532416	3.248	40072	VV
5		2.04	86370	0.405	7260	TBB
6		3.40	201680	1.230	7536	TBB
7		4.32	18991	0.116	771	TBV
8		5.13	19944	0.122	750	TVV
9		6.13	86384	0.527	3953	TVB
10		7.12	36889	0.225	1629	TBB
11		7.87	1560	0.010	143	BB
12		8.63	11280	0.069	395	BB
13		9.49	13780	0.084	417	BB
14		11.44	52490	0.320	1441	BB
15		17.61	10920039	66.615	225388	BV
16		18.96	15590	0.095	560	TBB
17		29.53	13980	0.085	343	BB
18		32.61	9640	0.059	285	BB
19		37.01	54374	0.332	716	BV
20		38.68	89555	0.546	2313	VB
21		46.23	211767	1.292	858	BV
22		49.21	2427712	14.810	73590	VV
23		50.60	32840	0.200	1315	TBB
24		53.32	52480	0.320	1149	TBB
25		60.17	44760	0.273	758	BV
26		61.44	155206	0.947	5996	VV
27		62.91	139319	0.850	3905	VV
28		63.52	125853	0.768	2571	VV
29		64.93	43190	0.263	1624	VV
30		65.71	93579	0.571	1433	VB
31		68.87	7016	0.043	495	BB
32		70.77	83868	0.512	2285	BV
33		71.25	78717	0.480	2731	VV

D-7000 HSM: INV_LAB 5		Series: 0082	Report: modified	System: Sys 1	
34	71.87	116097	0.708	4524	VV
35	72.24	62334	0.380	3544	VV
36	72.67	99501	0.607	3752	VV
37	72.93	48112	0.293	3745	VV
38	73.20	111299	0.679	3412	VV
39	73.91	65592	0.400	3210	VV
40	74.21	52169	0.318	2044	VB
			16392835	100.000	474965

Peak rejection level: 100

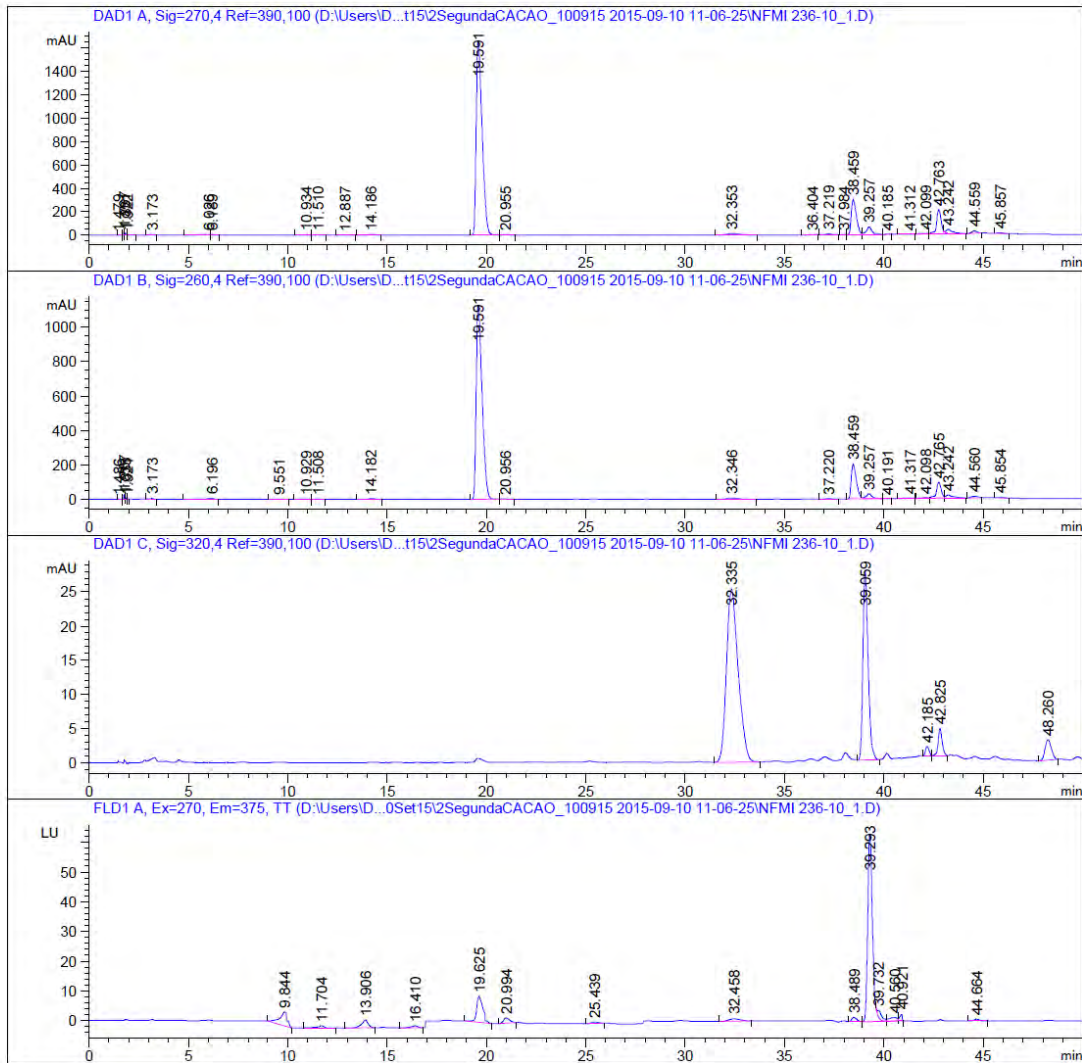


A. 4 Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M3).

Data File D:\Users\D...SF\10Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-10_1.D
 Sample Name: NFMI 236-10

```

=====
Acq. Operator   : Ana Gonzalez           Seq. Line :    3
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD FLD      Location  :    1
Injection Date  : 9/10/2015 12:33:07 PM Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.0 µl
Method         : D:\Users\Data\NIEVESF\10Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25
                                           \2cacaoofluor070915.M (Sequence Method)
Last changed   : 9/10/2015 11:06:25 AM by Ana Gonzalez
Method Info    : Método cacao: Metilxantinas y Ácidos fenólicos con timetable FLD
    
```



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=390,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.479	BB	0.0900	8.02988	1.37769	0.0171
2	1.767	BV	0.0439	70.96767	25.95444	0.1507
3	1.831	VV	0.0534	52.28984	14.06327	0.1111
4	1.922	VB	0.0818	29.64649	4.95294	0.0630
5	3.173	BB	0.1576	48.57855	4.44185	0.1032
6	6.026	BV	0.4143	174.96754	5.31128	0.3716
7	6.189	VB	0.1620	63.45561	5.69549	0.1348
8	10.934	BB	0.2513	33.22108	1.86955	0.0706
9	11.510	BB	0.2652	35.58598	1.92878	0.0756
10	12.887	BB	0.3195	31.39567	1.43334	0.0667
11	14.186	BB	0.3829	79.29406	2.79583	0.1684
12	19.591	BB	0.3160	3.42571e4	1651.54956	72.7618
13	20.955	BB	0.3024	41.72153	2.09480	0.0886
14	32.353	BB	0.6221	506.80603	11.82223	1.0765
15	36.404	BB	0.2852	25.57343	1.33680	0.0543
16	37.219	BB	0.2861	149.14035	7.83375	0.3168
17	37.984	BV	0.2014	9.61905	7.71656e-1	0.0204
18	38.459	VV	0.2680	5308.71973	300.72058	11.2757
19	39.257	VB	0.2947	1310.01575	64.57445	2.7825
20	40.185	BB	0.1872	14.65664	1.22820	0.0311
21	41.312	BB	0.3889	75.69776	2.59026	0.1608
22	42.099	BB	0.3684	50.71759	1.88207	0.1077
23	42.763	BV R	0.2491	3298.55127	205.67822	7.0061
24	43.242	VB E	0.3368	884.14630	36.72911	1.8779
25	44.559	BB	0.3089	381.51553	19.61960	0.8103
26	45.857	BB	0.3491	139.78052	6.39344	0.2969

Totals : 4.70812e4 2384.64920

Signal 2: DAD1 B, Sig=260,4 Ref=390,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.486	BB	0.0887	10.57782	1.84881	0.0342
2	1.767	BV	0.0438	72.14404	26.42871	0.2334
3	1.833	VV	0.0562	38.01770	10.04368	0.1230
4	1.921	VB	0.0468	11.63772	3.89840	0.0377
5	3.173	BB	0.1627	63.88359	5.61511	0.2067
6	6.196	BB	0.4421	231.02893	6.57171	0.7475

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
7	9.551	BB	0.2920	31.82240	1.50898	0.1030
8	10.929	BB	0.2928	56.93915	2.67027	0.1842
9	11.508	BB	0.2469	25.84915	1.50098	0.0836
10	14.182	BB	0.3683	109.42641	4.03642	0.3540
11	19.591	BB	0.3152	2.31903e4	1121.57886	75.0299
12	20.956	BB	0.2945	28.69396	1.49138	0.0928
13	32.346	BB	0.6063	336.05215	8.06196	1.0873
14	37.220	BB	0.2813	68.18118	3.66141	0.2206
15	38.459	BV R	0.2691	3590.65747	202.25845	11.6172
16	39.257	VB E	0.3016	607.87286	28.87078	1.9667
17	40.191	BB	0.1944	13.96023	1.11226	0.0452
18	41.317	BB	0.3546	46.53512	1.79402	0.1506
19	42.098	BV E	0.3604	60.75957	2.32892	0.1966
20	42.765	VV R	0.2614	1569.94421	91.86401	5.0794
21	43.242	VB	0.3608	490.39807	18.77252	1.5866
22	44.560	BB	0.3111	186.43640	9.57975	0.6032
23	45.854	BB	0.3406	66.97149	3.06866	0.2167

Totals : 3.09081e4 1558.56606

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=390,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	32.335	BB	0.6181	1040.38550	25.38930	61.8614
2	39.059	BB	0.2715	503.65662	27.78500	29.9475
3	42.185	BB	0.1899	16.29372	1.35838	0.9688
4	42.825	BB	0.2085	55.33975	3.97355	3.2905
5	48.260	BB	0.3264	66.12534	3.00933	3.9318

Totals : 1681.80092 61.51556

Signal 4: FLD1 A, Ex=270, Em=375, TT

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU *s	Height [LU]	Area %
1	9.844	BB	0.3435	123.49730	4.69684	7.3887
2	11.704	BB	0.3494	20.42813	8.00839e-1	1.2222
3	13.906	BB	0.3208	59.99598	2.62343	3.5895
4	16.410	BB	0.3418	16.22725	6.57878e-1	0.9709
5	19.625	BB	0.3271	189.44142	8.64015	11.3340
6	20.994	BB	0.3259	38.64826	1.80141	2.3123
7	25.439	BB	0.3738	12.05056	5.08213e-1	0.7210
8	32.458	BB	0.5916	31.92745	8.13770e-1	1.9102
9	38.489	VB	0.2767	26.76862	1.52024	1.6015
10	39.293	BV R	0.2572	1048.12488	62.84555	62.7080
11	39.732	VV E	0.2478	38.74453	2.18618	2.3180
12	40.560	VV E	0.3773	34.74042	1.19781	2.0785

Data File D:\Users\D...SF\10Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-10_1.D
Sample Name: NFMI 236-10

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Area *s	Height [LU]	Area %
13	40.921	VB E	0.1267	20.53626		2.48272	1.2287
14	44.664	BB	0.2729	10.30608		5.89966e-1	0.6166

Totals : 1671.43713 91.36499

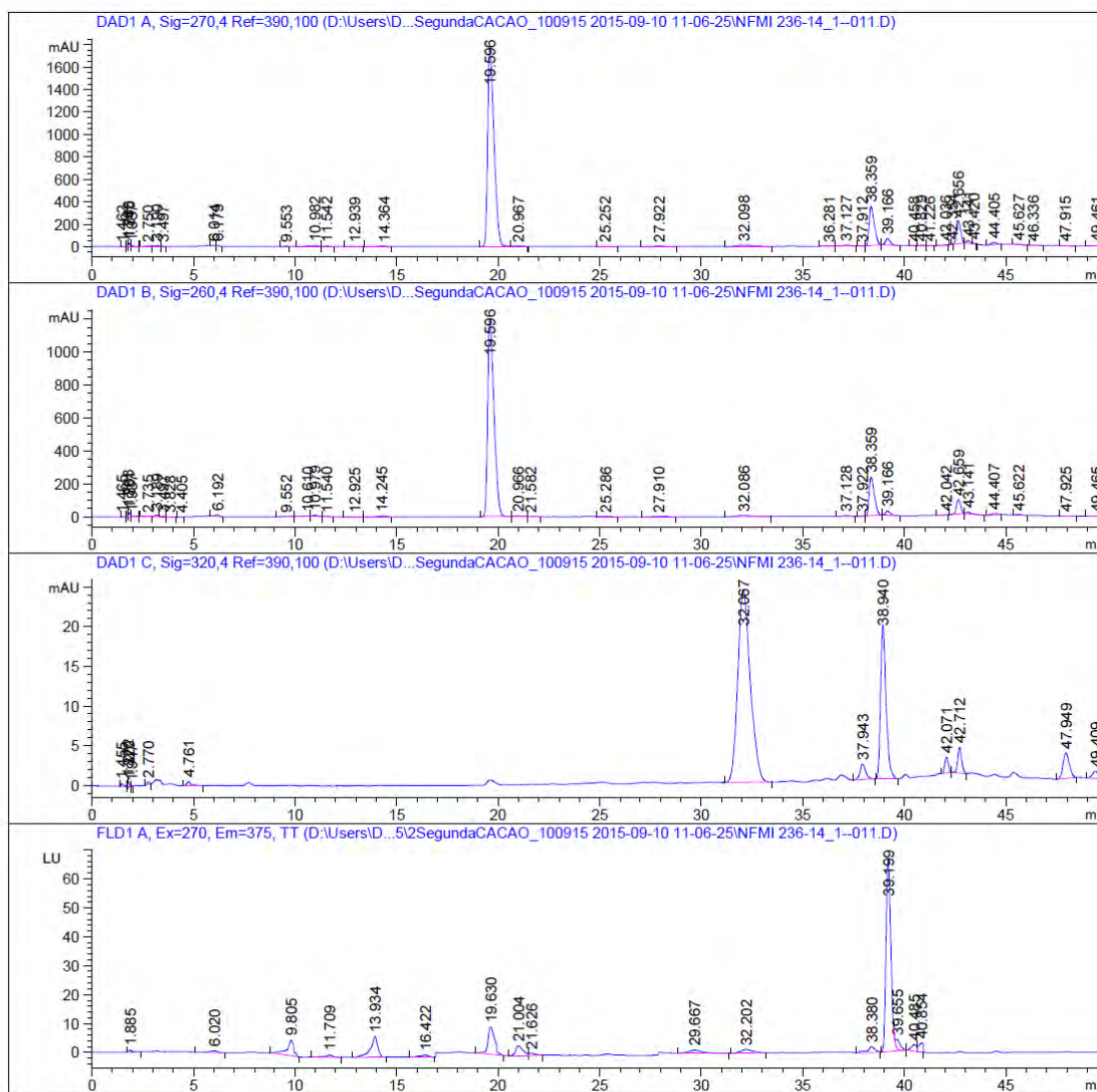
=====
*** End of Report ***

A.5 Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M4).

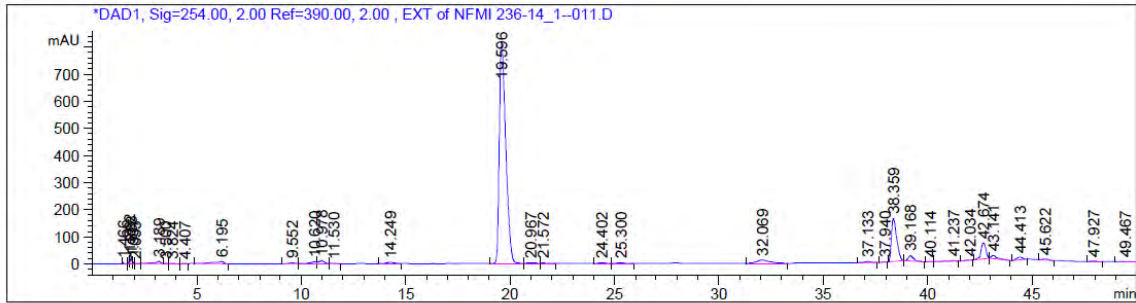
Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-14_1--011.D
 Sample Name: NFMI 236-14

```

=====
Acq. Operator   : Ana Gonzalez           Seq. Line : 11
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD FLD       Location  : 5
Injection Date  : 9/10/2015 6:18:42 PM    Inj       : 1
                                           Inj Volume: 10.0 µl
Acq. Method    : D:\Users\Data\NIEVESF\10Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25
                                           \2cacaofluor070915.M
Last changed   : 9/10/2015 11:06:25 AM by Ana Gonzalez
Analysis Method: D:\Users\Data\NIEVESF\10Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25
                                           \2cacaofluor070915.M (Sequence Method)
Last changed   : 9/17/2015 7:49:18 PM by Ana Gonzalez
                                           (modified after loading)
Method Info    : Método cacao: Metilxantinas y Ácidos fénolicos con timetable FLD
  
```



Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-14_1--011.D
 Sample Name: NFMI 236-14



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.462	BB	0.0765	11.31255	2.04757	0.0220
2	1.763	BV	0.0423	92.02107	33.22905	0.1792
3	1.840	VV	0.0714	154.19664	33.66523	0.3003
4	1.937	VB	0.0740	46.63804	8.77027	0.0908
5	2.750	BV E	0.2473	17.97076	1.02104	0.0350
6	3.190	VV R	0.2062	126.25074	8.35705	0.2458
7	3.497	VB	0.1265	15.89031	1.88254	0.0309
8	6.014	BV	0.1635	59.85475	5.30878	0.1166
9	6.179	VB	0.1450	60.21971	6.21745	0.1173
10	9.553	BB	0.1843	14.52646	1.26230	0.0283
11	10.982	BB	0.2886	137.55688	6.61389	0.2679
12	11.542	BB	0.2317	30.14336	1.91483	0.0587
13	12.939	BB	0.3159	30.70927	1.32723	0.0598
14	14.364	BB	0.4030	88.33621	2.88642	0.1720
15	19.596	BV R	0.3336	3.83243e4	1763.23962	74.6284
16	20.967	VB E	0.3230	82.36233	3.85839	0.1604
17	25.252	BB	0.3390	28.66745	1.02271	0.0558
18	27.922	BB	0.4887	74.54205	2.14906	0.1452
19	32.098	BB	0.6390	540.34436	12.19238	1.0522
20	36.281	BB	0.2950	27.63615	1.38390	0.0538
21	37.127	BB	0.3091	178.76649	8.58059	0.3481
22	37.912	BB	0.1942	12.33505	1.02611	0.0240
23	38.359	BB	0.2658	6157.66504	349.02106	11.9907
24	39.166	BB	0.2445	917.75421	56.79526	1.7871
25	40.458	BB	0.1543	6.93138	7.07775e-1	0.0135
26	40.829	BB	0.2043	24.66630	1.88919	0.0480
27	41.226	BB	0.2004	13.57176	1.08166	0.0264
28	42.036	BB	0.2654	49.61604	2.63778	0.0966
29	42.354	BV f	0.0867	5.77221	1.23143	0.0112

Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-14_1--011.D
 Sample Name: NFMI 236-14

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
30	42.656	BB	0.2443	3030.47412	200.59424	5.9012
31	43.141	BB	0.2244	338.83408	23.20306	0.6598
32	43.420	VV b	0.1049	6.36005	1.01827	0.0124
33	44.405	BB	0.3062	386.30582	20.09896	0.7522
34	45.627	BB	0.3285	128.78400	6.19592	0.2508
35	46.336	BB	0.3678	28.75605	1.16586	0.0560
36	47.915	BB	0.3203	33.52566	1.58799	0.0653
37	49.461	BBA	0.4593	69.90232	2.30813	0.1361

Totals : 5.13535e4 2577.49301

Signal 2: DAD1 B, Sig=260,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.465	BB	0.0781	15.11662	2.66979	0.0445
2	1.763	BV	0.0445	90.22009	32.42268	0.2658
3	1.851	VV	0.0781	119.15604	23.91569	0.3510
4	1.937	VB	0.0751	47.43062	8.77099	0.1397
5	2.735	BV E	0.2478	18.21476	1.04253	0.0537
6	3.189	VV R	0.2052	147.98683	9.85293	0.4360
7	3.497	VB E	0.1192	6.97881	8.92762e-1	0.0206
8	3.828	BB	0.1881	5.61600	4.42350e-1	0.0165
9	4.405	BB	0.1403	4.21839	4.62909e-1	0.0124
10	6.192	BB	0.2088	111.73115	7.54425	0.3291
11	9.552	BB	0.2545	53.99590	3.05102	0.1591
12	10.610	BV	0.2624	78.66547	4.28147	0.2317
13	10.979	VB	0.2408	148.72063	8.90541	0.4381
14	11.540	BB	0.2210	21.88911	1.49326	0.0645
15	12.925	BB	0.3445	26.19061	1.02373	0.0772
16	14.245	BB	0.3979	120.67852	4.09429	0.3555
17	19.596	BB	0.3301	2.59261e4	1199.57776	76.3749
18	20.966	BB	0.3039	49.37458	2.50532	0.1455
19	21.582	BB	0.2107	4.84753	3.35305e-1	0.0143
20	25.286	BB	0.3850	30.94025	1.11764	0.0911
21	27.910	BB	0.4400	47.55325	1.36658	0.1401
22	32.086	BB	0.6368	354.44220	8.19177	1.0441
23	37.128	BB	0.3023	80.34267	3.96657	0.2367
24	37.922	BB	0.1921	7.13182	5.93857e-1	0.0210
25	38.359	BB	0.2670	4174.52246	235.30789	12.2976
26	39.166	BB	0.2464	394.80313	24.18866	1.1630
27	42.042	BB	0.2663	25.91248	1.38466	0.0763
28	42.659	BB	0.2481	1342.89209	86.99498	3.9560
29	43.141	BB	0.2446	176.72482	10.82000	0.5206
30	44.407	BB	0.3046	187.70303	9.75155	0.5529
31	45.622	BB	0.3229	59.21326	2.89195	0.1744
32	47.925	BB	0.3159	24.49875	1.12552	0.0722
33	49.465	BBA	0.3737	42.00306	1.39332	0.1237

Totals : 3.39458e4 1702.37939

Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-14_1--011.D
 Sample Name: NFMI 236-14

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.455	BV	0.1144	3.54131	4.03576e-1	0.2192
2	1.772	VV	0.0437	2.16944	7.99022e-1	0.1343
3	1.820	VB	0.0616	2.44936	5.53719e-1	0.1516
4	1.947	BB	0.0373	5.41604e-1	2.50054e-1	0.0335
5	2.770	BB	0.1216	2.04844	2.66802e-1	0.1268
6	4.761	BB	0.2110	7.52287	4.84994e-1	0.4657
7	32.067	BB	0.6414	1036.80957	24.31821	64.1860
8	37.943	BB	0.2763	38.10415	1.92994	2.3589
9	38.940	BB	0.2799	361.52402	19.35298	22.3810
10	42.071	BB	0.1903	24.99142	2.02113	1.5472
11	42.712	BB	0.2052	44.35978	3.25055	2.7462
12	47.949	BB	0.3174	69.14172	3.20858	4.2804
13	49.409	BBA	0.3194	22.11590	9.23537e-1	1.3691

Totals : 1615.31958 57.76309

Signal 4: FLD1 A, Ex=270, Em=375, TT (D:\Users\D...5\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU *s	Height [LU]	Area %
1	1.885	BB	0.1640	8.09291	6.62955e-1	0.3903
2	6.020	BB	0.3725	18.00847	6.50912e-1	0.8684
3	9.805	BB	0.3119	125.00410	5.42654	6.0280
4	11.709	BB	0.3777	20.89749	7.53143e-1	1.0077
5	13.934	BB	0.3415	176.69299	7.17059	8.5205
6	16.422	BB	0.3872	20.42461	7.24607e-1	0.9849
7	19.630	BB	0.3369	209.59416	9.35937	10.1071
8	21.004	BV	0.3624	79.94688	3.27703	3.8552
9	21.626	VB	0.3081	16.51040	7.77941e-1	0.7962
10	29.667	BB	0.6277	44.14031	1.04301	2.1285
11	32.202	BB	0.5878	46.33877	1.17430	2.2346
12	38.380	BB	0.3639	49.76816	1.95508	2.3999
13	39.199	BV R	0.2600	1121.59985	66.29527	54.0859
14	39.655	VB E	0.2236	49.76080	3.14250	2.3996
15	40.485	BV	0.2645	42.47168	2.30655	2.0481
16	40.854	VB	0.2044	44.48592	3.17762	2.1452

Totals : 2073.73750 107.89744

Signal 5: DAD1, Sig=254.00, 2.00 Ref=390.00, 2.00 , EXT of NFMI 236-14_1--011.D
 Signal has been modified after loading from rawdata file!

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.466	BB	0.0816	17.60116	3.03968	0.0731
2	1.762	BV	0.0441	76.90160	27.92789	0.3193
3	1.858	VV	0.0754	84.30930	17.74767	0.3501
4	1.937	VB	0.0408	14.63443	5.54042	0.0608
5	2.033	BB	0.1350	4.12727	3.97801e-1	0.0171
6	3.189	BV R	0.2276	154.96834	9.15058	0.6435
7	3.500	VB E	0.1050	3.19436	4.83910e-1	0.0133
8	3.824	BB	0.1935	8.43372	5.54217e-1	0.0350
9	4.407	BB	0.1423	7.90254	8.20777e-1	0.0328
10	6.195	BB	0.4131	281.80713	8.67205	1.1702
11	9.552	BB	0.2392	47.24112	2.85279	0.1962
12	10.620	BV	0.2804	93.62427	4.78328	0.3888
13	10.978	VB	0.2429	174.52728	10.23963	0.7247
14	11.530	BB	0.2162	15.12442	1.02452	0.0628
15	14.249	BB	0.3708	101.48394	3.69126	0.4214
16	19.596	BB	0.3277	1.75786e4	814.79712	72.9939
17	20.967	BB	0.2516	35.60135	1.84149	0.1478
18	21.572	BB	0.2206	7.08510	3.96284e-1	0.0294
19	24.402	BB	0.3025	21.25644	8.53639e-1	0.0883
20	25.300	BB	0.3315	27.03209	9.68752e-1	0.1122
21	32.069	BB	0.5937	489.34070	11.61078	2.0320
22	37.133	BB	0.3021	74.35119	3.77038	0.3087
23	37.940	BB	0.1756	10.10552	7.67495e-1	0.0420
24	38.359	BB	0.2662	2810.13574	159.02911	11.6689
25	39.168	BB	0.2659	345.31848	19.01525	1.4339
26	40.114	BB	0.1820	8.10119	6.75314e-1	0.0336
27	41.237	BB	0.4827	56.10374	1.45231	0.2330
28	42.034	BB	0.2871	30.83669	1.49209	0.1280
29	42.674	BB	0.2556	949.89874	59.06486	3.9444
30	43.141	BB	0.2681	204.05588	11.01433	0.8473
31	44.413	BB	0.3062	200.25835	10.32666	0.8316
32	45.622	BB	0.3307	70.22686	3.24281	0.2916
33	47.927	BB	0.2923	34.36623	1.65504	0.1427
34	49.467	BBA	0.3633	43.72950	1.51248	0.1816

Totals : 2.40823e4 1200.41265

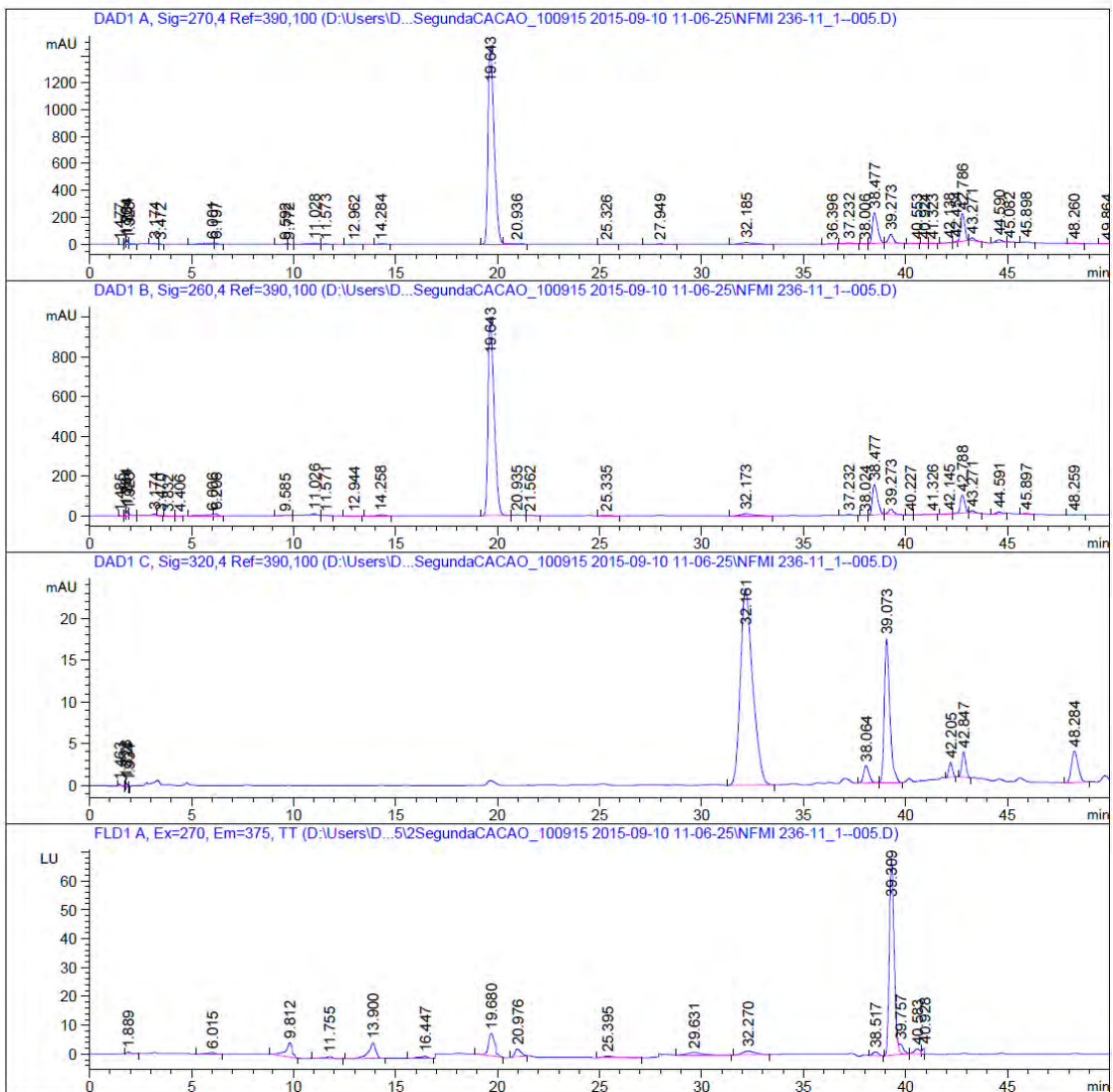
=====
 *** End of Report ***

A. 6 Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M5).

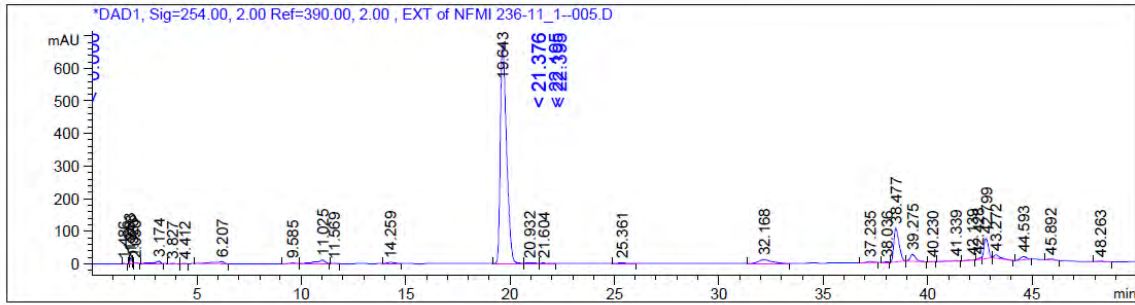
Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-11_1--005.D
 Sample Name: NFMI 236-11

```

=====
Acq. Operator   : Ana Gonzalez           Seq. Line :    5
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD FLD       Location  :    2
Injection Date  : 9/10/2015 1:59:31 PM   Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.0 µl
Acq. Method    : D:\Users\Data\NIEVESF\10Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25
                                           \2cacaofluor070915.M
Last changed   : 9/10/2015 11:06:25 AM by Ana Gonzalez
Analysis Method : D:\Users\Data\NIEVESF\10Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25
                                           \2cacaofluor070915.M (Sequence Method)
Last changed   : 9/17/2015 7:52:54 PM by Ana Gonzalez
                                           (modified after loading) (Current integration events modified)
Method Info    : Método cacao: Metilxantinas y Ácidos fénolicos con timetable FLD
  
```



Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-11_1--005.D
 Sample Name: NFMI 236-11



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.474	BB	0.0947	7.92436	1.27111	0.0191
2	1.764	BV	0.0421	81.25696	29.50074	0.1955
3	1.834	VV	0.0619	142.21883	34.62296	0.3422
4	1.923	VB	0.0743	53.22483	9.65734	0.1281
5	3.174	BV	0.1550	69.21123	6.35994	0.1665
6	3.472	VB	0.1189	11.32085	1.45310	0.0272
7	6.001	BV	0.4280	275.73233	8.16556	0.6634
8	6.197	VB	0.1609	81.09027	7.33822	0.1951
9	9.592	BV	0.2161	20.42896	1.35326	0.0492
10	9.772	VB	0.1600	12.29962	1.12134	0.0296
11	11.028	BB	0.2993	153.99857	7.09158	0.3705
12	11.573	BB	0.2281	20.56656	1.31777	0.0495
13	12.962	BB	0.3160	27.02732	1.18542	0.0650
14	14.284	BB	0.3506	55.04074	2.15046	0.1324
15	19.643	BV R	0.3159	3.05737e4	1474.59070	73.5583
16	20.936	VB E	0.4257	114.02680	3.76085	0.2743
17	25.326	BB	0.3745	28.35503	1.04532	0.0682
18	27.949	BB	0.4761	63.39488	1.71953	0.1525
19	32.185	BB	0.6314	530.18109	12.19109	1.2756
20	36.396	BB	0.2983	22.23406	1.04465	0.0535
21	37.232	BB	0.2843	171.81316	9.18384	0.4134
22	38.006	BB	0.2145	13.44250	1.04195	0.0323
23	38.477	BB	0.2606	3894.55371	226.54803	9.3700
24	39.273	BB	0.2582	1062.03784	62.50740	2.5552
25	40.553	BB	0.2626	11.65387	6.16457e-1	0.0280
26	40.924	BB	0.2015	23.25855	1.79076	0.0560
27	41.323	BB	0.1853	14.46511	1.21152	0.0348
28	42.138	BB	0.2989	51.13852	2.41647	0.1230
29	42.454	BV f	0.1250	23.38104	3.20861	0.0563

Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-11_1--005.D
 Sample Name: NFMI 236-11

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
30	42.786	BB	0.2342	3015.95361	206.71448	7.2562
31	43.271	BB	0.2315	335.94971	22.33763	0.8083
32	44.590	BB	0.3125	393.85532	19.93588	0.9476
33	45.082	BB	0.2163	12.86945	9.60606e-1	0.0310
34	45.898	BB	0.3421	139.74817	6.46623	0.3362
35	48.260	BB	0.3321	47.31941	2.13896	0.1138
36	49.864	BBA	0.3313	9.24454	4.65130e-1	0.0222

Totals : 4.15639e4 2174.48489

Signal 2: DAD1 B, Sig=260,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.485	BB	0.0961	10.45785	1.69273	0.0383
2	1.764	BV	0.0443	77.45413	27.97403	0.2837
3	1.841	VV	0.0723	109.31972	24.39929	0.4004
4	1.923	VB	0.0757	55.55699	9.87091	0.2035
5	3.174	BV R	0.2287	147.16614	8.55583	0.5391
6	3.470	VB E	0.1240	7.15744	8.51896e-1	0.0262
7	3.832	BB	0.1875	6.18057	4.95564e-1	0.0226
8	4.406	BB	0.1376	3.49853	3.72469e-1	0.0128
9	6.006	BV	0.4406	210.74278	5.95842	0.7720
10	6.206	VB	0.1843	108.67841	8.43621	0.3981
11	9.585	BB	0.2569	33.73103	1.86594	0.1236
12	11.026	BB	0.3454	242.11230	9.37303	0.8869
13	11.571	BB	0.2172	14.74571	1.01691	0.0540
14	12.944	BB	0.3320	22.86477	9.19980e-1	0.0838
15	14.258	BB	0.3798	94.73033	3.43487	0.3470
16	19.643	BB	0.3154	2.06643e4	998.59418	75.6951
17	20.935	BB	0.2938	45.41683	2.28558	0.1664
18	21.562	BB	0.2129	3.75705	2.59493e-1	0.0138
19	25.335	BB	0.3642	32.00626	1.19619	0.1172
20	32.173	BB	0.6191	344.41647	8.11530	1.2616
21	37.232	BB	0.2831	79.74419	4.28514	0.2921
22	38.024	BB	0.2021	7.49928	5.83013e-1	0.0275
23	38.477	BB	0.2614	2635.27905	152.62315	9.6532
24	39.273	BB	0.2631	472.18265	27.11707	1.7296
25	40.227	BB	0.1695	5.75424	5.26394e-1	0.0211
26	41.326	BB	0.4587	44.50963	1.27059	0.1630
27	42.145	BB	0.2911	26.93177	1.31426	0.0987
28	42.788	BB	0.2405	1344.00122	89.87145	4.9232
29	43.271	BB	0.2330	157.53474	10.38250	0.5771
30	44.591	BB	0.3103	191.35818	9.69187	0.7010
31	45.897	BB	0.3387	66.48712	3.09465	0.2435
32	48.259	BB	0.3406	33.81796	1.49125	0.1239

Totals : 2.72994e4 1417.92015

Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-11_1--005.D
 Sample Name: NFMI 236-11

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.463	BV	0.1279	2.84154	2.86091e-1	0.1893
2	1.773	VV	0.0427	1.61510	6.13313e-1	0.1076
3	1.824	VB	0.0551	1.70391	4.22026e-1	0.1135
4	1.934	BB	0.0340	4.24562e-1	2.06657e-1	0.0283
5	32.161	BB	0.6200	985.24048	23.55186	65.6187
6	38.064	BB	0.2791	38.49325	2.06856	2.5637
7	39.073	BB	0.2810	324.53967	17.28689	21.6149
8	42.205	BB	0.1916	21.52307	1.74849	1.4335
9	42.847	BB	0.2026	40.22226	3.03529	2.6789
10	48.284	BB	0.3473	84.85973	3.76023	5.6518

Totals : 1501.46358 52.97942

Signal 4: FLD1 A, Ex=270, Em=375, TT (D:\Users\D...5\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU *s	Height [LU]	Area %
1	1.889	BB	0.1621	7.29584	6.06005e-1	0.3867
2	6.015	BB	0.3527	13.63383	5.21281e-1	0.7226
3	9.812	BB	0.3111	114.61639	5.03285	6.0748
4	11.755	BB	0.3738	18.16822	6.67216e-1	0.9629
5	13.900	BB	0.3348	132.12254	5.44758	7.0026
6	16.447	BB	0.4309	21.29254	6.62873e-1	1.1285
7	19.680	BB	0.3303	171.79669	7.80434	9.1054
8	20.976	BB	0.3257	55.98116	2.63364	2.9670
9	25.395	BB	0.5537	19.98402	5.10734e-1	1.0592
10	29.631	BB	0.6370	35.66670	8.09816e-1	1.8904
11	32.270	BB	0.5856	50.63103	1.25376	2.6835
12	38.517	BB	0.3005	23.40698	1.23810	1.2406
13	39.309	BV R	0.2591	1126.28943	67.63317	59.6943
14	39.757	VB E	0.2312	46.27370	2.87223	2.4525
15	40.583	BV	0.2608	32.20030	1.79772	1.7066
16	40.928	VB	0.1142	17.40315	2.30023	0.9224

Totals : 1886.76253 101.79155

Signal 5: DAD1, Sig=254.00, 2.00 Ref=390.00, 2.00 , EXT of NFMI 236-11_1--005.D
 Signal has been modified after loading from rawdata file!

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.486	BB	0.0972	12.19302	1.94387	0.0631
2	1.763	BV	0.0437	66.08024	24.32773	0.3417
3	1.846	VV	0.0691	76.84148	17.55979	0.3974
4	1.923	VB	0.0403	16.05752	6.18680	0.0830

Data File D:\Users\D...\Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-11_1--005.D
Sample Name: NFMI 236-11

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
5	2.030	BB	0.1462	5.27499	5.38849e-1	0.0273
6	3.174	BB	0.2189	123.19003	7.60796	0.6370
7	3.827	BB	0.1673	6.99558	5.32458e-1	0.0362
8	4.412	BB	0.1422	6.27342	6.40818e-1	0.0324
9	6.207	BB	0.4336	255.61028	7.50023	1.3218
10	9.585	BB	0.2253	29.04938	1.73495	0.1502
11	11.025	BB	0.3523	281.82736	10.73446	1.4573
12	11.569	BB	0.1893	9.13162	6.68872e-1	0.0472
13	14.259	BB	0.3434	74.24412	2.99306	0.3839
14	19.643	BB	0.3152	1.40039e4	677.34216	72.4148
15	20.932	BB	0.2577	33.53334	1.70297	0.1734
16	21.604	BB	0.2633	7.89760	3.88339e-1	0.0408
17	25.361	BB	0.3456	30.59444	1.08307	0.1582
18	32.168	BB	0.6019	471.92133	11.37888	2.4403
19	37.235	BB	0.2788	75.41353	4.05840	0.3900
20	38.036	BB	0.1785	10.32210	7.89420e-1	0.0534
21	38.477	BB	0.2607	1773.94568	103.09582	9.1732
22	39.275	BB	0.2834	408.21429	21.31640	2.1109
23	40.230	BB	0.1811	9.69984	8.37815e-1	0.0502
24	41.339	BB	0.4404	50.09838	1.45239	0.2591
25	42.139	BB	0.3198	31.65131	1.36851	0.1637
26	42.428	BV f	0.1437	13.91668	1.56527	0.0720
27	42.799	BB	0.2445	940.95996	61.49097	4.8657
28	43.272	BB	0.2708	196.60379	10.68048	1.0166
29	44.593	BB	0.3025	200.62909	10.24561	1.0375
30	45.892	BB	0.3351	70.13493	3.20695	0.3627
31	48.263	BB	0.3009	46.24681	2.08439	0.2391

Totals : 1.93385e4 997.05771

=====
*** End of Report ***

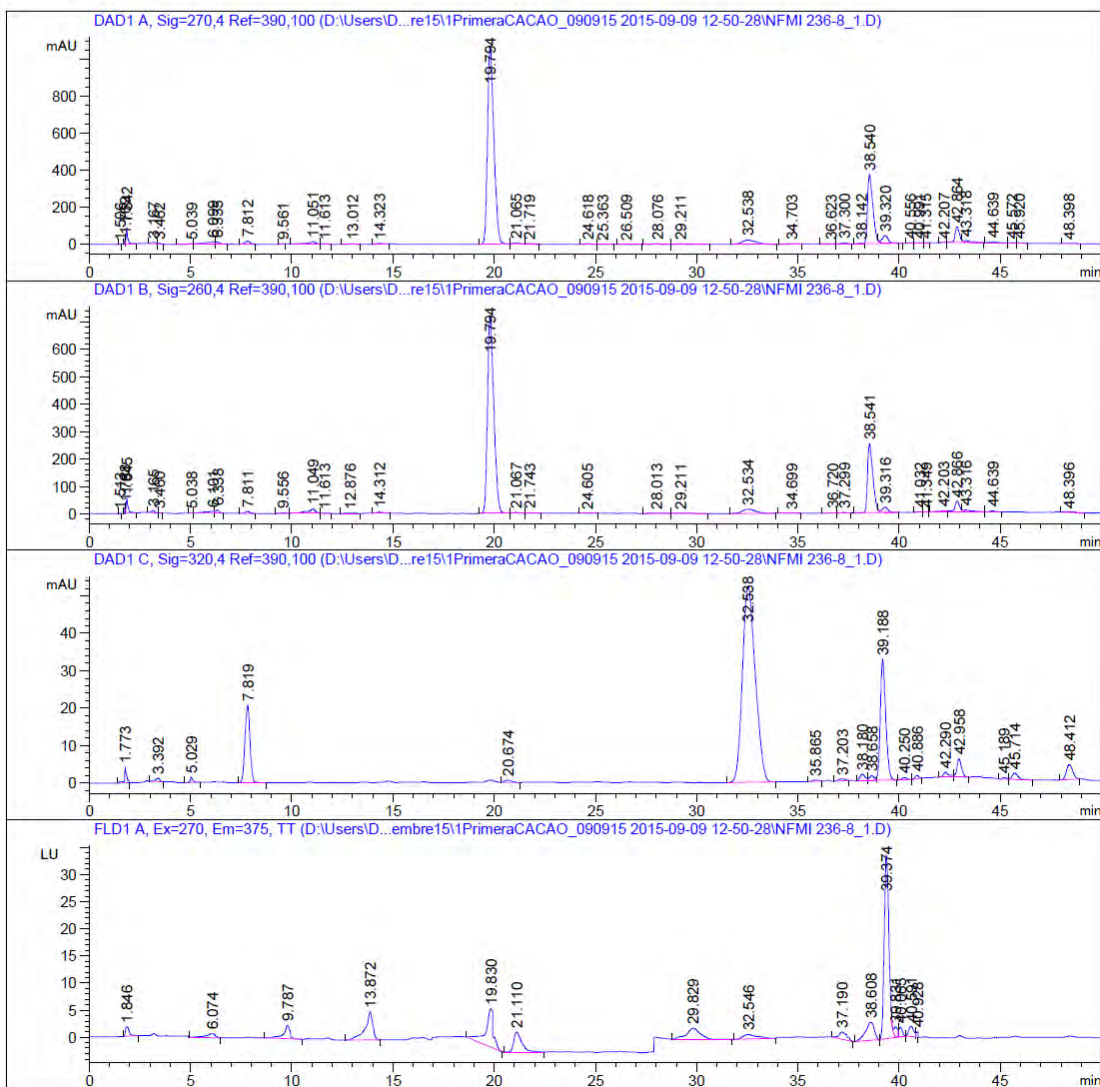
A. 7 Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M7).

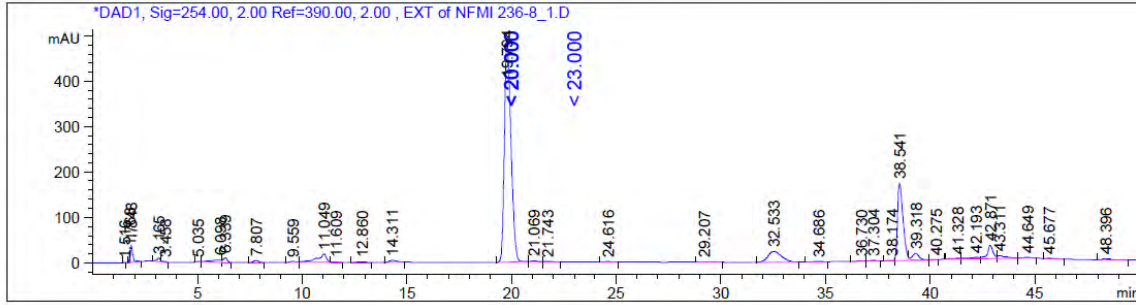
Data File D:\Users\D...Setiembre15\PrimeraCACAO_090915 2015-09-09 12-50-28\NFMI 236-8_1.D
 Sample Name: NFMI 236-8

```

=====
Acq. Operator   : Ana Gonzalez           Seq. Line : 26
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD FLD       Location  : 8
Injection Date  : 9/10/2015 6:23:45 AM    Inj       : 1
                                           Inj Volume: 10.0 µl

Acq. Method    : D:\Users\Data\NIEVESF\09Setiembre15\PrimeraCACAO_090915 2015-09-09 12-50-28\2cacaofluor070915.M
Last changed   : 9/9/2015 12:50:28 PM by Ana Gonzalez
Analysis Method: D:\Users\Data\NIEVESF\09Setiembre15\PrimeraCACAO_090915 2015-09-09 12-50-28\2cacaofluor070915.M (Sequence Method)
Last changed   : 9/17/2015 8:37:48 PM by Ana Gonzalez
                                           (modified after loading) (Current integration events modified)
Method Info    : Método cacao: Metilxantinas y Ácidos fenólicos con timetable FLD
    
```





=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...re15\1PrimeraCACAO_090915 2015-09-09 12-50-28\NFM1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.506	BB	0.0733	4.40855	9.29302e-1	0.0122
2	1.769	BV	0.0465	90.71719	30.68384	0.2506
3	1.842	VB	0.0785	483.58447	87.52552	1.3359
4	3.167	BV	0.1621	88.00193	7.65381	0.2431
5	3.462	VB	0.1446	40.97022	4.17221	0.1132
6	5.039	BV	0.1814	34.99203	2.59419	0.0967
7	6.099	VV	0.4901	427.43344	11.07888	1.1808
8	6.335	VB	0.1677	119.65066	10.28847	0.3305
9	7.812	BB	0.2683	273.44858	16.08601	0.7554
10	9.561	BB	0.1799	10.12263	8.82101e-1	0.0280
11	11.051	BB	0.3291	295.55167	12.17995	0.8165
12	11.613	BB	0.2136	19.58809	1.34731	0.0541
13	13.012	BB	0.3650	30.09197	1.10762	0.0831
14	14.323	BB	0.3314	71.78998	3.18024	0.1983
15	19.794	BB	0.3346	2.32241e4	1064.22388	64.1584
16	21.065	BV R	0.3140	80.58514	3.88527	0.2226
17	21.719	VB E	0.2417	8.31304	4.71590e-1	0.0230
18	24.618	BB	0.3114	12.34026	4.74480e-1	0.0341
19	25.363	BB	0.3005	7.09496	2.82976e-1	0.0196
20	26.509	BB	0.4470	17.98239	4.82294e-1	0.0497
21	28.076	BB	0.5305	33.38375	7.78175e-1	0.0922
22	29.211	BB	0.4682	31.03971	7.97263e-1	0.0857
23	32.538	BB	0.6741	999.71338	22.33914	2.7618
24	34.703	BB	0.3504	24.98279	9.15346e-1	0.0690
25	36.623	BV	0.3387	44.97473	1.58645	0.1242
26	37.300	VB	0.3207	99.44018	4.51860	0.2747
27	38.142	BV E	0.2530	25.96811	1.53749	0.0717
28	38.540	VV R	0.2786	6870.50049	373.44928	18.9803
29	39.320	VV E	0.3025	848.28082	41.49376	2.3434

Data File D:\Users\D...Setiembre15\1PrimeraCACAO_090915 2015-09-09 12-50-28\NFM1 236-8_1.D
 Sample Name: NFM1 236-8

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
30	40.556	BB	0.1886	8.74223	7.46776e-1	0.0242
31	40.991	BV	0.2780	35.11768	1.98840	0.0970
32	41.315	VB	0.1633	7.89456	7.23670e-1	0.0218
33	42.207	BB	0.2061	19.99468	1.57538	0.0552
34	42.864	BV R	0.2341	1314.04272	86.06258	3.6301
35	43.318	VB E	0.3727	279.14700	10.09058	0.7712
36	44.639	BB	0.3476	121.70143	5.46945	0.3362
37	45.572	BV	0.2793	15.17258	6.98817e-1	0.0419
38	45.920	VB	0.3228	27.64225	1.25595	0.0764
39	48.398	BB	0.3631	49.58391	2.10274	0.1370

Totals : 3.61981e4 1817.65978

Signal 2: DAD1 B, Sig=260,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...re15\1PrimeraCACAO_090915 2015-09-09 12-50-28\NFM1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.513	BB	0.0794	4.55024	9.24757e-1	0.0187
2	1.768	BV	0.0463	81.37476	27.71319	0.3341
3	1.845	VB	0.0949	360.99677	54.77449	1.4823
4	3.165	BV	0.1643	104.69412	8.96158	0.4299
5	3.460	VB	0.1233	17.14330	2.09887	0.0704
6	5.038	BB	0.0976	5.44726	8.64042e-1	0.0224
7	6.101	BV	0.4174	235.89059	7.14077	0.9686
8	6.338	VB	0.1790	144.59514	11.63258	0.5937
9	7.811	BB	0.2685	123.54803	7.25976	0.5073
10	9.556	BB	0.2220	29.93283	2.00745	0.1229
11	11.049	BB	0.3720	445.28351	15.93545	1.8284
12	11.613	BB	0.2093	14.83631	1.07312	0.0609
13	12.876	BB	0.3952	37.46262	1.28850	0.1538
14	14.312	BB	0.3379	108.80317	4.77366	0.4468
15	19.794	BB	0.3345	1.56777e4	718.66992	64.3759
16	21.067	BV	0.2996	55.64180	2.75569	0.2285
17	21.743	VB	0.3077	24.57318	1.15719	0.1009
18	24.605	BB	0.3455	22.30043	8.45984e-1	0.0916
19	28.013	BB	0.5036	21.78297	5.12792e-1	0.0894
20	29.211	BB	0.4800	26.00079	6.51015e-1	0.1068
21	32.534	BB	0.6688	709.68292	15.89845	2.9141
22	34.699	BB	0.3708	18.76650	6.17150e-1	0.0771
23	36.720	BB	0.3147	11.24110	4.36088e-1	0.0462
24	37.299	BB	0.2599	30.54123	1.78283	0.1254
25	38.541	BV R	0.2794	4639.51514	251.32028	19.0508
26	39.316	VB E	0.3148	408.44589	19.30768	1.6772
27	41.032	BV	0.2649	14.26075	8.44931e-1	0.0586
28	41.349	VB	0.2257	7.26144	4.51365e-1	0.0298
29	42.203	BV E	0.2968	30.03942	1.46757	0.1233
30	42.866	VV R	0.2599	684.90582	39.18605	2.8124
31	43.316	VB E	0.4116	163.76678	5.28345	0.6725
32	44.639	BB	0.3248	56.48556	2.67061	0.2319
33	48.396	BB	0.3585	35.92548	1.50470	0.1475

Totals : 2.43534e4 1211.81199

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...re15\1PrimeraCACAO_090915 2015-09-09 12-50-28\NFMI

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.773	BB	0.0971	29.84821	4.09109	0.8147
2	3.392	BB	0.2084	13.96732	9.13563e-1	0.3812
3	5.029	BB	0.1252	12.34663	1.39614	0.3370
4	7.819	BB	0.2717	354.11853	20.68973	9.6657
5	20.674	BB	0.2671	13.85403	6.43715e-1	0.3781
6	32.538	BB	0.6708	2314.43457	52.45525	63.1725
7	35.865	BB	0.2588	8.95672	4.33903e-1	0.2445
8	37.203	BB	0.2814	10.34288	4.54662e-1	0.2823
9	38.180	BV E	0.2547	30.65267	1.76383	0.8367
10	38.658	VV E	0.2559	21.55939	1.27096	0.5885
11	39.188	VB R	0.2783	597.97681	32.26009	16.3218
12	40.250	BB	0.2276	10.01363	6.43151e-1	0.2733
13	40.886	BB	0.1967	10.92534	8.81054e-1	0.2982
14	42.290	BV	0.2855	25.92550	1.29520	0.7076
15	42.958	VB	0.2378	77.44650	4.91482	2.1139
16	45.189	BV	0.2076	6.56190	4.16866e-1	0.1791
17	45.714	VB	0.2942	35.00285	1.74331	0.9554
18	48.412	BB	0.3401	89.74319	4.02491	2.4495

Totals : 3663.67667 130.29227

Signal 4: FLD1 A, Ex=270, Em=375, TT (D:\Users\D...embre15\1PrimeraCACAO_090915 2015-09-09 12-50-28\NFMI

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU *s	Height [LU]	Area %
1	1.846	BB	0.2060	22.40544	1.74399	1.5566
2	6.074	BB	0.4201	24.41113	7.59988e-1	1.6960
3	9.787	BB	0.2953	54.16136	2.50678	3.7628
4	13.872	BB	0.3608	134.20610	5.10378	9.3239
5	19.830	BB	0.3707	191.27571	7.04581	13.2888
6	21.110	BB	0.3968	100.04650	3.68347	6.9507
7	29.829	BB	0.6681	95.64516	2.03142	6.6449
8	32.546	BB	0.7010	40.98240	8.21256e-1	2.8472
9	37.190	BB	0.3958	36.41559	1.30920	2.5300
10	38.608	BB	0.4569	101.51373	3.29288	7.0526
11	39.374	BV R	0.2538	553.89679	33.80206	38.4817
12	39.831	VV E	0.1747	21.36014	1.77824	1.4840
13	40.065	VB E	0.1947	23.18408	1.81131	1.6107
14	40.591	BV	0.2718	34.21002	1.94830	2.3767
15	40.928	VB	0.0761	5.66359	1.08374	0.3935

Totals : 1439.37776 68.72222

Signal 5: DAD1, Sig=254.00, 2.00 Ref=390.00, 2.00 , EXT of NFMI 236-8_1.D
Signal has been modified after loading from rawdata file!

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.516	BB	0.0802	5.00782	1.00407	0.0278
2	1.768	BV	0.0459	74.97110	25.83650	0.4161
3	1.848	VB	0.1026	267.00235	37.73323	1.4818
4	3.165	BV R	0.1639	94.56781	8.23766	0.5248
5	3.458	VB E	0.1272	10.74987	1.23901	0.0597
6	5.035	BB	0.1164	8.77056	1.13158	0.0487
7	6.098	BV	0.4052	169.26842	5.26360	0.9394
8	6.339	VB	0.1871	135.11505	10.43043	0.7498
9	7.807	BB	0.2672	74.41921	4.35907	0.4130
10	9.559	BB	0.2163	28.77274	1.97125	0.1597
11	11.049	BV R	0.3865	536.40167	18.48693	2.9769
12	11.609	VB E	0.2173	15.84728	1.01991	0.0879
13	12.860	BB	0.3360	39.27334	1.46848	0.2180
14	14.311	BB	0.3304	100.21661	4.38848	0.5562
15	19.794	BB	0.3344	1.06179e4	486.88187	58.9259
16	21.069	BV	0.2919	40.25013	2.00752	0.2234
17	21.743	VB	0.2797	31.94149	1.41295	0.1773
18	24.616	BB	0.3129	24.74937	9.65937e-1	0.1374
19	29.207	BB	0.4183	17.21478	5.11896e-1	0.0955
20	32.533	BB	0.6441	1058.59509	23.92837	5.8749
21	34.686	BB	0.3686	14.48717	4.76640e-1	0.0804
22	36.730	BV	0.3169	16.53289	6.49644e-1	0.0918
23	37.304	VB	0.2732	37.00040	1.89992	0.2053
24	38.174	BV E	0.1927	15.54696	1.00391	0.0863
25	38.541	VV R	0.2790	3141.05640	170.42087	17.4318
26	39.318	VB E	0.3223	334.03363	15.08588	1.8538
27	40.275	BV	0.1727	5.02992	4.29401e-1	0.0279
28	41.328	BV E	0.3846	56.84812	1.78982	0.3155
29	42.193	VV E	0.5014	76.05623	1.87417	0.4221
30	42.871	VV R	0.3064	626.70343	29.43256	3.4780
31	43.311	VB	0.4115	205.45084	6.59412	1.1402
32	44.649	BB	0.3037	60.01672	2.84969	0.3331
33	45.677	BB	0.4208	27.69566	7.90408e-1	0.1537
34	48.396	BB	0.3127	51.59206	2.14414	0.2863

Totals : 1.80191e4 873.71992

*** End of Report ***

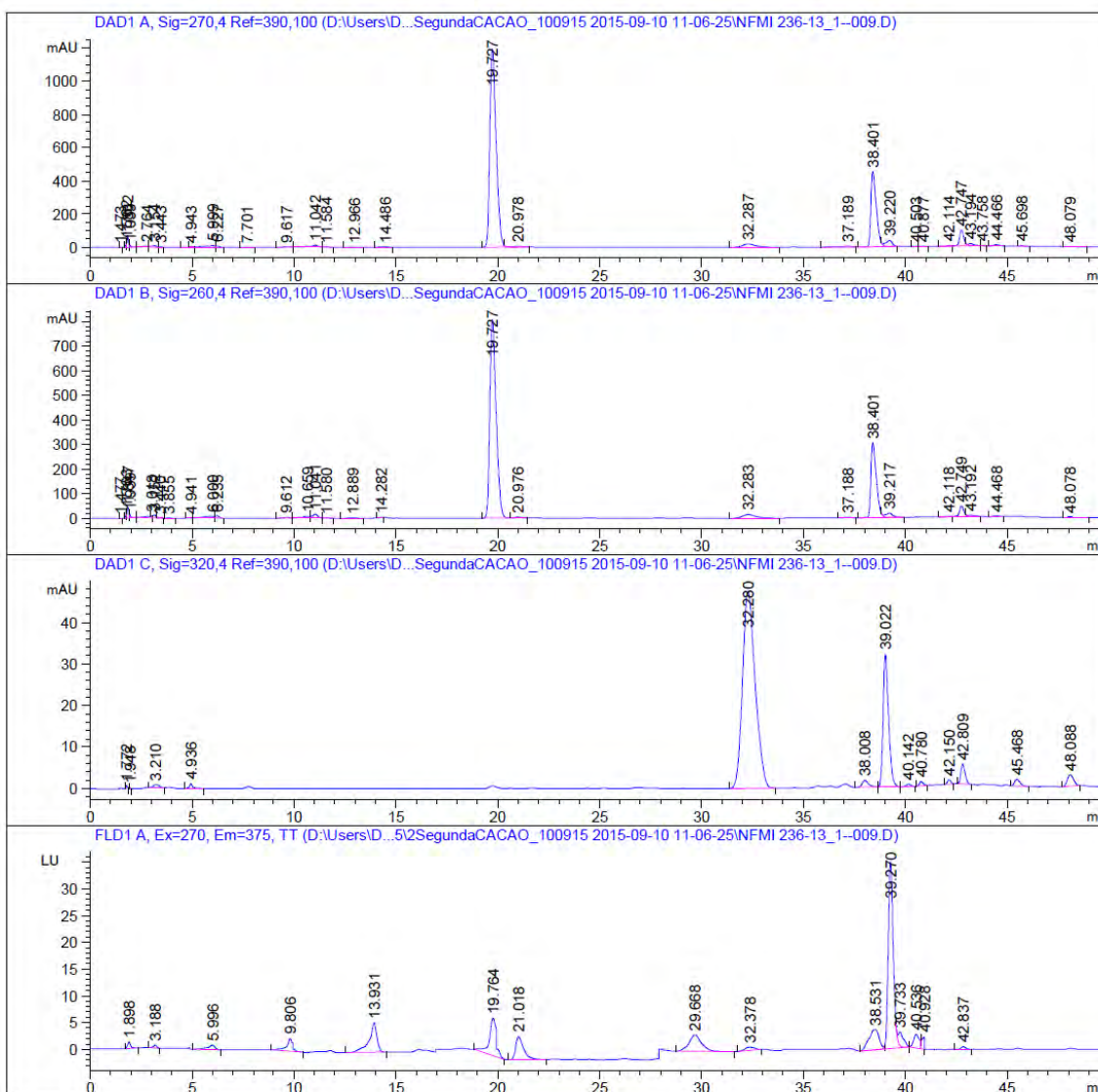
A. 8 Cromatograma mediante HPLC-DAD-FD 50 min, equipo Agilent, de un extracto metanólico de cacao representativo (M8).

Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-13_1--009.D
 Sample Name: NFMI 236-13

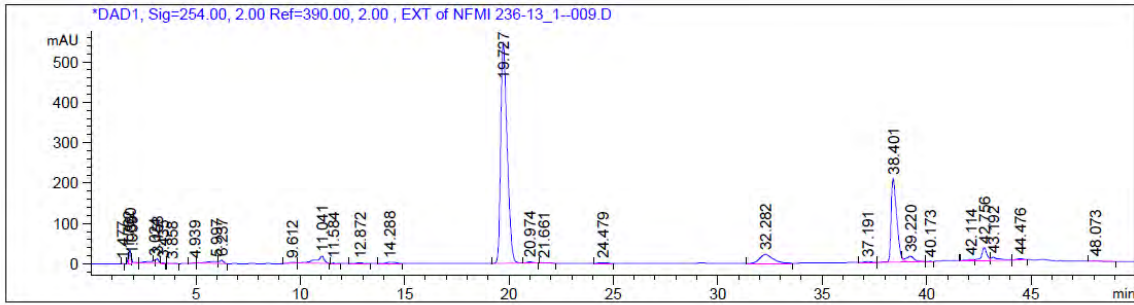
```

=====
Acq. Operator   : Ana Gonzalez                Seq. Line :    9
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD FLD          Location  :    4
Injection Date  : 9/10/2015 4:52:16 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.0 µl

Acq. Method    : D:\Users\Data\NIEVESF\10Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25
                 \2cacaofluor070915.M
Last changed   : 9/10/2015 11:06:25 AM by Ana Gonzalez
Analysis Method : D:\Users\Data\NIEVESF\10Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25
                 \2cacaofluor070915.M (Sequence Method)
Last changed   : 9/17/2015 7:33:39 PM by Ana Gonzalez
                 (modified after loading)
Method Info    : Método cacao: Metilxantinas y Ácidos féolicos con timetable FLD
    
```



Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-13_1--009.D
 Sample Name: NFMI 236-13



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.473	BB	0.0622	3.23048	7.50336e-1	8.143e-3
2	1.762	BV	0.0484	105.96860	32.18045	0.2671
3	1.832	VV	0.0754	303.07614	63.82532	0.7640
4	1.939	VB	0.0643	61.59997	13.23213	0.1553
5	2.764	BV	0.2785	73.37124	3.65052	0.1850
6	3.154	VV	0.2093	154.61313	9.95069	0.3898
7	3.443	VB	0.1283	28.32467	3.29489	0.0714
8	4.943	BV E	0.0979	4.38087	6.91219e-1	0.0110
9	5.999	VV R	0.4858	419.92697	10.89135	1.0586
10	6.227	VB	0.1616	94.81557	8.53373	0.2390
11	7.701	BB	0.2737	17.23251	8.60157e-1	0.0434
12	9.617	BB	0.2725	33.14304	1.67767	0.0835
13	11.042	BB	0.3164	277.82727	11.89958	0.7004
14	11.584	BB	0.2030	13.53226	9.92917e-1	0.0341
15	12.966	BB	0.3523	26.59903	1.04037	0.0671
16	14.486	BB	0.3575	52.02589	1.92358	0.1311
17	19.727	BV R	0.3265	2.56050e4	1192.34204	64.5458
18	20.978	VB E	0.3862	144.04825	5.34854	0.3631
19	32.287	BB	0.6492	891.78967	20.19569	2.2480
20	37.189	BB	0.4226	165.69939	5.45240	0.4177
21	38.401	BV R	0.2802	8442.16016	451.42154	21.2812
22	39.220	VB E	0.3001	763.07874	36.47382	1.9236
23	40.503	BB	0.1618	5.73986	5.68576e-1	0.0145
24	40.877	BB	0.2248	21.02774	1.50681	0.0530
25	42.114	BV E	0.2347	47.09203	2.97387	0.1187
26	42.747	VV R	0.2300	1449.18103	96.05175	3.6531
27	43.194	VB E	0.2645	228.13231	12.52613	0.5751
28	43.758	BB	0.1907	12.87863	1.08307	0.0325
29	44.466	BB	0.3148	151.33403	7.64895	0.3815

Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-13_1--009.D
 Sample Name: NFMI 236-13

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
30	45.698	BB	0.3254	34.52892	1.68303	0.0870
31	48.079	BB	0.3553	38.18512	1.62980	0.0963

Totals : 3.96696e4 2002.30092

Signal 2: DAD1 B, Sig=260,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.477	BB	0.0819	4.32510	9.01922e-1	0.0162
2	1.763	BV	0.0490	93.05373	29.31568	0.3490
3	1.847	VV	0.0878	230.77670	42.21149	0.8654
4	1.939	VB	0.0653	64.48379	13.60624	0.2418
5	3.018	VV f	0.0599	1.59988	4.45790e-1	6.000e-3
6	3.152	BV R	0.3113	283.58780	11.67897	1.0635
7	3.440	VB E	0.1195	13.20995	1.64789	0.0495
8	3.855	BB	0.2052	9.52368	6.41378e-1	0.0357
9	4.941	BB	0.1067	4.95267	7.16033e-1	0.0186
10	6.000	BV	0.4199	231.12872	6.98719	0.8667
11	6.235	VB	0.1789	117.94068	9.49560	0.4423
12	9.612	BB	0.2507	41.95451	2.48799	0.1573
13	10.659	BV	0.3327	151.60605	6.53369	0.5685
14	11.041	VB	0.2418	261.32214	15.41485	0.9800
15	11.580	BB	0.2034	10.46238	7.95617e-1	0.0392
16	12.889	BB	0.3868	34.43008	1.25195	0.1291
17	14.282	BB	0.2128	12.57321	9.35406e-1	0.0471
18	19.727	BV R	0.3266	1.73136e4	805.95288	64.9264
19	20.976	VB E	0.3196	77.88316	3.63997	0.2921
20	32.283	BB	0.6498	630.47284	14.42836	2.3643
21	37.188	BB	0.2900	42.53731	2.23535	0.1595
22	38.401	BV R	0.2813	5719.04785	304.20871	21.4466
23	39.217	VB E	0.3307	422.04953	17.66458	1.5827
24	42.118	BV E	0.2300	27.50236	1.74365	0.1031
25	42.749	VV R	0.2373	659.75250	42.44468	2.4741
26	43.192	VB E	0.2623	104.01737	5.71482	0.3901
27	44.468	BB	0.3095	73.87371	3.75481	0.2770
28	48.078	BB	0.3414	28.80154	1.16912	0.1080

Totals : 2.66664e4 1348.02462

Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=390,100 (D:\Users\D...SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.772	BV	0.0516	2.50320	7.37506e-1	0.0864
2	1.948	BB	0.0372	6.25038e-1	2.89059e-1	0.0216
3	3.210	BB	0.2698	14.31217	7.08033e-1	0.4941
4	4.936	BB	0.1552	13.87806	1.23396	0.4791

Data File D:\Users\D...Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-13_1--009.D
 Sample Name: NFMI 236-13

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
5	32.280	BB	0.6486	2046.39600	47.50291	70.6412
6	38.008	BB	0.2912	34.01814	1.67329	1.1743
7	39.022	BB	0.2771	592.96399	31.85927	20.4690
8	40.142	BB	0.2209	8.63021	5.82378e-1	0.2979
9	40.780	BB	0.1980	12.93097	1.00569	0.4464
10	42.150	BB	0.1881	13.29964	1.09179	0.4591
11	42.809	BB	0.2194	69.46201	4.78518	2.3978
12	45.468	BB	0.2647	28.97224	1.57454	1.0001
13	48.088	BB	0.3212	58.89759	2.77991	2.0331

Totals : 2896.88926 95.82351

Signal 4: FLD1 A, Ex=270, Em=375, TT (D:\Users\D...5\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU *s	Height [LU]	Area %
1	1.898	BB	0.1420	12.80669	1.24142	0.8388
2	3.188	BB	0.1748	6.19185	5.31313e-1	0.4055
3	5.996	BB	0.3977	24.07515	8.54801e-1	1.5768
4	9.806	BB	0.2831	49.53935	2.38809	3.2445
5	13.931	BB	0.3645	146.51364	5.46693	9.5957
6	19.764	BB	0.3523	164.05656	6.91822	10.7447
7	21.018	BB	0.3899	115.77342	4.32772	7.5825
8	29.668	BB	0.6212	135.32391	3.12929	8.8629
9	32.378	BB	0.5260	20.55022	6.28746e-1	1.3459
10	38.531	BV E	0.4736	130.94308	3.71749	8.5760
11	39.270	VV R	0.2646	596.55798	34.83834	39.0709
12	39.733	VB E	0.2595	46.97456	2.50878	3.0765
13	40.536	BV	0.2790	48.13015	2.54418	3.1522
14	40.928	VB	0.1315	21.62831	2.49222	1.4165
15	42.837	BB	0.2287	7.79508	5.14312e-1	0.5105

Totals : 1526.85997 72.10186

Signal 5: DAD1, Sig=254.00, 2.00 Ref=390.00, 2.00 , EXT of NFMI 236-13_1--009.D
 Signal has been modified after loading from rawdata file!

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.477	BB	0.0687	4.74707	9.77178e-1	0.0244
2	1.762	BV	0.0479	80.25329	26.06944	0.4119
3	1.860	VV	0.0854	174.98831	33.26770	0.8982
4	1.939	VB	0.0656	52.69458	11.05275	0.2705
5	3.024	VV f	0.0677	1.83163	4.67100e-1	9.402e-3
6	3.153	BV R	0.3158	270.36609	10.96036	1.3878
7	3.435	VB E	0.1140	7.27372	9.42651e-1	0.0373
8	3.858	BB	0.2031	11.17134	7.27682e-1	0.0573
9	4.939	BB	0.1206	6.86464	8.65210e-1	0.0352

Data File D:\Users\D...\Set15\2SegundaCACAO_100915 2015-09-10 11-06-25\NFMI 236-13_1--009.D
Sample Name: NFMI 236-13

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
10	5.997	BV	0.4199	170.60533	5.07909	0.8757
11	6.237	VB	0.1877	110.30708	8.48372	0.5662
12	9.612	BB	0.2348	36.51183	2.32969	0.1874
13	11.041	BB	0.3613	472.84604	17.49501	2.4271
14	11.584	BB	0.1797	6.55270	5.39438e-1	0.0336
15	12.872	BB	0.3304	38.06400	1.43067	0.1954
16	14.288	BB	0.4102	78.47018	2.58457	0.4028
17	19.727	BV R	0.3244	1.17235e4	546.12592	60.1764
18	20.974	VB E	0.2825	53.86489	2.63523	0.2765
19	21.661	BB	0.2728	17.24796	8.02421e-1	0.0885
20	24.479	BB	0.3146	25.94862	9.94014e-1	0.1332
21	32.282	BB	0.6329	935.60919	21.70368	4.8025
22	37.191	BB	0.2734	42.94815	2.22299	0.2205
23	38.401	BV R	0.2819	3886.18018	206.18336	19.9476
24	39.220	VB E	0.3470	348.89771	13.79786	1.7909
25	40.173	BB	0.1703	5.52904	4.80338e-1	0.0284
26	42.114	BV E	0.2571	33.09644	1.79539	0.1699
27	42.756	VV R	0.2579	557.38220	31.89435	2.8610
28	43.192	VB	0.3767	211.97852	7.57042	1.0881
29	44.476	BB	0.3053	78.24395	3.98125	0.4016
30	48.073	BB	0.2941	37.91523	1.57934	0.1946

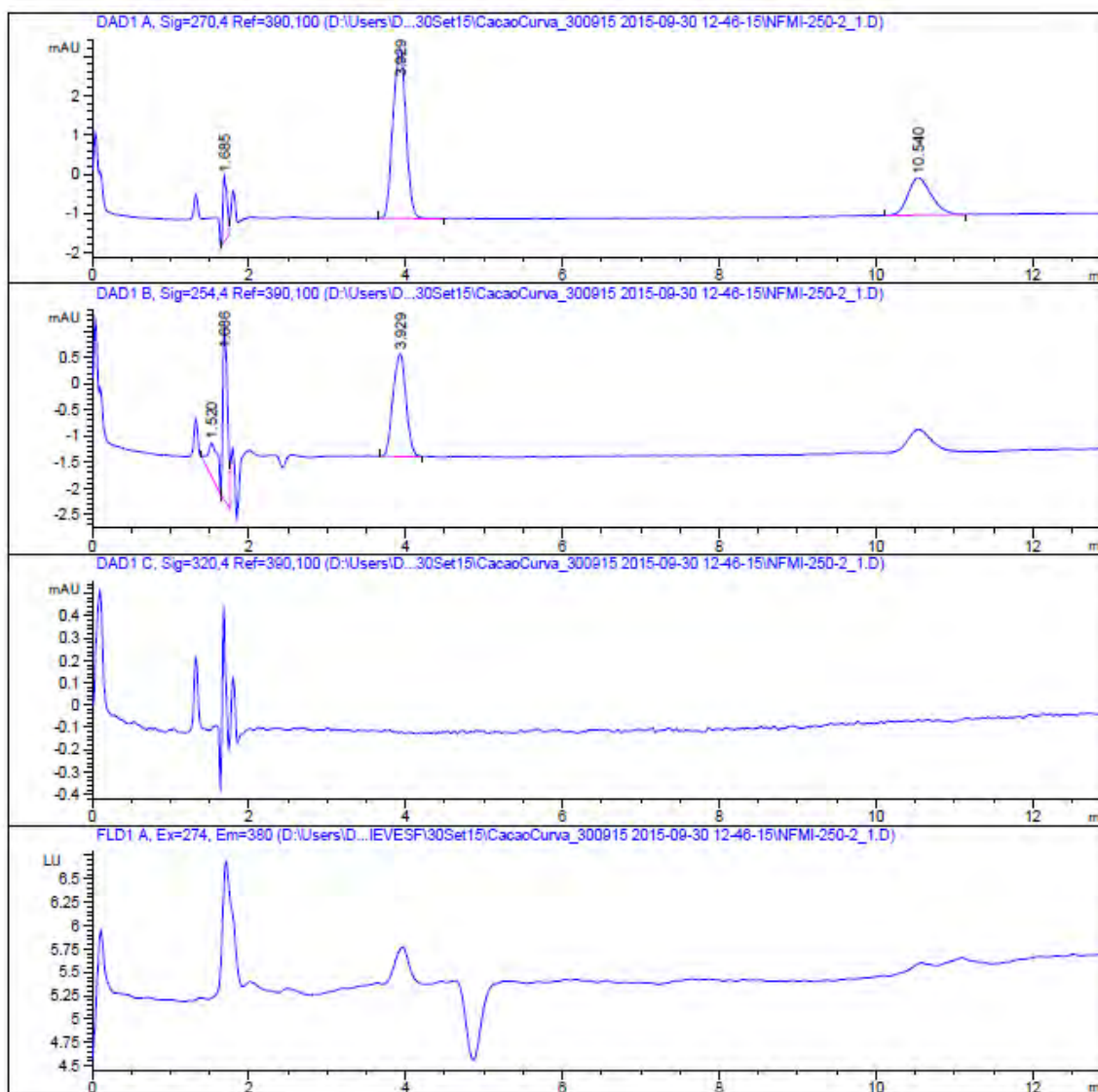
Totals : 1.94819e4 965.03884

=====
*** End of Report ***

A. 9 Cromatograma HPLC-DAD 13 min, equipo Agilent, de teobromina y cafeína.

Data File D:\Users\D...IEVESF\30Set15\CacaoCurva_300915 2015-09-30 12-46-15\NFMI-250-2_1.D
Sample Name: NFMI 251_7

```
=====
Acq. Operator   : Ana Gonzalez           Seq. Line :    1
Acq. Instrument : HPLC 1200 DAD FLD      Location  :    1
Injection Date  : 9/30/2015 12:46:35 PM Inj       :    1
                                           Inj Volume: 10.0 µl
Acq. Method     : D:\Users\Data\NIEVESF\30Set15\CacaoCurva_300915 2015-09-30 12-46-15\5cacao_
                                           Teo-caf.M
Last changed    : 9/30/2015 12:46:15 PM by Ana Gonzalez
Analysis Method : D:\Users\Data\NIEVESF\30Set15\CacaoCurva_300915 2015-09-30 12-46-15\5cacao_
                                           Teo-caf.M (Sequence Method)
Last changed    : 9/30/2015 1:03:44 PM by Ana Gonzalez
Method Info     : Método cacao: Metilxantinas y Ácidos fenólicos con timetable FLD
=====
```



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=270,4 Ref=390,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.685	BV	0.0543	6.05112	1.67027	7.9624
2	3.929	BB	0.1893	50.09975	4.31949	65.9243
3	10.540	BB	0.3015	19.84501	9.58729e-1	26.1133

Totals : 75.99588 6.94848

Signal 2: DAD1 B, Sig=254,4 Ref=390,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.520	BB	0.1201	5.75780	6.33120e-1	13.7241
2	1.686	BV	0.0685	13.71539	3.29746	32.6915
3	3.929	BB	0.1863	22.48077	1.95284	53.5844

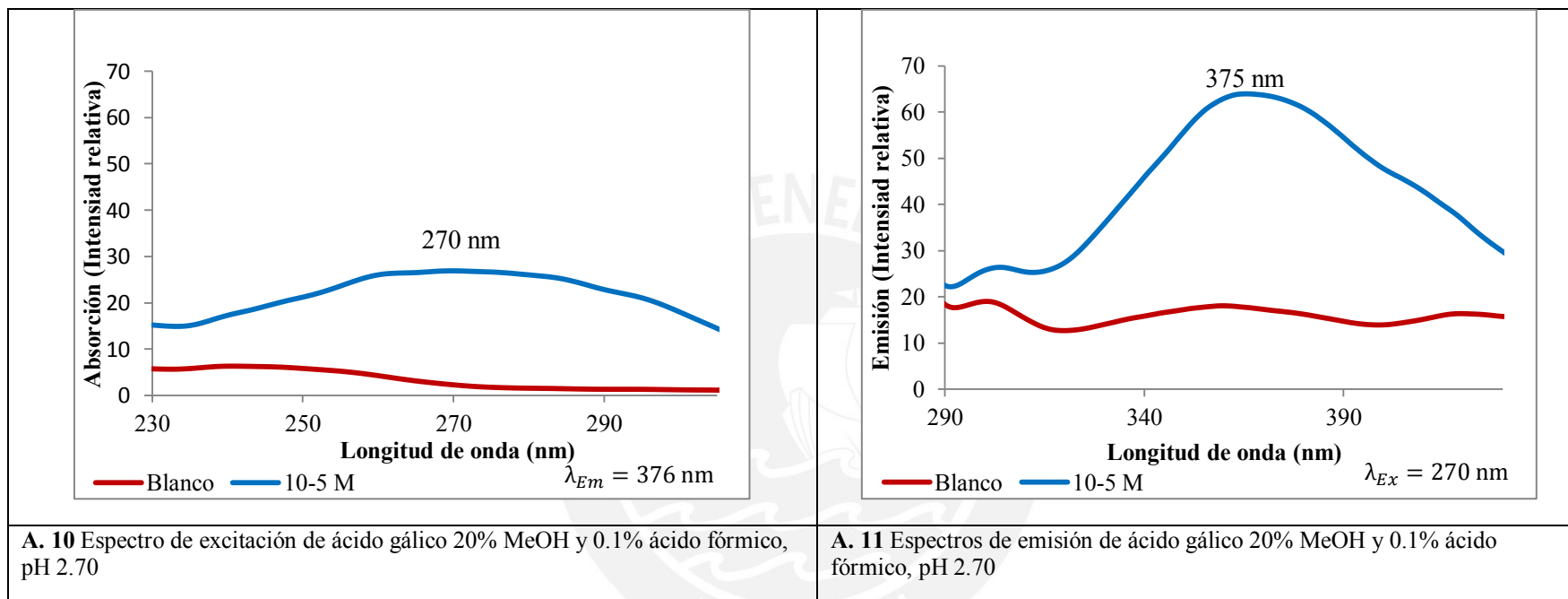
Totals : 41.95396 5.88341

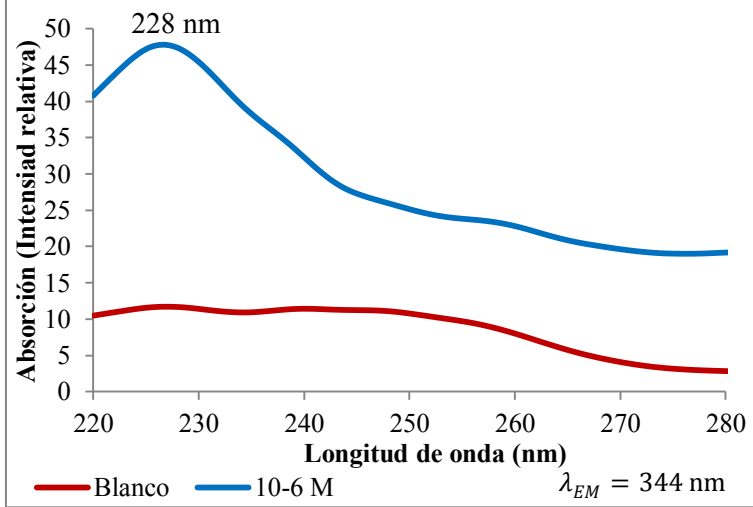
Signal 3: DAD1 C, Sig=320,4 Ref=390,100

Signal 4: FLD1 A, Ex=274, Em=380

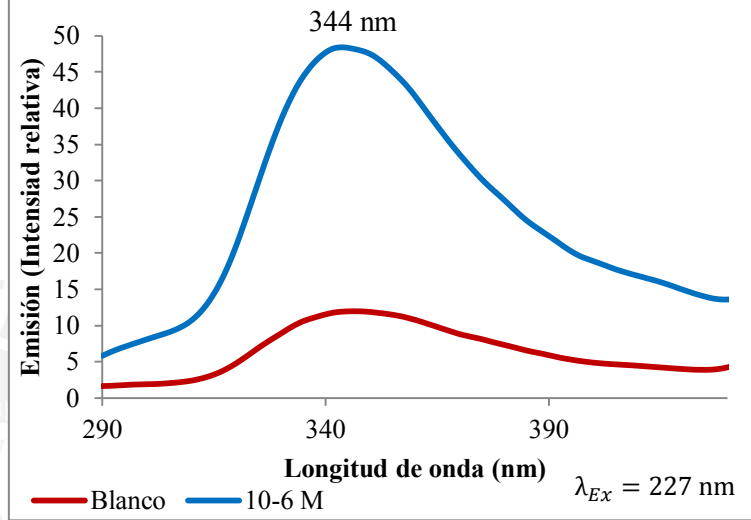
=====
*** End of Report ***

Espectros de emisión y excitación de estándares.

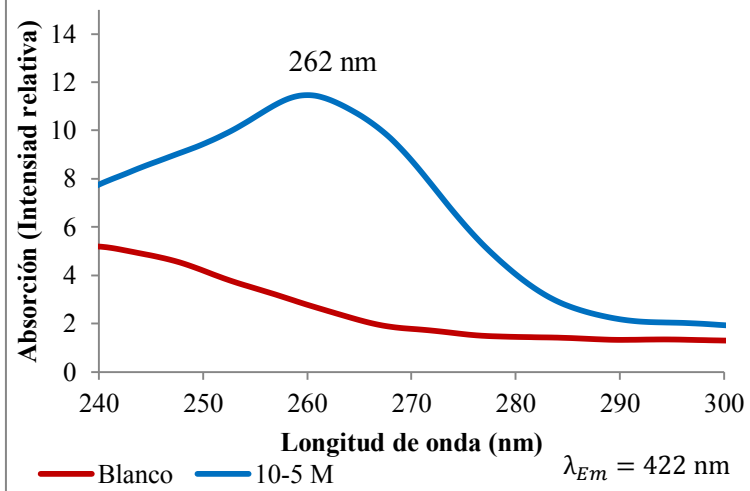




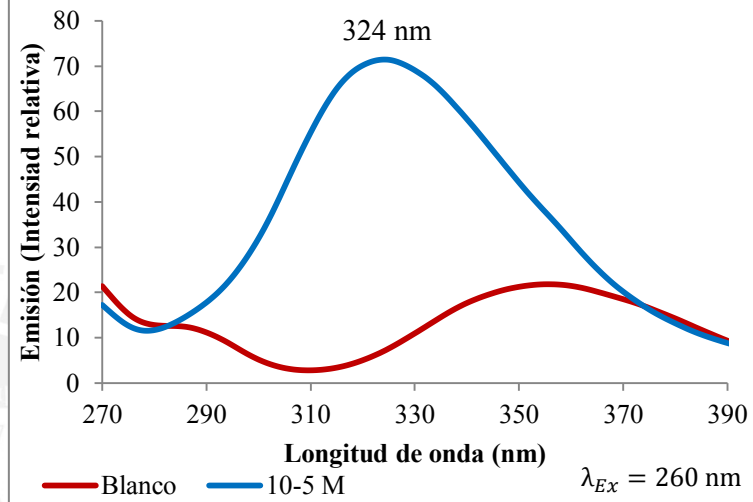
A. 12 Espectro de excitación de ácido protocatéuico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70



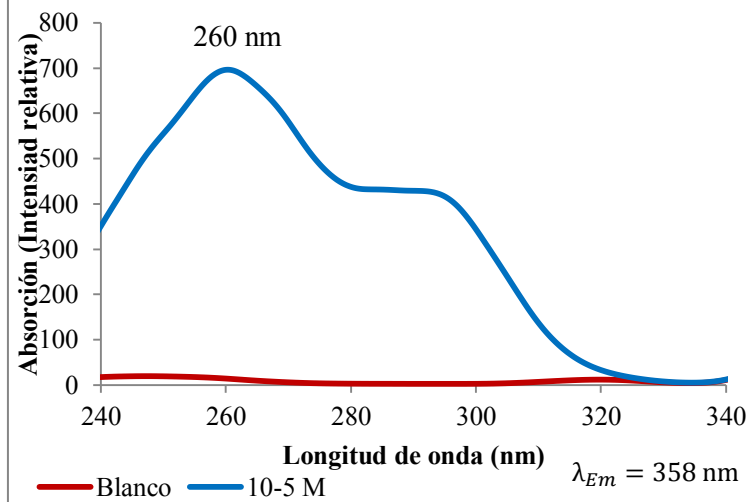
A. 13 Espectros de emisión de ácido protocatéuico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70



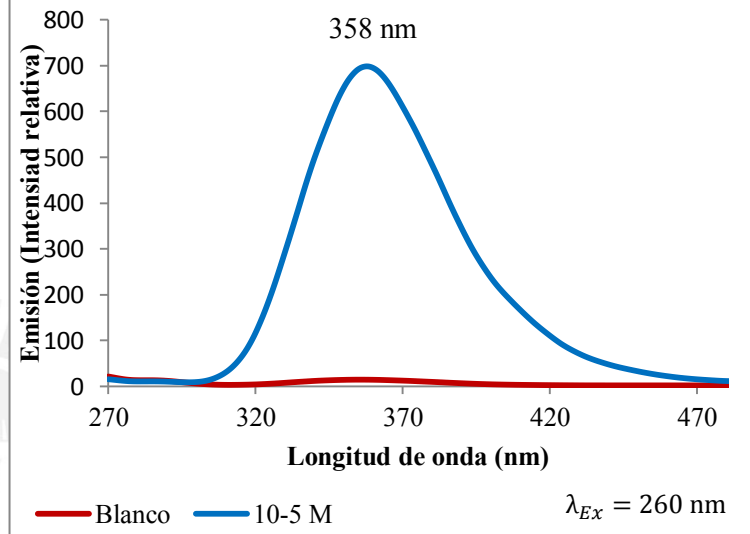
A. 14 Espectro de excitación de ácido *p*-hidroxibenzoico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70



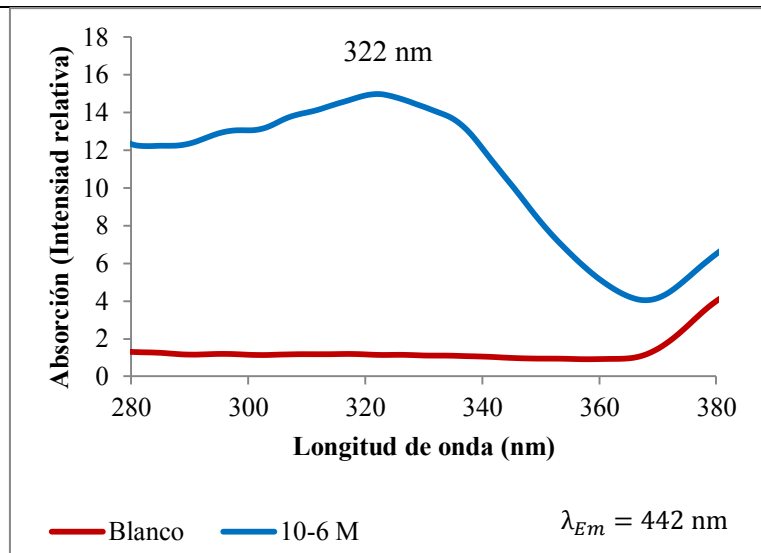
A. 15 Espectros de emisión de ácido *p*-hidroxibenzoico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70



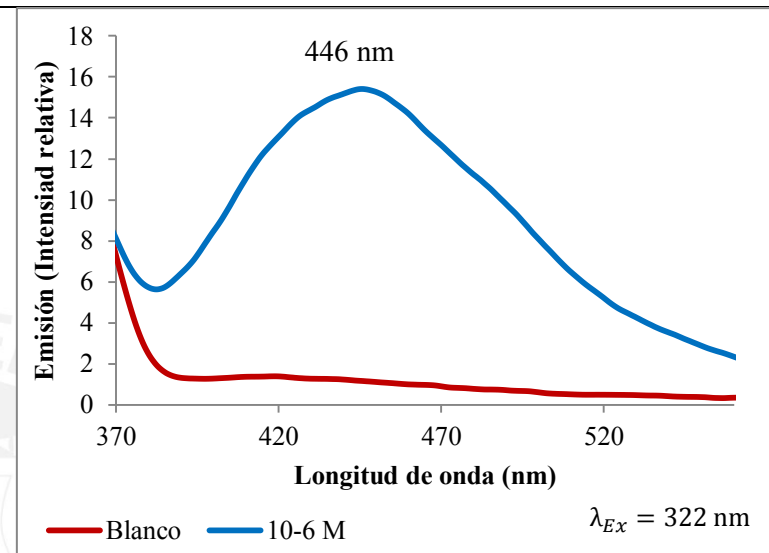
A. 16 Espectro de excitación de ácido vanílico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70



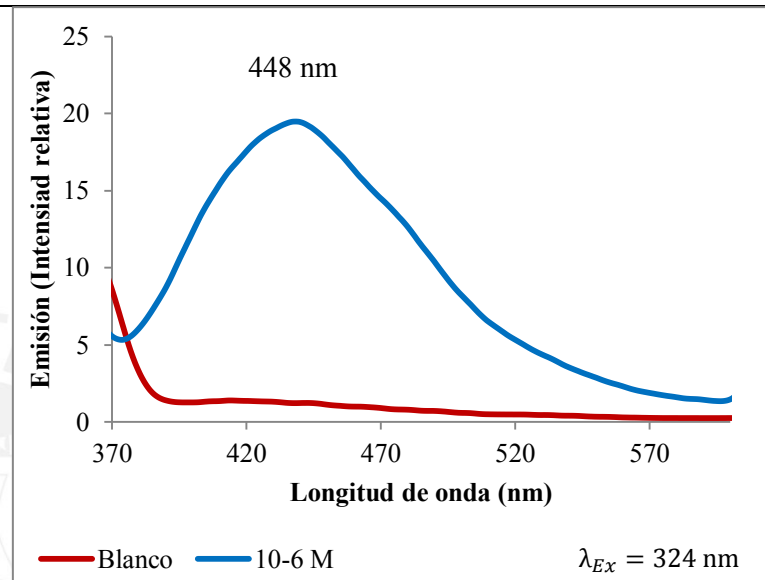
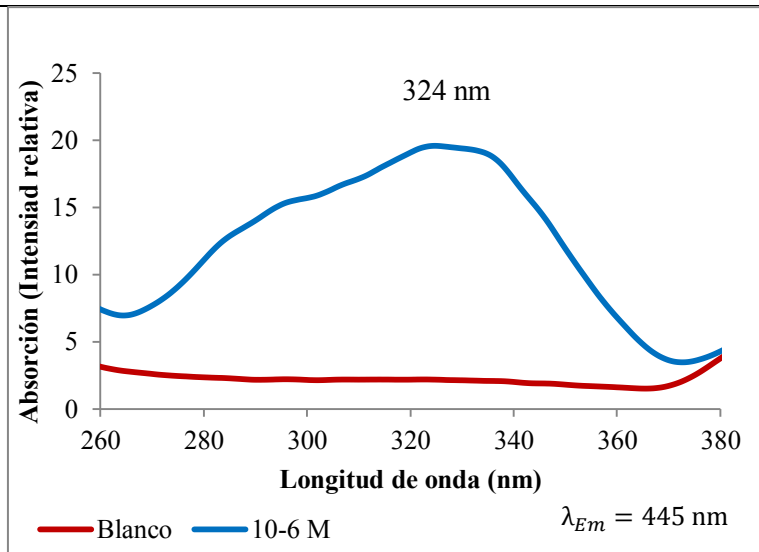
A. 17 Espectros de emisión de ácido vanílico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70



A. 18 Espectro de excitación de ácido cafeico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70

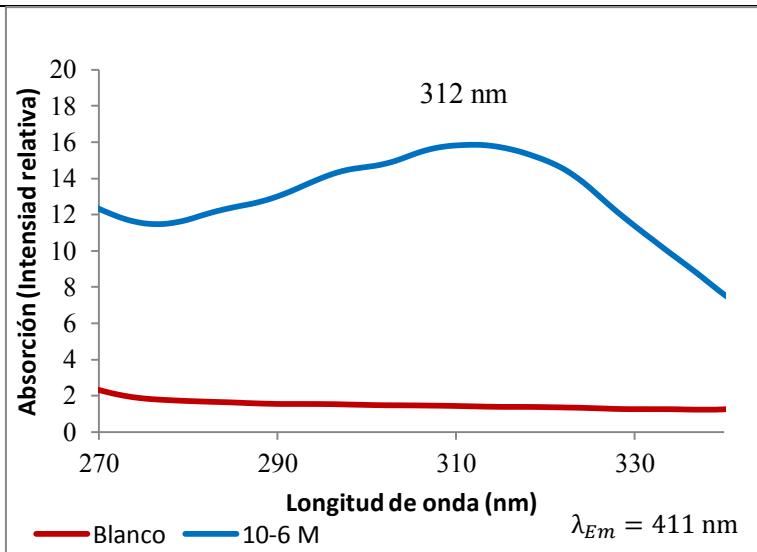


A. 19 Espectros de emisión de ácido cafeico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70

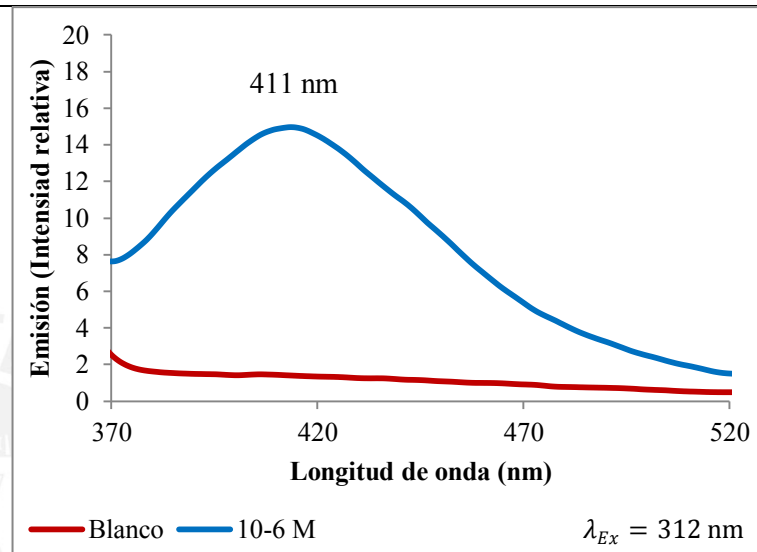


A. 20 Espectro de excitación de ácido clorogénico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70

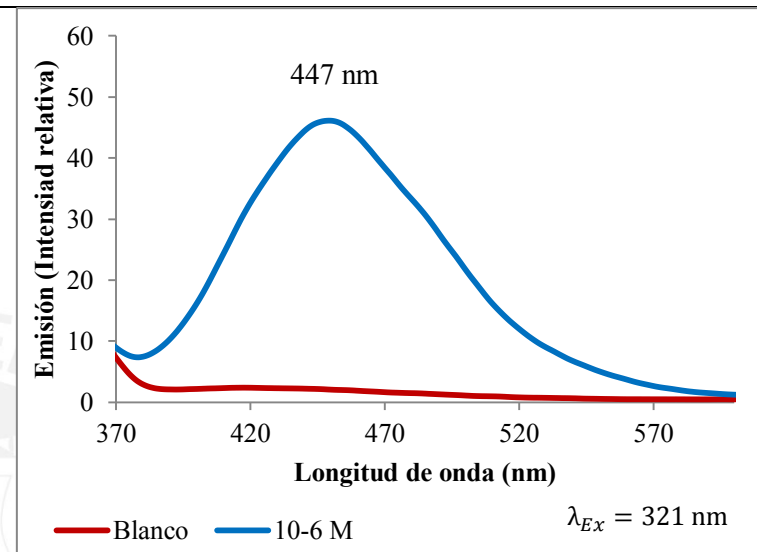
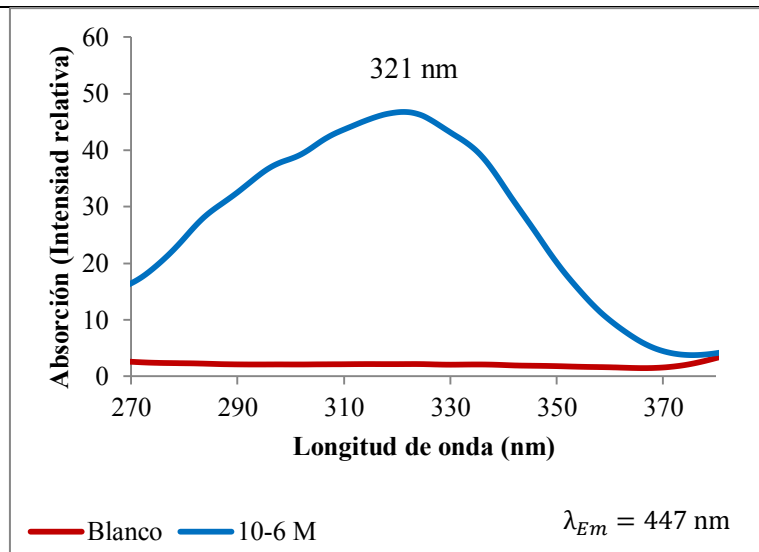
A. 21 Espectros de emisión de ácido clorogénico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70



A. 22 Espectro de excitación de ácido *p*-cumárico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70



A. 23 Espectros de emisión de ácido *p*-cumárico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70



A. 24 Espectro de excitación de ácido ferúlico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70

A. 25 Espectros de emisión de ácido ferúlico 20% MeOH y 0.1% ácido fórmico, pH 2.70

A. 26 Espectro ESI-MS de muestra representativa de manteca de cacao M6 en modo negativo.

Acquisition Parameter Report

Analysis Info

Analysis Name D:\DATA_MS\NIEVES\Nieves cacaoneg\NFM1 258-12_1.D
 Method NFM1-CACAOPRUEBANEG_071015.M
 Sample Name NFM1 258-12
 Comment

Acquisition Date 07/10/2015 04:19:39 p.m.

Operator HELENA MARUENDA
 Instrument esquire6000

Mode

Mass Range Mode Std/Normal
 Ion Polarity Negative
 Ion Source Type ESI
 Alternating Ion Polarity off
 Current Alternating Ion Pol Negative
 Divert Valve to Source

Tune SPS

Target Mass 300 m/z
 Compound Stability 100 %
 Trap Drive Level 100 %
 Optimize Normal
 Smart Parameter Setting active

Tune Source

Trap Drive 43.5
 Octopole RF Amplitude 152.8 Vpp
 Lens 2 60.0 Volt
 Capillary Exit -113.5 Volt
 Dry Temp (Set) 365 °C
 Nebulizer (Set) 40.00 psi
 Dry Gas (Set) 9.00 l/min
 HV Capillary 4000 V
 HV End Plate Offset -500 V

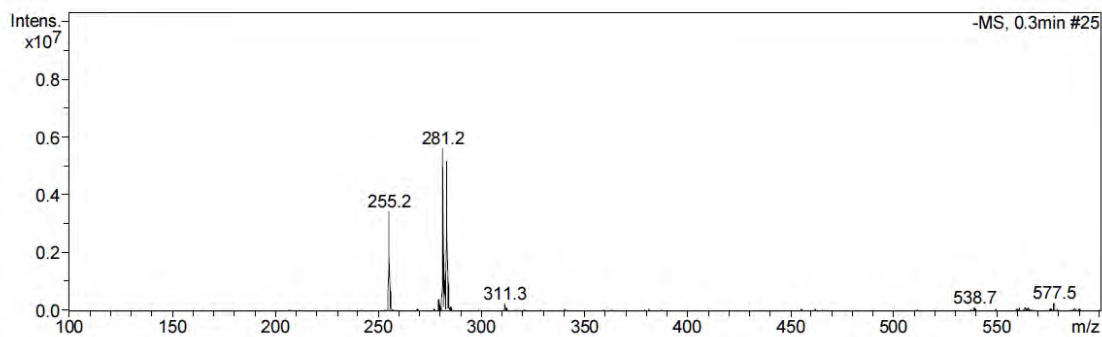
Trap

Rolling on
 Rolling, Averages 1 cts
 Scan Begin 100 m/z
 Scan End 600 m/z
 Averages 7 Spectra
 Max. Accu Time 200000 µs
 (Smart) ICC Target 7000
 ICC on

MS/MS Automatic

Auto MS/MS off

Fragmentation Options



#	m/z	I	A %	S/N
1	207.2	57453	0.6	6.8
2	212.1	31055	0.3	3.7
3	241.8	38819	0.4	4.6
4	253.2	43440	0.6	5.2
5	254.3	30276	0.3	3.6
6	255.2	3425122	57.8	407.0
7	256.2	662882	9.1	78.8
8	257.4	28158	0.5	3.3
9	258.3	52671	0.5	6.3
10	267.3	26849	0.3	3.2
11	269.1	98609	1.2	11.7
12	270.2	15097	0.2	1.8
13	277.2	72083	0.9	8.6

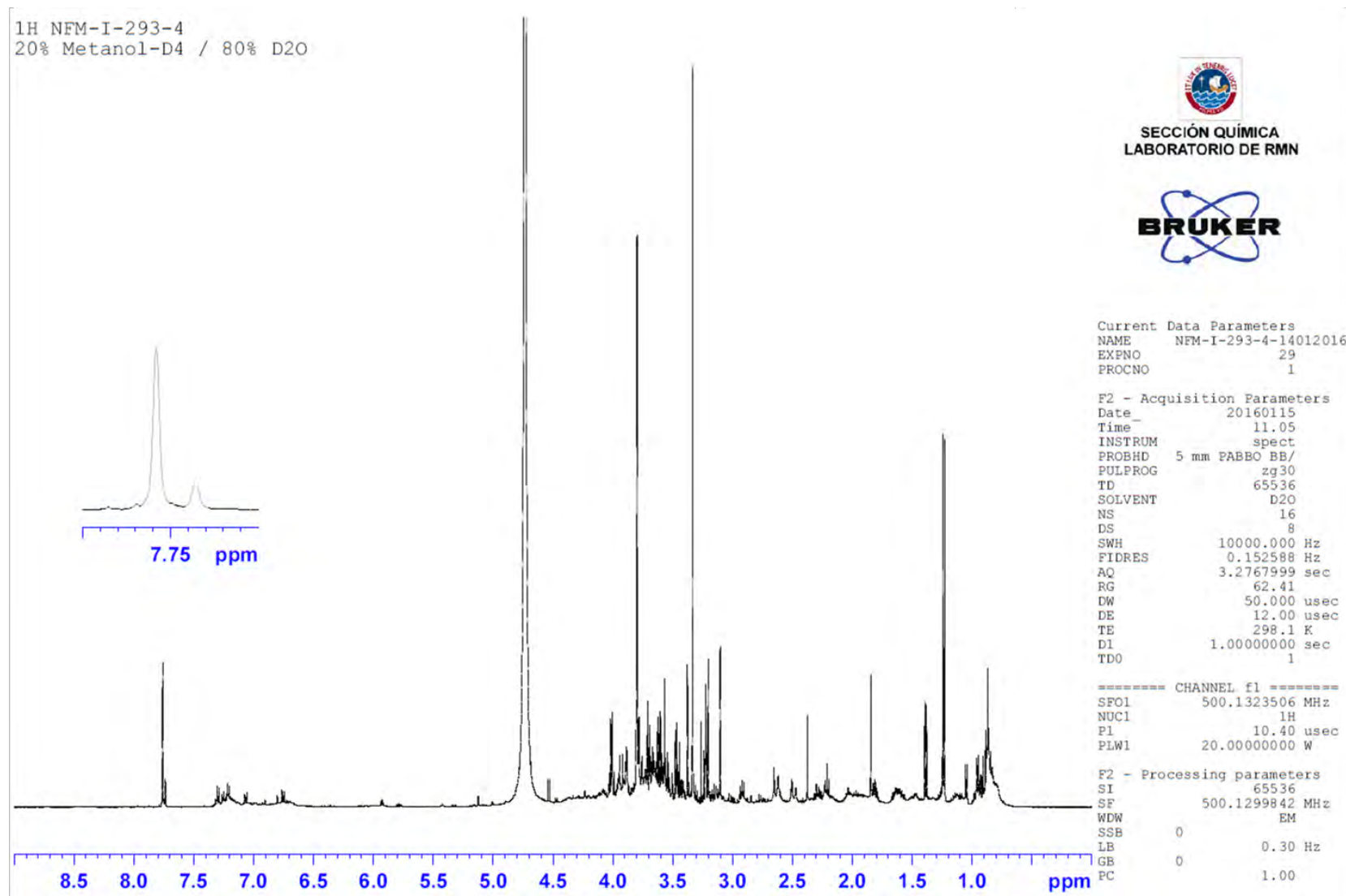
Acquisition Parameter Report

#	m/z	I	A %	S/N
14	279.3	418235	7.8	49.7
15	280.3	141683	1.6	16.8
16	281.2	5616712	100.0	667.4
17	282.2	1081496	19.5	128.5
18	283.2	5168834	91.0	614.2
19	284.2	937915	14.9	111.5
20	285.2	172965	2.8	20.6
21	286.5	11497	0.1	1.4
22	298.9	28362	0.3	3.4
23	309.1	11578	0.1	1.4
24	311.3	259888	3.9	30.9
25	312.2	113685	1.9	13.5
26	313.0	12395	0.1	1.5
27	317.1	35533	0.4	4.2
28	319.1	13753	0.2	1.6
29	320.2	14817	0.2	1.8
30	320.8	45280	0.5	5.4
31	325.2	10462	0.1	1.2
32	329.1	30516	0.3	3.6
33	334.5	21173	0.2	2.5
34	339.0	22846	0.3	2.7
35	340.3	69308	0.6	8.2
36	341.2	49533	0.5	5.9
37	347.2	22058	0.2	2.6
38	353.2	19218	0.3	2.3
39	355.2	17812	0.2	2.1
40	357.1	10559	0.1	1.3
41	359.4	34938	0.4	4.2
42	363.1	47873	0.6	5.7
43	364.4	22512	0.2	2.7
44	367.4	20775	0.3	2.5
45	372.9	25735	0.3	3.1
46	379.2	60755	0.9	7.2
47	381.1	75891	0.8	9.0
48	381.5	40902	0.3	4.9
49	383.2	17757	0.2	2.1
50	387.5	29584	0.3	3.5
51	395.0	25000	0.3	3.0
52	415.1	15422	0.1	1.8
53	429.0	23133	0.3	2.7
54	455.1	75051	0.7	8.9
55	461.9	65126	0.7	7.7
56	462.7	24422	0.2	2.9
57	465.3	38043	0.3	4.5
58	468.8	25382	0.2	3.0
59	508.6	16045	0.2	1.9
60	511.3	59261	1.2	7.0
61	512.0	20469	0.1	2.4
62	512.3	20409	0.2	2.4
63	533.4	23181	0.4	2.8
64	535.3	19965	0.2	2.4
65	536.4	22903	0.2	2.7
66	537.1	38766	0.8	4.6
67	538.7	107459	2.5	12.8
68	539.4	82956	0.9	9.9
69	548.9	11607	0.1	1.4
70	549.3	81484	1.0	9.7
71	550.3	13064	0.1	1.6
72	559.4	64914	0.9	7.7
73	559.7	67438	0.6	8.0
74	560.6	114331	1.4	13.6
75	562.5	36498	0.4	4.3
76	563.3	117876	1.8	14.0
77	563.6	121841	1.8	14.5
78	564.3	78411	0.7	9.3

Acquisition Parameter Report

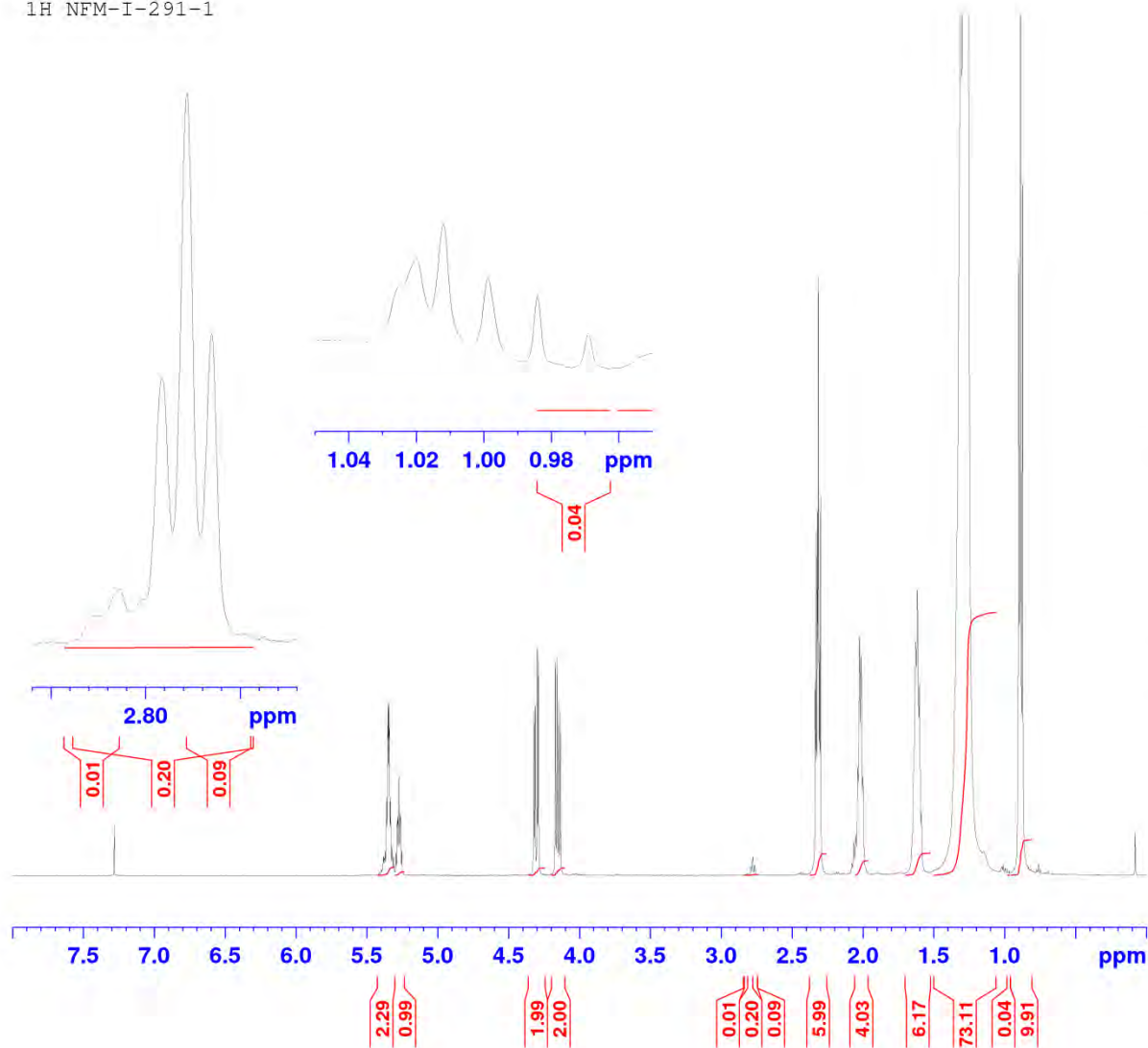
#	m/z	I	A %	S/N
79	565.0	116992	2.3	13.9
80	566.2	44186	0.5	5.3
81	566.9	56065	0.6	6.7
82	568.2	31883	0.3	3.8
83	575.6	74481	1.5	8.9
84	576.1	95003	1.1	11.3
85	577.5	282108	5.2	33.5
86	578.3	12014	0.1	1.4
87	579.0	99404	1.4	11.8
88	580.4	13812	0.1	1.6
89	581.5	17278	0.2	2.1
90	584.4	13627	0.1	1.6
91	585.6	49792	0.5	5.9
92	586.2	12247	0.1	1.5
93	586.5	31648	0.4	3.8
94	587.1	44102	0.3	5.2
95	587.6	97184	2.3	11.5
96	588.8	17897	0.3	2.1
97	589.5	77635	1.1	9.2
98	590.0	38242	0.5	4.5
99	597.9	12335	0.1	1.5
100	599.4	29291	0.3	3.5

A. 27 Espectro de ^1H -RMN de extracto metanólico del cacao



A. 28 Espectro de ¹H-RMN de manteca de cacao

1H NFM-I-291-1



SECCIÓN QUÍMICA
LABORATORIO DE RMN



Current Data Parameters
NAME NFM-I-291-13012016AS
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20160113
Time 12.52
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 176
DS 8
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 0.98
DW 50.000 usec
DE 19.79 usec
TE 298.1 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1 500.1330883 MHz
NUC1 1H
P1 9.80 usec
PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

A. 29 Poster DGI-PUCP Perfil: químico de café y cacao peruano mediante análisis multivariable por resonancia magnética y espectroscopía de masas

CIENCIAS - QUÍMICA

PERFIL QUÍMICO DE CAFÉ Y CACAO PERUANO MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIABLE POR RESONANCIA MAGNÉTICA Y ESPECTROSCOPIA DE MASAS

> **Investigadora responsable:** Helena Maruenda
 > **Asistentes de investigación:** Ana González, Alexander Nieva, Vanessa Leyva, Crishtian Cañari, Anastasia Gant, Alvaro Zevallos, Nieves Flores
 > **Co-Financiado por:** CENFROCAFE
 > **Financiado por:** Dirección de Gestión de la Investigación

> **Presentación:**
 El café y el cacao peruanos son muy apreciados a nivel mundial por sus propiedades únicas, resultado del clima privilegiado con el que cuentan algunas zonas del país. Actualmente, el Perú es el tercer productor de café de Sudamérica. En el caso del cacao, el Perú se posiciona como uno de los principales productores a nivel regional y como el segundo productor de cacao orgánico a nivel mundial. La calidad de ambos productos depende de muchos factores dentro de los cuales destacan la composición química basal del grano, que es crítica, pues a partir de ella, una vez procesado el grano, se desarrolla el sabor y aroma final del producto. Dado que la concentración relativa de los compuestos químicos que conforman estas semillas depende directamente de la variedad y de la zona de cultivo, entre otras variables (cosecha y poscosecha), es claro que distintos tipos de café y cacao poseerán perfiles químicos diferentes y, por ende, calidades distintas. Por ello, los protocolos de control de calidad de estos productos (Fig. 1-4) deben incorporar metodologías químico-analíticas como garantía de homogeneidad.

> **Objetivo:**
 Proporcionar metodología cualitativa y cuantitativa que permita generar el perfil químico de granos de café y cacao, e implementar mejoras en el control de calidad de la producción.

> **Resultados:**
 Se implementaron metodologías HPLC-DAD, RMN (1D y 2D) y ESI-DIMS para el control de la calidad de café tostado y grano de cacao. Se realizó el perfil metabólico del proceso de tostado de café mediante HPLC-DAD y RMN (1D-¹H-RMN) (Fig. 5) y de los distintos tipos de cacao mediante HPLC-DAD, ESI-DIMS y RMN (2D-COSY) (Fig. 6). Por último, se redactó una publicación científica.¹

Fig. 5 Química del café

Fig. 6 Química del cacao

Fig. 7 Control de calidad del cacao

> **Impacto:**
 Los impactos se dan en tres niveles: a) tecnológico, el uso de metodologías químico-analíticas dentro del proceso de control de calidad de estos productos permite que se planteen mejoras; b) científico, los estudios realizados involucran metodologías de punta dentro de un área en pleno desarrollo a nivel internacional, la metabólica; y c) social, un importante porcentaje de las ventas de café y cacao corresponde al esfuerzo de microempresas campesinas, miembros del programa de desarrollo de cultivos alternativos.

> **Agradecimientos:**
 Se agradece a CENFROCAFE por proporcionar las muestras para el estudio y al Vicerrectorado de investigación de la PUCP; al FINCYT por el apoyo financiero otorgado, a través del proyecto DGI-075-2014 y el PIPEI-3-080-2012, respectivamente.

¹Gant, A.; Leyva, V.; González, A.; Maruenda, H. (2015). "Validated HPLC-Diode Array Detector Method for the Simultaneous Evaluation of Six Quality Markers in Coffee 2015". Journal of the AOAC International, 98, 1, pp.98-102.

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN