

PONTIFICA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**Investigación de los compuestos volátiles asociados al sabor del chocolate producido
a partir del cacao “fino y de aroma” peruano**

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN QUÍMICA

AUTOR

Stephanie Rose Michel Zavaleta

ASESORA:

Dra. Madina Mansurova

Lima, Julio, 2019

RESUMEN

El sabor es una de las características más importantes del chocolate, además de ser un aspecto clave para determinar el precio que el consumidor está dispuesto a pagar. Actualmente, se han caracterizado dos tipos de granos de cacao según su perfil de sabor y aroma, (1) el ordinario y (2) el fino y de aroma (o FFC por sus siglas en inglés). El cacao fino y de aroma ha sido destacado frente al cacao ordinario por tener una gran variedad de sabores y presentar un perfil aromático suave, floral, frutal, a nueces y almendras.

El objeto de estudio fue el chocolate fabricado en la empresa Theobroma Inversiones S.A.C, el cual fue elaborado a partir de granos de cacao fino y de aroma de la región de Piura–Perú, por lo que esta investigación se basó en identificar los compuestos químicos que son los responsables del sabor y aroma de estos chocolates, y de analizar el desarrollo de estos compuestos durante cada una de las etapas críticas de la manufactura del chocolate.

Se lograron identificar once compuestos químicos que son los responsables del sabor del chocolate del norte del Perú en todas aquellas etapas donde el chocolate puede ser vendido, ya sea como la materia prima (cacao tostado o licor de chocolate) y producto final (barra de chocolate), mediante la técnica de separación de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se hizo una búsqueda bibliográfica de los sabores representativos de los once compuestos marcadores, y aún no se tiene información sobre el sabor de tres de estos compuestos, por lo que podría ser un inicio para investigar sobre el perfil organoléptico de estos tres compuestos químicos.

Finalmente, se implementó un protocolo por espectrometría de masas acoplada a la fuente de ionización de análisis directo en tiempo real (DART-MS) para la identificación de chocolate según el contenido de cacao y para el monitoreo de cada una de las etapas claves de la manufactura del chocolate.

Al conocer estos compuestos se puede comenzar a entender la química de la fabricación del chocolate peruano, siendo este el primer paso para poder perfeccionarla en los próximos años.

*Para Dios, mi familia
y todos aquellos
que me apoyaron
en esta etapa
de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi fuerza y soporte en todo momento. A mi esposo, por todo su apoyo y amor incondicional. Gracias por siempre animarme a ser la mejor versión de mi misma y, sobre todo, por guiarme hacia el Amor. A mi mamá, por ser una mujer valiente y dedicada, y por alentarme todos los días a no rendirme. A mi abuelita, por ser mi compañera en todo momento y esa mujer que nunca se cansa de dar amor y ternura a los demás. Este logro es también de ustedes.

A mis hermanas agustinas, que me apoyan con sus oraciones. Sé que caminan conmigo en cada paso nuevo que doy. Gracias por cada palabra de ánimo que me han brindado.

A mi asesora de tesis, Dra. Madina Mansurova, por apoyarme y acompañarme en este camino de la investigación. Gracias por su preocupación y exigencia en todo este tiempo. Por el honor de compartir con una excelente persona y profesional durante el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Alfredo Ibáñez, por cada una de sus enseñanzas. Pero, sobre todo, por su paciencia durante cada aprendizaje nuevo. Gracias por compartir sus conocimientos y por permitirme descubrir y conocer más sobre el nuevo espectrómetro de masas Orbitrap.

Al laboratorio de Bioanalítica de la PUCP por brindarme su apoyo con el uso del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas.

A cada uno de mis amigos que siempre me dieron ánimos para continuar y seguir adelante en mi etapa universitaria.

Al equipo de trabajo del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada (ICOBA) por apoyarme durante el desarrollo de mi tesis. Por cada experiencia vivida en el laboratorio.

A la empresa Theobroma Inversiones S.A.C. por proporcionarme las muestras de Cacaosuyo y la información necesaria para el desarrollo de mi tesis.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Proyecto Nacional de Innovación Agraria (PNIA 16452-2016). Además, agradecer a la Dirección de Gestión de la Investigación de la PUCP por aceptar este trabajo como ganador del concurso "PAIN" en el año 2017.

ÍNDICE GENERAL

1.	Introducción	1
2.	Objetivos	2
2.1.	Objetivo general.....	2
2.2.	Objetivos específicos.....	2
3.	Marco Teórico	3
3.1.	El Cacao En El Mundo Y En El Perú	3
3.2.	Cultivares De Cacao Y Características De Sabor	5
3.3.	Desarrollo De Compuestos De Sabor En El Tratamiento Poscosecha.....	7
3.3.1.	Cosecha.	7
3.3.2.	Fermentación.....	8
3.3.3.	Secado.	9
3.3.4.	Tostado.....	10
3.3.5.	Conchado.	11
3.4.	Técnicas De Análisis Por Espectrometría De Masas (MS)	12
3.4.1.	Análisis de compuestos volátiles de chocolate por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).	13
3.4.2.	Identificación de chocolate por espectrometría de masas acoplada a la fuente de iones de análisis directo en tiempo real (DART-MS).	15
3.5.	Análisis Estadísticos	16
3.5.1.	Análisis de componentes principales.	16
4.	Parte experimental	18
4.1.	Análisis De Los Compuestos Volátiles Del Chocolate Por Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (GC-MS).....	18
4.1.1.	Materiales.....	18
4.1.2.	Preparación de las muestras.	18
4.1.3.	Acondicionamiento de la fibra SPME.....	19
4.1.4.	Extracción de compuestos volátiles.	20
4.1.5.	Condiciones de separación de los compuestos volátiles.....	21
4.1.6.	Análisis de los datos.	21
4.1.6.1.	<i>Identificación de compuestos volátiles marcadores.</i>	22
4.1.6.2.	<i>Análisis de los componentes principales (PCA) y obtención del loading plot de los compuestos marcadores identificados.</i>	23
4.1.6.3.	<i>Análisis de las intensidades de cada compuesto marcador.</i>	23
4.1.6.4.	<i>Comparación y evaluación de los sabores identificados.</i>	24

4.2. Análisis De Los Compuestos Volátiles En Las Etapas Críticas De Fabricación Del Chocolate Por Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (GC-MS)	25
4.2.1. Materiales.....	25
4.2.2. Preparación de muestras.	25
4.2.2.1. Granos de cacao pre y post tostado.	25
4.2.2.2. Licor de cacao y manteca de cacao (aditivo alimentario)	27
4.2.3. Condiciones de análisis de las muestras.	27
4.2.4. Análisis de los datos en retrospectiva.	28
4.3. Análisis De Chocolate Y De Cada Una De Las Etapas Claves De Su Elaboración Por Análisis Directo En Tiempo Real Acoplado A Espectrometría De Masas (DART-MS)	29
4.3.1. Materiales.....	29
4.3.2. Extracción de compuestos químicos de las muestras.	29
4.3.3. Preparación de stock.	31
4.3.4. Preparación de muestras.	31
4.3.5. Calibración del equipo DART-MS.	31
4.3.6. Conexión de la fuente DART.	32
4.3.7. Introducción de la muestra.	32
5. Resultados y Discusión	34
5.1. Análisis De Los Compuestos Volátiles Del Chocolate Por Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (GC-MS)	34
5.1.1. Identificación de los compuestos marcadores.....	34
5.1.2. Análisis del loading plot del PCA de los compuestos marcadores.....	37
5.1.3. Gráfico radial de sabores de los once compuestos marcadores para los chocolates de diferentes regiones del Perú.	39
5.1.4. Identificación del fragmento molecular con menor desviación estándar relativa (RSD).....	41
5.1.5. Comparación de perfiles de sabores obtenidos por GC-MS y por un catador de chocolate.	41
5.1.6. Análisis de componentes principales (PCA) de los chocolates de diferentes regiones del Perú.	43
5.2. Análisis De Los Compuestos Volátiles En Las Etapas Críticas De Elaboración Del Chocolate Por Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (GC-MS)	45
5.2.1. Análisis de componentes principales (PCA) de las etapas críticas de elaboración del chocolate.....	45
5.2.2. Comparación de muestras de licores y granos pos tostados.	49

5.2.3. Evaluación del desarrollo de cada compuesto marcador durante cada etapa clave de elaboración del chocolate.....	54
5.2.3.1. <i>Compuestos confirmados por GC-MS/MS</i>	54
5.2.3.2. <i>Compuestos en proceso de confirmación por GC-MS/MS</i>	60
5.2.4. Evaluación del desarrollo de los sabores durante cada etapa clave de elaboración del chocolate.....	76
5.3. Análisis De Chocolate Por Análisis Directo En Tiempo Real Acoplado A Espectrometría De Masas (DART-MS)	79
5.3.1. Procesamiento de datos para el análisis de componentes principales (PCA) para la diferenciación entre chocolates de diferentes contenidos de cacao	83
5.3.2. Análisis de componentes principales (PCA) de los metabolitos involucrados en cada una de las etapas claves de elaboración del chocolate.	84
6. Conclusiones	87
7. Bibliografía	89
8. Anexo A	94
9. Anexo B	100
10. Anexo C	106
11. Anexo D	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciudades del Perú donde se produce cacao fino y de aroma.....	4
Figura 2. Mecanismo de formación y desarrollo del sabor del chocolate.....	6
Figura 3. Perfil general de sabores del cacao fino y de aroma de Perú.....	7
Figura 4. Cosecha y partición del fruto de cacao.....	8
Figura 5. Cambio del color de las semillas de cacao durante proceso de fermentación.	9
Figura 6. Proceso de secado de granos de cacao.	10
Figura 7. Proceso de tostado de granos de cacao.....	11
Figura 8. Conchado de cacao para producción de chocolate.....	11
Figura 9. Las partes y funciones más importantes del espectrómetro de masas.	13
Figura 10. Diagrama de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector (espectrómetro de masas).....	14
Figura 11. Chocolate rallado.	19
Figura 12. Acondicionamiento de la fibra SPME en el equipo Agilent 7890B GC System..	20
Figura 13. Exposición de la fibra triple (DVB/CAR/PDMS).....	21
Figura 14. Granos de cacao pre tostado.	26
Figura 15. Granos de cacao post tostado.....	26
Figura 16. Molienda de los granos de cacao pre tostado.	26
Figura 17. Chocolate rallado.	30
Figura 18. Viales con chocolate rallado y DCM.	30
Figura 19. Viales luego de la extracción de chocolate con DCM.	30
Figura 20. DART-MS conectado al espectrómetro de masas Orbitrap.	32
Figura 21. Introducción de la muestra al DART-MS.....	33
Figura 22. Diagrama de cajas y bigotes de las intensidades de cada compuesto marcador en los chocolates Cacaosuyo y del chocolate Otro A.	35
Figura 23. Loading plot del PCA de los compuestos marcadores del chocolate del norte del Perú.	38
Figura 24. El gráfico radial de los sabores presentes en el chocolate Cacaosuyo y en el chocolate Otro A.	40
Figura 25. Comparación de los (A) resultados experimentales por MS y de los (B) resultados de catación de los chocolates de Cacaosuyo.	42
Figura 26. Análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos para el chocolate Cacaosuyo (círculo rojo) y para la otra empresa chocolatera (círculo azul) mediante la técnica de GC-MS.	44
Figura 27. Análisis de componentes principales (PCA) del análisis de los compuestos volátiles en las etapas críticas de elaboración del chocolate Cacaosuyo en comparación con el chocolate Otro A.	47
Figura 28. PCA en tres dimensiones (PCA-3D) del análisis de los compuestos volátiles en las etapas críticas de elaboración del chocolate Cacaosuyo.	49
Figura 29. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los once marcadores.....	50

Figura 30. Gráficos de barras comparativas entre el licor 1 y licor 2 para los once marcadores.....	52
Figura 31. Desarrollo de la tetrametilpirazina durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	55
Figura 32. Desarrollo del acetato de 2-feniletilo durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	57
Figura 33. Desarrollo del 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	59
Figura 34. Desarrollo del compuesto marcador 1 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	61
Figura 35. Desarrollo del compuesto marcador 2 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	63
Figura 36. Desarrollo del compuesto marcador 3 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	64
Figura 37. Desarrollo del compuesto marcador 4 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	66
Figura 38. Desarrollo del compuesto marcador 5 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	68
Figura 39. Desarrollo del compuesto marcador 7 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	70
Figura 39. Desarrollo del compuesto marcador 7 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	71
Figura 40. Desarrollo del compuesto marcador 8 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	72
Figura 41. Desarrollo del compuesto marcador 10 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.	74
Figura 42. Desarrollo de los sabores en cada etapa de elaboración del chocolate.	78
Figura 43. Espectros de masas del chocolate Cacaosuyo 70% Cacao Piura Select (Bitter). Espectro de masas (A) correspondiente a la muestra extraída con pentano. Espectro de masas (B) correspondiente a la muestra extraída con diclorometano.	79
Figura 44. Espectro de masas de la muestra del chocolate Cacaosuyo 70% Cacao Piura Select (Bitter).....	80
Figura 45. Espectro de masas de la muestra de chocolate Cacaosuyo 70% Cacao Piura Nibs	81
Figura 46. Espectro de masas de la muestra de chocolate Cacaosuyo 50 % Piura Milk.	81
Figura 47. Espectro de masas de la muestra del chocolate “Otro A”.	82
Figura 48. Espectro de masas de la muestra de chocolate “Otro B”.....	82
Figura 49. Análisis de componentes principales (PCA) de los cinco chocolates analizados. (A) PCA antes del filtrado de las señales y (B) PCA después del filtrado de las señales.	84
Figura 50. PCA en tres dimensiones (PCA-3D) del análisis de los metabolitos involucrados en las etapas críticas de elaboración del chocolate Cacaosuyo, por DART-MS.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Lista de países productores de cacao fino y de aroma en el año 2016.</i>	4
Tabla 2. <i>Compuestos volátiles presentes en muestras de cacao fino y de aroma de Huila-Colombia analizadas por HS-SPME-GC-MS.</i>	15
Tabla 3. <i>Información de los once marcadores diferenciadores del chocolate Cacaosuyo.</i> ...	36
Tabla 4. <i>Relaciones entre los sabores de los compuestos marcadores propuestos en base a los valores del loading plot del PCA, los cuales fueron obtenidos mediante GC-MS.</i>	38
Tabla 5. <i>Los dos fragmentos moleculares más intensos de los compuestos marcadores y el fragmento con menor RSD (color plomo) por cada compuesto</i>	41
Tabla 6. <i>Masas empleadas para el análisis de componentes principales (PCA)</i>	83
Tabla 7. <i>Masas empleadas para realizar el PCA del análisis en retrospección</i>	84

ABREVIATURAS

DART	Análisis directo en tiempo real (<i>direct analysis in real time</i>)
DCM	Diclorometano (<i>dichloromethane</i>)
EIC	Cromatograma de iones extraídos (<i>extracted ion chromatogram</i>)
FFC	Cacao fino y de aroma (<i>fine flavour cocoa</i>)
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (<i>gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (<i>headspace solid - phase microextraction</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>principal component analysis</i>)
RSD	Desviación estándar relativa (<i>relative standard deviation</i>)
TIC	Corriente total de iones (<i>total ion current</i>)

1. Introducción

El buen sabor es uno de los atributos esenciales del chocolate y este se debe principalmente a ciertos compuestos presentes tanto en la materia prima, es decir, en el grano de cacao, como en aquellos que se van desarrollando durante el proceso de fabricación del chocolate. El Perú, al ser el segundo país productor y exportador de los granos de cacao fino y de aroma, tiene la posibilidad de convertirse en uno de los países más prominentes en el mundo del chocolate de alta gama. Por ello, la identificación de estos compuestos químicos, que son los responsables de darle el sabor especial al chocolate, es de gran utilidad para incrementar su valor final.

Actualmente no se tiene información sobre cómo los precursores de sabor presentes en el cacao fino y de aroma peruano se van transformando durante cada una de las etapas de manufactura del chocolate. Por esta razón, la presente investigación abordó el análisis y la identificación de los compuestos precursores (o marcadores) del chocolate del norte del Perú para evaluar cómo se van desarrollando durante su proceso de elaboración.

Para lograr este objetivo, se usó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, siendo esta última una técnica analítica bastante útil y versátil para analizar muestras de alimentos, y que además, tiene la gran ventaja de identificar compuestos desconocidos.

Este estudio analítico puede ser de gran utilidad tanto en la industria chocolatera del Perú, para incrementar el valor final del chocolate producido a partir del conocimiento de los compuestos marcadores de sabor, como en las próximas investigaciones sobre el chocolate peruano.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Identificar los compuestos químicos que pueden asociarse al sabor del chocolate peruano para monitorear cómo estos se van desarrollando durante las etapas claves de su elaboración industrial.

2.2. Objetivos específicos

- Optimizar la preparación de muestras del chocolate, granos de cacao prefermentados, postostados y licor de cacao para el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Analizar las muestras de chocolate “Cacaosuyo” de la empresa Theobroma Inversiones S.A.C usando GC-MS.
- Analizar las muestras de los granos de cacao (de Morropón-Piura) prefermentados, postostados y licor de cacao, con los que se fabrica el chocolate “Cacaosuyo”, usando GC-MS.
- Automatizar el procesamiento de los datos usando el programa estadístico MatLab.
- Analizar muestras de chocolate originarias de otra región del Perú, para generar una base de datos para identificar marcadores diferenciadores de chocolate producidos a partir de granos de cacao de dos regiones diferentes del Perú.
- Diseñar un protocolo de identificación de chocolate, según el contenido de cacao, mediante la técnica de espectrometría de masas acoplada a la fuente de ionización de análisis directo en tiempo real (DART-MS).

3. Marco Teórico

3.1. El Cacao En El Mundo Y En El Perú

El chocolate es uno de los productos más consumidos a nivel mundial por su único e incomparable sabor, siendo el grano de cacao el principal componente para su producción. El árbol de cacao (*Theobroma cacao L.*) crece en zonas tropicales que se encuentran a temperaturas entre los 20°C y 30°C (Centro de Innovación del Cacao, CIC, s.f). El fruto, también conocido como mazorca, contiene en su interior de 20 a 45 granos inmersos en una pulpa mucilaginosa, blanquecina, gelatinosa y dulce. La textura del fruto y otras características de la misma varían de acuerdo a su origen botánico, ubicación de crecimiento y condiciones de cultivo (Recalde, 2007; Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2008). Adicionalmente, se han caracterizado 2 tipos de granos de cacao según su perfil de sabor y aroma, (i) el ordinario (o a granel) y (ii) el fino y de aroma, donde este último ha sido destacado por tener una gran variedad de sabores y presentar un perfil aromático suave, floral, frutal, a nueces y almendras (Corporación Fortaleza del Valle, 2015).

La producción de cacao fino y de aroma representa el 8% de la producción mundial de cacao (Armando, 2016). En el Perú, se conoce que el 75% de la producción total de cacao es de fino y de aroma (International Cocoa Organization, ICCO, 2016) y, como se observa en la Tabla 1, el Perú ocupa el segundo lugar entre los principales países productores y exportadores de este tipo de cacao (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 2017). En nuestro país, el origen de estos granos de cacao fino y de aroma se encuentran en algunas provincias y localidades (ver Figura 1) como, por ejemplo, Chanchamayo (Junín), Chulucanas (Piura), Ucayali, Cuzco, Tingo María (Huánuco), San Martín y Tumbes (Brelinski, 2018).

Tabla 1. Lista de países productores de cacao fino y de aroma en el año 2016.

País	Exportaciones totales del país clasificado como cacao fino y de aroma	Producción total de cacao (toneladas)	Producción de cacao fino y de aroma para exportación (toneladas)
Ecuador	75%	177551	133.163,25
Peru	75%	107922	80.941,50
Colombia	95%	56163	53.354,85
Papua Nueva Guinea	90%	44943	40.448,70
Republica Dominicana	40%	81246	32.498,40
México	100%	26863	26.863,00
Venezuela	100%	23254	23.254,00
Madagascar	100%	11354	11.354,00
Indonesia	1%	656817	6.568,17
Bolivia	100%	6143	6.143,00
Granada	100%	800	800,00
Jamaica	95%	725	688,75
Costa Rica	100%	650	650,00
Honduras	50%	802	401,00
Trinidad y Tobago	100%	297	297,00
Nicaragua	100%	5,85	5,85
Guatemala	50%	11,567	5,78

Nota. Tomado de “Países exportadores de cacao fino y de aroma”, por ICCO, 2016 y, tomado de “Datos estadísticos de producción de cacao fino y de aroma en el Perú”, por FAO, 2016.

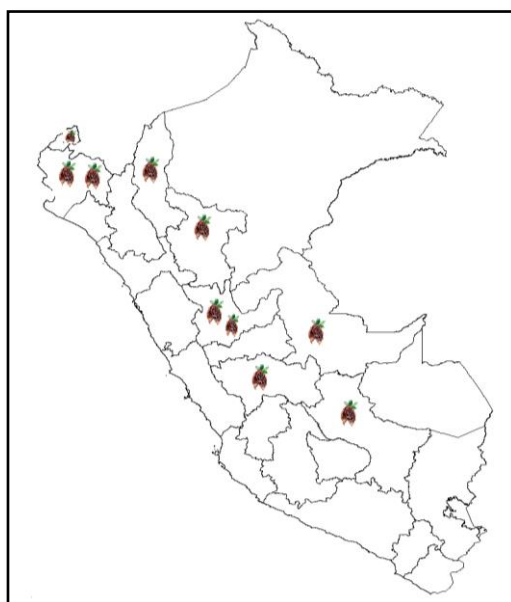


Figura 1. Ciudades del Perú donde se produce cacao fino y de aroma.

Tomado de “Base de datos de tipos de granos de cacao”, por Brelinski, 2018.

En los últimos años ha crecido la demanda del cacao fino y de aroma a nivel mundial, ofreciendo una oportunidad de crecimiento económico para los países productores de cacao fino (Iniciativa Latinoamericana del Cacao, 2018). Por ese motivo, en el Perú se está trabajando para aumentar las áreas de siembra y productividad del cacao fino y de aroma (Andina, 2018).

3.2. Cultivares De Cacao Y Características De Sabor

Se han clasificado cuatro variedades de plantas de cacao debido a las diferencias que cada uno brinda en el sabor del chocolate: Criollo, Forastero, Trinitario y Nacional. Además, estos sabores han sido atribuidos al origen geográfico y botánico, y a las condiciones de cultivo, aunque también pueden estar influenciados por las condiciones y la tecnología del procesamiento poscosecha (fermentación, tostado, conchado, etc.) y el almacenamiento. Por otro lado, las diferencias de sabores, que provienen de un mismo tipo de cacao, se deben principalmente a factores cuantitativos en los contenidos azúcares, polifenoles y descomposición enzimática de polisacáridos que son una fuente importante de precursores de sabor. Pero, hay dos compuestos químicos que están presentes en todos los tipos de plantas de cacao: la teobromina y la cafeína. Estos son los dos principales compuestos pseudo alcaloides que son inherentes a las plantas de cacao (Brunetto et al., 2007).

Las diferentes áreas productoras y los métodos de procesamiento (ver *Figura 2*) impactan en la composición química de los granos de cacao, que conducen a diferentes propiedades aromáticas y de sabor del chocolate (Aprotosoie, Luca, & Miron, 2016; Reineccius, 2006; Liu et al., 2016).

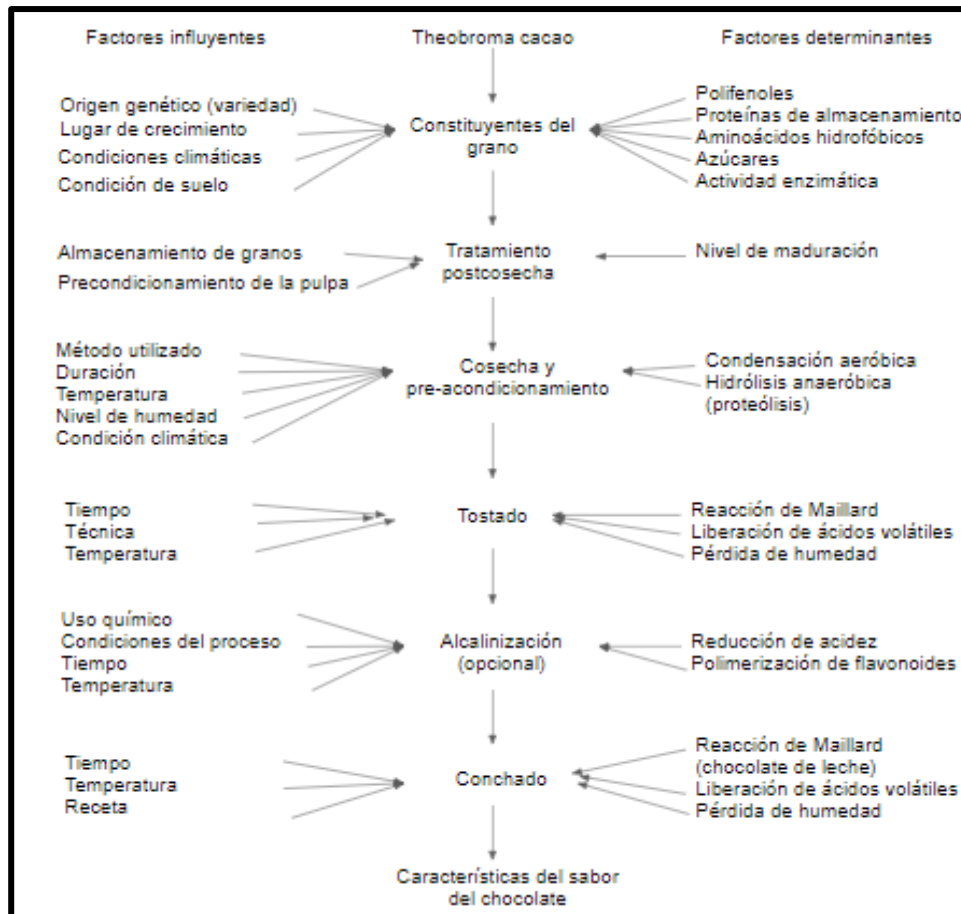


Figura 2. Mecanismo de formación y desarrollo del sabor del chocolate.

Tomado de "Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review, por Afoakwa et al., 2008.

Existen diversos compuestos químicos que son precursores del sabor del cacao y que fueron formados durante todo el proceso de producción de chocolate, y además, varían de acuerdo con el clima y el genotipo de cacao. Estos compuestos son alcaloides (teobromina, cafeína) que contribuyen con el sabor amargo; polifenoles (catequinas, antocianinas y proantocianidinas) que son los responsables del sabor astringente, frutal y herbal; proteínas (albúmina y globulina) y carbohidratos (azúcares como fructosa, glucosa, galactosa; polisacáridos como celulosa, pentosas) (Aprotosoie et al., 2016).

En la Figura 3 se muestran los sabores más predominantes en el cacao peruano, que es principalmente de la especie Criollo. En esta misma figura se observa que el sabor frutal, amargo y a vino son los que más predominan, pero cabe señalar que se trata de un promedio

de intensidades de sabores, por lo que tampoco se puede indicar que sean los únicos. Este perfil de sabores pueden variar por el origen geográfico, condiciones climáticas, tipo de suelo, como también por las condiciones de elaboración del chocolate, ya sea por el proceso de fermentación, de tostado, etc.



Figura 3. Perfil general de sabores del cacao fino y de aroma de Perú.
Tomado de “Sabores del chocolate por origen”, por Ferro, 2013.

3.3. Desarrollo De Compuestos De Sabor En El Tratamiento Poscosecha

3.3.1. Cosecha.

La cosecha del cacao se realiza una vez que la mazorca está madura y esto se reconoce por el cambio de color en la cáscara del fruto. Se evita cosechar mazorcas de color verde porque no presentan suficiente cantidad de azúcares en la pulpa, teniendo como consecuencia una insatisfactoria fermentación. En la Figura 4 se muestra cómo las mazorcas se parten por la mitad, y se extraen las semillas (CIC, 2018; Recalde, 2007).



Figura 4. Cosecha y partición del fruto de cacao.

Tomado de Exportación de cacao de Tocache a Estados Unidos y Suiza”, por Inforegión, 2013.

3.3.2. Fermentación.

La fermentación es un proceso clave para el desarrollo de precursores de sabor tales como azúcares reductores y compuestos nitrogenados. En este proceso se reduce el sabor astringente y amargo (Aprotosoiaie et al., 2016). En la fermentación ocurren ciertas reacciones bioquímicas como, por ejemplo, que los azúcares presentes en el mucílago (con un pH menor a 4) como sacarosa, glucosa y fructosa, son sometidos a fermentación alcohólica por acción de levaduras, produciendo así etanol, ácido láctico, ácido acético y dióxido de carbono. Luego, de 48 a 96 horas, la actividad de la levadura se inhibe por aireación e incremento de pH por la disminución de ácido cítrico provocando el aumento de bacterias del ácido láctico (Aprotosoiaie et al., 2016; CIC, 2018; Ho, Zhao, & Fleet, 2014).

En la Figura 5 se muestran los cambios de color de los granos de cacao, durante la fermentación, debido al pardeamiento enzimático catalizado por polifenol oxidasa donde los granos de cacao pasan de un color gris oscuro (antes de la fermentación), a púrpura (parcialmente fermentado) y, finalmente, a marrón (Caligiani, Cirlini, Palla, Ravaglia, & Arlorio, 2007; Aculey et al., 2010).

Finalmente, son diversos los factores que influyen en el proceso de fermentación tales como: el tiempo (días), el almacenamiento de granos de cacao, el tipo de cacao, la velocidad y el método de fermentación (Afoakwa, 2012).



Figura 5. Cambio del color de las semillas de cacao durante proceso de fermentación.
Tomado de “Proceso del cultivo de cacao”, por Cocoa Ecuador, s.f.

3.3.3. Secado.

En este proceso, que dura entre 5 a 7 días, se reduce la humedad del grano de cacao de un 55% a 7 - 7.5% para impedir la sobrefermentación, la contaminación por moho y el daño del grano durante el almacenamiento (Aprotosoiaie et al., 2016; CIC, 2018).

En esta etapa siguen ocurriendo cambios físicos como el desarrollo del color marrón del grano (ver Figura 6). Además, los procesos oxidativos iniciados en la fermentación, continúan durante esta etapa, como por ejemplo, polifenol oxidasas catalizan la transformación de polifenoles a quinonas. Estas se someten después a una condensación adicional con grupos amino y sulfhidrilo libres que provocan el desarrollo de polímeros marrones, produciendo más precursores de sabor y aroma, además de seguir reduciendo la astringencia, acidez y amargor (Aprotosoiaie et al., 2016; CIC, 2018; Guehi, Dabonne, Ban-Koffi, Kedjebo, & Zahouli, 2010).

Un buen proceso de secado se caracteriza por la calidad de los granos de cacao: coloración marrón, baja astringencia y amargura, ausencia de sabores desagradables. Por el contrario, el secado incompleto produce compuestos de carbonilo que presentan olores fuertes y desagradables (Afoakwa et al., 2008).

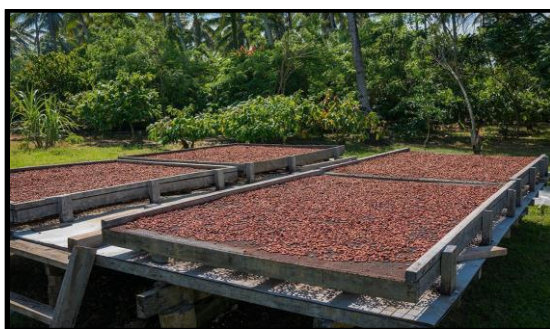


Figura 6. Proceso de secado de granos de cacao.

Tomado de “Semillas de cacao y productos derivados del cacao”, por Huyser Möller B.V., s.f.

3.3.4. Tostado.

El tostado (ver Figura 7) es una etapa muy importante del procesamiento del grano de cacao porque se desarrolla el típico sabor tostado del cacao y el contenido de humedad se reduce al 1 - 2% (Giacometti, Jolić, & Josić, 2015). Además, se mantienen los compuestos no volátiles como los ácidos oxálico, cítrico, tartárico, succínico y láctico y, por el contrario, se reduce la concentración de los compuestos volátiles no deseados como el ácido acético. En esta etapa sigue disminuyendo la astringencia porque una mayor proporción de polifenoles reacciona con las proteínas (Awua, 2002).

Para obtener una buena calidad de sabor del cacao, se debe alcanzar las condiciones adecuadas para el tostado, como la temperatura y el tiempo, ya que a elevadas temperaturas y a tiempos largos pueden generarse compuestos que dan un sabor quemado y desagradable. Además, estas condiciones dependen del tipo de cacao con el que se esté trabajando y del tipo de sabor que se desea obtener (Afoakwa et al., 2008).



Figura 7. Proceso de tostado de granos de cacao.
Tomado de "Process of manufacture", por Chocolateo, s.f.

3.3.5. Conchado.

El conchado es la última etapa para la fabricación de chocolate y es esencial para el desarrollo final del sabor y de la textura suave y sedosa del chocolate. Además, reduce la concentración de ácidos libres y ácidos volátiles residuales, disminuyendo así los sabores desagradables. En este proceso térmico se usa un rango de temperaturas entre 40°C y 82°C (dependiendo del tipo de chocolate que se quiere obtener) para ir eliminando la humedad y ciertos compuestos volátiles no deseados (Dimick & Hoskin, 1999). Finalmente, se observa en la Figura 8 cuando el polvo de los granos de cacao se convierten en pasta de cacao o licor de cacao mediante el uso de una prensa hidráulica (Aprotosoai et al., 2016; Afoakwa et al., 2008).



Figura 8. Conchado de cacao para producción de chocolate.
Tomado de "Step 6: Conching, tempering, molding", por The Ohio State University, 2015.

3.4. Técnicas De Análisis Por Espectrometría De Masas (MS)

La espectrometría de masas es una poderosa técnica analítica que es útil para identificar compuestos desconocidos dentro de una muestra. La técnica además permite identificar la fórmula química (y a veces la estructura) de diferentes moléculas. Esta técnica se inicia con la ionización de los componentes de la muestra en fase gaseosa. Estos iones son analizados y detectados en base a la relación de masa / carga (m/z) y registrados en términos de sus abundancias relativas. Los componentes principales del instrumento son: el sistema de introducción de muestras; la fuente de ionización (donde se producen los iones gaseosos de la muestra); el analizador (donde se separa a estos iones gaseosos en base del radio de masa-carga (m/z)); y el detector (donde se detectan los iones y se registra la abundancia relativa de cada uno de ellos) (ver Figura 9). Luego, todas las señales se traducen en señales eléctricas que son leídas por un software (de Hoffmann & Stroobant, 2013).

La espectrometría de masas tiene diferentes aplicaciones, en los últimos años una de las más utilizadas ha sido la de analizar alimentos, teniendo un gran impacto en la industria alimentaria al ser una útil herramienta para el control de calidad de los alimentos (Careri, Bianchi, & Corradini, 2002). El chocolate ha sido uno de los recientes productos analizados por esta técnica analítica, y ha tenido un gran impacto a nivel científico, dando como resultado los compuestos responsables del buen sabor del chocolate (Aprotosoie et al., 2016).

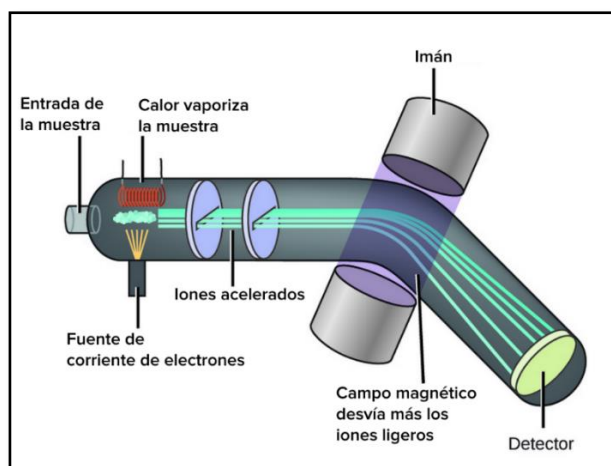


Figura 9. Las partes y funciones más importantes del espectrómetro de masas.

Tomada de “*Espectrometría de masas (MS); fundamento y equipos de tecnología avanzada*”, por Analitek, 2018.

3.4.1. Análisis de compuestos volátiles de chocolate por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

La calidad del producto se caracteriza por sus cualidades organolépticas, siendo los compuestos volátiles los precursores del aroma y sabor del chocolate. De acuerdo a estudios previos en diferentes regiones se han determinado diferentes compuestos volátiles como: aldehídos y cetonas (benzaldehído, fenilacetaldehido, acetofenona), alcoholes (2,3-butanodiol, fenetil alcohol), ésteres (etilbenzoato, 2-fenil acetato), ácidos (ácido acético); pirazinas (2,5-dimetilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina, tetrametilpirazina), terpenos (linalool, óxido de linalool) y pirroles (acetilpirrol) (Machado, Ordoñez, Sánchez, Guaca, & Suárez, 2018). No todos los compuestos volátiles pueden contribuir al aroma de los alimentos, por lo tanto, solo pequeñas cantidades de olores son responsables del aroma característico del cacao.

La cromatografía de gases es una técnica de separación que consiste en vaporizar una muestra haciéndola pasar a través de una columna cromatográfica. Después de pasar por la columna, los compuestos presentes en la muestra van siendo separados y eluidos de acuerdo al peso molecular e interacción con el tipo de columna cromatográfica. Finalmente, estos analitos son transportados hacia el detector, que es la fuente de iones del espectrómetro de

masas, para que sean ionizados y finalmente detectados (ver Figura 10) (Skoog, Holler, & Crouch, 2013).

Para esta investigación es muy útil el análisis por GC-MS, porque el objetivo es poder separar todos los compuestos volátiles presentes en cada una de las muestras de granos de cacao, licor y chocolate. Por ello, las ventajas del análisis por GC-MS son que tiene una alta capacidad resolutive para separar compuestos orgánicos volátiles y que hay abundante información de espectros de masas de ionización por electrones con miles de compuestos en librerías estandarizadas que hacen mas sencilla la interpretación de datos e identificación de los compuestos.

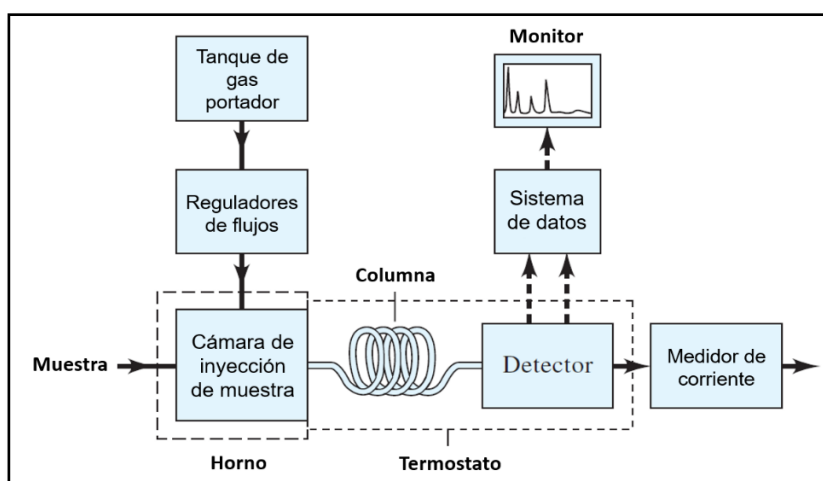


Figura 10. Diagrama de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector (espectrómetro de masas).

Tomado de "Principles of instrumental analysis", por Skoog, 2013.

Hay diversos estudios que han reportado el análisis de compuestos volátiles mediante esta técnica, usando microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME-GC-MS). Una investigación reciente identificó catorce compuestos químicos que contribuían con el aroma del cacao colombiano (ver Tabla 3), siendo ácido acético, tetrametilpirazina y 2,3-butanodiol los más representativos. Estos tres compuestos identificados fueron similares a los reportados por grupos en otros países; además, se relacionó cómo influye el aroma del cacao

con el proceso de poscosecha (Machado et al., 2018; Magi, Bono, & Di Carro, 2012; Rodriguez, Escalona, Orozco, Lugo, & Jaramillo, 2011; Chetschik, y otros, 2017; Albak & Tekin, 2016).

Tabla 2. *Compuestos volátiles presentes en muestras de cacao fino y de aroma de Huila-Colombia analizadas por HS-SPME-GC-MS.*

Grupo Funcional	Compuesto	Atributo
Aldehídos y cetonas	Benzaldehído	Nueces
	Fenilacetaldéhído	Nueces
	Acetofenona	Manteca
Alcoholes	2,3-butanodiol	Floral
	Fenil alcohol	Frutal
Ésteres	Etilbenzoato	Floral
	2-fenil acetato	Floral
Ácidos	Ácido acético	Astringente
Pirazinas	2,5-dimetilpirazina	Cacao
	2,3,5-trimetilpirazina	Cacao
	Tetrametilpirazina	Cacao
Terpenos	Linalool	Floral
	Óxido de linalool	Floral
Pirroles	Acetilpirrol	Chocolate-avellana-cacao

Nota. Tomado de “*Organoleptic quality assessment of Theobroma cacao L. in cocoa farms in northern Huila, Colombia*”, por Machado et al., 2018.

3.4.2. Identificación de chocolate por espectrometría de masas acoplada a la fuente de iones de análisis directo en tiempo real (DART-MS).

DART es una fuente de iones que, actualmente, es utilizada para realizar análisis de manera rápida y, puede producir iones positivos o negativos según el potencial que se le aplique. Además, no requiere de una ardua preparación de muestra porque esta técnica tiene la ventaja de analizar muestras directamente en la superficie sin necesidad de extraer con solventes. DART es una técnica para rápidos análisis de una gran variedad de muestras, tanto volátiles como no volátiles, además es utilizado para análisis de control de calidad de materiales sólidos o líquidos a granel para identificar compuestos biomarcadores. El uso de esta fuente

acoplada a espectrometría de masas tiene aplicaciones farmacéuticas, ambientales, de control de calidad de alimentos, de identificación de drogas y de sustancias controladas (Cody, Laramée, Nilles, & Durst, 2005; Kern, Crowe, Litzau, & Heitkemper, 2017).

Kern et al. (2017) realizó un análisis forense mediante el uso de DART-MS y, logró identificar las señales de teobromina (m/z 181.07212) y cafeína (m/z 195.0875) presentes en un área manchada del pantalón de uno de los sospechosos de un crimen.

Por lo tanto, las ventajas antes mencionadas, hacen que el uso del DART-MS para el tipo de aplicación en esta investigación sea muy satisfactoria e interesante, pues el tiempo de análisis es corto y solo es necesario microlitros de muestra (Cody et al., 2005; Gross, 2013).

3.5. Análisis Estadísticos

3.5.1. Análisis de componentes principales.

El análisis de componentes principales se ha convertido en uno de los métodos analíticos más importantes y poderosos en la quimiometría y en los diferentes campos de la ciencia (Bro & Smilde, 2014). Este análisis es una técnica de multivariantes que analiza un conjunto de datos en términos de variables y muestra el patrón de similitud y varianza de estos datos (Abdi & Williams, 2010). El PCA puede ser utilizado para revelar las relaciones entre las variables y muestras, detectar valores atípicos, cuantificar patrones y generar nuevas hipótesis sobre los datos obtenidos (Bro & Smilde, 2014).

La utilidad de esta técnica en análisis de compuestos químicos del cacao es determinar cuáles son los compuestos más importantes en cada etapa de la manufactura del chocolate (Rodríguez et al., 2011). Además, permite calcular el porcentaje de variabilidad de los datos

obtenidos y cómo estos se relacionan con los atributos sensoriales y el proceso poscosecha (Machado et al., 2018).

En este estudio se obtendrá una cantidad grande de datos, por lo que este análisis multivariante será de gran utilidad. Además, permite agrupar a todo el conjunto de datos en diferentes clústeres, lo que ayuda a poder interpretar los resultados de manera eficiente (Bro & Smilde, 2014).

4. Parte experimental

4.1. Análisis De Los Compuestos Volátiles Del Chocolate Por Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (GC-MS)

4.1.1. Materiales.

Se analizaron dos diferentes grupos de chocolates. El primero corresponde a los chocolates Cacaosuyo de la empresa Theobroma Inversiones S.A.C. la cual utilizan granos de cacao “fino y de aroma” de la región de Piura-Perú. Dentro de este primer grupo se utilizaron tres tipos de barra de chocolate: Piura Select (70% de contenido de cacao y, al que se le denominará Bitter), Piura Nibs (70% de contenido de cacao, además de contener nibs de cacao) y Piura Milk (50% de contenido de cacao). El segundo grupo corresponde a un chocolate con 70% de contenido de cacao que ha sido elaborado con granos de cacao de otra región del Perú, al que denominaremos “Otro A”. Todas las muestras de chocolate mencionadas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C.

4.1.2. Preparación de las muestras.

Se ralló 1 g de cada tipo de chocolate en un mortero hasta formar un polvo fino (ver Figura 11). Luego, el polvo de chocolate fue añadido a un vial con septo.



Figura 11. Chocolate rallado.

4.1.3. Acondicionamiento de la fibra SPME.

Los compuestos volátiles de cada muestra de chocolate fueron extraídos usando la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME, por sus siglas en inglés). La fibra que se usó para la extracción fue 50/30 μm divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, Stableflex 24 Ga, Manual Holder) de la marca Supelco. De acuerdo a Rodríguez et al. (2011), el uso de la fibra DVB/CAR/PDMS para análisis organoléptico de cacao permite obtener una buena separación de los picos cromatográficos.

Se acondicionó la fibra SPME en el equipo de GC-MS Agilent 7890B GC System durante 15 minutos. El acondicionamiento consistió en exponer la fibra dentro del inyector del GC, la cual se encontraba a una temperatura de 250°C (ver Figura 12).

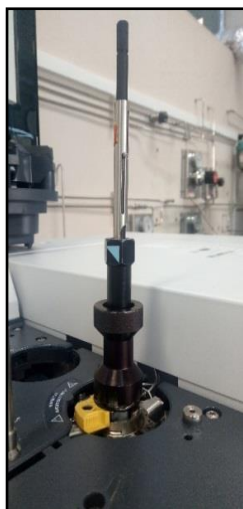


Figura 12. Acondicionamiento de la fibra SPME en el equipo Agilent 7890B GC System.

4.1.4. Extracción de compuestos volátiles.

Después de haber acondicionado la fibra, se llevó la muestra de chocolate a 60°C por 15 minutos, en un bloque termostático, para equilibrar el espacio de cabeza previo al muestreo y, después de ese tiempo, se expuso la fibra por 30 minutos (ver Figura 13). La exposición de la fibra se realizó de la siguiente manera: primero se introdujo la aguja del SPME, haciendo un pequeño agujero en la tapa del vial con septo luego se verificó que la aguja se viera en la parte superior del vial; después se bajó el émbolo del SPME para que la fibra se expusiera. En esta parte se tuvo el detalle de observar que la fibra no estuviera tocando la muestra sólida, sino que esté unos centímetros arriba del chocolate en polvo. Después de los 30 minutos de exposición de la fibra, esta se retrajo antes de retirar el SPME del vial y finalmente se guardó la aguja con ayuda del émbolo.



Figura 13. Exposición de la fibra triple (DVB/CAR/PDMS).

4.1.5. Condiciones de separación de los compuestos volátiles.

Los compuestos volátiles que fueron adsorbidos por la fibra fueron analizados en el equipo de GC-MS. Este equipo tenía una columna capilar VF-23ms (50% cianopropil, 50% dimetilpolisiloxano, alta polaridad, longitud 30 m, diámetro 0.25 mm, grosor de película 0.25 μm). El horno del equipo fue sometido a una rampa de temperaturas durante el análisis y, fue el siguiente: la temperatura inicial fue de 40°C durante 5 minutos, luego empezó a incrementarse hasta 200°C con una gradiente de 5°C/min y, finalmente se mantuvo en 200°C por 1 minuto. El modo de inyección de la fibra SPME fue manual y se expuso la fibra después de haber introducido la aguja del SPME. Este se deja expuesto por 10 minutos y luego, es retirado. Este detalle se realizó en todas las mediciones para evitar que la fibra se deteriore rápidamente al estar expuesta a alta temperatura.

4.1.6. Análisis de los datos.

Se hizo un análisis no dirigido de los cromatogramas obtenidos, lo que significa que se buscaron todos los compuestos presentes en cada medición. Luego de obtener los

cromatogramas y espectros de masas de cada muestra analizada, se integraron todos los picos cromatográficos usando el software del equipo GC-MS (Enhanced ChemStation, Agilent Technologies), y en cada integración se accedió a la base de datos NIST 2.0 Mass Spectral Search Program y a la Biblioteca espectral MS NIST 2011 que permitió acceder a una lista de compuestos probables en función del porcentaje de equivalencia entre espectro de masas experimental y el teórico. En una hoja de cálculo de Excel, se insertaron los datos de cada muestra, donde se especificaba el tiempo de retención (minutos), el área de integración de la señal, el compuesto según la biblioteca espectral NIST, el peso molecular y la fórmula molecular.

Debido a que en un espectro de masas, uno es capaz de encontrar entre 10,000 y 100,000 señales, un paso crítico fue (i) eliminar señales que estén asociadas con el ruido técnico (señales instrumentales no deseadas), y (ii) diferenciar señales de interés del ruido biológico (señales provenientes de las muestras que no estén relacionadas con la pregunta de interés).

Además, se hizo todo este mismo procedimiento para el análisis de chocolate de otra empresa chocolatera para así, poder compararla con el de Cacaosuyo e identificar qué compuestos son marcadores de Cacaosuyo frente a otros chocolates. Este chocolate ha sido elaborado con granos de cacao de otra región del Perú y, lo llamaremos “Otro A”.

4.1.6.1. Identificación de compuestos volátiles marcadores.

Para poder identificar qué señales son de interés, se realizó el análisis de ANOVA, con el que se obtuvieron los valores p . Estos valores indican qué tan diferentes son los datos de los chocolates de Cacaosuyo y los del chocolate de otra región del Perú. Por lo tanto, se seleccionaron todas aquellas señales que tenían un valor p menor a $1E-06$, y a esas señales, que correspondían a un compuesto químico, se les asignó como compuesto marcador. Finalmente,

con este procesamiento de datos, se seleccionaron once compuestos que presentaban una diferencia significativa entre ambos grupos de chocolates analizados.

4.1.6.2. *Análisis de los componentes principales (PCA) y obtención del loading plot de los compuestos marcadores identificados.*

Se usó el programa estadístico Matlab (versión R2019a y suministrado por MathWorks) para realizar el método multivariable de análisis conocido como el análisis de componentes principales (PCA), el cual es un análisis estadístico multivariante que permite visualizar más fácilmente la relación entre un grupo de muestras.

Luego de obtener los valores para el PCA, se obtuvieron los datos del *loading plot* del PCA, que es una evaluación estadística que agrupa las señales correlacionadas entre sí en un mismo cuadrante (Okuma et al., 2017).

4.1.6.3. *Análisis de las intensidades de cada compuesto marcador.*

Para poder conocer la intensidad de los sabores presentes en cada compuesto marcador, se hizo el procesamiento de los datos obtenidos en cada medición, donde, primero se seleccionaron los dos fragmentos moleculares más intensos, presentes en el espectro de masas dentro del rango de área de cada pico cromatográfico correspondiente a cada uno de los marcadores determinados.

Luego, se obtuvieron las intensidades relativas de cada fragmento molecular de cada compuesto marcador en el cromatograma de iones extraídos (EIC). Cada uno de los valores de las intensidades relativas eran divididos por la suma total de las intensidades de todos los fragmentos moleculares presentes en todo el espectro de masas de cada muestra medida. La suma total de estos fragmentos moleculares fueron obtenidas por el cromatograma de la

corriente iónica total (TIC). Los valores obtenidos, luego de este primer paso de procesamiento de señales, fueron transformados a escala logarítmica porque los valores eran muy pequeños.

Cada valor logarítmico era restado por el menor valor logarítmico de toda la matriz. Después se obtenía una nueva matriz con los datos que resultaron de la resta y, se sacó el promedio de estos datos por cada conjunto de muestras. Finalmente, se seleccionaron los valores de uno de los dos fragmentos moleculares, de cada compuesto marcador, que tenía una desviación estándar relativa (RSD) menor y, con esos datos seleccionados se armó la matriz final de valores.

4.1.6.4. Comparación y evaluación de los sabores identificados.

Para poder realizar la comparación entre los resultados experimentales con los del catador de la empresa Theobroma Inversiones S.A.C., se hizo el *loading plot* del PCA con la matriz final de los datos. Con los resultados del *loading plot* se observó las correlaciones entre los sabores de los compuestos marcadores. Se identificaron cinco grupos de sabores con las correlaciones. Finalmente, se promediaron las intensidades de los sabores que están correlacionados entre sí y con esos datos finales se hicieron los gráficos radiales correspondientes.

4.2. Análisis De Los Compuestos Volátiles En Las Etapas Críticas De Fabricación Del Chocolate Por Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (GC-MS)

4.2.1. Materiales.

Las muestras analizadas fueron el grano de cacao pre tostado, post tostado y licor de cacao (también llamado pasta de cacao) proporcionados por la empresa que trabaja a partir de granos de cacao de la provincia de Piura . Las tres primeras muestras fueron almacenadas en un lugar fresco, a temperatura ambiente, mientras que el licor de cacao fue almacenado en refrigeración a 4°C.

4.2.2. Preparación de muestras.

4.2.2.1. Granos de cacao pre y post tostado.

Se pesó aproximadamente 3 g de cada tipo de grano (ver Figura 14 y Figura 15) y se utilizó un molinillo para poder molerlos con facilidad (ver Figura 16). La molienda se realizó durante 20 segundos continuos para evitar que se perdieran algunos compuestos volátiles. Inmediatamente después de ese tiempo, con ayuda de una espátula, se agregó 0.8 g de esa mezcla en cada vial con septo (por triplicado).



Figura 14. Granos de cacao pre tostado.



Figura 15. Granos de cacao post tostado.



Figura 16. Molienda de los granos de cacao pre tostado.

4.2.2.2. *Licor de cacao y manteca de cacao (aditivo alimentario)*

La preparación de las muestras (licor de cacao y manteca de cacao) es la misma que para la preparación de muestras de chocolate. Para cada muestra, se pesaron 0.8 g en un vial con septo (por triplicado cada muestra).

4.2.3. Condiciones de análisis de las muestras.

El procedimiento del acondicionamiento de la fibra SPME y la extracción de volátiles, así como las condiciones de separación en el equipo de GC-MS, fue el mismo que se empleó para el análisis de compuestos volátiles del chocolate. La razón de esto fue para poder comparar, por desviación estándar que, los tiempos de retención de los marcadores identificados estén presentes en un tiempo igual o parecido que los del análisis de chocolate y así, poder evaluar el patrón de comportamiento de los marcadores durante esas etapas de fabricación del chocolate.

Las muestras que se midieron fueron, tanto los granos pre y pos tostados y licor de cacao como los chocolates Bitter, Nibs y Milk. Las muestras de chocolate fueron medidas como referencia para saber si el tiempo de retención de los compuestos aparecían al mismo tiempo que las anteriores mediciones de chocolate. Para cada tipo de muestra se usaron tres muestras independientes que fueron medidas repetidamente. Se hacían corridas de columna vacía del GC-MS cada tres mediciones, para eliminar cualquier contaminación que haya quedado en la columna y asegurar que los compuestos de la muestra anterior hayan sido eluidos. Además, se utilizaron dos fibras triples, y cada tres muestras se cambiaba la fibra del SPME y, seguidamente, se medía un blanco (vial vacío) para confirmar que los compuestos que estaban presentes en las muestras no provenían del vial con septo.

4.2.4. Análisis de los datos en retrospectiva.

En esta parte de la investigación, se evaluó cómo se desarrolló cada uno de estos marcadores durante cada etapa clave de fabricación del chocolate. Para ello, se hizo un EIC de los dos fragmentos moleculares más intensos de cada marcador de chocolate y así, se logró identificar la intensidad de cada compuesto con mayor certeza en los cromatogramas de las muestras analizadas.

En una hoja de cálculo de Excel se introdujeron, para cada muestra analizada, las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a cada uno de los dos fragmentos (m/z) más intensos de los marcadores. Luego, se obtuvo la suma total de las intensidades de todos los fragmentos moleculares presentes en todo el espectro de masas de cada muestra medida. Y, cada área se dividía entre la suma total de intensidades de los fragmentos pertenecientes a cada muestra. Finalmente, se calculó el logaritmo de las áreas estandarizadas y se introdujo estos datos en el programa Matlab para realizar el análisis de componentes principales (PCA).

Con el promedio de las áreas estandarizadas para cada fragmento molecular de toda las muestras analizadas, se logró hacer un gráfico de barras comparativo entre los chocolates, licor de cacao, grano pre y post tostado.

4.3. Análisis De Chocolate Y De Cada Una De Las Etapas Claves De Su Elaboración Por Análisis Directo En Tiempo Real Acoplado A Espectrometría De Masas (DART-MS)

4.3.1. Materiales.

Se analizaron tres diferentes grupos de chocolates. El primero corresponde a los chocolates de la región de Piura, denominados como Bitter, Nibs y Milk. El segundo grupo corresponde a un chocolate con 70% de contenido de cacao que ha sido elaborado con granos de cacao de otra región del Perú, al que denominaremos “Otro A”. Finalmente, el tercer grupo es un chocolate con bajo contenido de cacao al que denominaremos “Otro B”. Todas las muestras de chocolate mencionadas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C. Además, se analizaron las muestras de granos pre tostado, post tostado y licor de cacao.

El solvente químico que se utilizó en esta primera parte experimental fue diclorometano, de grado MS, de la compañía Merck (Alemania).

4.3.2. Extracción de compuestos químicos de las muestras.

La extracción se realizó para separar los compuestos orgánicos volátiles de una mezcla de compuestos químicos presentes en el chocolate.

Se pesó 250 mg de cada muestra (ver Figura 17), y luego este fue colocado en un vial de vidrio de 5 mL. Seguidamente, se añadió 2.5 mL de diclorometano (DCM) a cada vial y, este se dejó en constante agitación por 14 horas (durante la noche). En la Figura 18 se muestra como quedó la mezcla del chocolate con DCM después de la agitación y en la Figura 19 se muestran las muestras luego de que el precipitado se haya separado del sobrenadante.



Figura 17. Chocolate rallado.

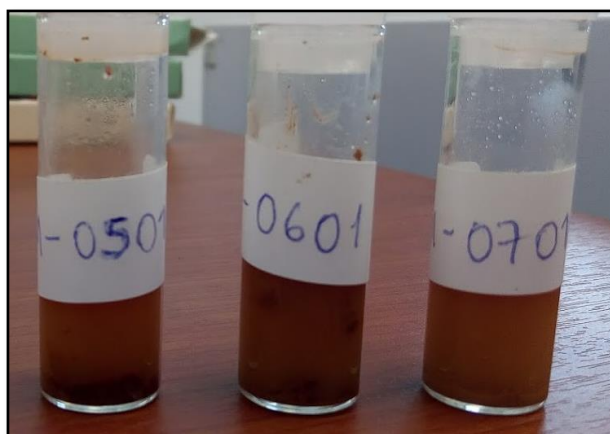


Figura 18. Viales con chocolate rallado y DCM.



Figura 19. Viales luego de la extracción de chocolate con DCM.

4.3.3. Preparación de stock.

Después de filtrar el sobrenadante, la solución resultante fue recolectada en un vial de vidrio de 2 mL al que se le denominó “stock”.

4.3.4. Preparación de muestras.

La muestra fue preparada en un vial de vidrio de 2 mL, donde se añadió 50 μ L de diclorometano, 5 μ L del “stock” y 5 μ L del estándar interno (cafeína marcada isotópicamente). La dilución se hizo con el objetivo de reducir la posibilidad de contaminación de la fuente DART y, porque solo se necesitaba 5 μ L de muestra para realizar la medición.

4.3.5. Calibración del equipo DART-MS.

Antes de iniciar con el análisis de muestras, se calibró el instrumento usando ionización por electrospray. Se inició con la limpieza del instrumento, para ello se enjuagó tres veces una jeringa de 500 μ L con metanol:agua (MeOH:H₂O / 50:50), luego a la jeringa lavada se le colocó 500 μ L de MeOH:H₂O (50:50) y este se conectó al espectrómetro de masas. La tasa de flujo de la limpieza del instrumento fue de 20 μ L/min. Finalizado esta etapa, se procedió a calibrar el instrumento en modo positivo en un rango de 150 - 2000 m/z usando una solución de calibración en modo positivo.

Se agregó aproximadamente 250 μ L de esa solución en la jeringa y se conectó al espectrómetro de masas. Se empezó a calibrar cuando los m/z del polímero del calibrante: 179, 371, 509.16 y 519.14 m/z empezaron a aparecer en el espectro y a incrementar sus intensidades. Finalmente, se lavó nuevamente con MeOH:H₂O (50:50), y se confirmó la limpieza cuando las señales del calibrante empezaron a disminuir considerablemente de intensidad.

4.3.6. Conexión de la fuente DART.

Se conectó la fuente de ionización DART - OS ionSense (ver Figura 20) para el análisis de muestras. Se conectó gas helio y gas nitrógeno al instrumento en un rango de presión de entre 75 - 80 PSI y se encendió la conexión al vacío. El monitoreo de esta fuente se realizó mediante el uso del controlador del DART que fue brindado por la compañía de ionSense. Primero se elevó la temperatura de la fuente a 550°C, para que quemara cualquier impureza que se encontrara en el equipo, luego esta se disminuyó a 350°C (temperatura de trabajo).

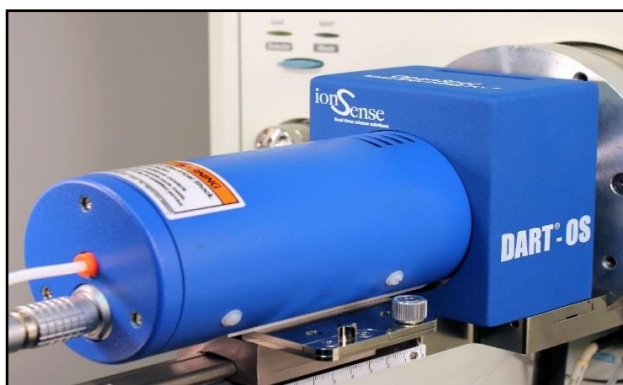


Figura 20. DART-MS conectado al espectrómetro de masas Orbitrap.

Tomado de "IonSense presenting OpenSpot Mass Spectrometry at the American Society for Mass Spectrometry Annual Conference", por Press Release, 2012.

4.3.7. Introducción de la muestra.

Se colocó 5 μ L de muestra en la parte central de la rejilla metálica de una tarjeta IonSense (ver Figura 21), previamente rotulada con el nombre de la muestra. Se dejó secar por 5 minutos. Se introdujo la tarjeta en la ranura metálica del DART por 10 segundos.

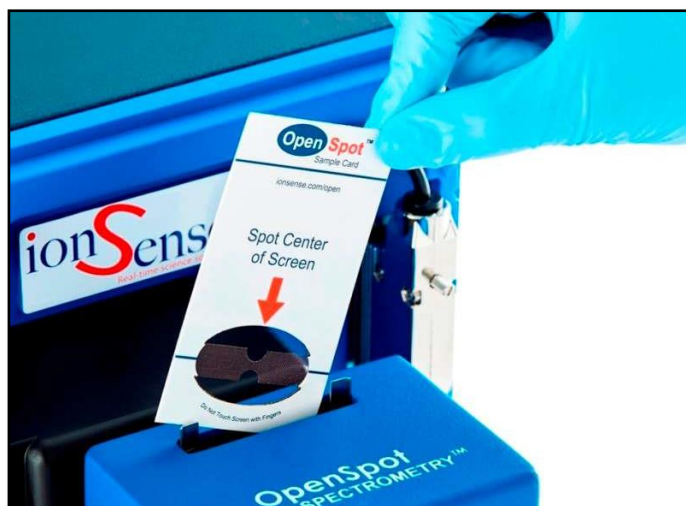


Figura 21. Introducción de la muestra al DART-MS.
Tomado de “Mass Detection in Real Time”, por Waters Corporation, s.f.

5. Resultados y Discusión

5.1. Análisis De Los Compuestos Volátiles Del Chocolate Por Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (GC-MS)

5.1.1. Identificación de los compuestos marcadores.

En el análisis de los compuestos volátiles de los chocolates, se obtuvieron once compuestos que eran significativamente diferentes entre los compuestos del chocolate Cacaosuyo y los del chocolate Otro A. Se logró determinar esta diferencia por el análisis de la varianza (ANOVA) que permitió obtener los valores de p . Para poder determinar aquellos compuestos que tenían una diferencia estadísticamente significativa entre los dos tipos de chocolate se seleccionaron aquellos compuestos que tenían un valor de p menores a 10^{-6} y, se les denominaron como compuestos marcadores. En la Figura 22 se muestra la diferencia significativa en las intensidades de los compuestos marcadores entre los chocolates Cacaosuyo y los del Otro A.

Los once compuestos seleccionados se muestran en la Tabla 3, donde estos se presentan en orden de masa molecular. Además, se muestran los nombres de tres compuestos que fueron validados por el instrumento GC-MS/MS Trace 1300 de la compañía Thermo Scientific. Los demás compuestos, cuyos nombres siguen en proceso de validación por ese instrumento, fueron representados por su fórmula química. También se muestra el tiempo de retención a la que eluyeron cada uno de los marcadores y, además, el atributo sensorial relacionado a cada uno mediante la búsqueda en la librería The Good Scents Company Information System, s.f.

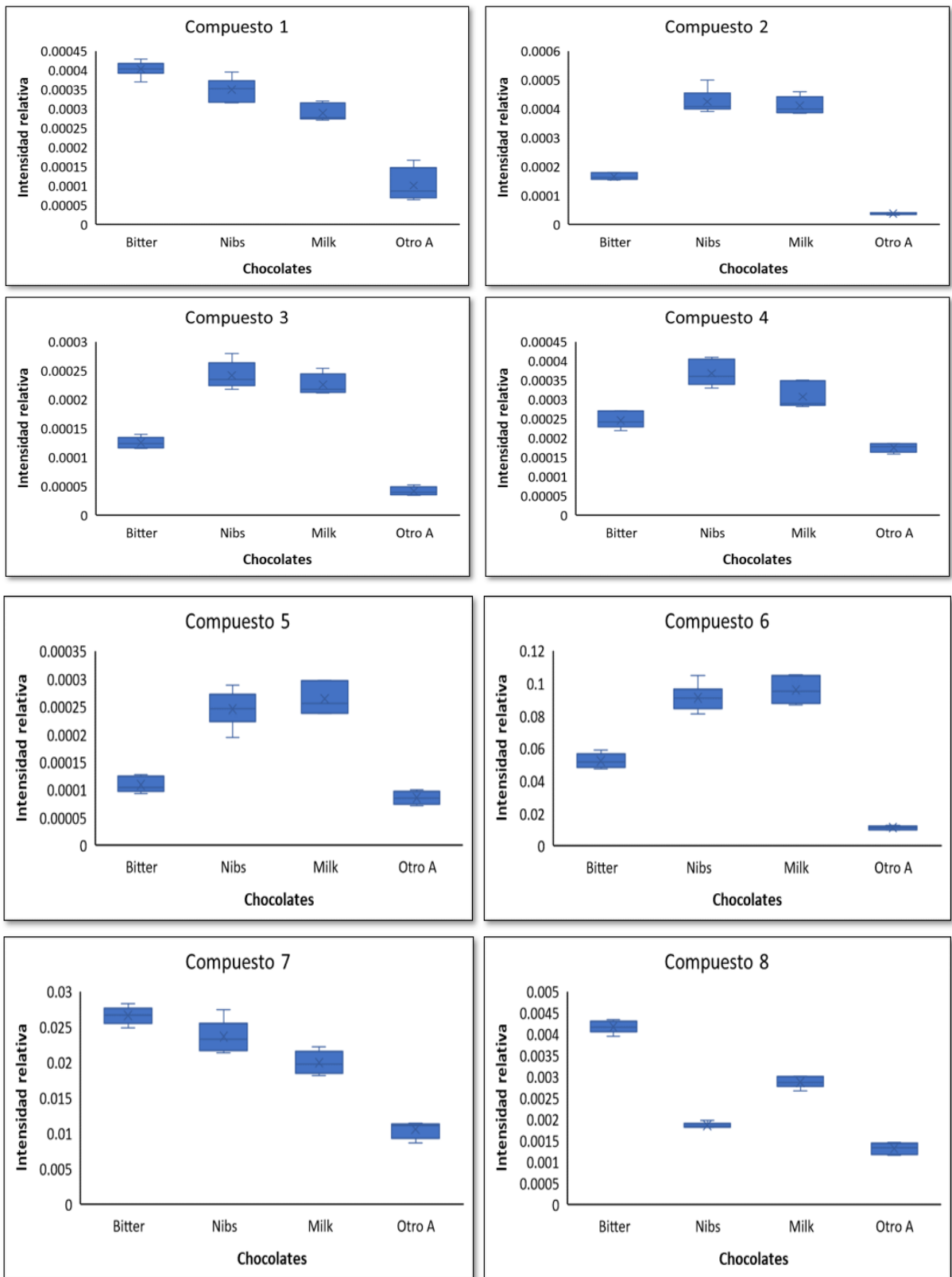


Figura 22. Diagrama de cajas y bigotes de las intensidades de cada compuesto marcador en los chocolates Cacaosuyo y del chocolate Otro A.

[Continúa en la siguiente página]

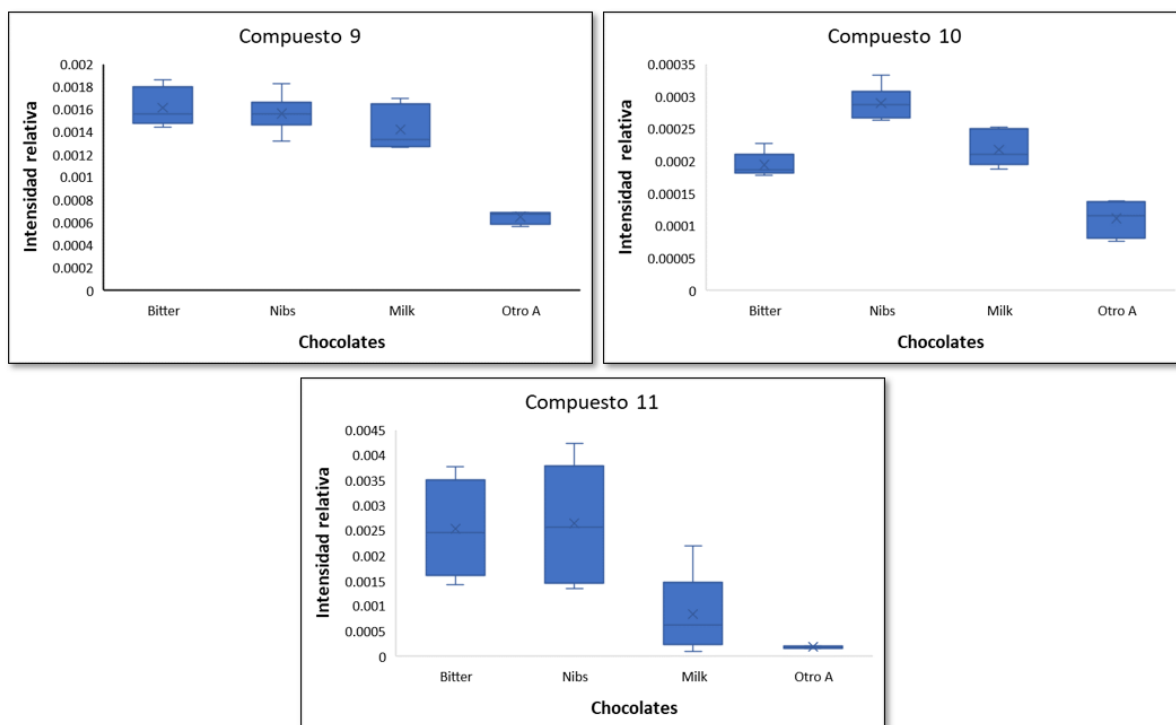


Figura 22. Diagrama de cajas y bigotes de las intensidades de cada compuesto marcador en los chocolates Cacaosuyo y del chocolate Otro A.

Tabla 3. Información de los once marcadores diferenciadores del chocolate Cacaosuyo.

Número de compuesto	Masa molecular (g/mol)	Compuesto marcador	Tiempo de retención (min)	Atributo sensorial
Compuesto 1	104	C ₄ H ₈ O ₃	22,081	No hay información
Compuesto 2	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	20,591	Dulce etéreo, afrutado
Compuesto 3	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	20,824	Dulce etéreo, afrutado
Compuesto 4	122	C ₈ H ₁₀ O	23,370	Dulce, fresco
Compuesto 5	134	C ₆ H ₆ N ₄	18,916	No hay información
Compuesto 6	136	Tetrametilpirazina	16,612	Cacao tostado, nuez, café
Compuesto 7	146	C ₇ H ₁₄ O ₃	17,347	Mantecoso, caramelizado
Compuesto 8	160	C ₈ H ₁₆ O ₃	19,310	Dulce, afrutado
Compuesto 9	164	Acetato de 2-feniletilo	24,579	Dulce, floral
Compuesto 10	170	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	22,516	Dulce, miel
Compuesto 11	174	3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona	23,267	No hay información

5.1.2. Análisis del loading plot del PCA de los compuestos marcadores.

Interesantemente, se notó que el sabor de tres de los compuestos marcadores no había sido reportado anteriormente en la literatura, por lo que se hizo el loading plot del PCA (ver Figura 23) con todos los datos de las mediciones de los chocolates de Cacaosuyo y, con estos resultados, se obtuvo una correlación de los datos de los compuestos de chocolate y se agruparon estos datos según su coincidencia dentro de los cuadrantes del loading plot.

En la Tabla 4 se muestran los sabores con los que podrían estar relacionados aquellos compuestos que no tienen sabor reportado hasta el momento. Se relacionaron las señales de los compuestos 1 y 11 con las del compuesto 6, donde este último tiene un perfil de sabor a cacao tostado, nueces y café, por lo tanto se podría señalar que estos dos compuestos (1 y 11) podrían tener un sabor relacionado o parecido a los del compuesto 6.

Así mismo, también se encontró una relación entre los compuestos 3 y 5, donde el compuesto 3 es responsable del sabor dulce etéreo y afrutado, por lo tanto, se puede considerar que el compuesto 5, que todavía no se ha reportado su atributo sensorial, tiene un perfil semejante al del compuesto 3.

Se logró interpretar el perfil de los sabores de los compuestos 1, 5 y 11, porque se encontró, también, una relación entre los compuestos 9 y 10 en el loading plot y, ambos presentaban un perfil de sabor dulce. Paralelamente, se notó que los compuestos 4 y 7 también están correlacionados en el loading plot y esto se puede deber a que ambos presentan un perfil de sabores que están relacionados entre sí, como son los sabores caramelizados y dulces y, afrutados y frescos.

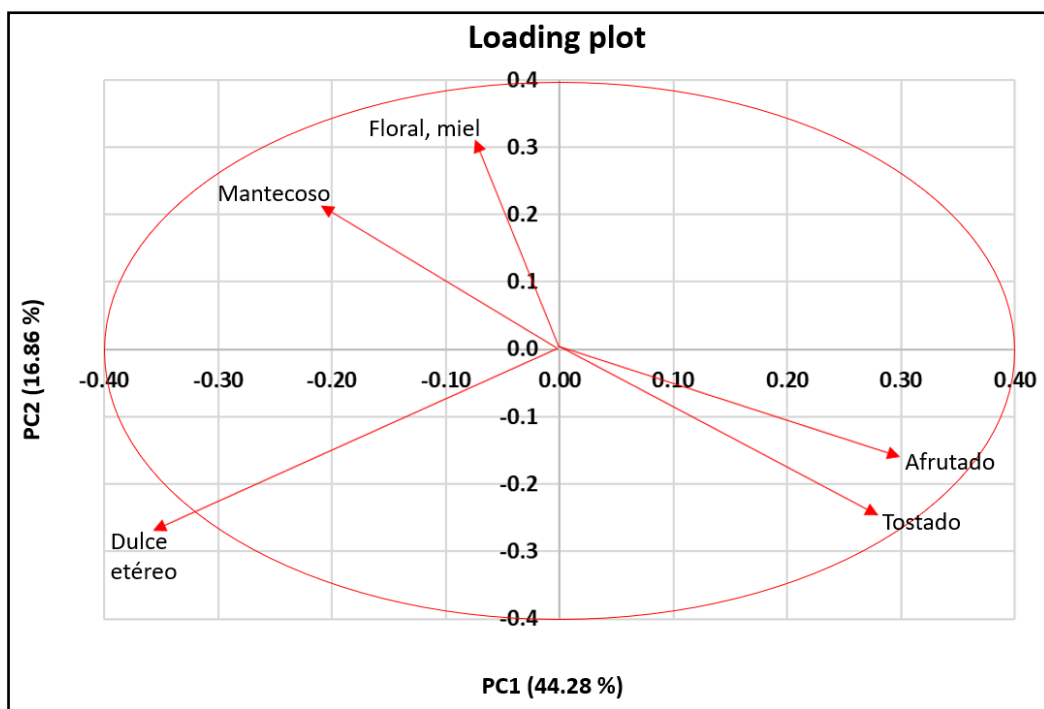


Figura 23. Loading plot del PCA de los compuestos marcadores del chocolate del norte del Perú.

Tabla 4. Relaciones entre los sabores de los compuestos marcadores propuestos en base a los valores del loading plot del PCA, los cuales fueron obtenidos mediante GC-MS.

	Tostado	Etereo	Floral / Miel	Afrutado	Mantecoso
Número de compuesto	¿Está relacionado con este sabor?	¿Está relacionado con este sabor?	¿Está relacionado con este sabor?	¿Está relacionado con este sabor?	¿Está relacionado con este sabor?
Compuesto 1	Sí	-	-	-	-
Compuesto 2	-	Sí	-	-	-
Compuesto 3	-	Sí	-	-	-
Compuesto 4	-	-	-	-	Sí
Compuesto 5	-	Sí	-	-	-
Compuesto 6	Sí	-	-	-	-
Compuesto 7	-	-	-	-	Sí
Compuesto 8	-	-	-	Sí	-
Compuesto 9	-	-	Sí	-	-
Compuesto 10	-	-	Sí	-	-
Compuesto 11	Sí	-	-	-	-

5.1.3. Gráfico radial de sabores de los once compuestos marcadores para los chocolates de diferentes regiones del Perú.

En la Figura 24 se puede observar el gráfico radial de los sabores presentes en el chocolate Cacaosuyo y en el Otro A. Cada punto dentro del gráfico representa la intensidad relativa del fragmento molecular con menor valor de desviación estándar relativa (RSD) (ver Tabla 5). Cabe señalar que los valores con los que se construyó la Figura 24 han sido obtenidos en el procesamiento de datos descrito en la sección 4.1.6.3 de este documento.

Se puede observar que la línea amarilla, que corresponde al chocolate Otro A, se encuentra en menor intensidad con respecto a las otras tres líneas, que corresponden a los chocolates de Cacaosuyo. Además, se observó que existen algunas diferencias significativas, en las intensidades de los sabores entre Cacaosuyo y Otro A, que son mayores frente a los demás. Estos sabores son dulce etéreo y afrutado (compuesto 2), cacao tostado y a nueces (compuesto 6) y el sabor, que aún no ha sido reportado, del compuesto 11, pero que se tiene la sospecha que pueda estar relacionado al sabor del cacao tostado. Con estos resultados se puede indicar que hay sabores que están presentes en mayor intensidad en el chocolate producido a partir de cacao de Piura que de la otra región del Perú.

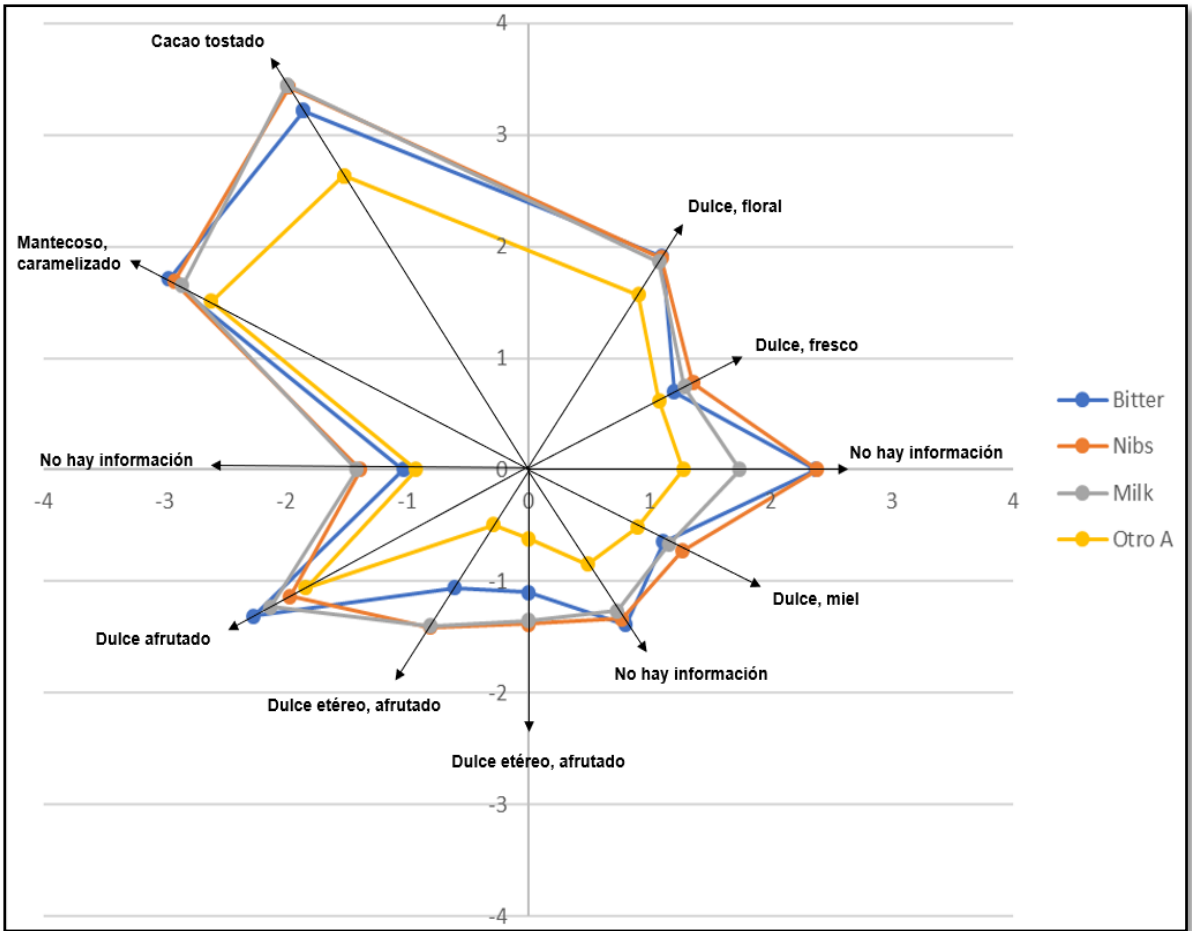


Figura 24. El gráfico radial de los sabores presentes en el chocolate Cacaosuyo y en el chocolate Otro A.

5.1.4. Identificación del fragmento molecular con menor desviación estándar relativa (RSD).

Tabla 5. Los dos fragmentos moleculares más intensos de los compuestos marcadores y el fragmento con menor RSD (color plomo) por cada compuesto

Número de compuesto	Compuesto marcador	Fragmento 1 (m/z)	Fragmento 2 (m/z)
Compuesto 1	C ₄ H ₈ O ₃	59	71
Compuesto 2	C ₆ H ₁₂ O ₂	71	116
Compuesto 3	C ₆ H ₁₂ O ₂	71	116
Compuesto 4	C ₈ H ₁₀ O	79	107
Compuesto 5	C ₆ H ₆ N ₄	52	134
Compuesto 6	Tetrametilpirazina	54	136
Compuesto 7	C ₇ H ₁₄ O ₃	57	75
Compuesto 8	C ₈ H ₁₆ O ₃	55	88
Compuesto 9	Acetato de 2-feniletilo	91	104
Compuesto 10	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	68	94
Compuesto 11	3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona	88	89

5.1.5. Comparación de perfiles de sabores obtenidos por GC-MS y por un catador de chocolate.

Los chocolates de Cacaosuyo (Bitter, Nibs y Milk) pasaron por un proceso de catación, con el objetivo de comparar la percepción organoléptica del catador con los resultados experimentales obtenidos por cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas. Los resultados se pueden observar en la Figura 25, donde se muestra que las diferencias en las intensidades de estos sabores, entre los chocolates de Cacaosuyo, son iguales tanto para el catador como para los resultados obtenidos por espectrometría de masas (MS), a excepción del sabor dulce y afrutado. Estos dos sabores, según la percepción de sabor del catador (ver Figura 25-B), están mayoritariamente presentes en el chocolate Bitter que en Milk, mientras que, los resultados por MS (ver Figura 25-A) muestran que es al revés. Uno de los factores que ha

podido influenciar en esta diferencia de resultados es que el catador ha recepcionado la mezcla del sabor dulce y afrutado con dulce y floral/miel y, por ello, ha incrementado su percepción de este sabor en el chocolate Bitter. Otro de los factores puede ser que solo se logró obtener los resultados de un catador y, estadísticamente, para que un conjunto de datos sea más confiable, se necesita de tres muestreos como mínimo para así, disminuir el error estándar de los resultados. Por ello, sería necesario recolectar datos de dos catadores adicionales, para poder corroborar así, los resultados obtenidos en la Figura 25.

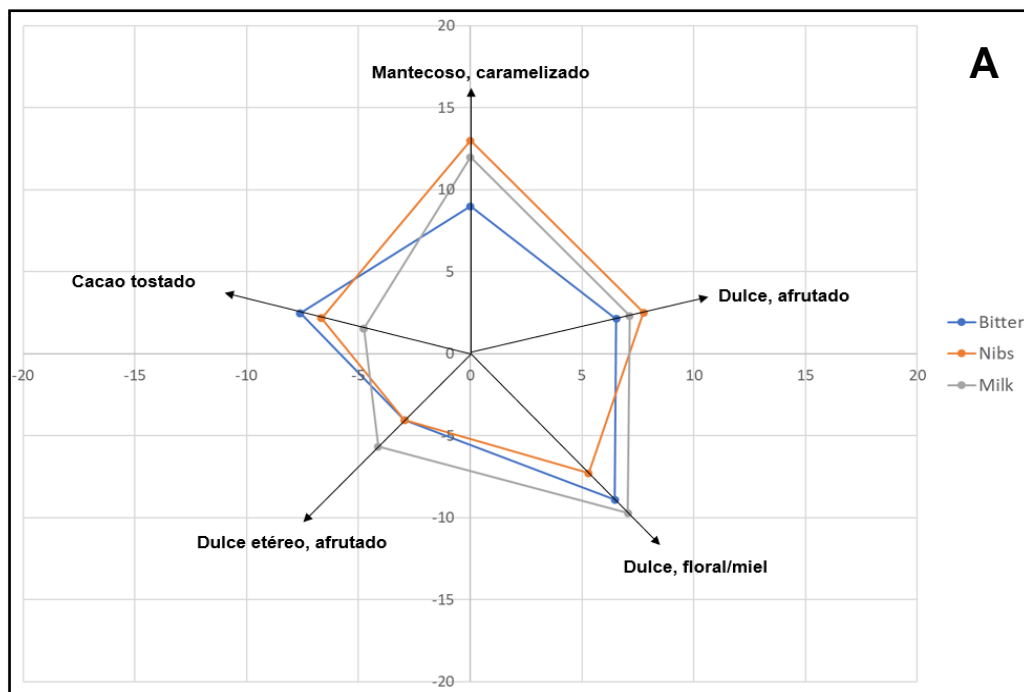


Figura 25. Comparación de los (A) resultados experimentales por MS y de los (B) resultados de catación de los chocolates de Cacaosuyo.

[Continúa en la siguiente página]

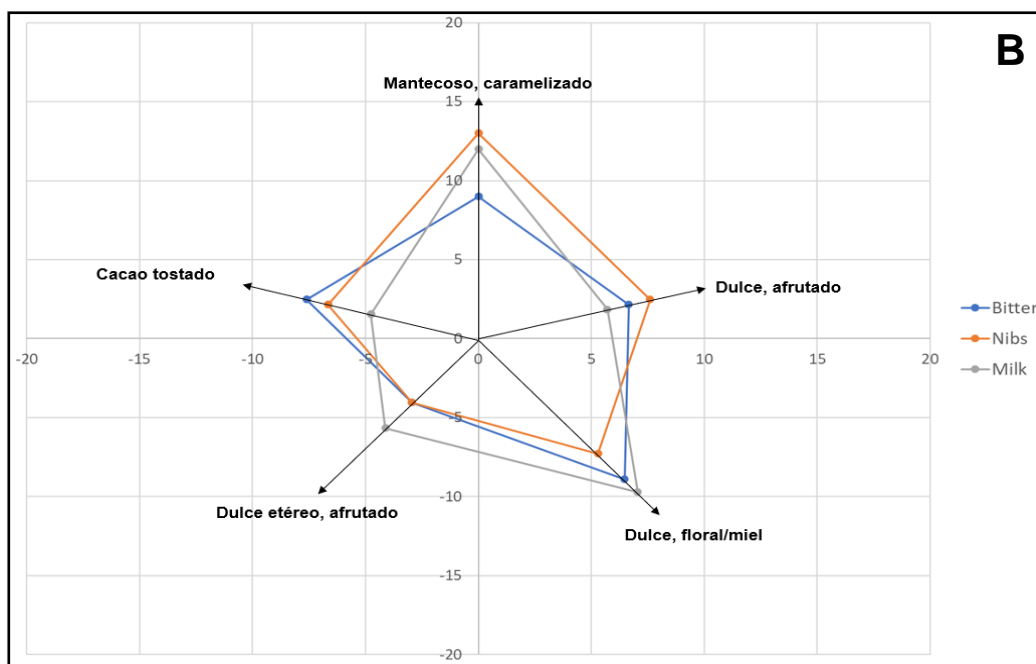


Figura 25. Comparación de los (A) resultados experimentales por MS y de los (B) resultados de catación de los chocolates de Cacaosuyo.

5.1.6. Análisis de componentes principales (PCA) de los chocolates de diferentes regiones del Perú.

El PCA de las mediciones de chocolate Cacaosuyo y Otro A se muestran en la Figura 26, donde se puede observar claramente que se han dividido en cuatro clústeres. Los tres clústeres que se encuentran en los cuadrantes I y IV, pueden referirse a los chocolates Cacaosuyo, mientras que el clúster ubicado en el cuadrante III, se refiere al chocolate Otro A.

Interesantemente se puede notar que, también hay clústeres divididos por cada tipo de chocolate Cacaosuyo, lo que podría indicar la diferencia en las condiciones del proceso de elaboración de cada uno. Se observa que el clúster del chocolate Bitter se encuentra en un cuadrante diferente que los chocolates Nibs y Milk, y los clústeres de Nibs y Milk están cercanos entre sí. Estos resultados sugirieron una hipótesis, la cual fue que el proceso de elaboración de los chocolates Bitter y Nibs/Milk se diferenciaban porque se usaron dos

temperaturas diferentes de tostado de los granos de cacao. Esta hipótesis fue confirmada por la empresa Theobroma Inversiones S.A.C.

Por otro lado, se observó que Bitter y Nibs/Milk se diferencian en la ubicación de sus clústeres por los diferentes aditivos alimentarios que le añaden a su licor de cacao. Además, se observa que los clústeres de Nibs/Milk también están separados, lo que puede indicar que hay una diferencia en los aditivos alimentarios, mientras que al chocolate Nibs le añaden pedazos pequeños de la semilla del grano de cacao tostado (también conocido como nibs), al chocolate Milk le añaden leche.

De los resultados obtenidos, se puede inferir que, dentro de todos los datos obtenidos en el GC-MS, hay una serie de señales que contribuyen a la diferenciación entre chocolates producidos por cacao fino y de aroma hecho en dos regiones diferentes del Perú y, entre los diferentes procesos de elaboración de cada tipo chocolate de Cacaosuyo.

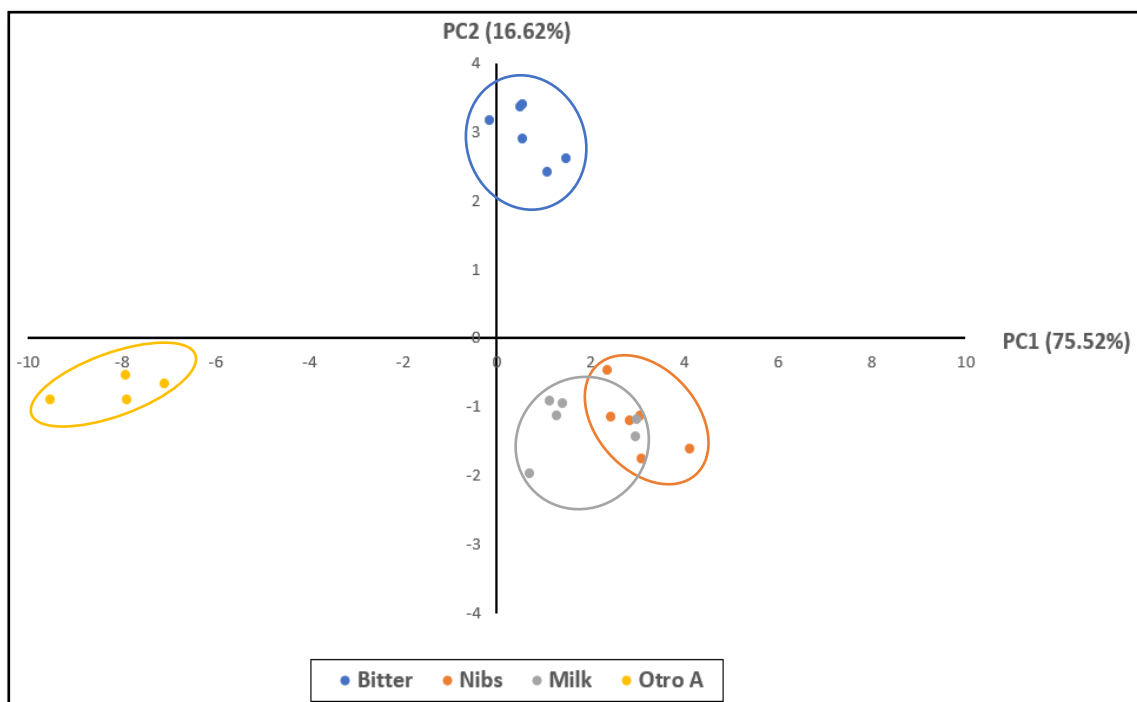


Figura 26. Análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos para el chocolate Cacaosuyo (círculo rojo) y para la otra empresa chocolatera (círculo azul) mediante la técnica de GC-MS.

El perfil aromático de los cacaos fino y de aroma de dos regiones del Perú tienen muchos aspectos comunes pero, en la hipótesis de esta investigación, son las pequeñas diferencias en el perfil lo que se traslada a una diferencia en la experiencia organoléptica del chocolate. Es importante resaltar que estas once señales representan la detección de once compuestos y se caracterizan por ser altamente reproducibles en su tiempo de retención en la cromatografía, y en la intensidad de sus señales en el espectrómetro de masas. Esto los hace ideales para ser utilizados en el análisis retrospectivo, es decir, monitorear la transformación de estos once compuestos en las etapas claves de la manufactura del chocolate Cacaosuyo.

5.2. Análisis De Los Compuestos Volátiles En Las Etapas Críticas De Elaboración Del Chocolate Por Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (GC-MS)

5.2.1. Análisis de componentes principales (PCA) de las etapas críticas de elaboración del chocolate.

En la Figura 27 se muestra el PCA de los datos obtenidos del análisis retrospectivo, donde se analizaron los granos de cacao pre tostados, granos pos tostados 1 y licor 1 (usados para la elaboración del chocolate Bitter), granos pos tostados 2 y licor 2 (usados para la elaboración del chocolate Nibs y Milk), los tres tipos de chocolates Cacaosuyo y los chocolates Otro A. Lo primero que se observa es el clúster que se encuentran en el extremo del cuadrante II, correspondiente al chocolate Otro A. Esta primera observación puede sugerir la idea de que el proceso de elaboración del chocolate Otro A es muy diferente al del chocolate Cacaosuyo y que el perfil de sabores de este chocolate es diferente que el de Cacaosuyo.

Se observa, además, que los granos de cacao pre tostados se subdividen en dos clústeres, uno que está en el I cuadrante, cerca a los valores de los clústeres de Nibs y Milk, y el otro que está en el II cuadrante. Una de las razones por la que se observa esta subdivisión, es que los granos de cacao no hayan pertenecido al mismo proceso de fermentación, es decir que se juntó en un lote, granos de cacao que fueron producidos por procesos de fermentación que diferían en días o condiciones (temperatura y humedad). El otro factor que ha podido influenciar en estos resultados es la contaminación de la fibra del SPME, a pesar que esta se acondicionaba previamente a las mediciones por 15 minutos. Otro de los factores de esta subdivisión ha podido ser la contaminación de los granos de cacao pre tostado por la humedad del laboratorio.

Los granos de cacao se almacenaban en una bolsa metálica y a temperatura ambiente, por lo que luego de ser abiertas para la primera medición de los granos pre tostados, pudieron haberse visto afectados por la humedad del ambiente del laboratorio y por ende, afectar los resultados.

Por lo tanto, se sugiere que se puedan medir más muestras de granos de cacao pre tostado, provenientes de diferentes lotes, para confirmar la razón por la cuál se subdividen en dos clústeres.

Al confirmar nuestra hipótesis, sobre la existencia de dos procesos diferentes de tostado y conchado con las que se elaboran los chocolates Bitter, Nibs y Milk, con la empresa Theobroma Inversiones S.A.C., se observa que, efectivamente, cada tipo de tostado y conchado (licor) se encuentra en un clúster diferente, ambos ubicados en el IV cuadrante del PCA.

Al tener dos diferentes procesos de tostados, también se tiene dos diferentes productos de licor o pasta de cacao. Se observa que ambos, licor 1 (relacionado al chocolate Bitter) y licor 2 (relacionado a los chocolates Nibs y Milk) se encuentran agrupados en dos clústeres, ubicados en el IV y I cuadrante, respectivamente.

Los chocolates, que son los productos finales, se encuentran agrupados en clústeres independientes. Los chocolates Bitter, Nibs y Milk, se encuentran en el III y I cuadrante, respectivamente. Además, se observa que los clústeres de Nibs y Milk se encuentran en el mismo cuadrante del PCA, mientras que el de Bitter se encuentra en un diferente cuadrante. Este resultado era de esperarse porque estos grupos difieren por razones de procesos de tostado y conchado.

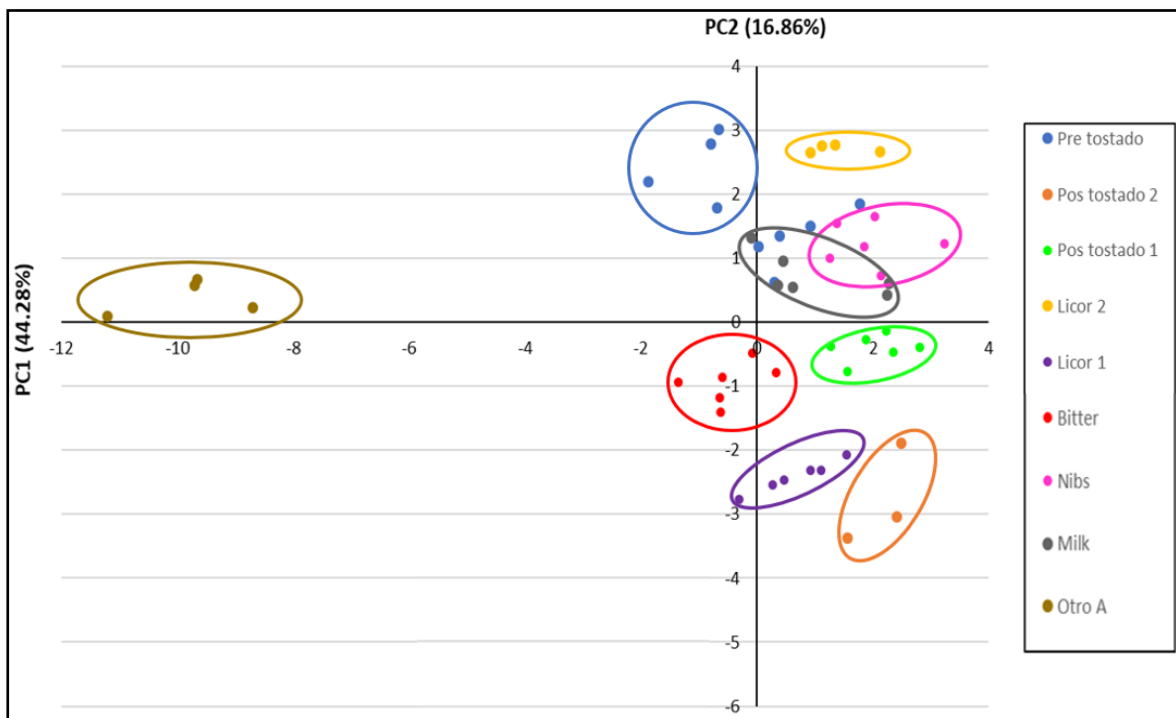


Figura 27. Análisis de componentes principales (PCA) del análisis de los compuestos volátiles en las etapas críticas de elaboración del chocolate Cacaosuyo en comparación con el chocolate Otro A.

Se observa en la Figura 28 el PCA en tres dimensiones (PCA-3D), donde solo se ha considerado las muestras de la empresa Theobroma Inversiones S.A.C. Se elaboró este nuevo PCA con los valores del PC1, PC2 y PC3, con el objetivo de evaluar la información que nos proporcionarían las distribuciones de cada uno de los clústeres en el espacio.

Se puede observar a primera vista que los clústeres de los chocolates (Bitter, Nibs y Milk) se encuentran cerca entre sí en el espacio. Por lo tanto, se puede señalar que los productos

finales, los chocolates, se ubican en el medio del PCA. Mientras que los granos de cacao pre y pos tostados, que pertenecen a los productos obtenidos en las dos primeras etapas claves de elaboración del chocolate, se ubican en la parte inferior del PCA. Por el contrario, los licores se ubican en la parte superior del PCA. Estas primeras observaciones de la Figura 28, confirman que el PCA-3D brinda información clave sobre la distribución de las muestras de acuerdo a su origen dentro de las etapas de la elaboración del chocolate.

Además de estas observaciones, se puede notar que los clústeres que corresponden a los granos pos tostados 1, licor 1 y Bitter se encuentran cercanos entre sí. Y curiosamente, los tres grupos de muestras están interrelacionadas, pues los granos pos tostados 1 y licor 1 son las etapas previas de la elaboración del chocolate Bitter. De la misma manera sucede con la ubicación de los clústeres del licor 2 y los chocolates Nibs y Milk. Pues, estos tres grupos se encuentran cerca en el espacio. Por lo tanto, se relaciona que el licor 2 es una etapa previa para la elaboración de los chocolates Nibs y Milk. Aunque, el clúster de los granos pos tostados 2, que son utilizados para la elaboración de estos dos chocolates, se encuentra alejado. Una razón por la que se observa esto es que, el perfil organoléptico de los granos pos tostados 2 es más semejante a los granos pos tostados 1 que al licor 2, es por eso que se ubica más distante a este último.

Finalmente, se observa que el clúster de los granos pre tostados se ubica cerca al clúster del chocolate Nibs. Este resultado sugiere que los nibs, que se añaden a la barra del chocolate Nibs, provienen de los granos pre tostados. Pero, según Hii, Menon, Chiang y Sharif (2016), los nibs se obtienen de los granos tostados, no de los pre tostados. Por lo tanto, deba medirse un nuevo lote de granos de cacao pre tostado y observar si sigue observando este mismo comportamiento.

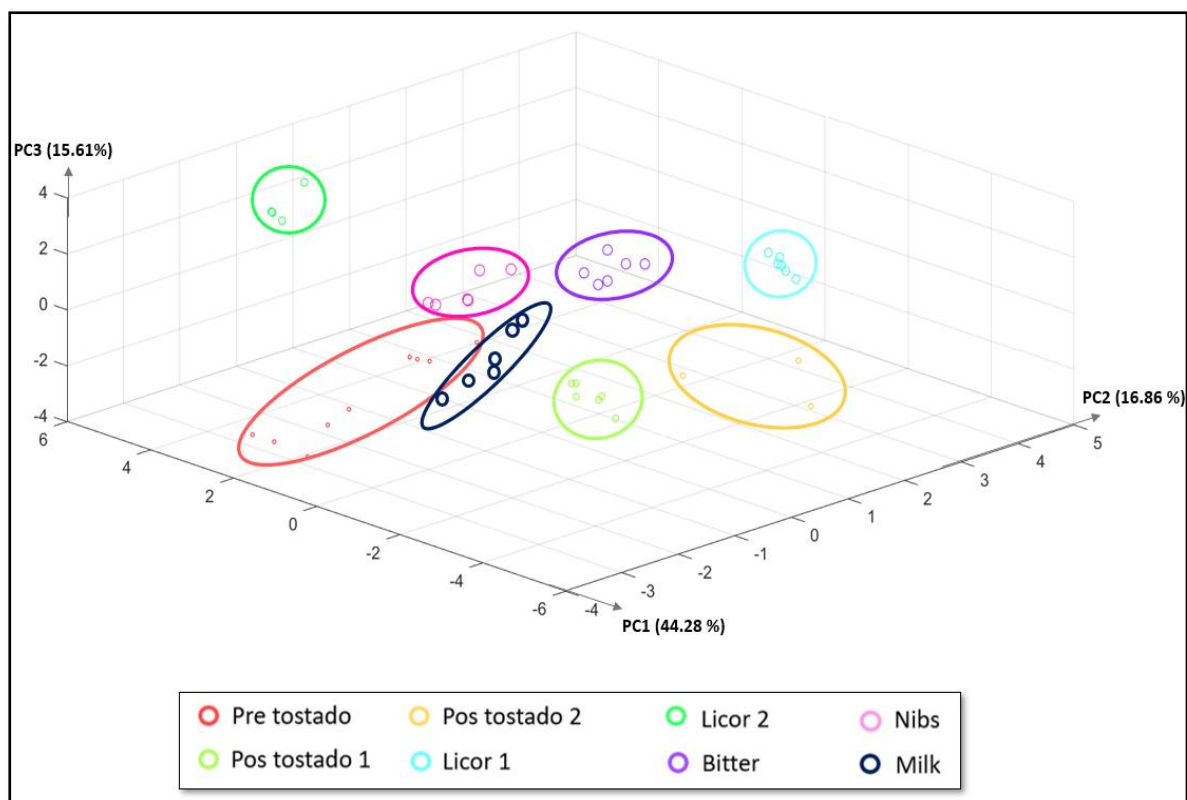


Figura 28. PCA en tres dimensiones (PCA-3D) del análisis de los compuestos volátiles en las etapas críticas de elaboración del chocolate Cacaosuyo.

5.2.2. Comparación de muestras de licores y granos pos tostados.

Como se confirmó, habían dos tipos de granos pos tostados. En la Figura 29 se muestra en un gráfico de barras cómo varían las intensidades de cada compuesto marcador, tanto para los granos pos tostados 1 como para los granos postados 2. Cabe señalar que solo se muestran el promedio de las intensidades de los fragmentos moleculares con un RSD menor (ver Tabla 6) para facilitar la visualización de los resultados. Pero, se ha adjuntado en el Anexo A los gráficos de barras de los dos fragmentos moleculares de cada compuesto marcador.

Se puede observar que la intensidad de cinco compuestos marcadores varía significativamente entre los dos tipos de granos tostados, pues sus valores p son menores al valor de 0.01. Estos cinco marcadores son los compuestos 2, 4, 6, 7 y 11. Estos resultados pueden indicar que los sabores representativos de cada uno de esos cinco compuestos se

intensifican más en ciertos chocolates de Cacaosuyo. Por ejemplo, la tetrametilpirazina, cuyo sabor es cacao tostado y a nueces, presenta una intensidad alta en el grano pos tostado 2, que está relacionado con la elaboración del chocolate Nibs y Milk. Por lo tanto, este sabor es más intenso en esos dos chocolates, mientras que en Bitter, la presencia de este sabor es menor.

En términos generales, la intensidad estos cinco compuestos es mayor en los granos pos tostados 2, a excepción de los compuestos 4 y 7, donde la intensidad es mayor en los granos pos tostados 1. Una razón por la cual ciertos compuestos tienen menor o mayor intensidad en los tipos de granos tostados, es porque quizá algunos se volatilizan más rápido que otros por efecto de la temperatura o el tiempo de tostado.

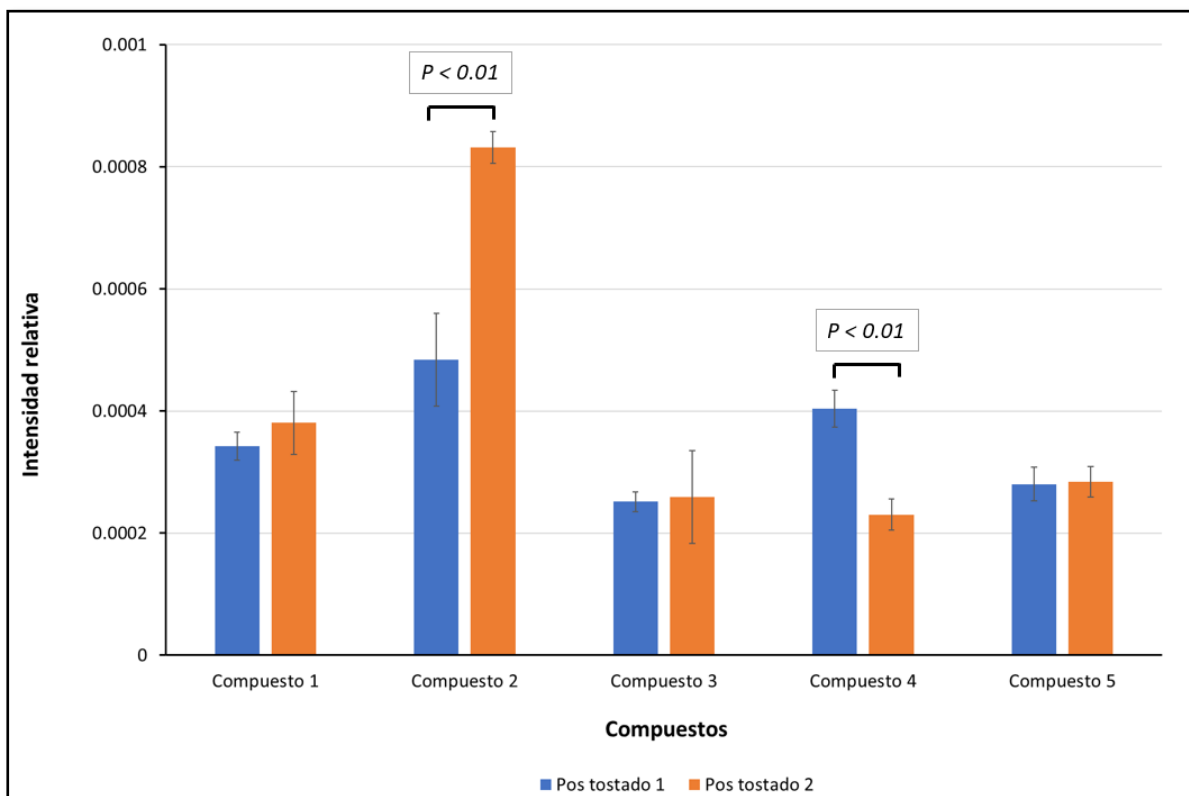


Figura 29. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los once marcadores.

[Continúa en la siguiente página]

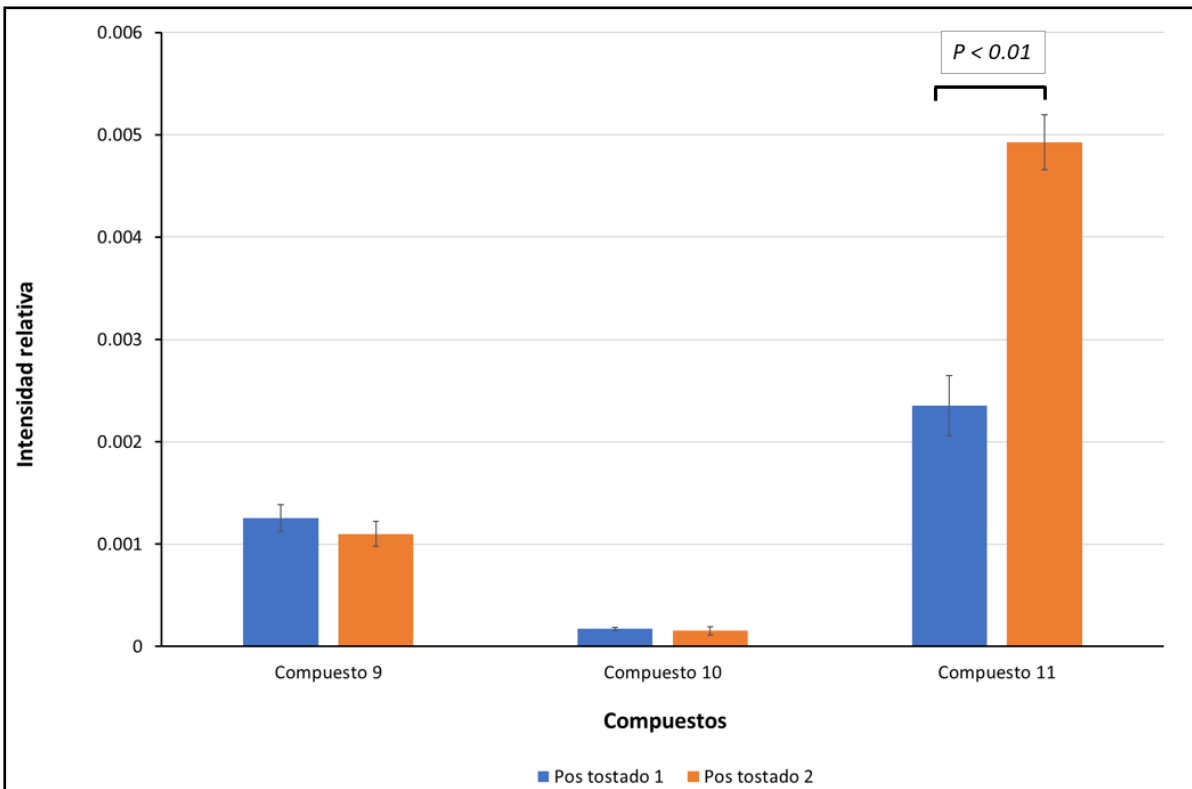
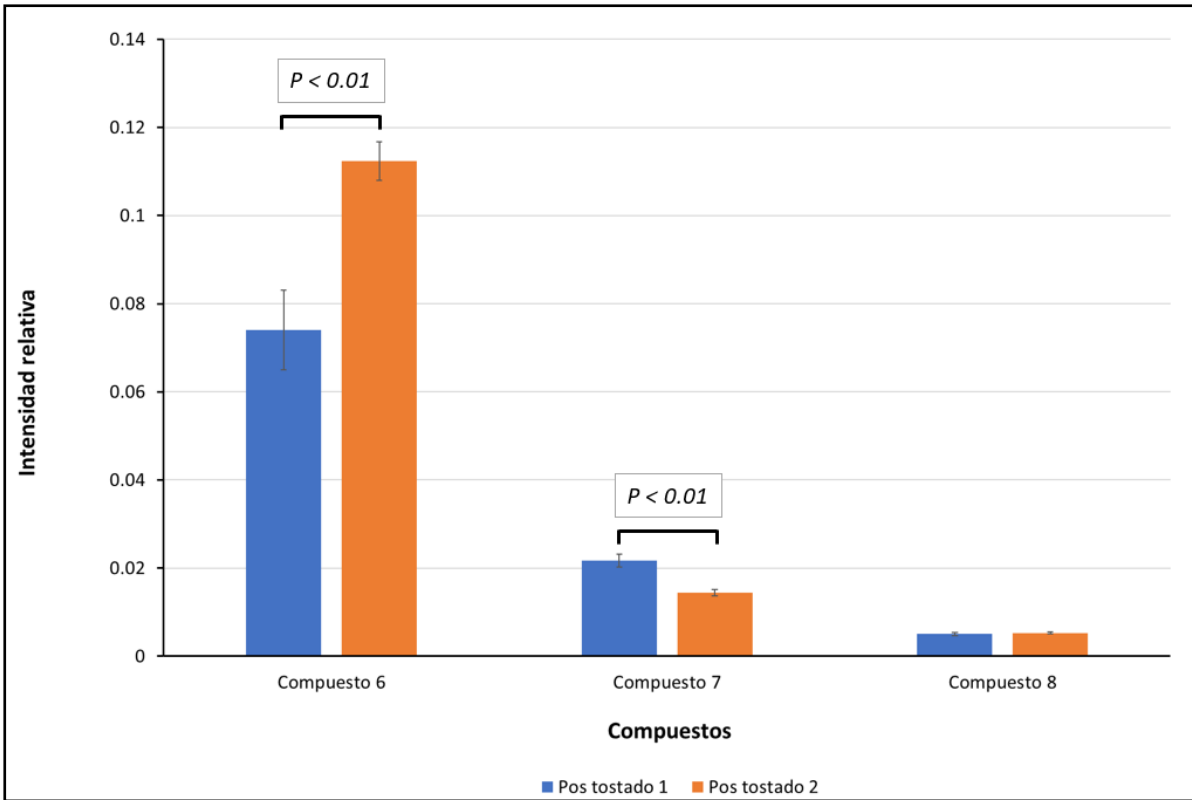


Figura 29. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los once marcadores.

En la Figura 30 se muestran las intensidades relativas de cada tipo de licor. Se puede observar que nueve de los once compuestos marcadores presentan una diferencia significativa entre los dos tipos de licor de cacao, pues el valor p que presentan son menor a 0.01. Además, se observa que seis de los nueve compuestos, que presentan una diferencia significativa, están presentes en una intensidad mayor en el licor 1 (que está relacionado a la elaboración de los chocolates Bitter). Por otro lado, la intensidad del compuesto 7 es mayor en el licor 2 que en el licor 1, pero comparando este resultado con lo obtenido en los granos tostados, se puede comprender que ha disminuido la intensidad del sabor mantecoso y caramelizado (representativo del compuesto 7) entre la etapa de tostado y de licor para la elaboración del chocolate Bitter.

En el Anexo B se muestran los gráficos para los dos fragmentos moleculares de cada compuesto marcador.

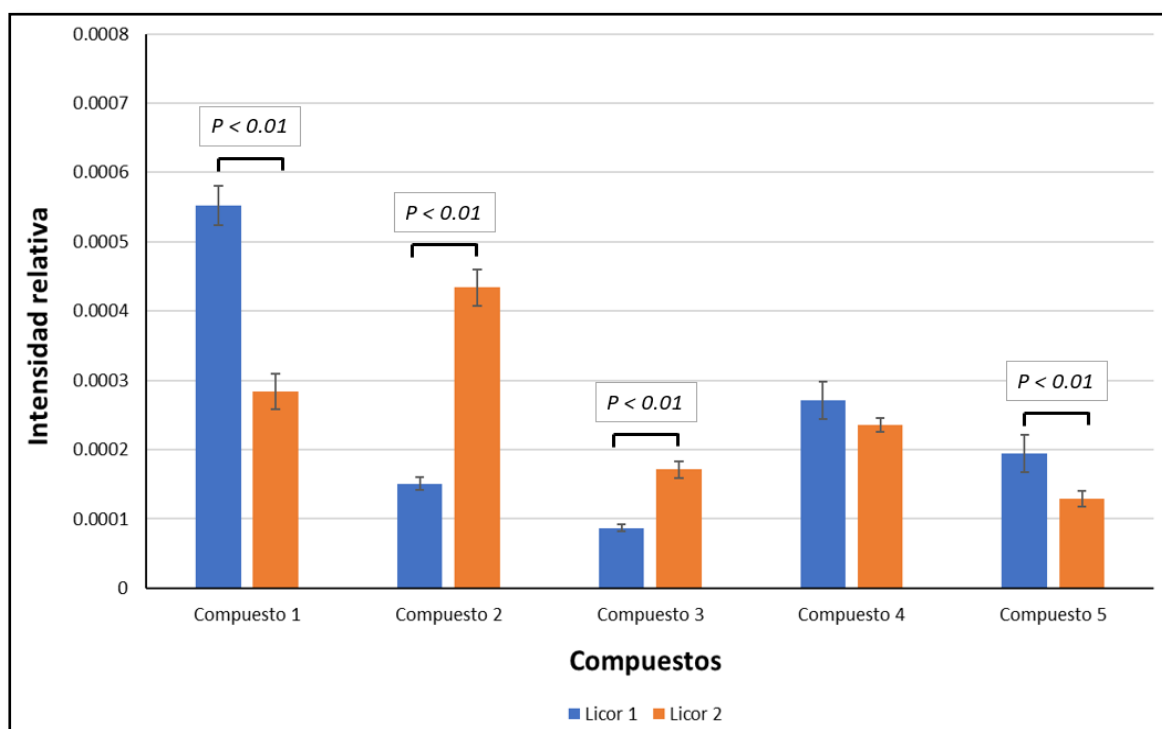


Figura 30. Gráficos de barras comparativas entre el licor 1 y licor 2 para los once marcadores.

[Continúa en la siguiente página]

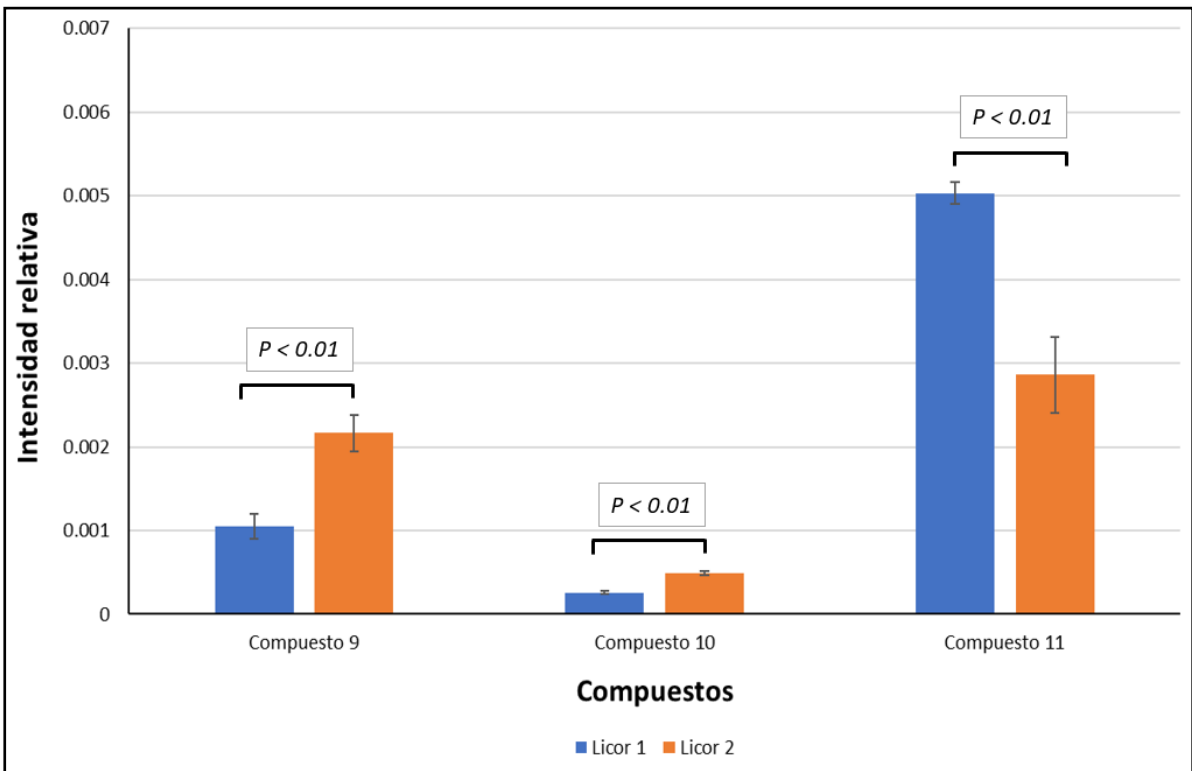
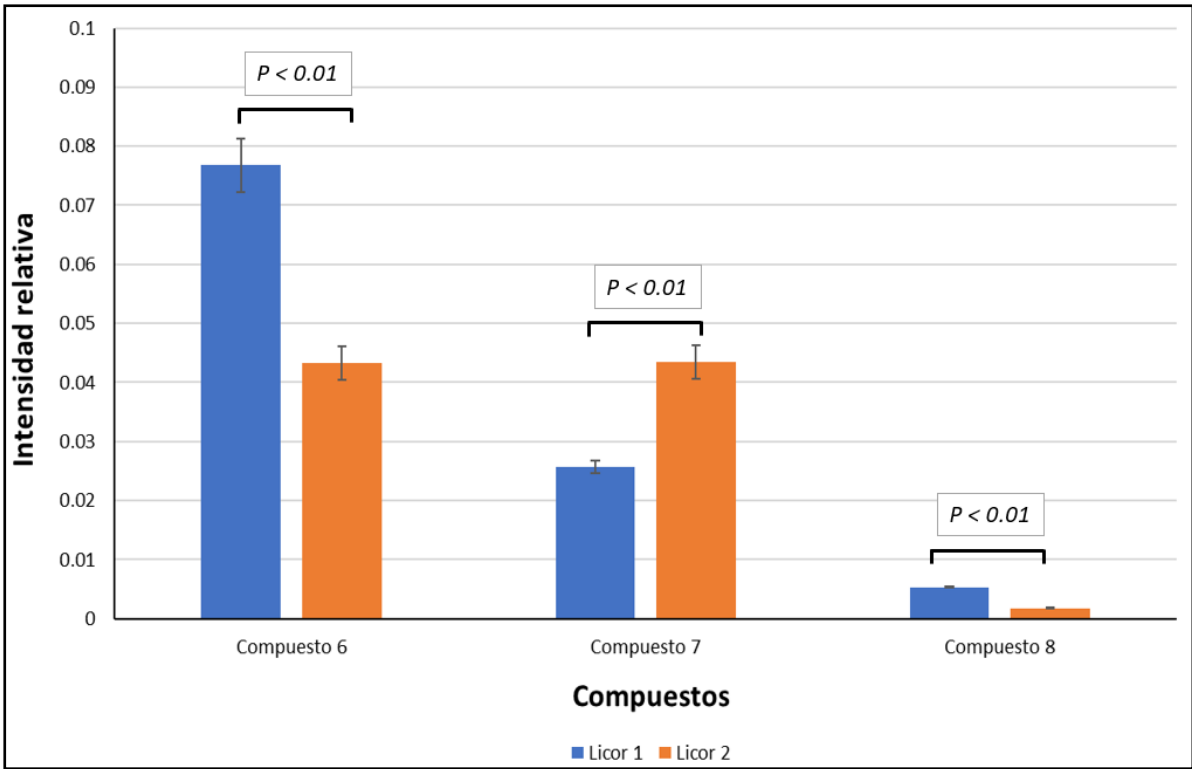


Figura 30. Gráficos de barras comparativas entre el licor 1 y licor 2 para los once marcadores.

5.2.3. Evaluación del desarrollo de cada compuesto marcador durante cada etapa clave de elaboración del chocolate.

Se evaluó el desarrollo de cada compuesto marcador durante cada una de las etapas claves de la elaboración del chocolate. Para ello, se hicieron gráficas de barras que representan la intensidad relativa de cada compuesto en las etapas de pre tostado, tostado, licor y chocolate de Cacaosuyo. Cabe señalar que, por temas de visualización, se realizaron los gráficos de barras con el fragmento molecular con menor RSD. En el Anexo C y Anexo D se muestran los gráficos con ambos fragmentos moleculares para la elaboración del chocolate Bitter y Nibs/Milk, respectivamente.

5.2.3.1. *Compuestos confirmados por GC-MS/MS*

La tetrametilpirazina es un producto de la reacción de Maillard, y es producido durante el proceso de tostado (Afoakwa et al., 2008). En la Figura 31 se puede confirmar que, efectivamente, la tetrametilpirazina está considerablemente presente en el proceso de tostado de los granos de cacao. Además, se observa que su intensidad disminuye significativamente para la elaboración del chocolate Bitter, mientras que para los otros dos chocolates no. Una de las razones de este comportamiento identificado, es la presencia de algún aditivo alimentario que puede compensar la pérdida o disminución del sabor a cacao y tostado que proviene de la tetrametilpirazina.

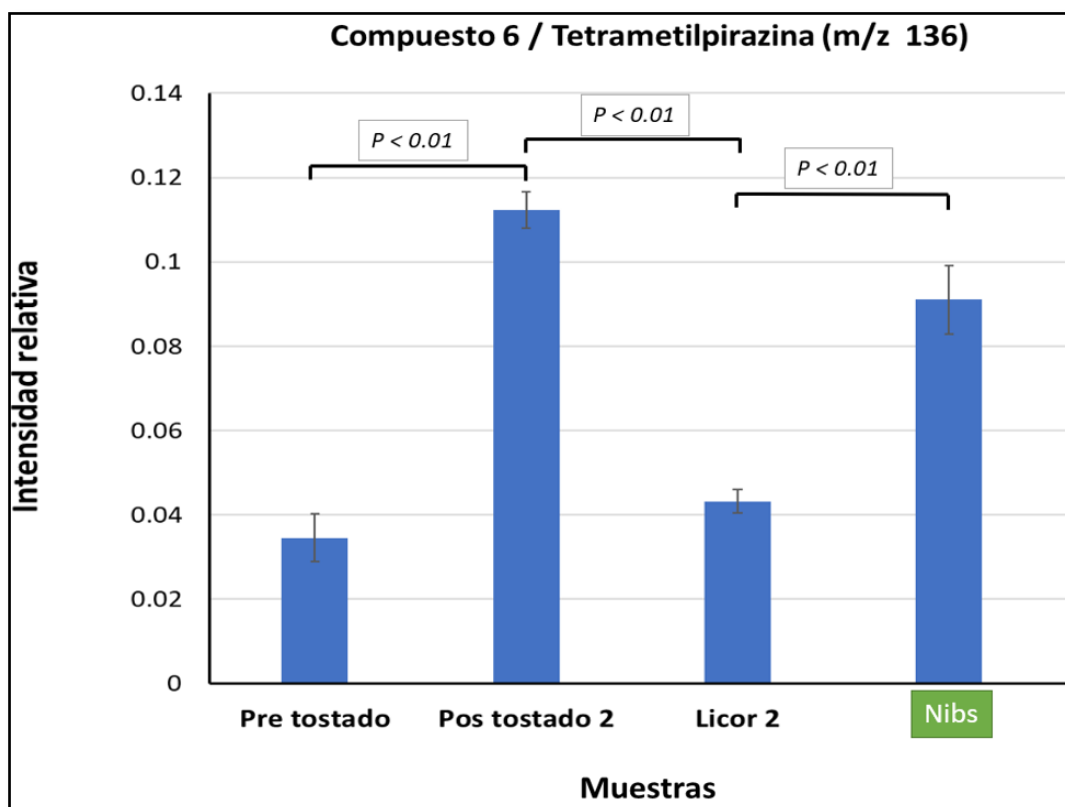
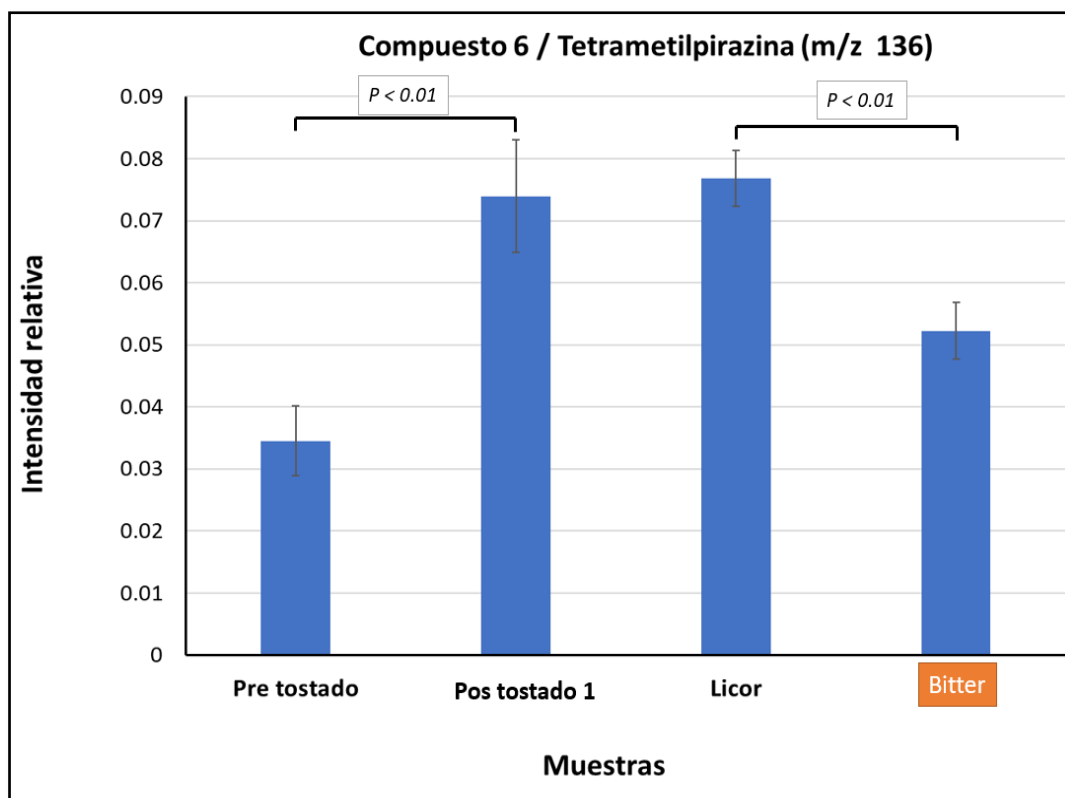


Figura 31. Desarrollo de la tetrametilpirazina durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

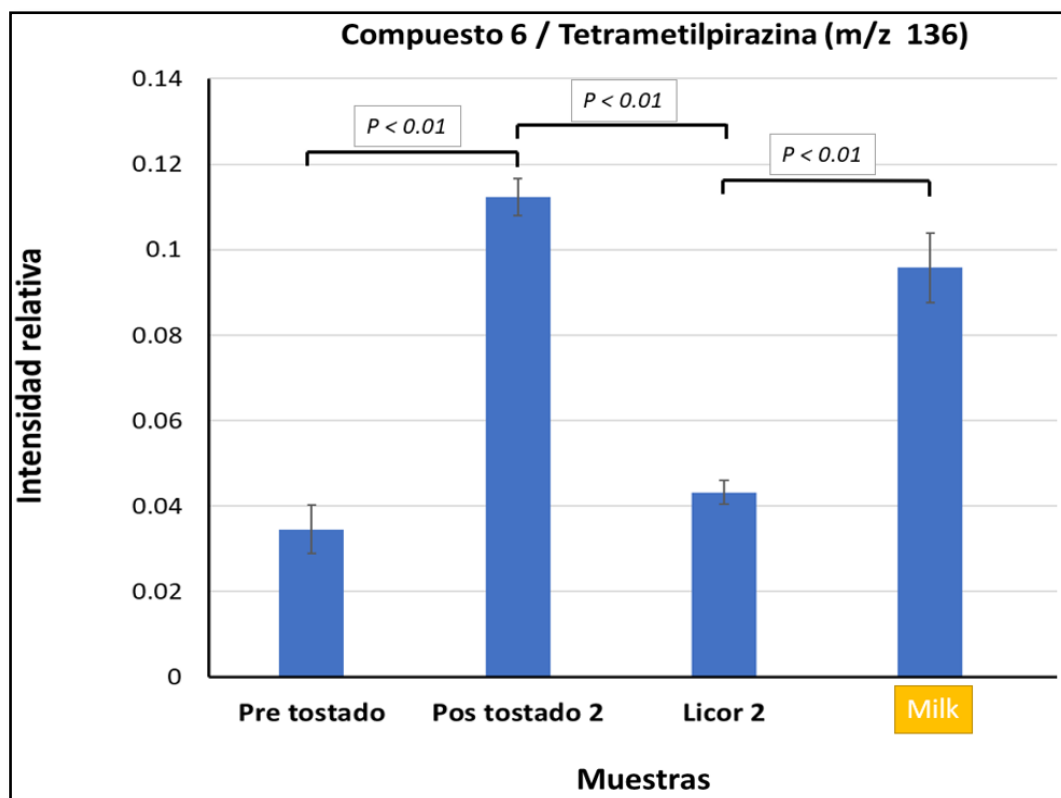


Figura 31. Desarrollo de la tetrametilpirazina durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

El acetato de 2-feniletilo tiene su origen en el proceso de la fermentación y secado (Adamek, Bergstorm, Borjesson, & Stolmann, 1992). Se puede afirmar esto en la Figura 32, donde se observa que la intensidad de este compuesto es casi constante en las tres primeras etapas de elaboración del chocolate, pero que aumenta significativamente su intensidad durante la etapa final de la elaboración de Bitter. Mientras que, para los chocolates Nibs y Milk, la intensidad del acetato de 2-feniletilo aumenta en el proceso de conchado y va disminuyendo hacia el producto final. Por lo tanto, se puede pensar que se trata de un compuesto que está presente desde los granos de cacao pre tostados pero que se va desarrollando aún más durante el proceso de elaboración de los chocolates.

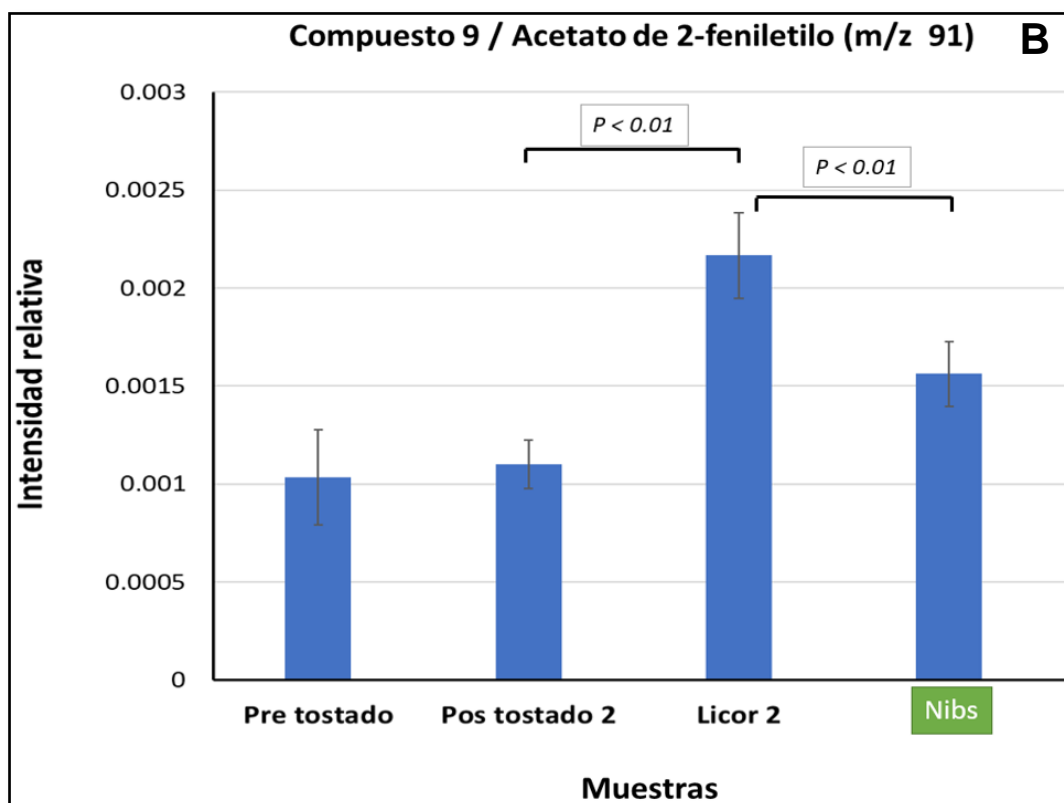
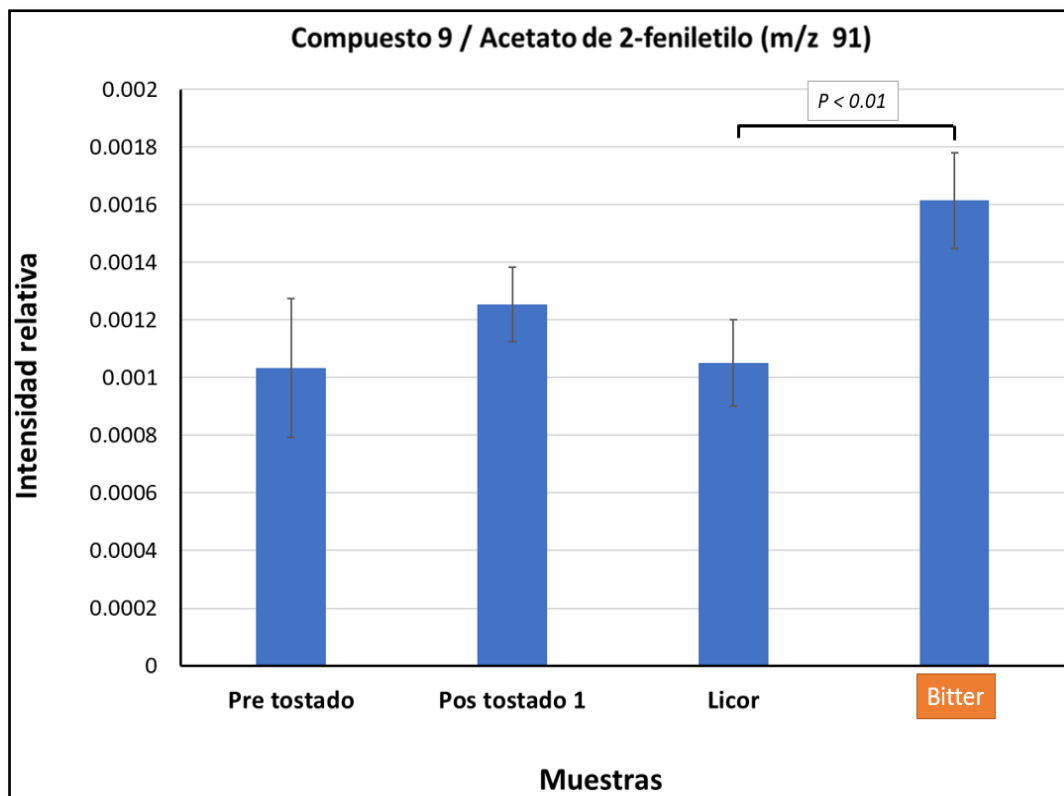


Figura 32. Desarrollo del acetato de 2-feniletilo durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

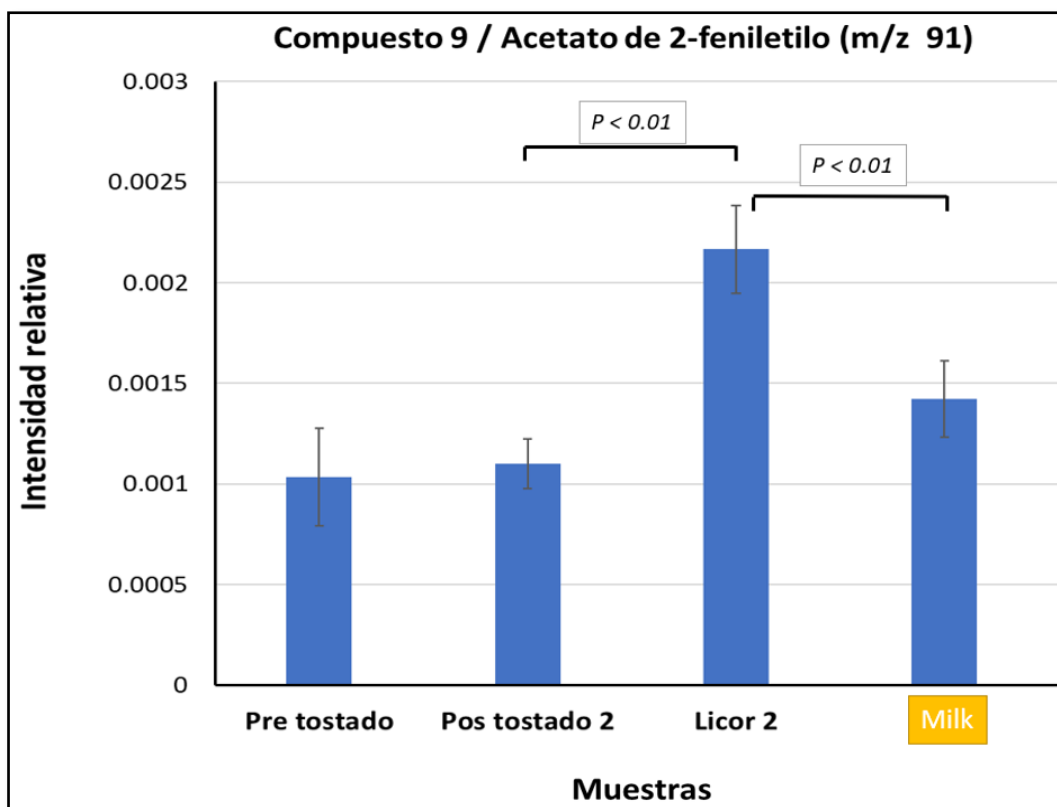


Figura 32. Desarrollo del acetato de 2-feniletilo durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

El compuesto 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona, se encuentra en mayor intensidad en Bitter que en Nibs/Milk. Además, se observa que la concentración de este compuesto en el licor, correspondiente al proceso de elaboración del chocolate Bitter, es significativamente mayor que en el chocolate. Por lo tanto, este resultado puede deberse a una dilución de este compuesto mediante la adición de aditivos. Hasta la actualidad no se tiene información en la literatura sobre cómo este compuesto está presente en el proceso de elaboración del chocolate.

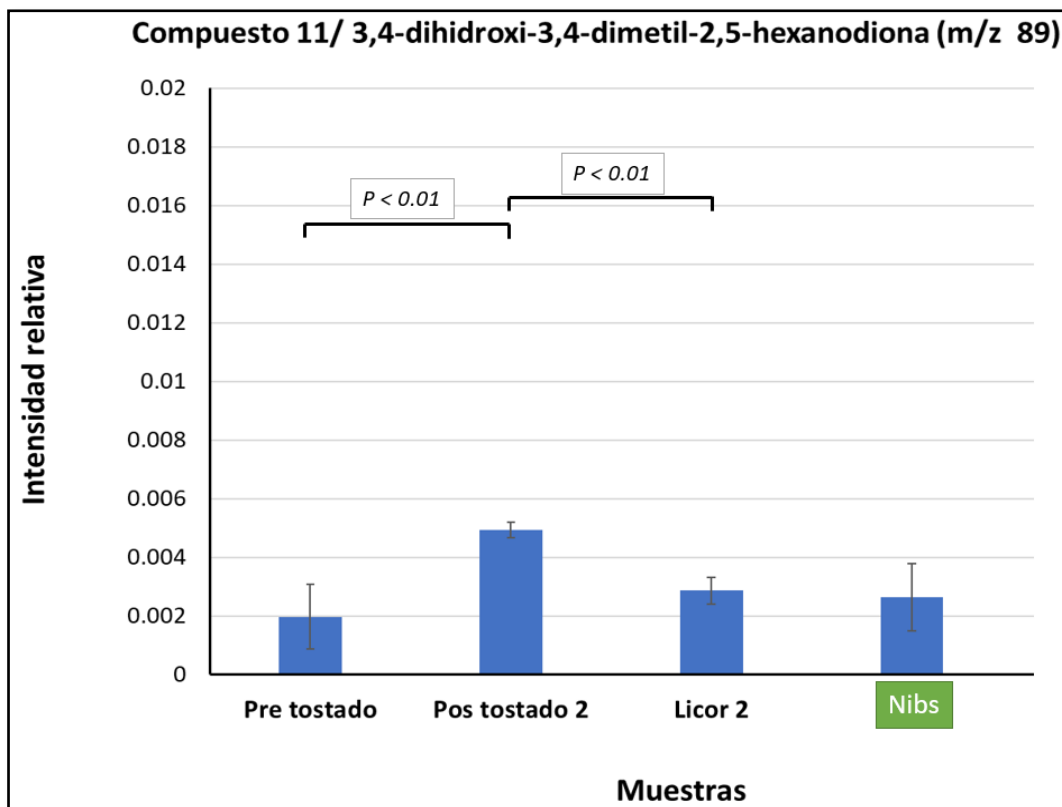
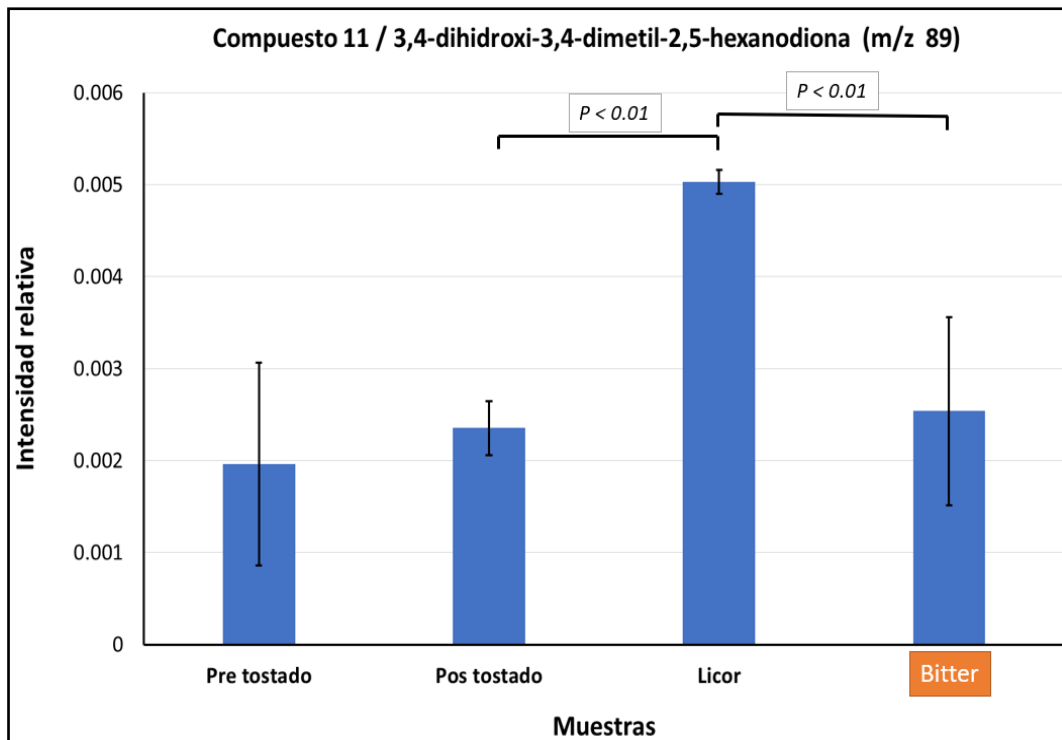


Figura 33. Desarrollo del 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

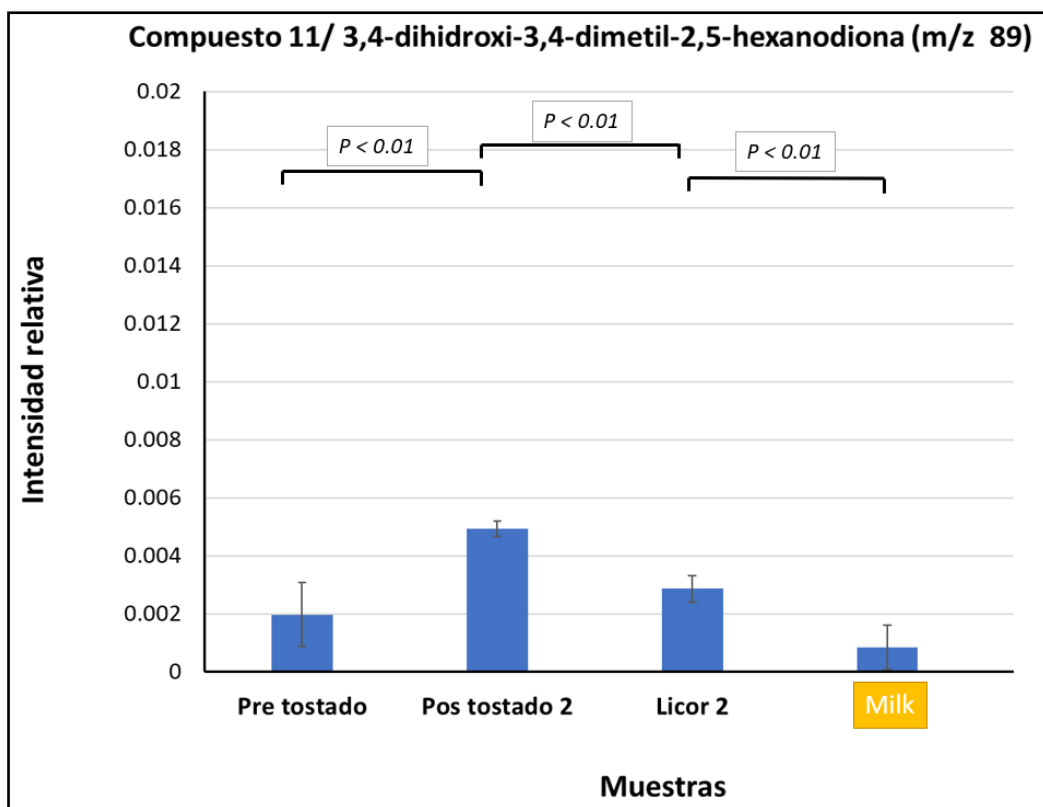


Figura 33. Desarrollo del 3,4-dihidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

5.2.3.2. *Compuestos en proceso de confirmación por GC-MS/MS*

En la Figura 34 se presenta el desarrollo del compuesto 1 ($m/z = 71$) durante las etapas claves hasta el producto final. Como se puede observar, la intensidad de este compuesto aumenta en el proceso de tostado a conchado, pero disminuye en el chocolate Bitter. De lo contrario, se observa que la intensidad del compuesto 1 aumenta entre el conchado y la elaboración del chocolate Nibs, mientras que se mantiene la intensidad entre el conchado y el chocolate Milk. Este último resultado sugiere que un aditivo alimentario ayudó a recuperar la intensidad del compuesto 1 que había disminuido durante el proceso de elaboración del licor.

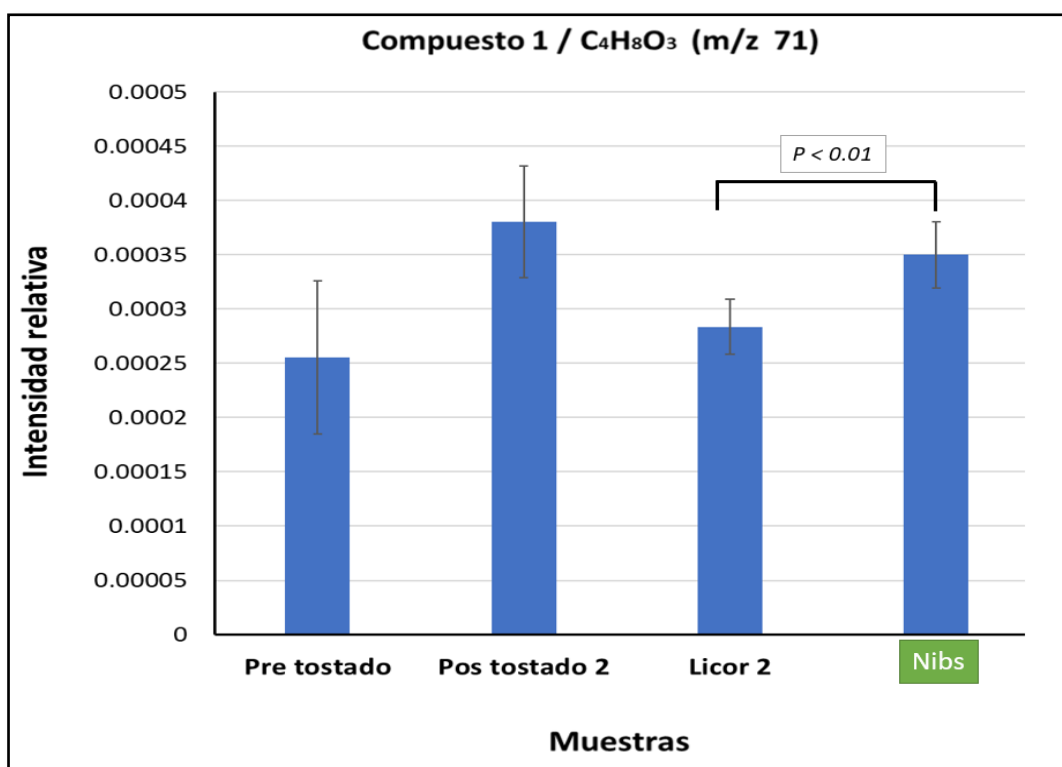
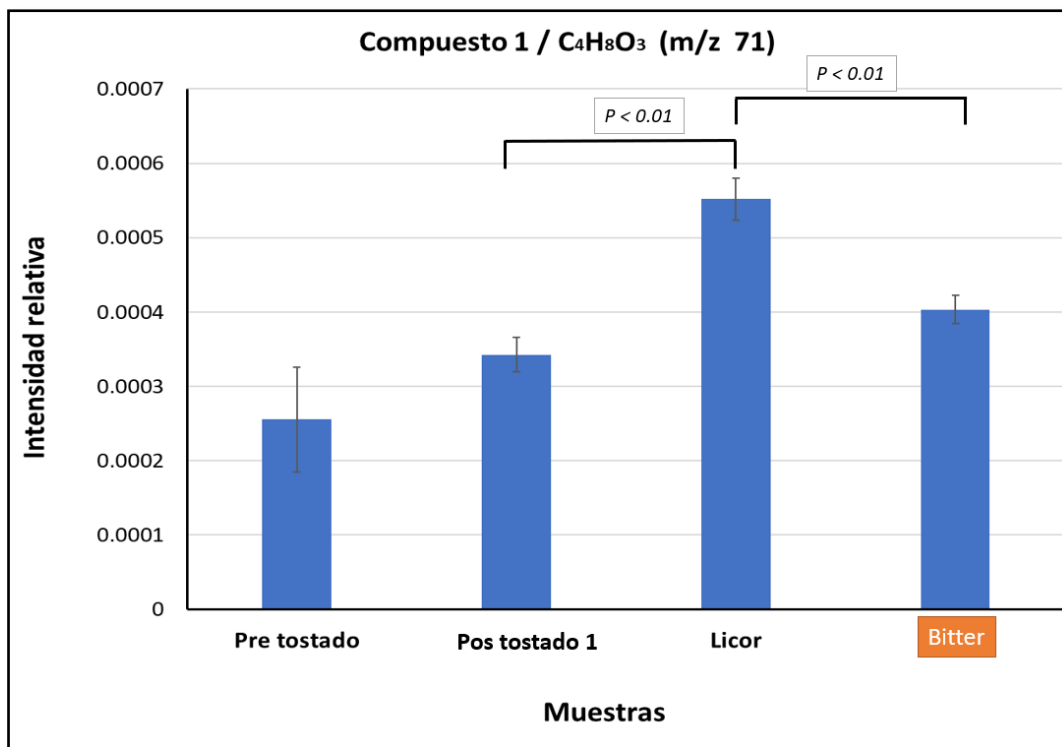


Figura 34. Desarrollo del compuesto marcador 1 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

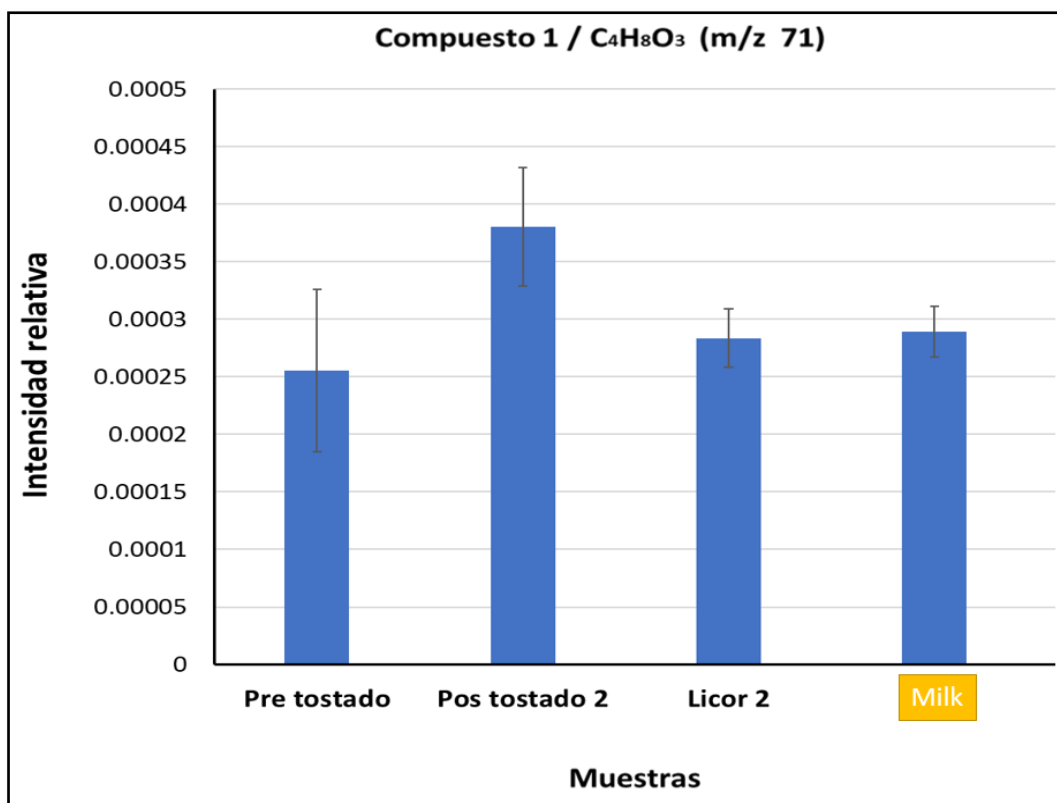


Figura 34. Desarrollo del compuesto marcador 1 durante cada una de las etapas para la elaboración de los chocolates.

En la Figura 35 y Figura 36 se muestran que la intensidades de los compuestos 2 y 3, respectivamente, son mayores en los chocolates Nibs y Milk que en Bitter. Por lo tanto, podría considerarse nuevamente, que este incremento se debe a un aditivo alimentario, a pesar que esta no presenta una alta intensidad. Se considera esto, puesto que Nibs y Milk se encuentran a la misma intensidad, y eso puede dar una idea que ambos tienen algo en común en su elaboración. Por otro lado, se observa que ambas figuras tienen el mismo fragmento molecular y, curiosamente ambos compuestos (2 y 3) tienen el mismo patrón de desarrollo durante cada etapa de elaboración del chocolate. Por ello, se puede decir que los compuestos 2 y 3 se tratan de dos estereoisómeros.

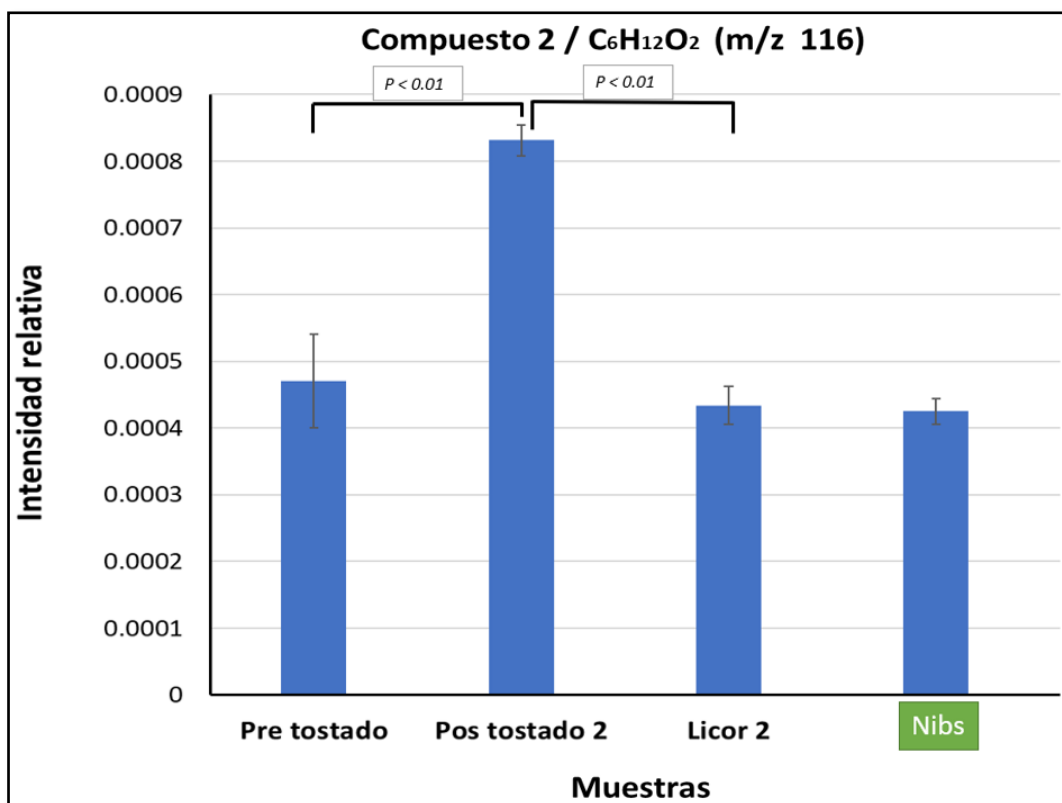
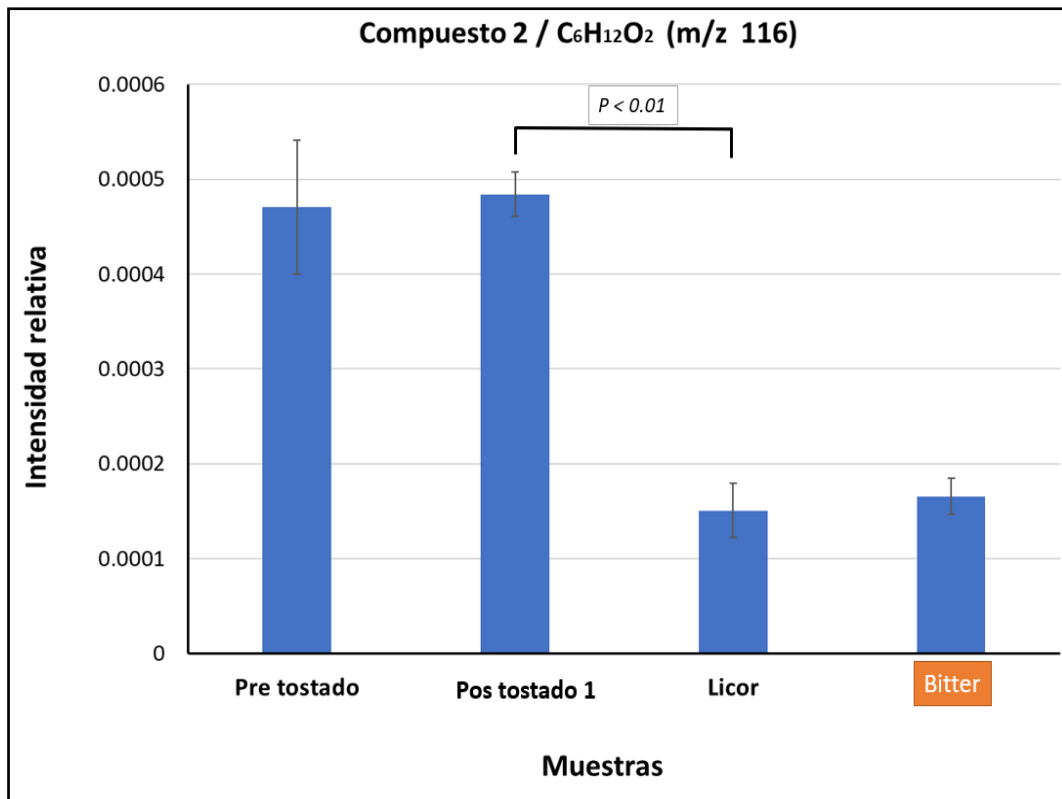


Figura 35. Desarrollo del compuesto marcador 2 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

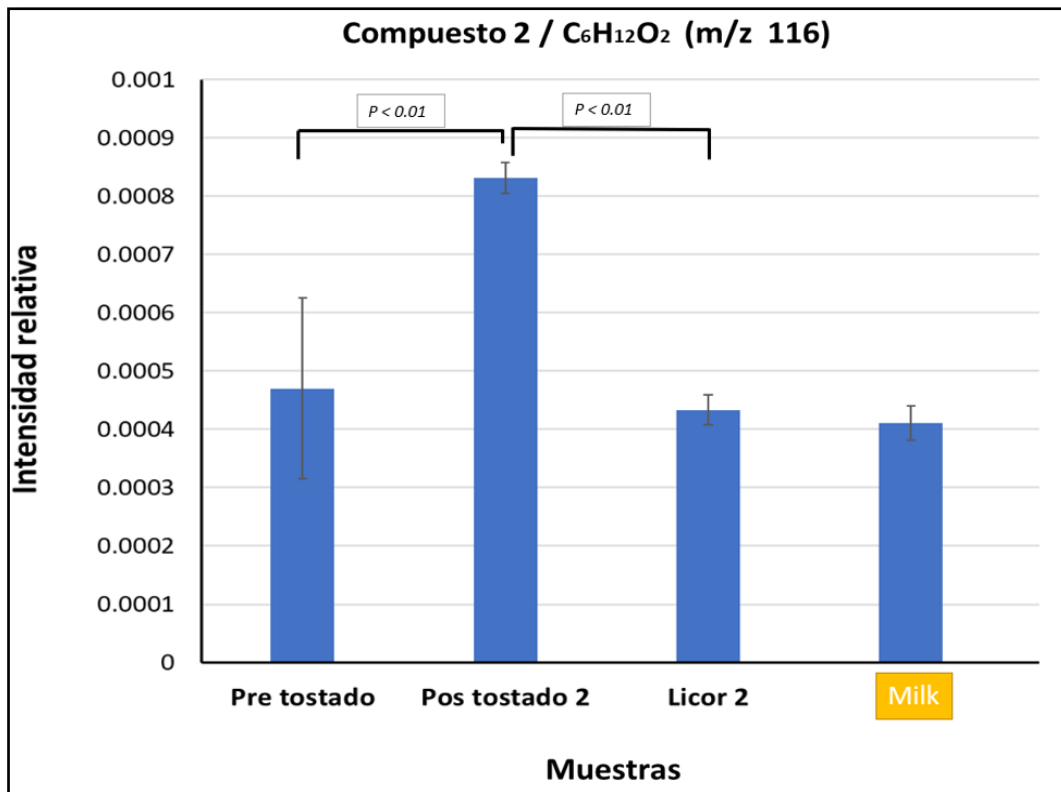


Figura 35. Desarrollo del compuesto marcador 2 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

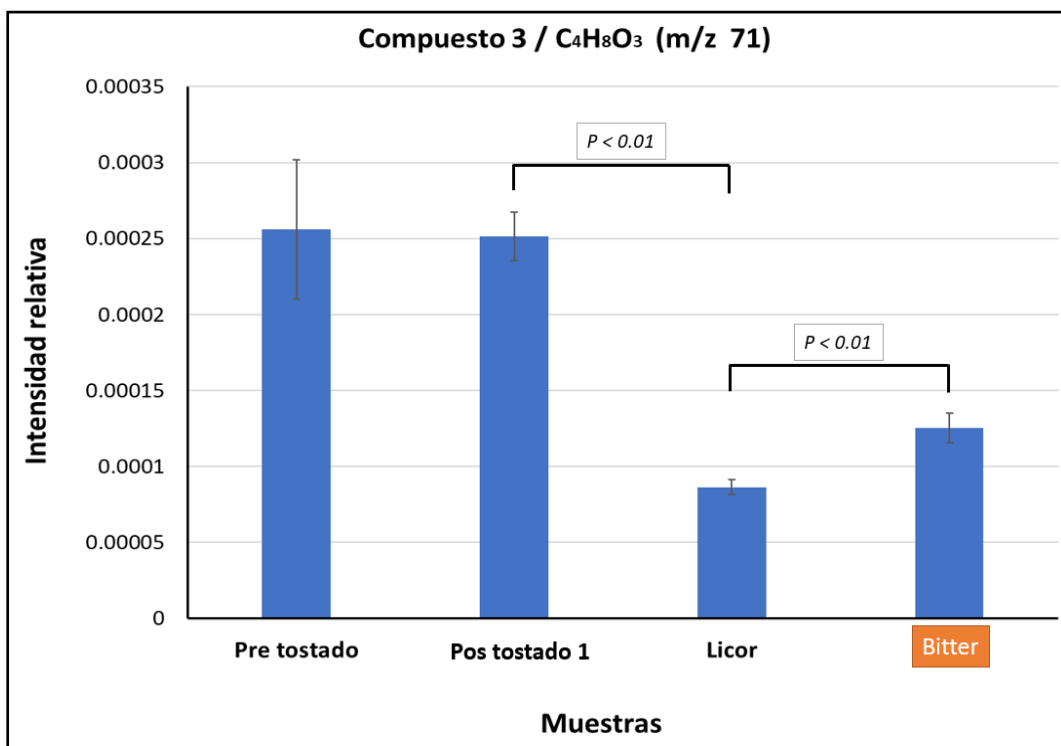


Figura 36. Desarrollo del compuesto marcador 3 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

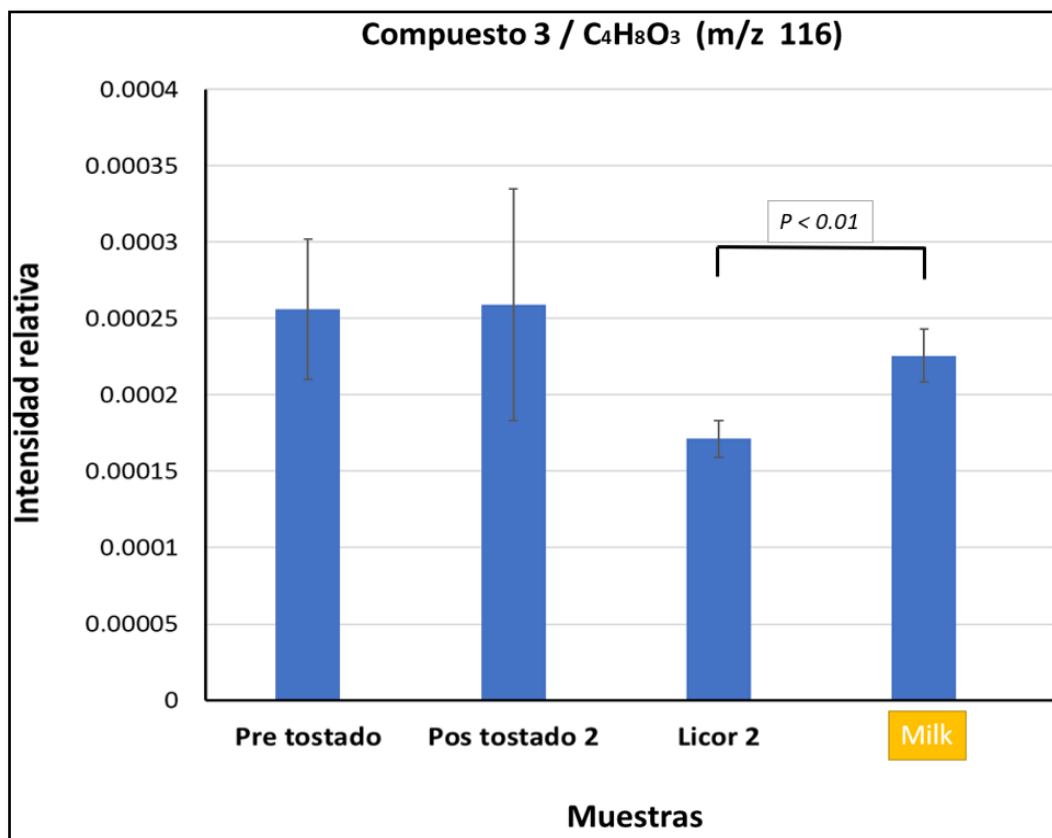
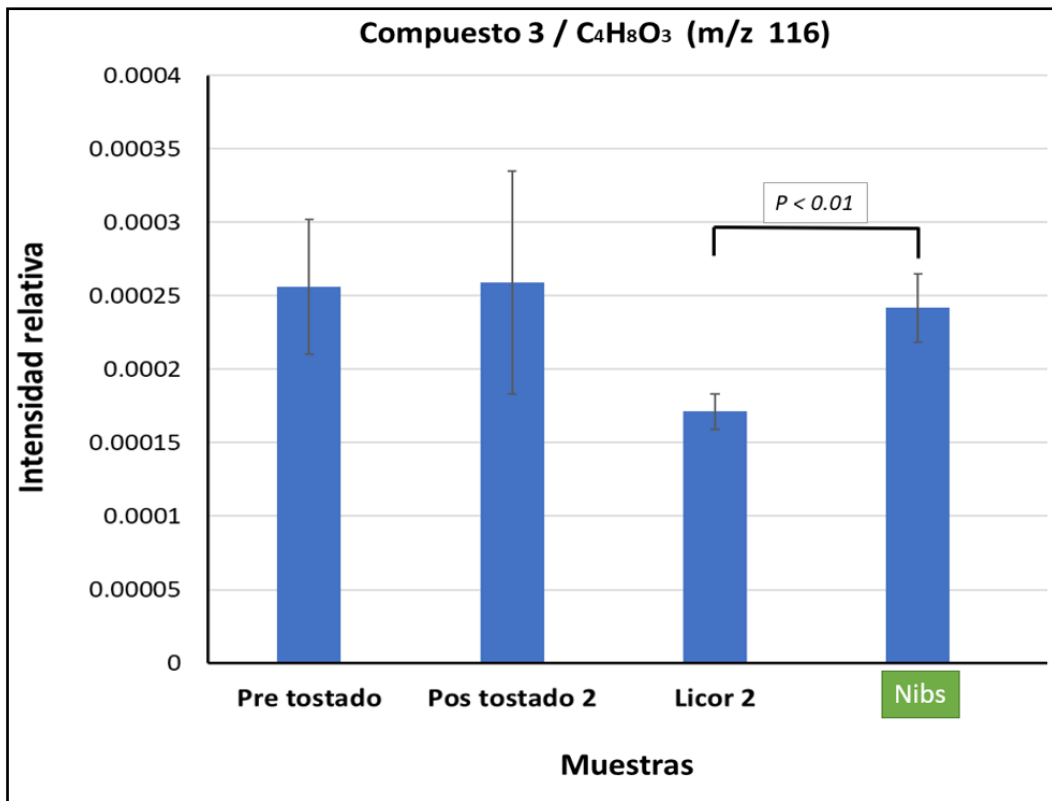


Figura 36. Desarrollo del compuesto marcador 3 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

El desarrollo del compuesto 4 durante cada etapa se muestra en la Figura 37. Se observa que en la elaboración de Bitter hay una gran intensidad de este compuesto en los granos pre tostados, aunque hay una disminución significativa en la intensidad de este compuesto en el proceso de conchado y que se mantiene hasta el producto final. En la elaboración de Nibs y Milk se puede observar también que la intensidad mayor de este compuesto está en los granos pre tostados. En las etapas posteriores se observa una disminución en la intensidad, pero que vuelve a incrementarse en los productos finales. En este caso, las intensidades de los chocolates Nibs y Milk difieren un poco más, por lo que podría entenderse que el incremento en la intensidad del compuesto 4 en el chocolate Nibs se debe a la adición de las semillas tostadas (nibs) en la barra de chocolate.

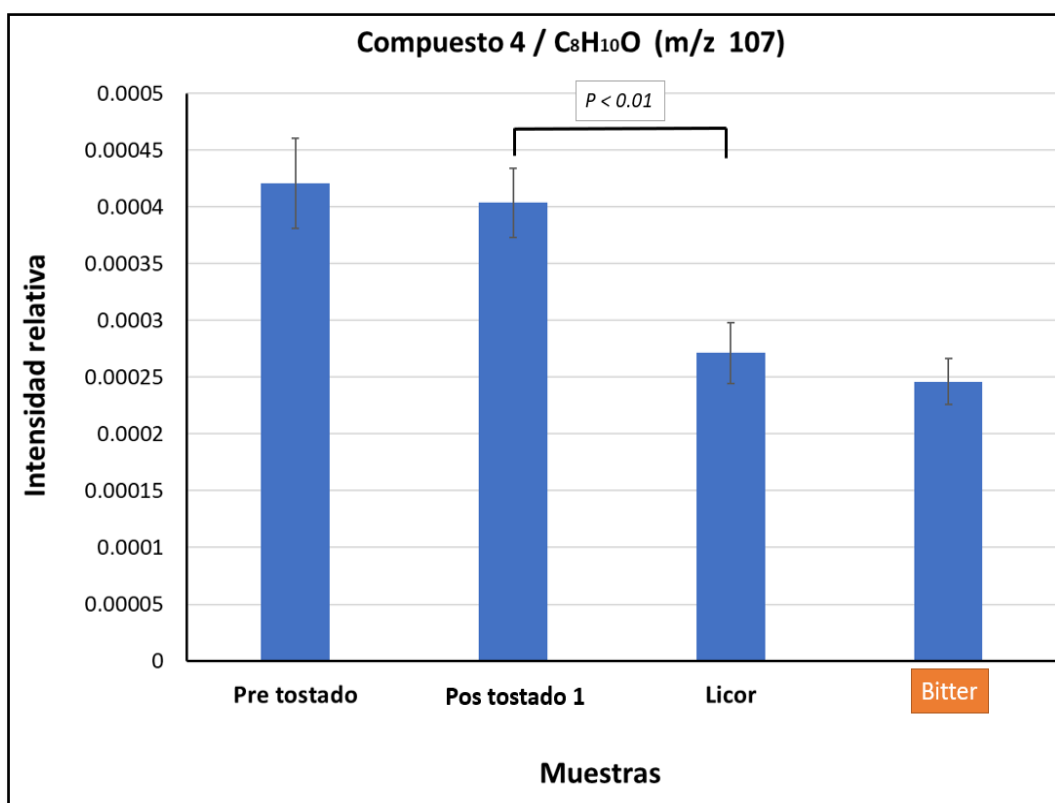


Figura 37. Desarrollo del compuesto marcador 4 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

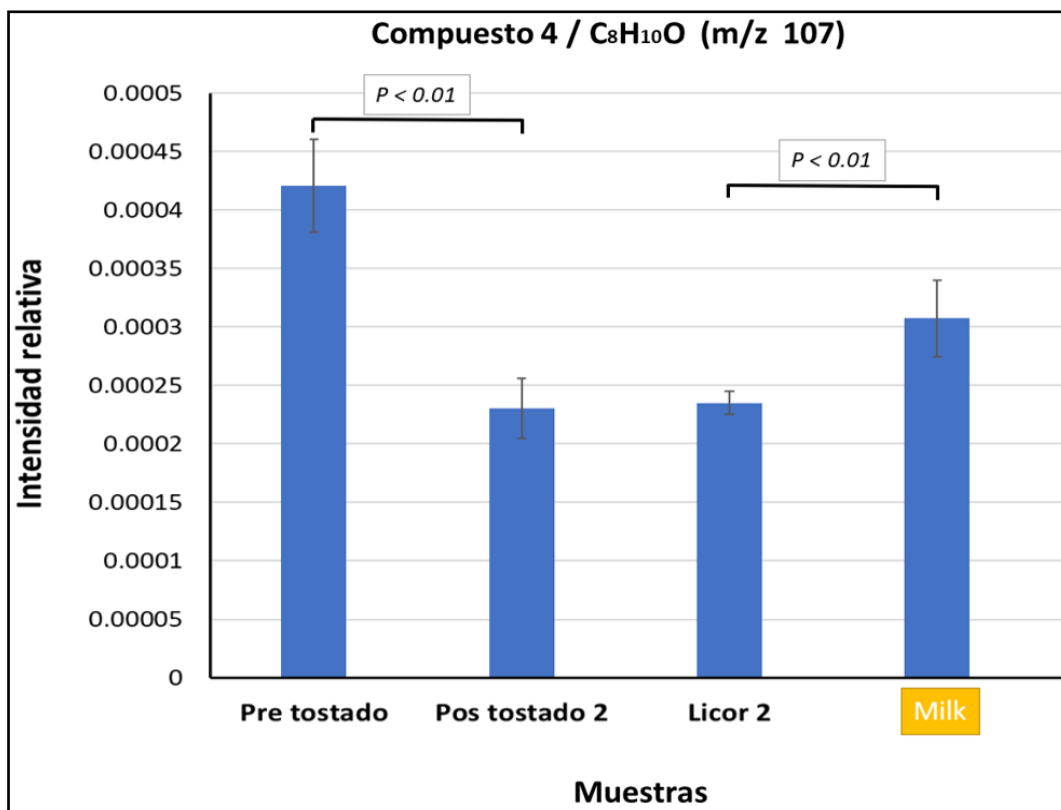
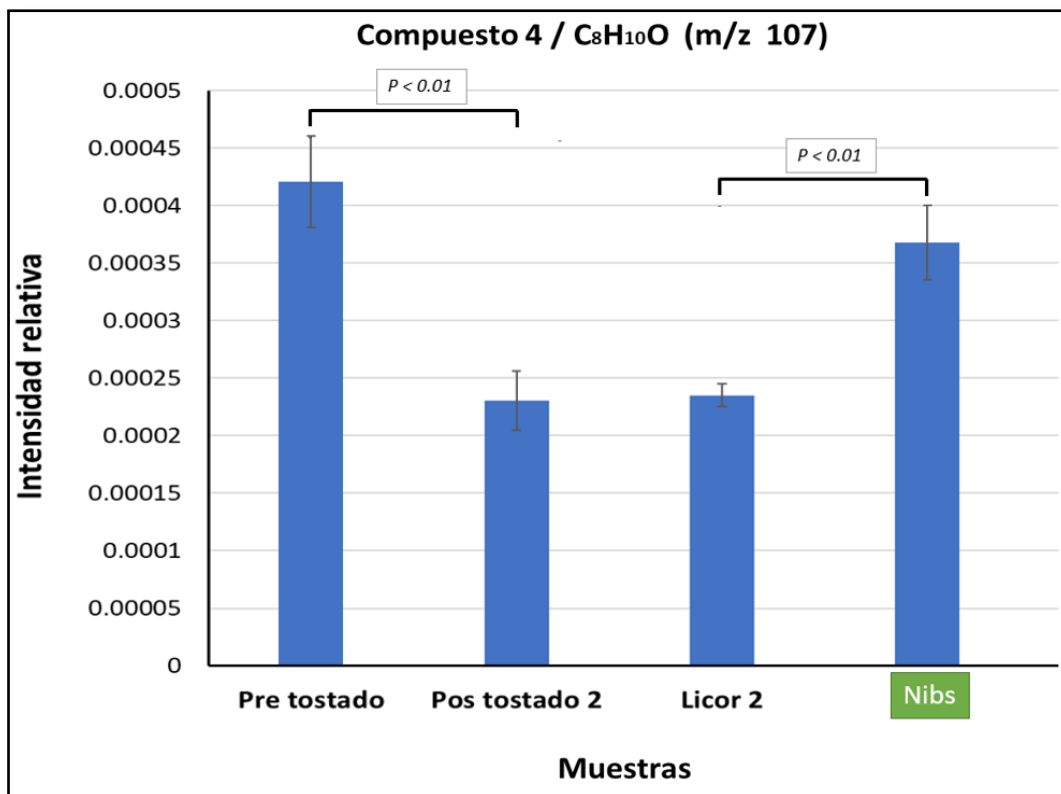


Figura 37. Desarrollo del compuesto marcador 4 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

En la Figura 38 se observa que el compuesto 5 obtiene su mayor intensidad en el proceso de tostado, pero luego disminuye hasta el producto final (Bitter) y aumenta en el chocolate Nibs y Milk. Este resultado puede estar relacionado a la adición de algún aditivo alimentario que compensa la pérdida de este sabor durante el proceso de conchado.

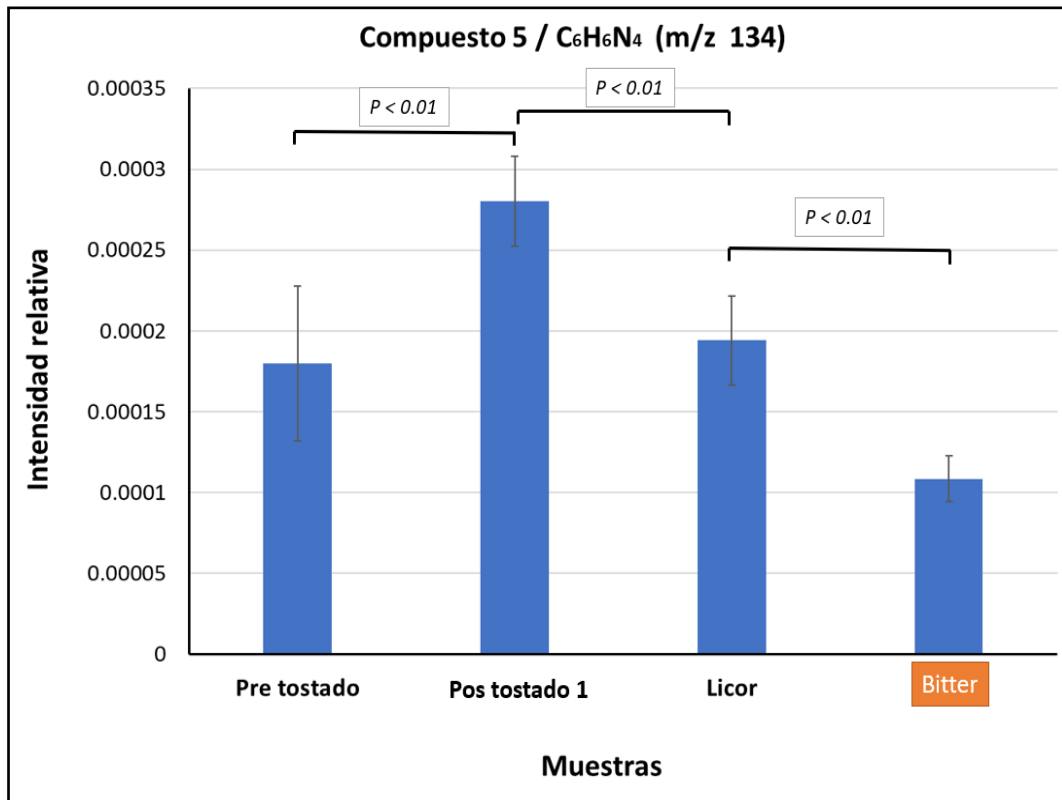


Figura 38. Desarrollo del compuesto marcador 5 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

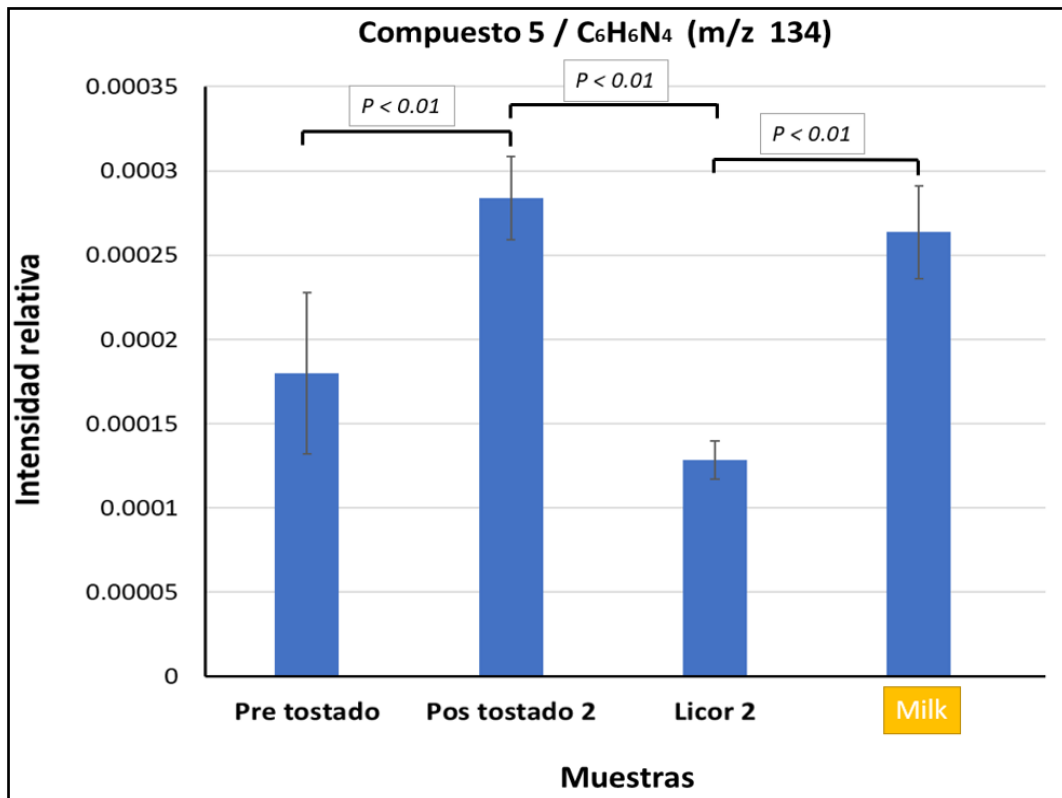
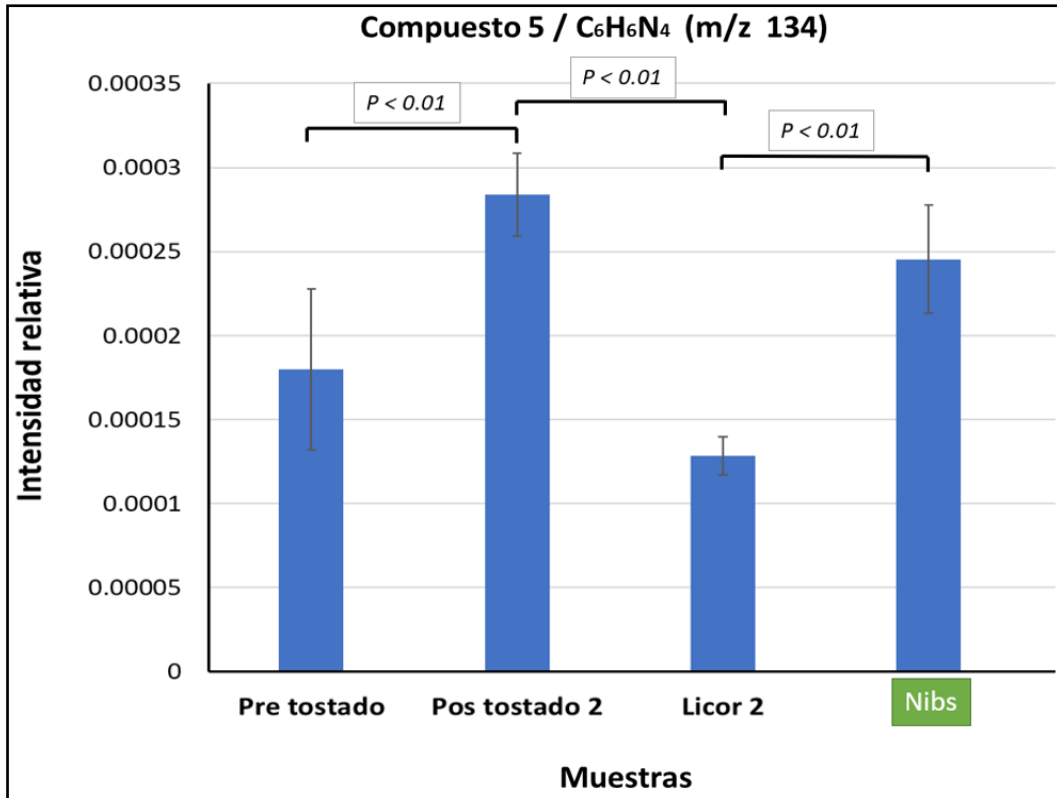


Figura 38. Desarrollo del compuesto marcador 5 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

En la Figura 39 se muestra cómo incrementa la intensidad del compuesto 7 desde los granos pre tostados hasta el chocolate Bitter. Mientras que la intensidad de este compuesto aumenta en el proceso de conchado, pero luego disminuye en los chocolates Nibs y Milk. Por lo tanto, estos resultados pueden sugerir que este compuesto es característico de los granos de cacao de Morropón-Piura y, que se va desarrollando a lo largo del proceso de elaboración. Pero, la intensidad de este compuesto disminuye en la medida en que se le añadan aditivos alimentarios. Se puede confirmar esto porque se tiene el mismo comportamiento que el acetato de 2-feniletilo durante cada etapa.

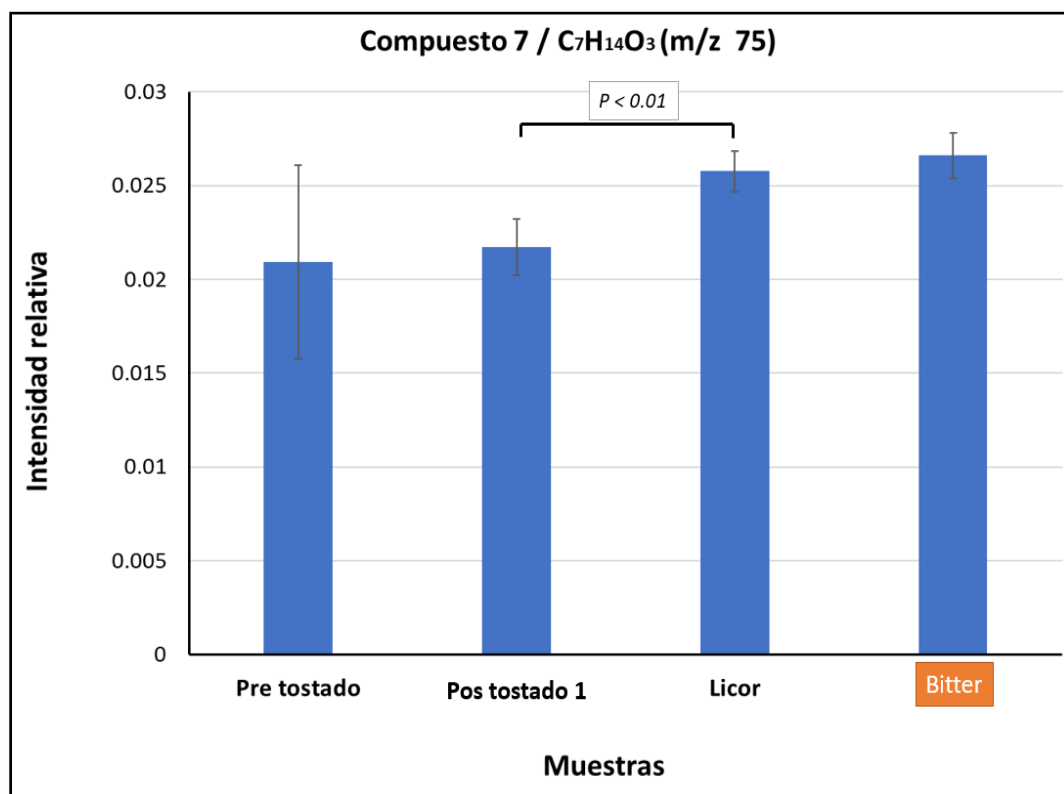


Figura 39. Desarrollo del compuesto marcador 7 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

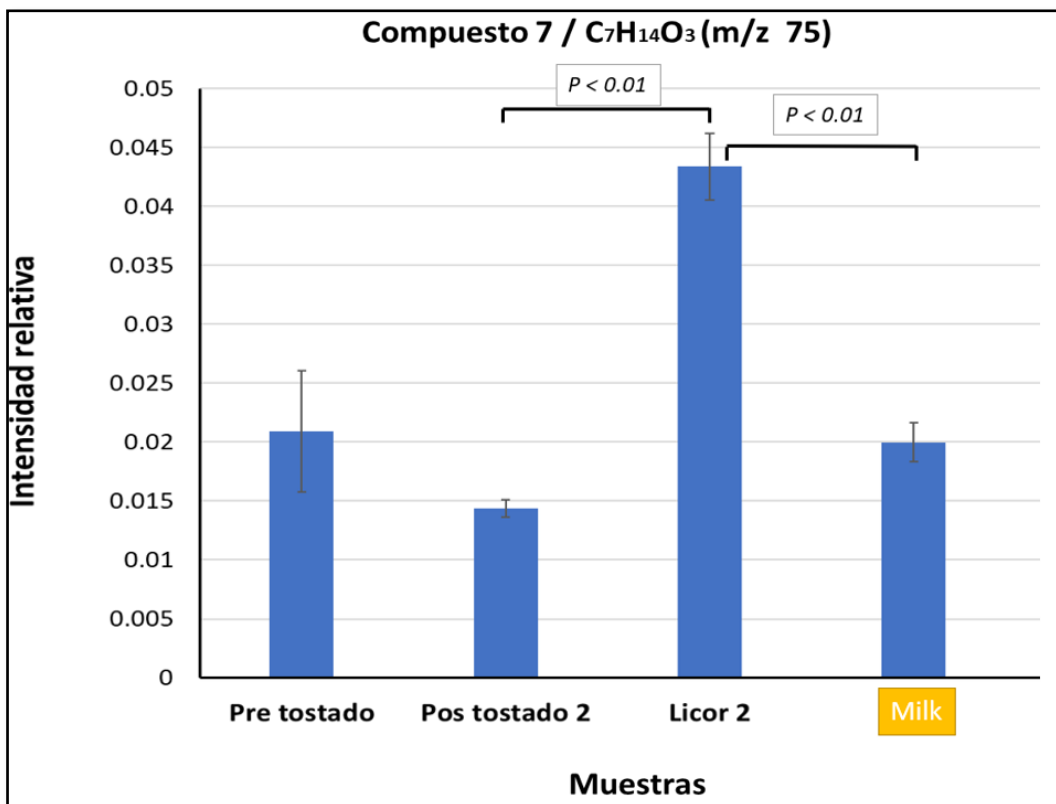
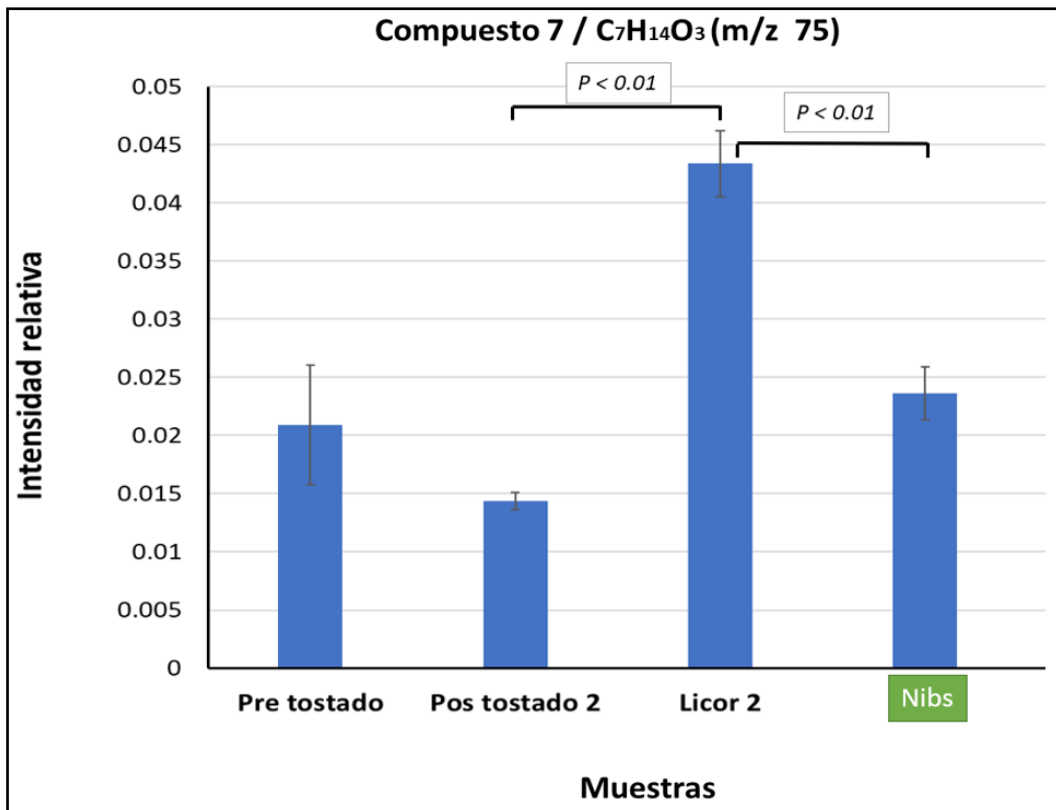


Figura 40. Desarrollo del compuesto marcador 7 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

El desarrollo del compuesto 8 durante cada etapa se muestra en la Figura 40. La intensidad de este compuesto es mayor en el chocolate Bitter que en los chocolates Nibs y Milk. Se observa, además, que la mayor intensidad del compuesto 8 se encuentra en la etapa de tostado. Por lo tanto, este resultado nos sugiere la idea que este compuesto se desarrolló más durante el tostado, y a medida que se va avanzando en el proceso, se va volatilizando por factores de temperatura.

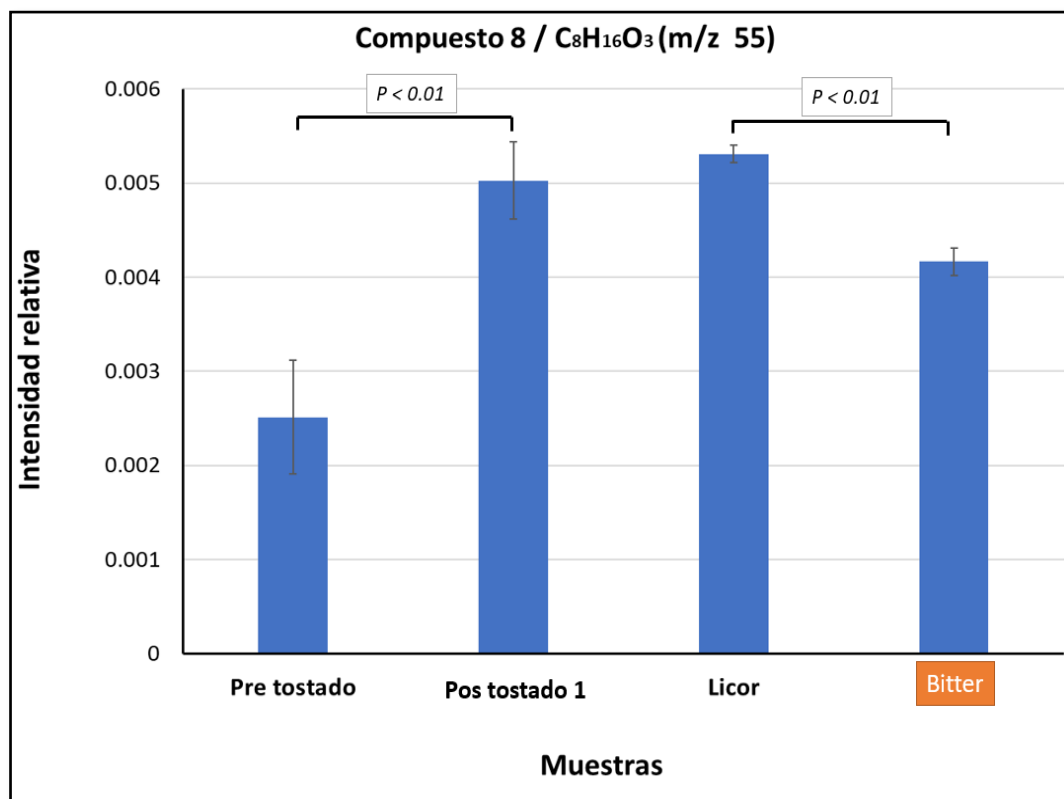


Figura 41. Desarrollo del compuesto marcador 8 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

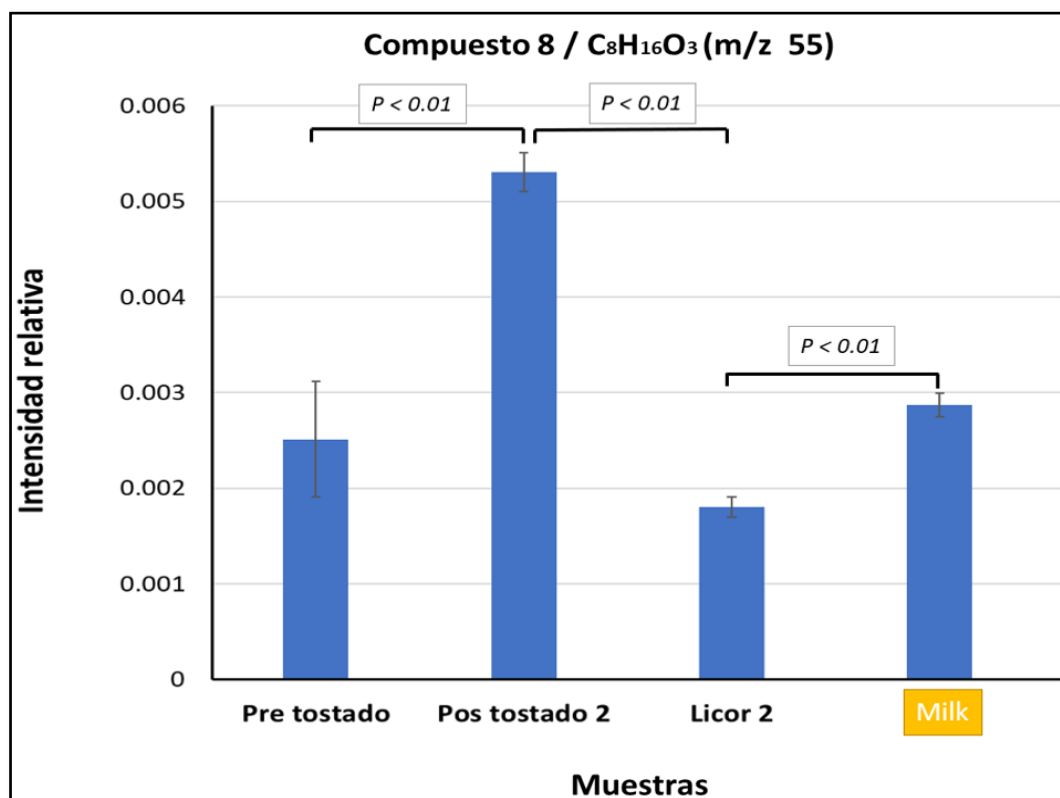
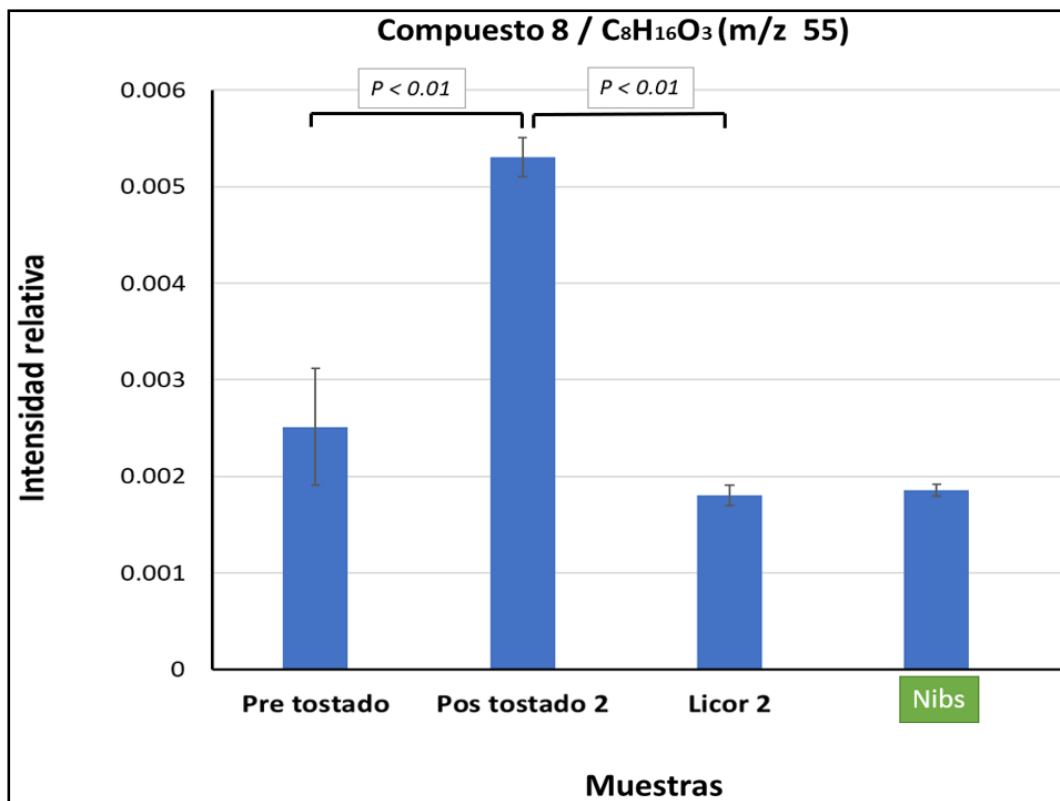


Figura 40. Desarrollo del compuesto marcador 8 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

En la Figura 41 se observa que el compuesto 10 es más intenso en los granos pre tostados, en el caso de la elaboración del chocolate Bitter. Mientras que este compuesto es más intenso en la etapa de conchado de los chocolates Nibs y Milk. Por lo tanto este compuesto podría ser originario del grano de cacao o que fue producido en mayor concentración durante el proceso de fermentación.

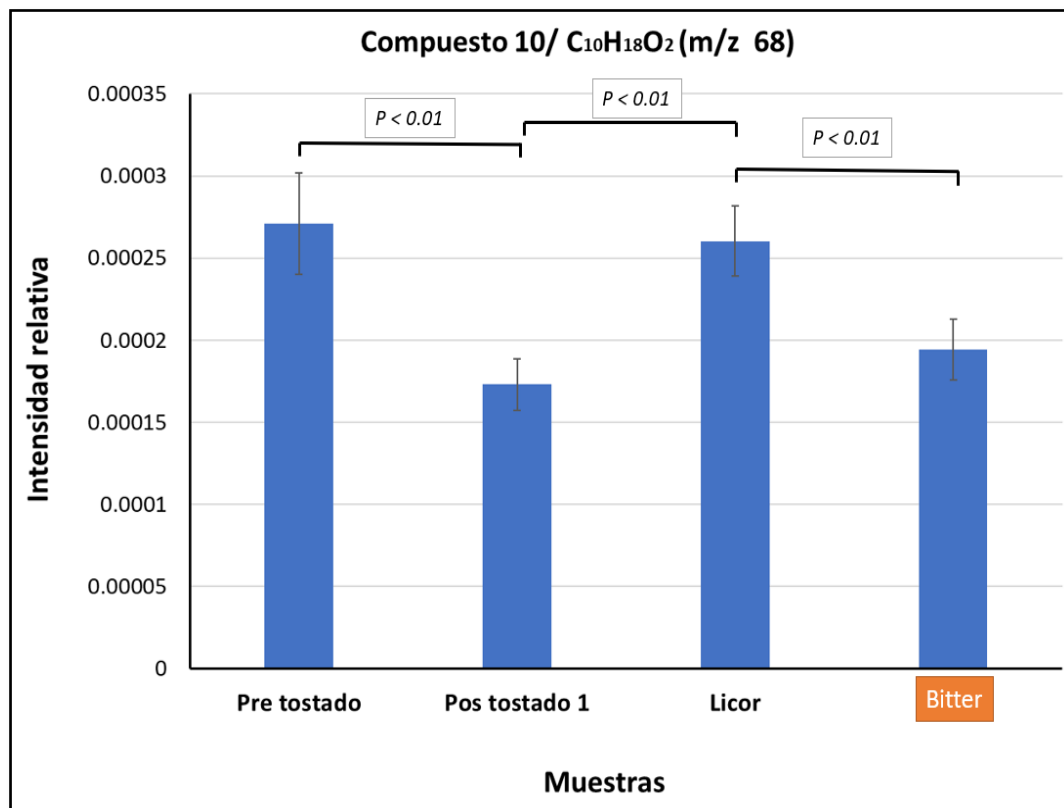


Figura 42. Desarrollo del compuesto marcador 10 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

[Continúa en la siguiente página]

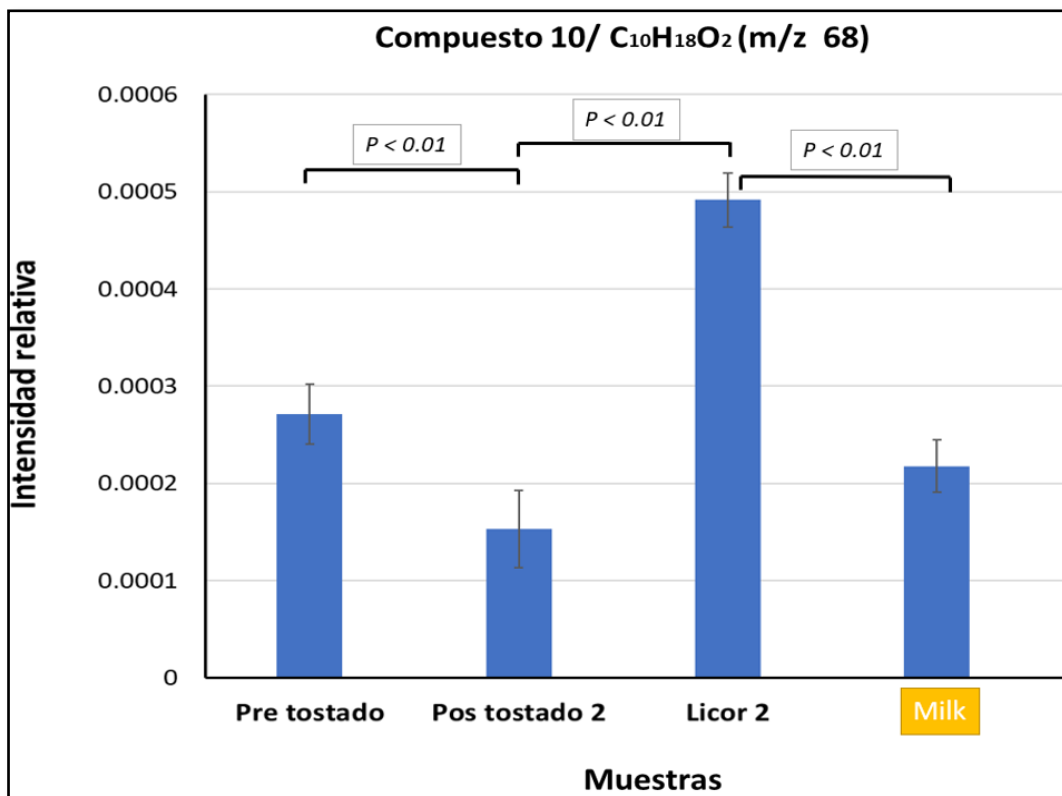
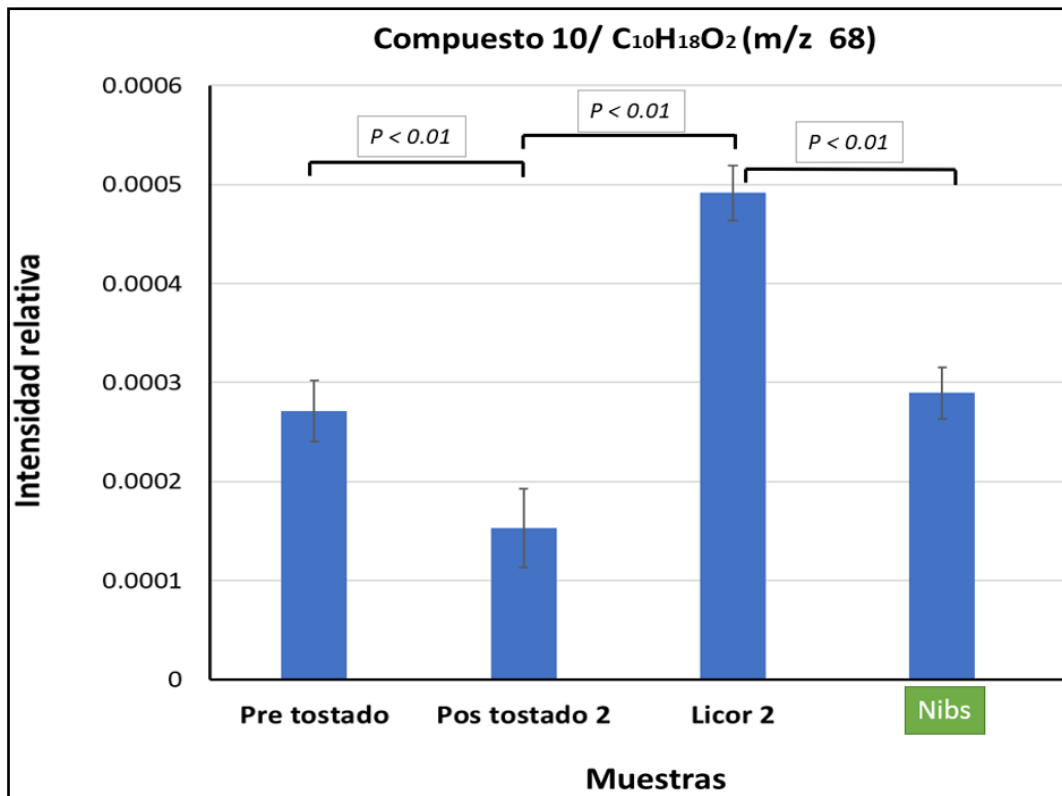


Figura 41. Desarrollo del compuesto marcador 10 durante cada una de las etapas de elaboración de los chocolates.

5.2.4. Evaluación del desarrollo de los sabores durante cada etapa clave de elaboración del chocolate.

En la Figura 42 se muestran los gráficos radiales que describen el desarrollo de los sabores del chocolate Cacaosuyo en cada una de las etapas claves de la elaboración del producto final. Los datos que se utilizaron para obtener cada uno de estos gráficos están descritos en la sección 4.1.6.4 de este documento. Cabe señalar que todos los datos fueron obtenidos experimentalmente por espectrometría de masas.

Se observa que el sabor dulce etéreo es el que está en menor intensidad en los granos pre tostados. Mientras que se puede notar que este sabor aumentó en los granos tostados 2 (relacionados al chocolate Nibs/Milk), mientras que en los tostados 1 incrementó en menor magnitud su intensidad. Por lo que, puede indicar que la diferencia en las condiciones de tostado, afecta en el sabor de lo granos. Además, se puede observar que el sabor dulce/afrutado y a cacao tostado mantuvieron casi constante su intensidad durante la etapa de tostado de los granos de cacao. Por otro lado, el sabor mantecoso/caramelizado disminuyó su intensidad en los granos tostados 2, mientras que lo mantuvo en los granos tostados 1. De manera contraria, el sabor dulce floral/miel aumentó ligeramente en intensidad en los granos tostados 1, mientras que se mantuvo en los tostados 2.

En la etapa de conchado, en donde se obtiene el licor de cacao, se observa que las intensidades de los sabores que cambiaron significativamente fueron el dulce etéreo, mantecoso/caramelizado, y dulce floral/miel. Donde los dos primeros sabores incrementaron considerablemente su intensidad en el proceso de obtención del licor 1 y 2, respectivamente. Mientras que la intensidad del último sabor disminuyó en el proceso de obtención del licor 1.

Finalmente, se observa que el sabor dulce floral/miel, que había disminuido su intensidad en el licor 2, ha aumentado considerablemente para el chocolate Nibs y Milk, los cuales están relacionados a este licor. La explicación de este resultado está en la adición de la manteca de cacao (aditivo alimentario), que contiene a ese sabor en la misma intensidad a la que aparecen, en promedio, en los chocolates Nibs y Milk. Por lo tanto, se puede señalar que la manteca de cacao ayuda a compensar el sabor dulce floral/miel que había disminuido en la etapa del conchado (licor 2).

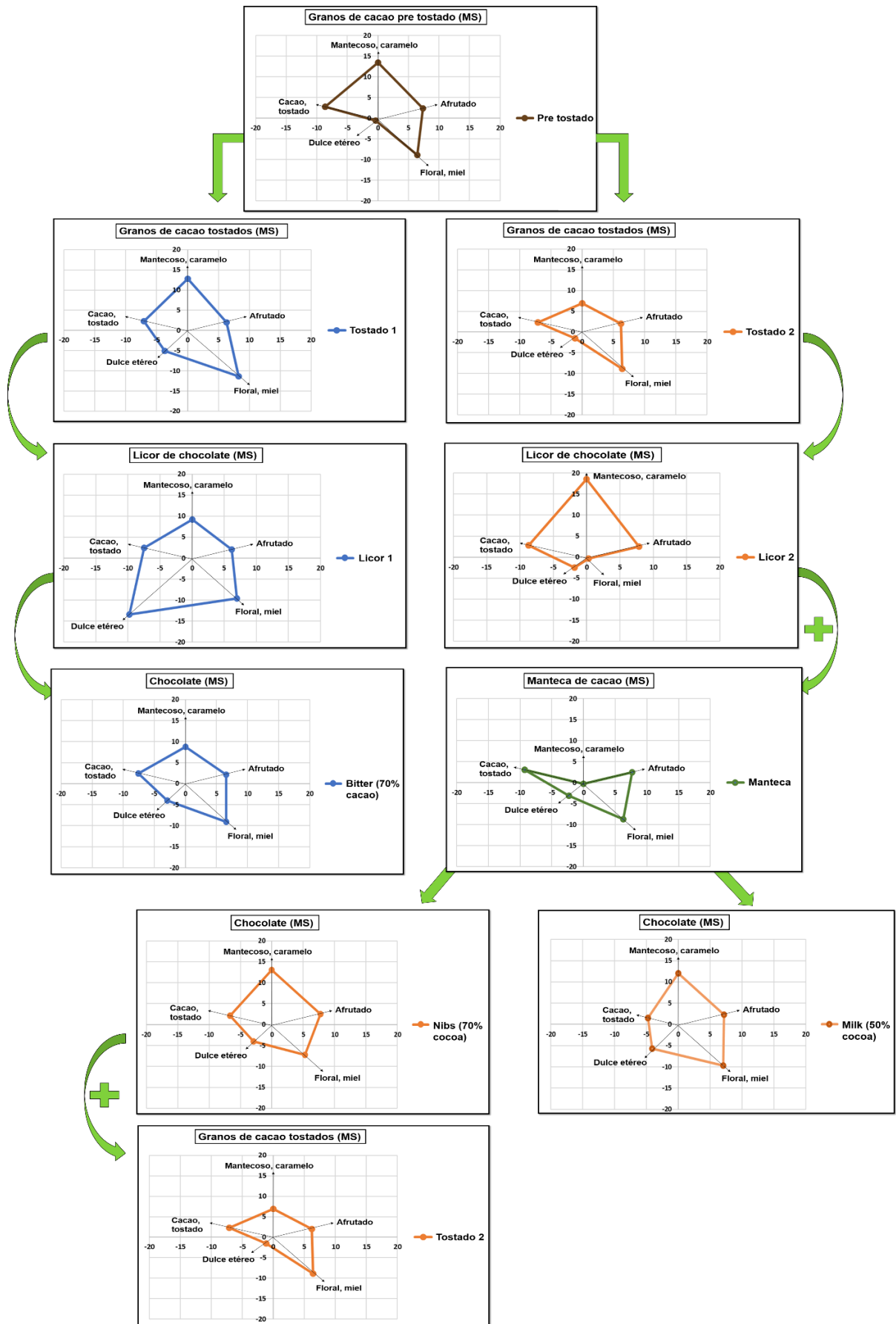


Figura 43. Desarrollo de los sabores en cada etapa de elaboración del chocolate.

5.3. Análisis De Chocolate Por Análisis Directo En Tiempo Real Acoplado A Espectrometría De Masas (DART-MS)

Se decidió desarrollar el protocolo de análisis de chocolate usando DART (direct analysis in real-time) como fuente de ionización, ya que brinda diversas ventajas sobre una fuente de ionización por electrospray. DART permite hacer mediciones de muestras en un tiempo corto (50 segundos aproximadamente), solo requiere una pequeña cantidad de muestra (5 μ L) y además no forma aductos con sodio o potasio y no necesita la presencia de solventes orgánicos como ácido acético, acetonitrilo, metanol, etc., durante la medición. Además, el solvente que se usó para la extracción de chocolate, diclorometano, permitía ver claramente las señales de teobromina y cafeína, pseudo alcaloides característicos del cacao (Ver Figura 43).

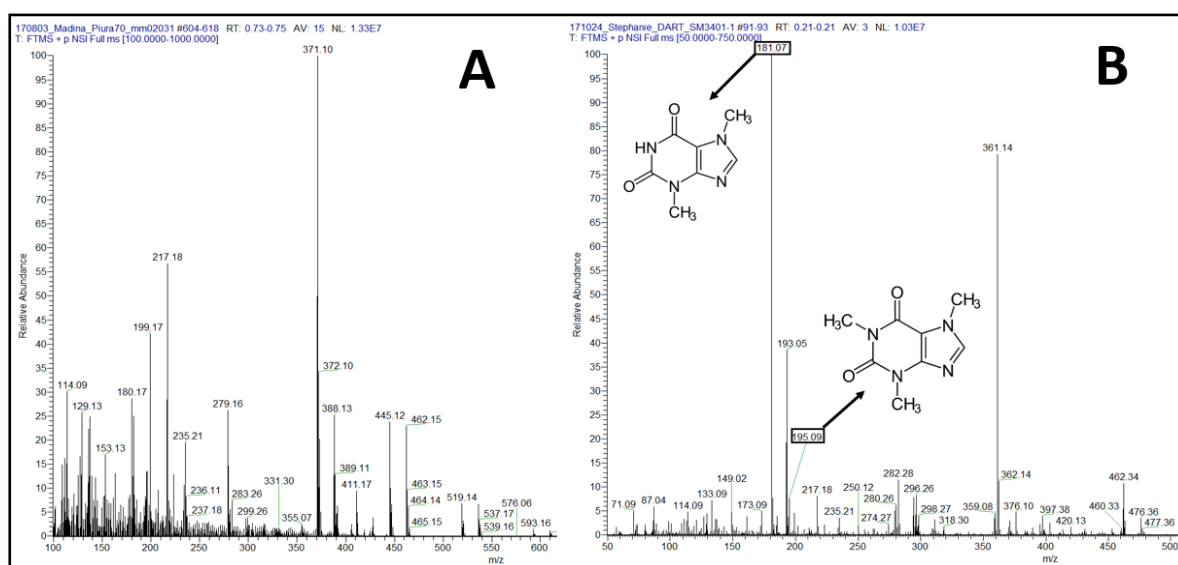


Figura 44. Espectros de masas del chocolate Cacaosuyo 70% Cacao Piura Select (Bitter). Espectro de masas (A) correspondiente a la muestra extraída con pentano. Espectro de masas (B) correspondiente a la muestra extraída con diclorometano.

Se obtienen los espectros para cada chocolate analizado, con un aproximado de 4800 señales en modo positivo. Todas las muestras mostraron señales fuertes que pueden ser asignadas a cafeína (195.0877 m/z) y teobromina (181.0720 m/z). Se encontraron, predominantemente ambas señales características del cacao, en el chocolate Cacaosuyo 70% Cacao Piura Select, asignado con el nombre de “Bitter” (ver Figura 44) y en el chocolate 70% Cacao Piura Nibs, asignado con el nombre de “Nibs” (ver Figura 45), mientras que en el chocolate 50 % Cacao Piura Milk, asignado con el nombre de “Milk” solo se observaba la señal de teobromina (ver Figura 46). El chocolate que es elaborado a partir de granos de cacao de otro origen del Perú, , asignado con el nombre de “Otro A”, también muestra la señal de teobromina y cafeína en su espectro de masas (ver Figura 47). La señal de teobromina, con respecto a la suma total de intensidades, es menos intensa en el chocolate con bajo contenido de cacao, asignado con el nombre de “Otro B” (ver Figura 48).

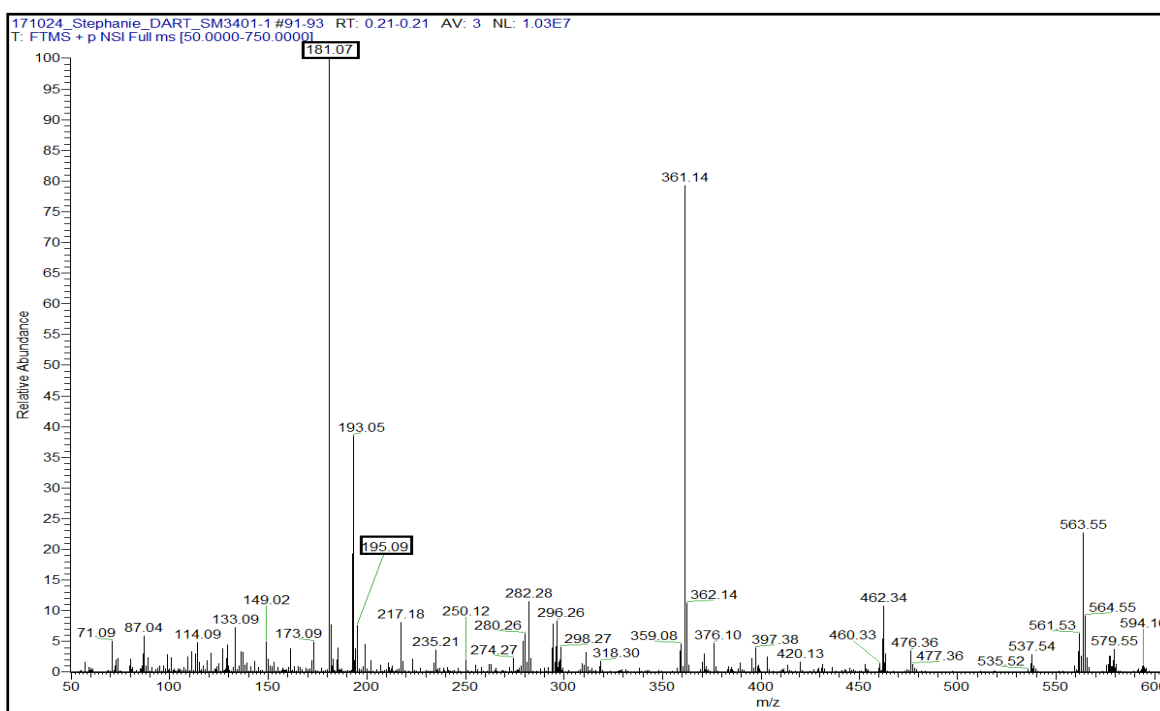


Figura 45. Espectro de masas de la muestra del chocolate Cacaosuyo 70% Cacao Piura Select (Bitter).

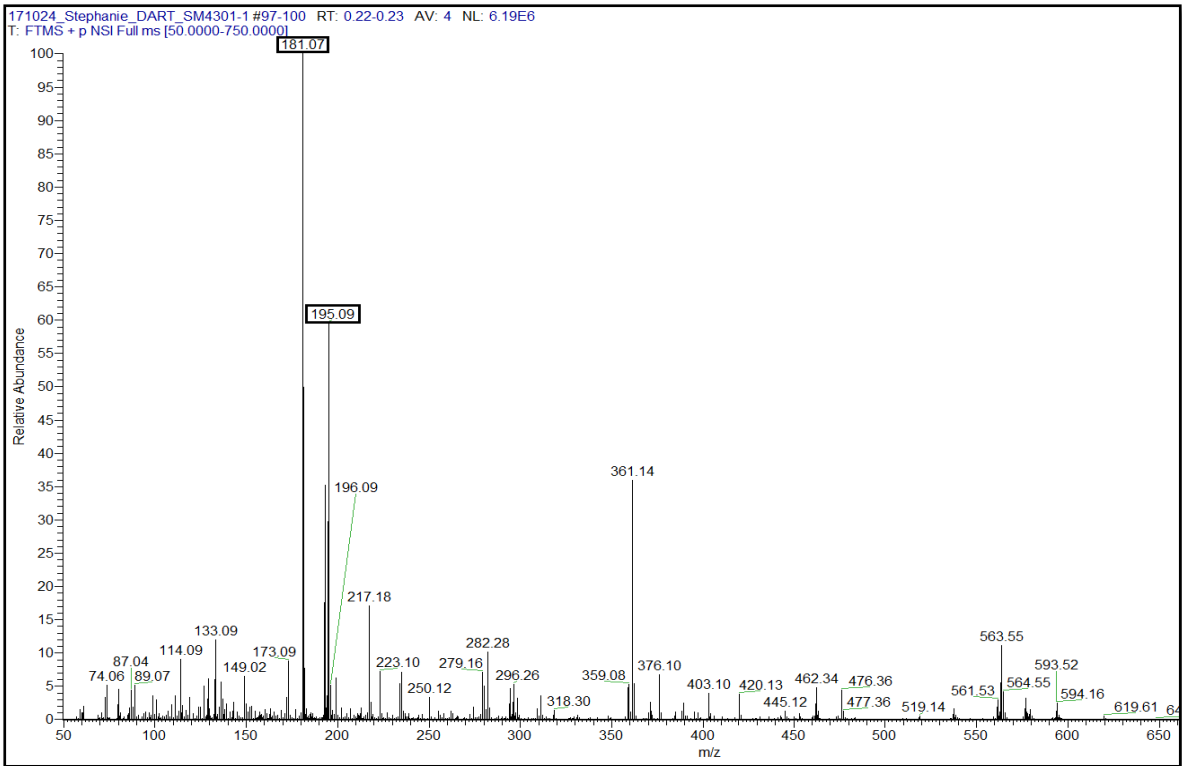


Figura 46. Espectro de masas de la muestra de chocolate Cacaosuyo 70% Cacao Piura Nibs

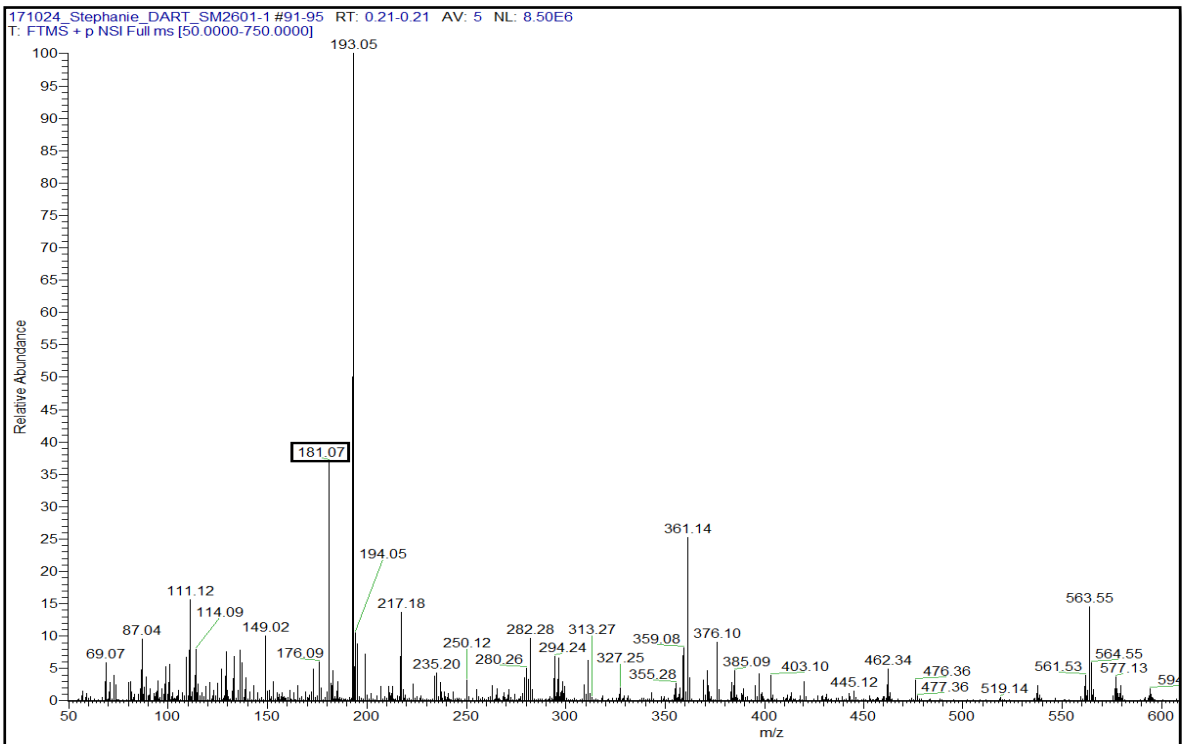


Figura 47. Espectro de masas de la muestra de chocolate Cacaosuyo 50 % Piura Milk.

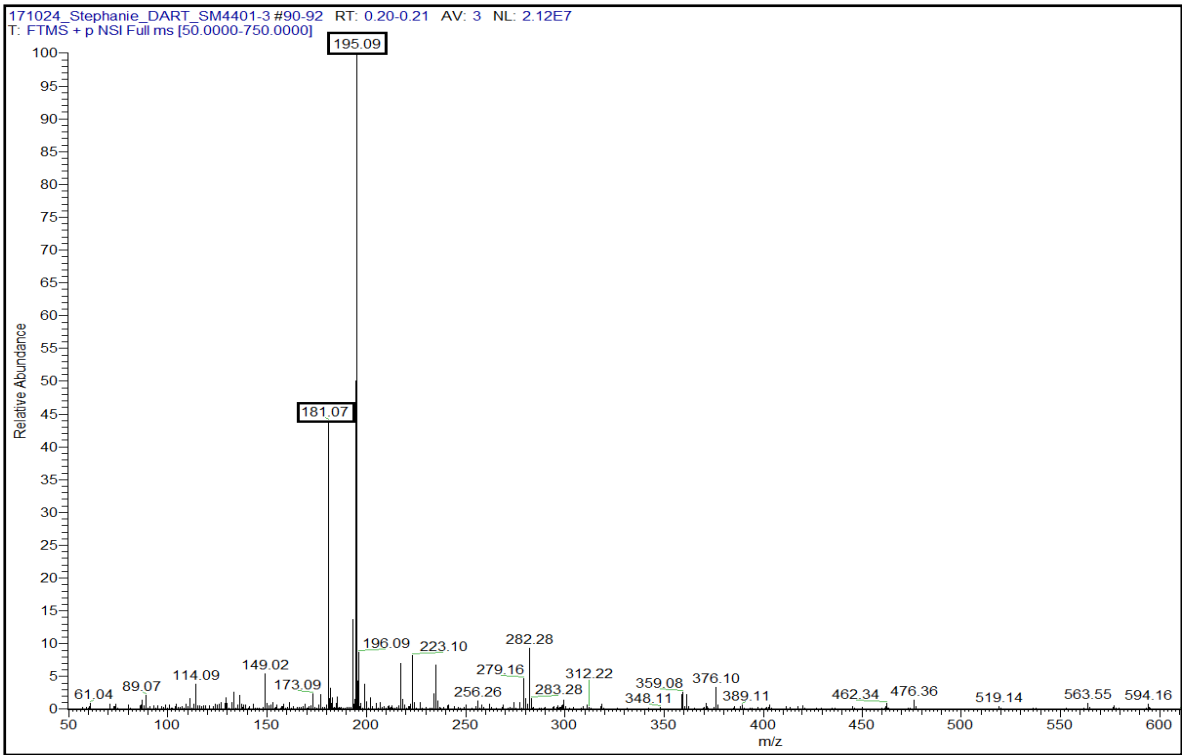


Figura 48. Espectro de masas de la muestra del chocolate “Otro A”.

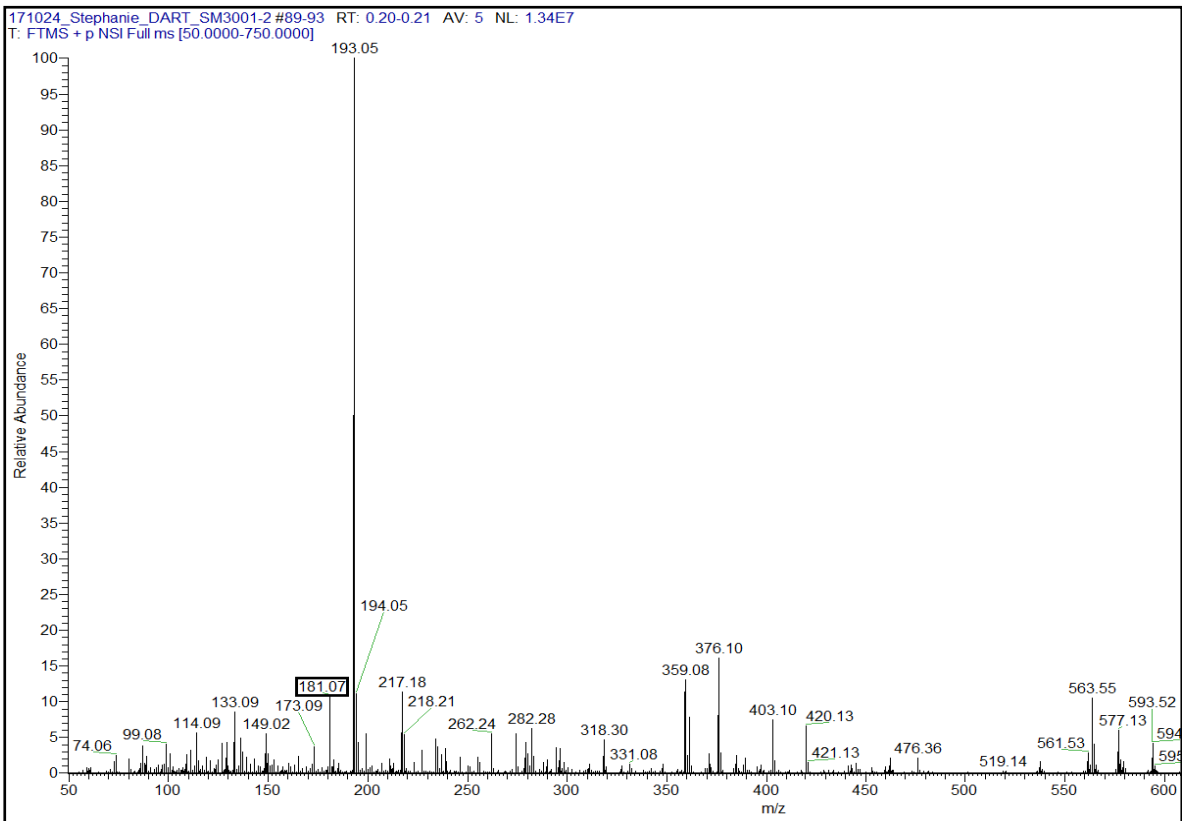


Figura 49. Espectro de masas de la muestra de chocolate “Otro B”.

5.3.1. Procesamiento de datos para el análisis de componentes principales (PCA) para la diferenciación entre chocolates de diferentes contenidos de cacao.

En la Tabla 6 se muestran las masas utilizadas para realizar el PCA y que, además, fueron seleccionadas por su alta reproducibilidad en todas las mediciones.

En la Figura 49 se muestra el filtrado de las señales obtenidas en el espectrómetro de masas. El procesamiento óptimo de estas señales permiten observar una división clara entre los chocolates de Cacaosuyo y los de Otro A y Otro B. Además se puede notar la formación de 5 clústeres, cada uno perteneciente a cada tipo de chocolate. Fueron veintisiete señales (que pueden referirse como metabolitos putativos), las que fueron identificadas por el instrumento Q-Exactive HF - Orbitrap como claves para reconocer si un chocolate pertenece a un chocolate de alto o bajo contenido de cacao.

Tabla 6. Masas empleadas para el análisis de componentes principales (PCA)

N°	m/z	N°	m/z
1	62.0620402	15	238.119722
2	137.082057	16	241.103978
3	177.102153	17	247.14374
4	179.117779	18	261.159381
5	179.837481	19	269.135681
6	180.838724	20	326.304889
7	180.945905	21	362.304888
8	181.195829	22	461.311502
9	181.200125	23	462.31443
10	182.069023	24	463.327249
11	182.075283	25	464.330712
12	182.318636	26	476.358964
13	183.076206	27	477.342945
14	197.128147		

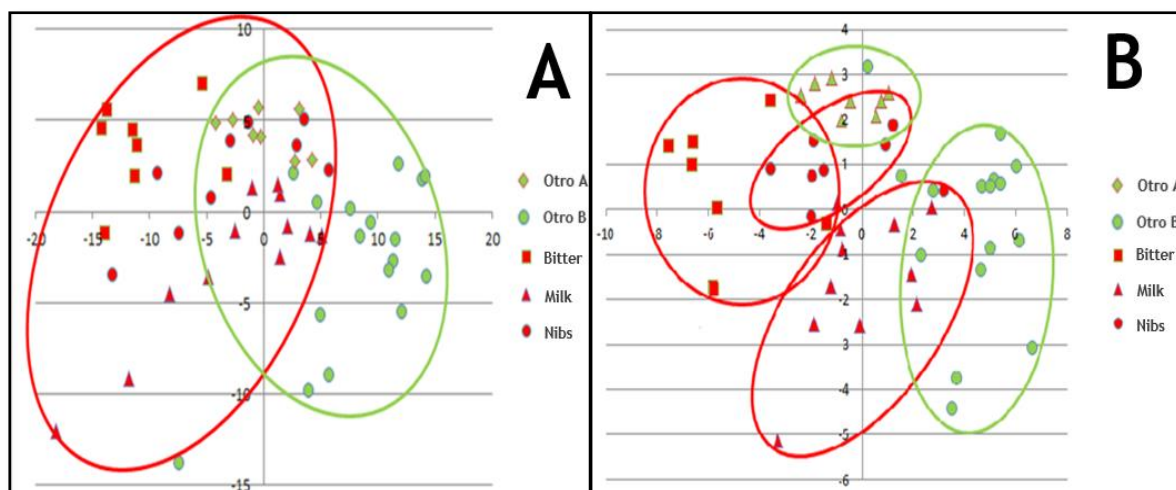


Figura 50. Análisis de componentes principales (PCA) de los cinco chocolates analizados. (A) PCA antes del filtrado de las señales y (B) PCA después del filtrado de las señales.

5.3.2. Análisis de componentes principales (PCA) de los metabolitos involucrados en cada una de las etapas claves de elaboración del chocolate.

En la Tabla 7 se muestran los catorce metabolitos involucrados en el proceso de elaboración del chocolate del norte del Perú. Dos de estas masas son teobromina (m/z 181.0713) y cafeína (195.0871). El procesamiento de estas señales fueron basadas en la intensidad del estándar interno que se utilizó para monitorear el análisis, cuya m/z era 198.09707).

Tabla 7. Masas empleadas para realizar el PCA del análisis en retrospectión

	m/z
1	109.1011879
2	131.0852405
3	138.0660569
4	139.0386277
5	155.1062409
6	171.1011741
7	181.0713823
8	195.0871447
9	196.0903715
10	197.1277163
11	199.1006043
12	219.1736121
13	251.1845983
14	270.2782991

En la Figura 50 se muestran los ocho clústeres que corresponden a cada etapa clave de elaboración del chocolate Cacaosuyo. Cerca a la parte central del PCA se observa que los chocolates están agrupados cerca entre sí en el espacio, mientras que el clúster de los granos pre postados está alejado del resto de los clústeres. Este resultado puede entenderse por la diferencia significativa en el perfil metabólico de los granos de cacao antes y después de pasar por el proceso de tostado.

El chocolate Bitter está cerca al licor 1, que es propio de su elaboración, pero el tostado 2, que también se encuentra cerca a este chocolate, no tiene ninguna relación dentro de su proceso. De la misma manera se observa que el licor 2 y el tostado 1 se encuentran lejos de sus productos finales (Nibs/Milk y Bitter, respectivamente), por lo que podría estar involucrado la cantidad de muestras que fueron medidas. Por lo tanto, sería ideal volver a hacer más replicas de cada muestra.

Finalmente, se observa una tendencia interesante en el PCA 3D. Las muestras de licores se encuentran cerca entre sí, y ambos están hacia la izquierda del PCA, mientras que las muestras de granos pre tostados y post tostados están en la parte superior derecha y en el centro superior, respectivamente. Los chocolates se localizan en el medio del PCA. Por lo tanto, al encontrar esta tendencia, podría usarse esta nueva técnica analítica, DART-MS, como control de calidad en las industrias chocolateras.

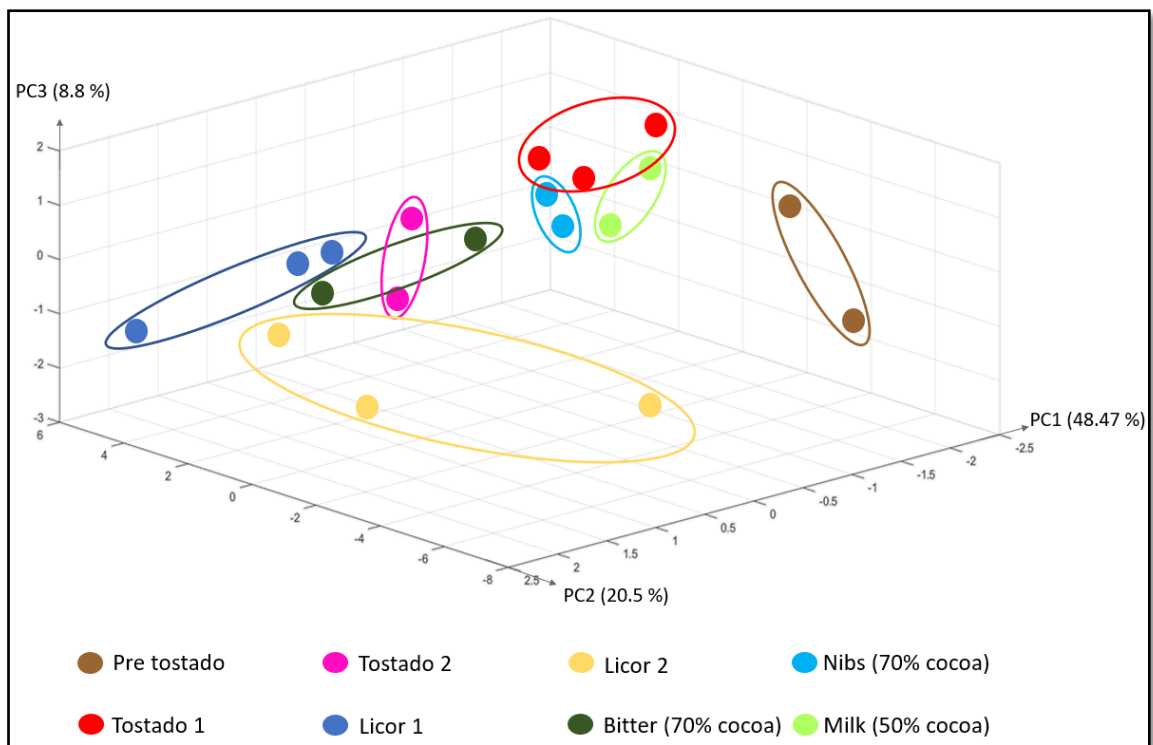


Figura 51. PCA en tres dimensiones (PCA-3D) del análisis de los metabolitos involucrados en las etapas críticas de elaboración del chocolate Cacaosuyo, por DART-MS.

6. Conclusiones

Se diseñó y optimizó un protocolo para analizar los chocolates de diferentes regiones del Perú por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se identificaron once compuestos como marcadores principales para el cacao fino y de aroma de la región norte del Perú, y su patrón se comparó con el cacao de otra región del Perú y con los diferentes productos (chocolates) de una misma región.

Se automatizó el procesamiento de los datos obtenidos en las mediciones haciendo uso del programa estadístico Matlab. Se logró realizar el análisis de componentes principales (PCA) y que, además, fue de gran utilidad para lograr diferenciar los chocolates provenientes de dos regiones diferentes del Perú y para identificar los once marcadores de sabor del chocolate Cacaosuyo de Morropón-Piura.

Se analizaron las muestras de los granos pre tostados, post tostados y licor de cacao de un mismo lote de cacao por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Con los datos obtenidos de estas mediciones, se realizó el análisis de componentes principales (PCA) que logró agrupar en clústeres a cada uno de los conjuntos de muestras. Estos resultados permitieron dar a conocer que la elaboración de los chocolates de Cacaosuyo provienen de dos condiciones diferentes de tostado, por ende, de dos tipos de licor de cacao. Además, se observó que esta diferencia de condiciones, dentro de los procesos de elaboración, afecta en la intensidad de algunos compuestos marcadores.

El resultado obtenido en este análisis multivariante, permitió diferenciar a las muestras en relación a su perfil aromático. Además, se pudo observar cómo estos marcadores de sabor del chocolate de Piura se fueron desarrollando en cada una de las etapas de fabricación del chocolate. Finalmente, se evaluó el desarrollo de los sabores del chocolate de Cacaosuyo con

los datos obtenidos del PCA y, se observó que el aditivo alimentario, manteca de cacao, puede recuperar el sabor que había disminuido durante el proceso de elaboración del chocolate.

Se diseñó un protocolo para identificación de chocolate usando la técnica analítica de espectrometría de masas acoplada a la fuente de iones de análisis directo en tiempo real (DART-MS). Con este análisis se logró diferenciar las muestras que estaban altamente relacionadas a los dos compuestos pseudo alcaloides, teobromina y cafeína (característicos del cacao) de aquellos que no lo estaban. Y así, se pudo diferenciar las muestras de chocolate de diferentes contenidos de cacao.

Con la nueva técnica analítica DART-MS se logró obtener el PCA de las muestras de granos de cacao, licor y chocolate en clústeres separados. Por lo que esta técnica puede ser empleada como control de calidad en las empresas chocolateras para monitorear la calidad de sus productos, no solo de los chocolates, sino también de cada etapa clave de elaboración de los mismos. Además que puede aprovecharse las grandes ventajas que tiene: análisis en poco segundos y una cantidad mínima de muestra.

La utilidad y trascendencia de la presente investigación radica en que se podrían emplear estos marcadores de sabor para el control de calidad tanto de los subproductos como del producto final durante cada etapa de manufactura del chocolate. La presente tesis contribuye en el conocimiento y perfeccionamiento de la química de la fabricación del chocolate en los próximos años.

7. Bibliografía

- Abdi, H., & Williams, L. (2010). Principal component analysis. Wiley interdisciplinary Reviews. *Computational Statistics*, 2, 433-459.
- Aculey, P., Snitkjaer, P., Owusu, M., Bassompierre, M., Takrama, J., Norgaard, L., Nielsen, D. (2010). Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics . *Journal of Food Science*, 75, 300-307.
- Adamek, P., Bergstorm, B., Borjesson, T., & Stolmann, U. (1992). Determination of volatile compounds for the detection of moulds. *Modern Methods in Food Mycology*, 327-336.
- Afoakwa, E. (2012). Chocolate and cocoa, flavor and quality. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1-19. doi:10.1002/0471238961.chocafoa.a01
- Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor Formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 840-857.
- Albak, F., & Tekin, A. (2016). Variation of total aroma and polyphenol content of dark chocolate during three phase of conching. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 848-855.
- Analitek*. (31 de Mayo de 2018). Recuperado el 4 de Diciembre de 2018, de Espectrometría de masas (MS); fundamento y equipos de tecnología avanzada: <http://blog.analitek.com/espectrometria-de-masas-ms-fundamento-y-equipos-de-tecnologia-avanzaca-0-1>
- Andina*. (19 de Julio de 2018). Recuperado el 11 de Abril de 2019, de Producción de cacao beneficia a más de 90,000 familias pobres a nivel nacional: <https://andina.pe/agencia/noticia-produccion-cacao-beneficia-a-mas-90000-familias-pobres-a-nivel-nacional-718117.aspx>

- Aprotosoiaie, A., Luca, S., & Miron, A. (2016). Flavor chemistry of cocoa and cocoa products- an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 73-91.
- Armando, C. (2016). *Agro al día*. Recuperado el 24 de Noviembre de 2018, de Agro al día: http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/videoconferencias/2017/estudio_cacao_para_iica.pdf
- Awua, P. (2002). Cocoa processing and chocolate manufacture in Ghana. *David Jamieson and Associates Press Inc.,.*
- Brelinski, B. (17 de Junio de 2018). *Flavors of Cacao*. Recuperado el 14 de Febrero de 2019, de http://flavorsofcacao.com/chocolate_database.html
- Bro, R., & Smilde, A. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6, 2812-2831.
- Brunetto, M., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, A., . . . Romero, C. (2007). 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 Chemistry*, 100, 459-467.
- Caligiani, A., Cirlini, M., Palla, G., Ravaglia, R., & Arlorio, M. (2007). GC-MS detection of chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. *Chirality*, 19, 329-334.
- Careri, M., Bianchi, F., & Corradini, C. (2002). Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *Journal of Chromatography A*, 970, 3-64.
- Centro de Innovación del Cacao*. (s.f). Recuperado el 30 de Enero de 2019, de <http://www.cic.pe/cadena-valor/>
- Chetschik, I., Kneubühl, M., Chatelain, K., Schlüter, A., Bernath, K., & Hühn, T. (2017). Investigations on the aroma of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L.) and its influence on the odor of fermented cocoa bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 2467-2472.

- Chocolateo*. (s.f.). Recuperado el 5 de Diciembre de 2018, de Process of manufacture:
<https://chocolateo.weebly.com/manufacture-process.html>
- Cocoa Ecuador*. (s.f.). Recuperado el 22 de Febrero de 2019, de Proceso de cultivo del cacao:
<http://cocoaecuador.com/proceso-de-cultivo/>
- Cody, R., Laramée, J., Nilles, J., & Durst, H. (2005). Direct Analysis in Real Time (DART tm) Mass Spectrometry. *JEOL News*, 40, 8-12.
- Corporación Fortaleza del Valle*. (2015). Recuperado el 5 de Febrero de 2019, de
<https://fortalezadelvalle.org/cacao-fino-de-aroma/>
- de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2013). *Mass spectrometry*. John Wiley & Sons.
- Dimick, P., & Hoskin, J. (1999). The chemistry of flavor development in chocolate. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, 3, 137-152.
- Ferro, S. (15 de Marzo de 2013). *Popular Science*. Recuperado el 22 de Febrero de 2019, de
Your Complete Guide To Chocolate Flavors:
<https://www.popsci.com/science/article/2013-03/what-does-peruvian-criollo-chocolate-taste-infographic>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations*. (18 de Enero de 2017). Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Giacometti, J., Jolić, S., & Josić, D. (2015). Cocoa processing and impact on composition. *Academic Press Elsevier*, 605-612.
- Gross, J. (2013). Direct analysis in real time—a critical review on DART-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 63-80.
- Guehi, S., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, D., & Zahouli, G. (2010). Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2, 163-171.

- Ho, V., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72-87.
- Huyser Möller B.V. (s.f). Recuperado el 16 de Noviembre de 2018, de <http://www.huysermoller.nl/es/contact.html>
- Inforegión. (27 de Febrero de 2013). Recuperado el 12 de Febrero de 2019, de Exportarán cacao de Tocache a Estados Unidos y Suiza: <http://www.inforegion.pe/152220/exportaran-cacao-de-tocache-a-estados-unidos-y-suiza/comment-page-1/>
- Iniciativa Latinoamericana del Cacao. (Octubre de 2018). Recuperado el 11 de Abril de 2019, de http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1347/OLC_CAF_boletin_4_Espa%F1ol.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- International Cocoa Organization. (26 de Julio de 2016). Recuperado el 12 de Octubre de 2018, de ICCO Panel recognizes 23 countries as fine and flavour cocoa exporters: <https://www.icco.org/about-us/icco-news/319-icco-panel-recognizes-23-countries-as-fine-and-flavour-cocoa-exporters.html>
- Kern, S., Crowe, J., Litzau, J., & Heitkemper, D. (2017). Forensic Analysis of Stains on Fabric Using Direct Analysis in Real-time Ionization with High-Resolution Accurate Mass-Mass Spectrometry. *Journal of Forensic Sciences*, 63, 592-597.
- Liu, M., Liu, J., He, C., Song, H., Liu, Y., Zhang, Y., Su, X. (2016). Characterization and comparison of key aroma-active compounds of cocoa liquors from five different areas. *International Journal of Food Properties*, 20, 2396-2408.
- Machado, L., Ordoñez, C., Sánchez, K., Guaca, L., & Suárez, J. (2018). Organoleptic quality assesment of Theobroma cacao L. in cocoa farms in northern Huila, Colombia. *Acta Agronómica*, 67, 46-52.

- Magi, E., Bono, L., & Di Carro, M. (2012). Characterization of cocoa liquors by GC-MS and LC-MS/MS: Focus on alkylpyrazines and flavonols. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 1191-1197.
- Press Release*. (17 de Mayo de 2012). Recuperado el 11 de Abril de 2019, de IonSense Presenting OpenSpot Mass Spectrometry™ at the American Society for Mass Spectrometry Annual Conference: <https://www.pr.com/press-release/413751>
- Recalde, A. (2007). *Evaluación del efecto del presecado y tiempo de fermentación, en los contenidos de polifenoles totales, alcaloides y ácidos volátiles en dos genotipos de cacao*. Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Reineccius, G. (2006). Flavor chemistry and technology . *Boca Ratón*.
- Rodriguez, J., Escalona, H., Orozco, I., Lugo, E., & Jaramillo, M. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44, 250-258.
- Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2013). *Principles of instrumental analysis* (Vol. 3). Thomson.
- The Good Scents Company Information System*. (s.f.). Recuperado el 2 de Diciembre de 2018, de <http://www.thegoodscentscopy.com/index.html>
- The Ohio State University*. (7 de Diciembre de 2015). Recuperado el 29 de Noviembre de 2018, de Step 6: Conching, tempering, molding: <https://u.osu.edu/alibulkcommoditychainproject/2015/12/07/conching/>
- Waters Corporation*. (s.f). Recuperado el 8 de Abril de 2019, de Mass Detection in Real Time: https://www.waters.com/waters/en_US/DART-QDa-System-with-LiveID-/nav.htm?cid=134983082&locale=en_US

8. Anexo A

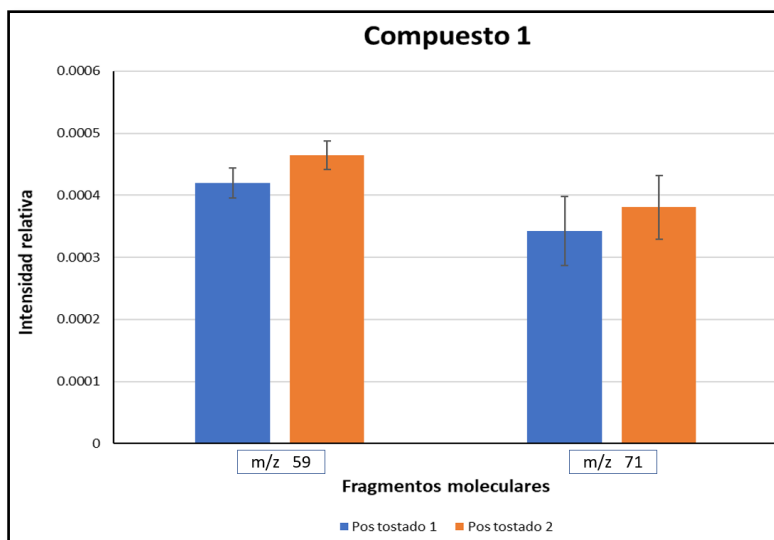


Figura A1. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 1.

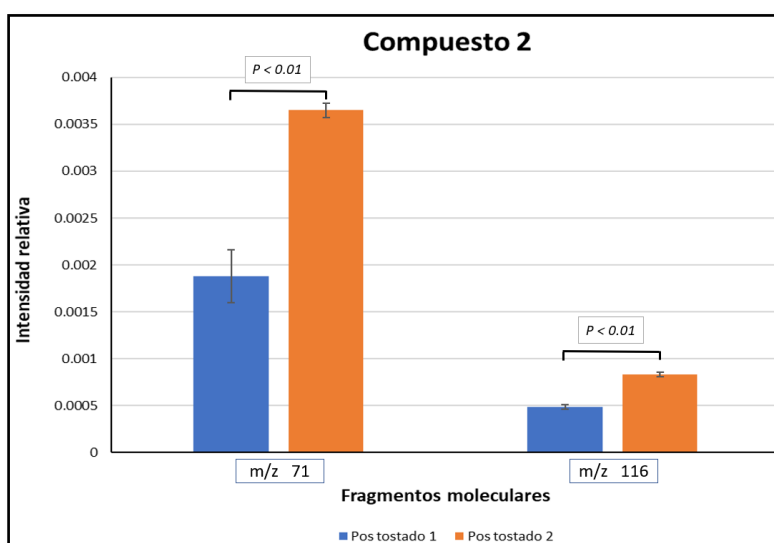


Figura A2. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 2.

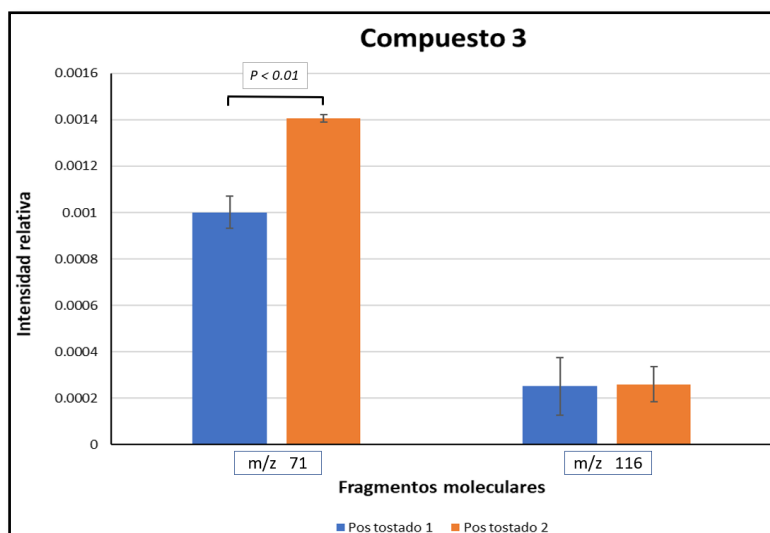


Figura A3. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 3.

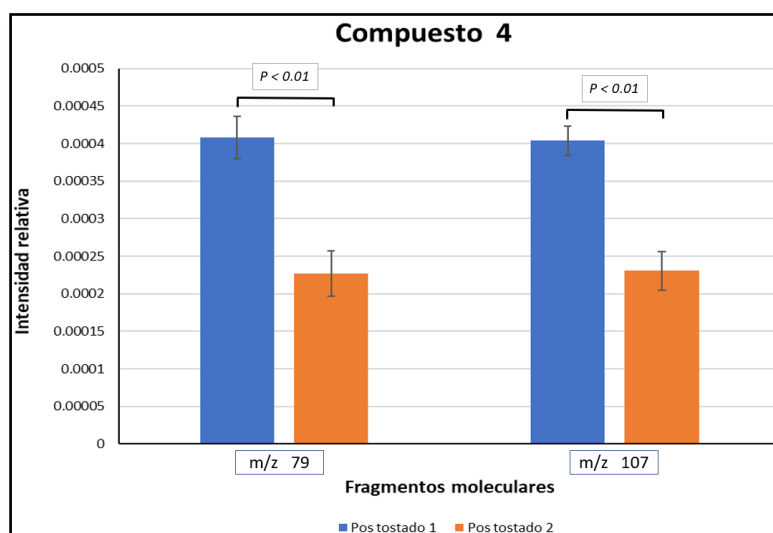


Figura A4. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 4.

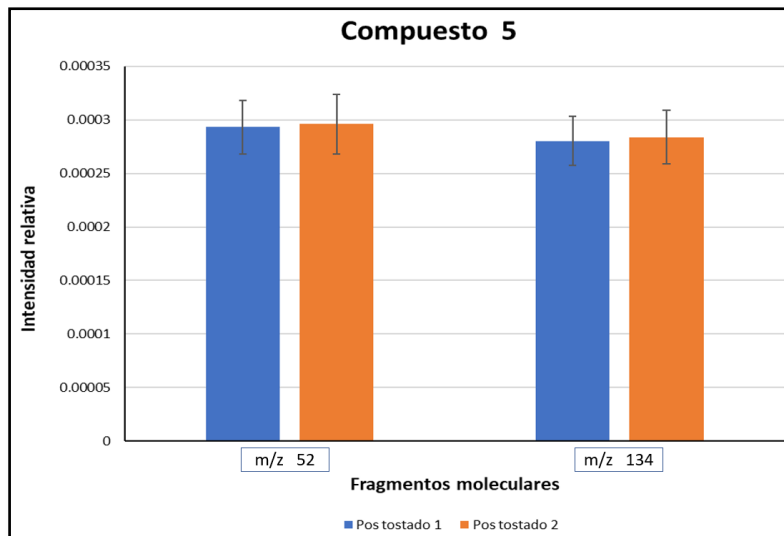


Figura A5. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 5.

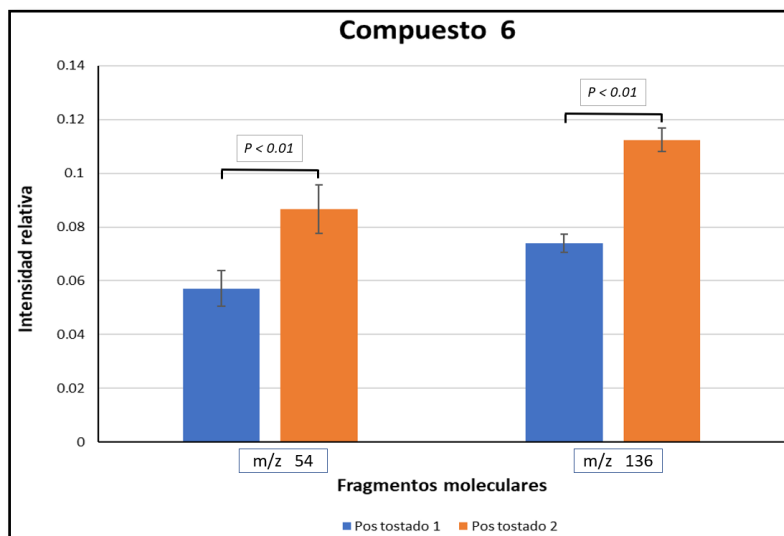


Figura A6. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 6.

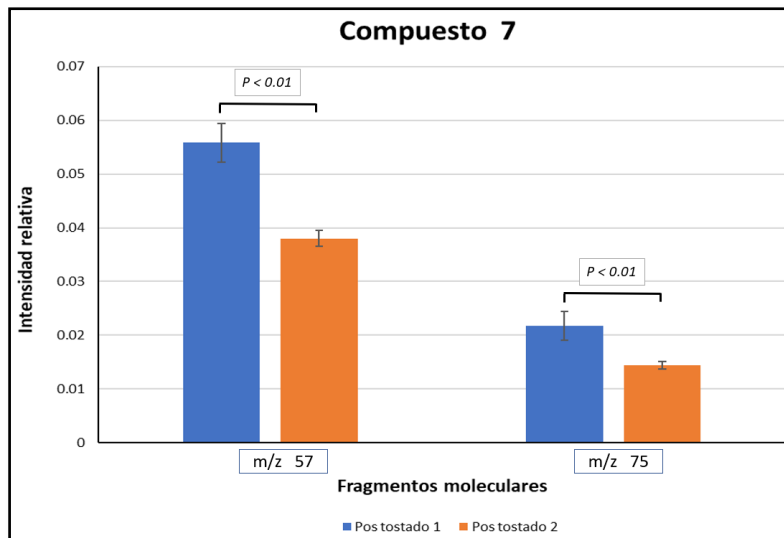


Figura A7. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 7.

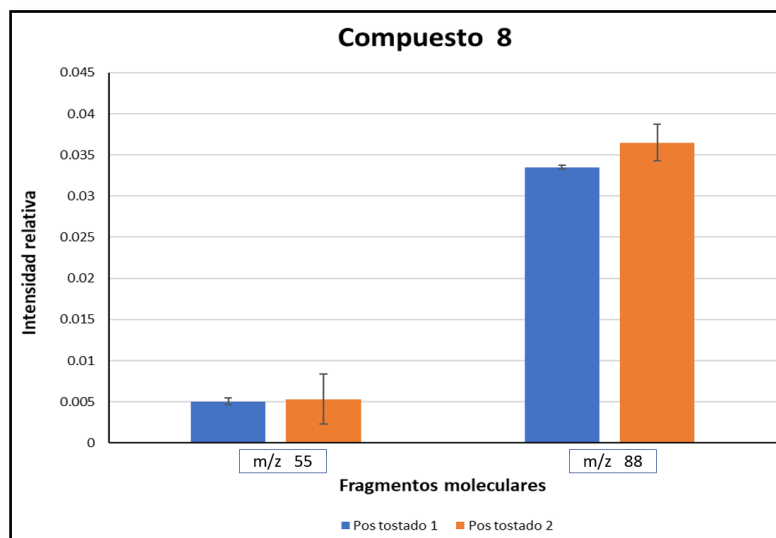


Figura A8. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 8.

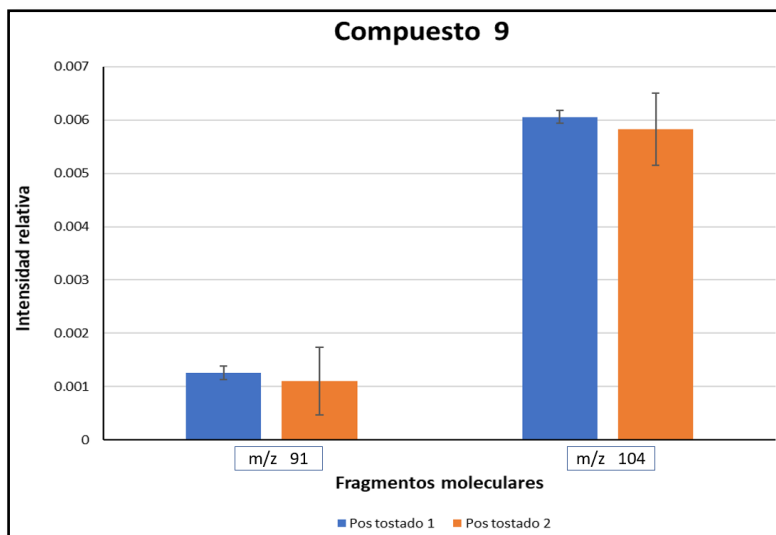


Figura A9. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 9.

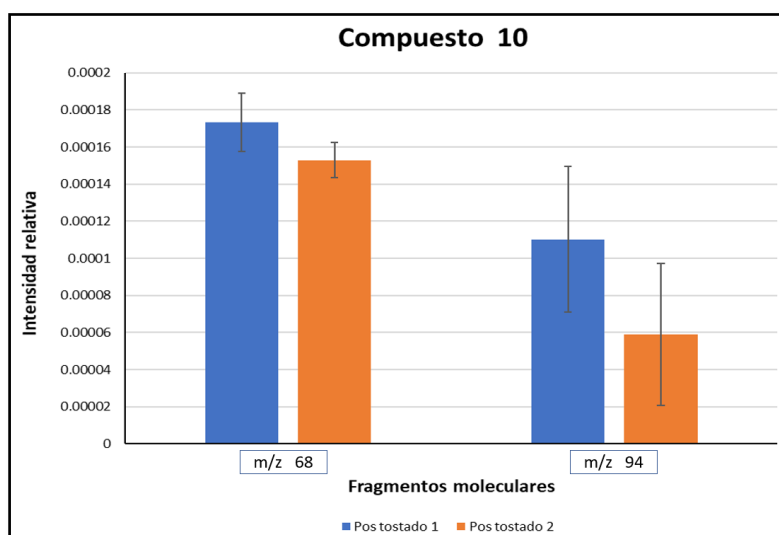


Figura A10. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 10.

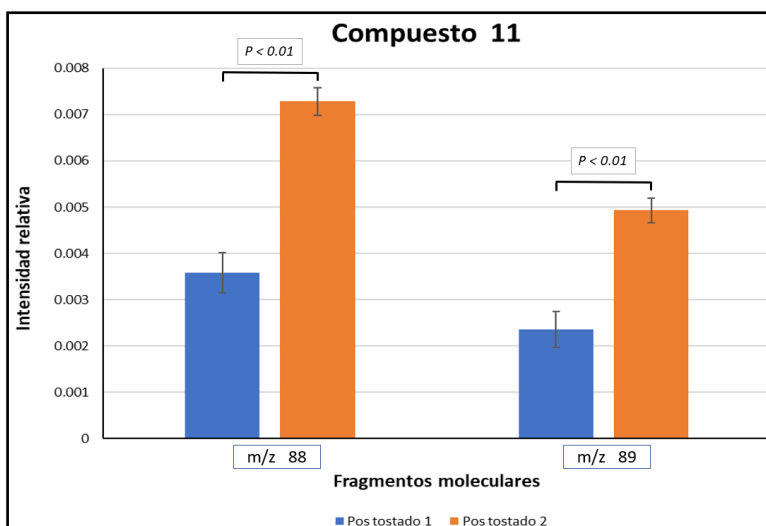


Figura A11. Gráficos de barras comparativas entre los granos pos tostados 1 y pos tostados 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 11.

9. Anexo B

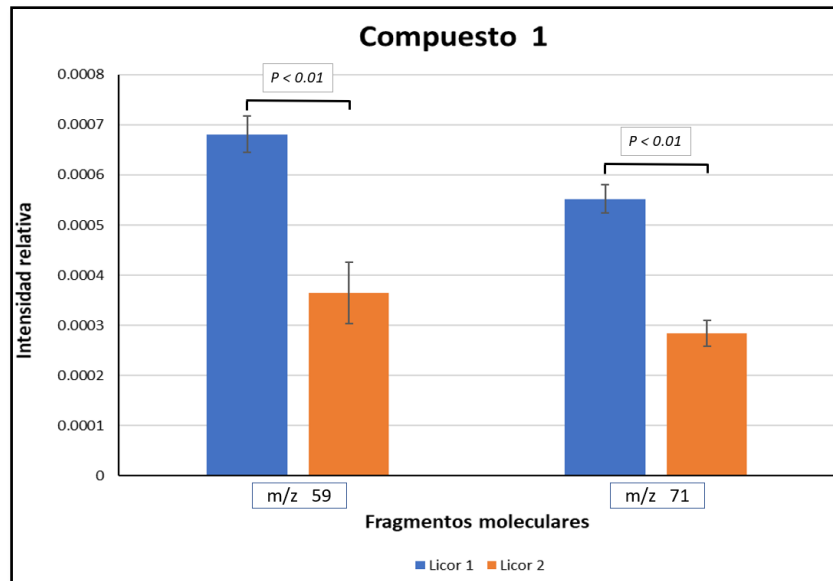


Figura B1. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 1.

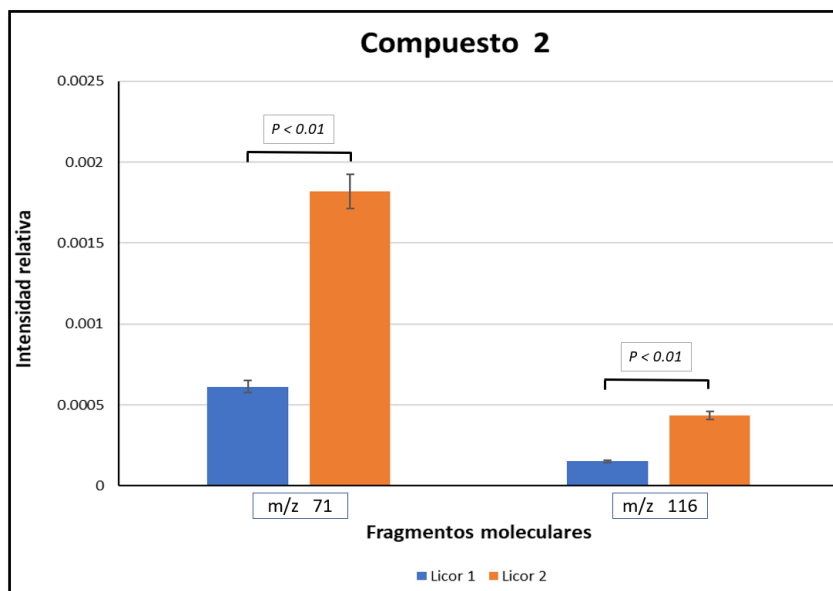


Figura B2. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 2.

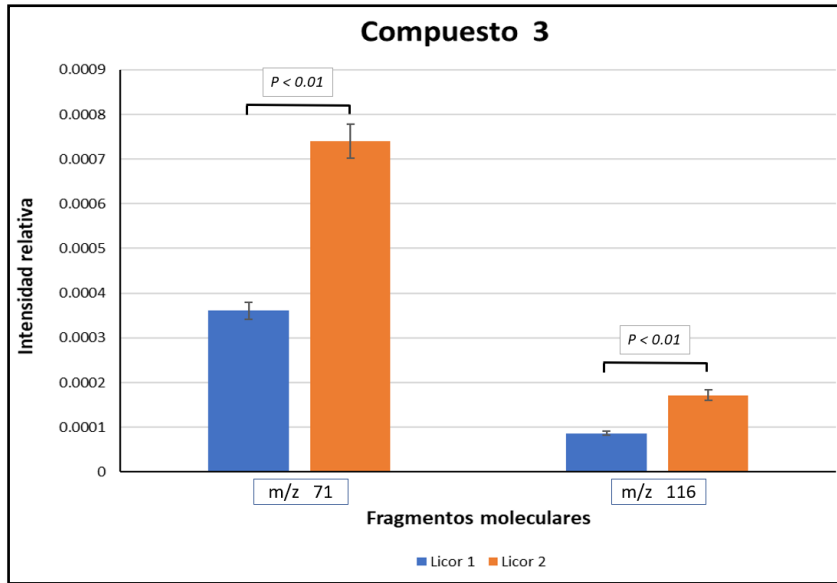


Figura B3. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 3.

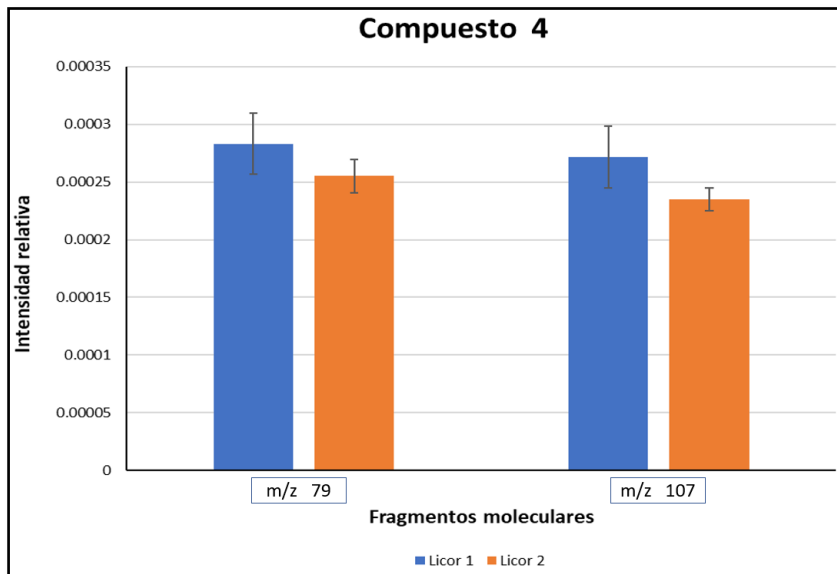


Figura B4. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 4.

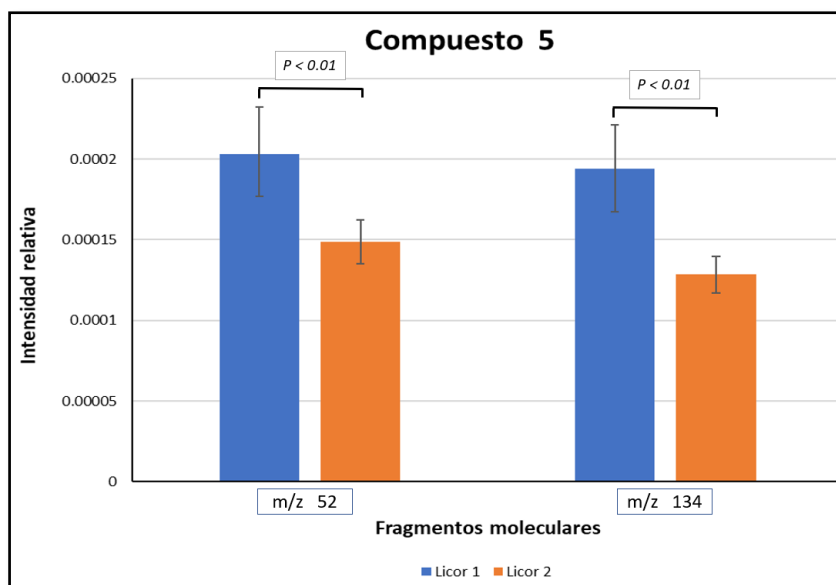


Figura B5. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 5.

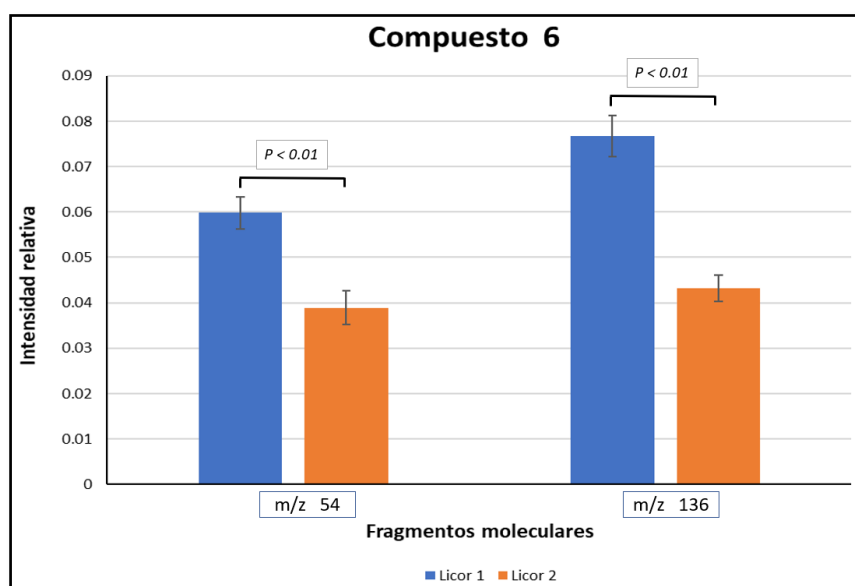


Figura B6. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 6.

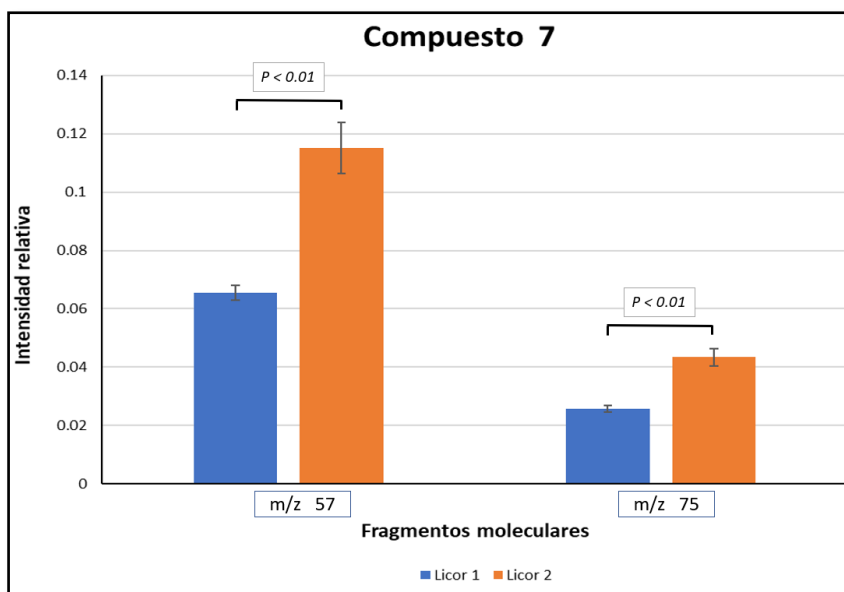


Figura B7. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 7.

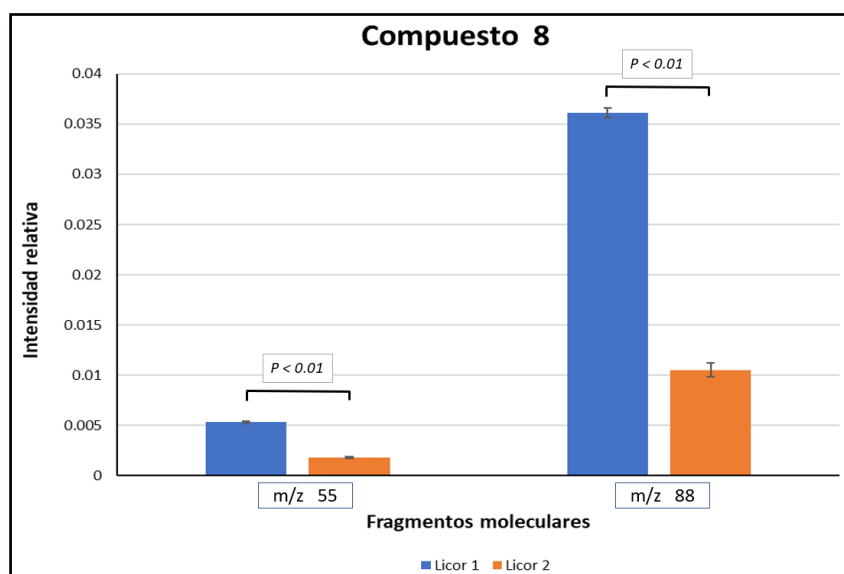


Figura B8. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 8.

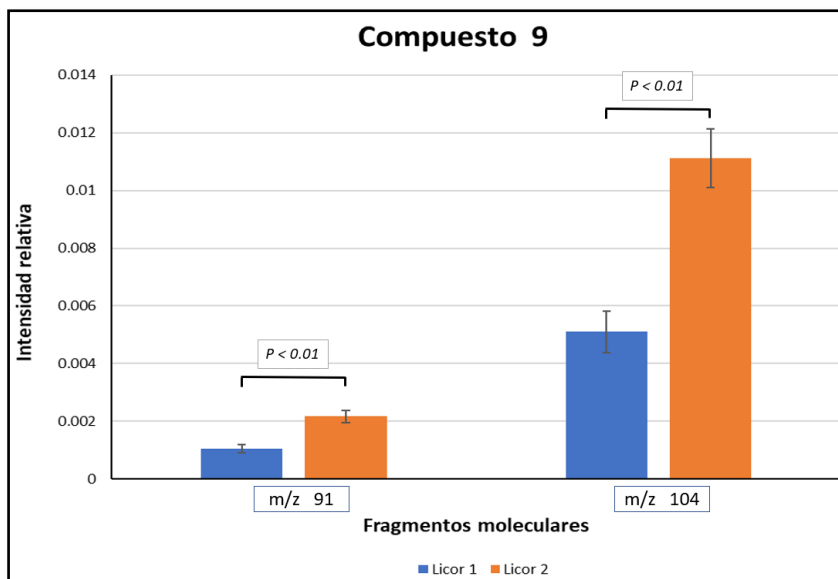


Figura B9. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 9.

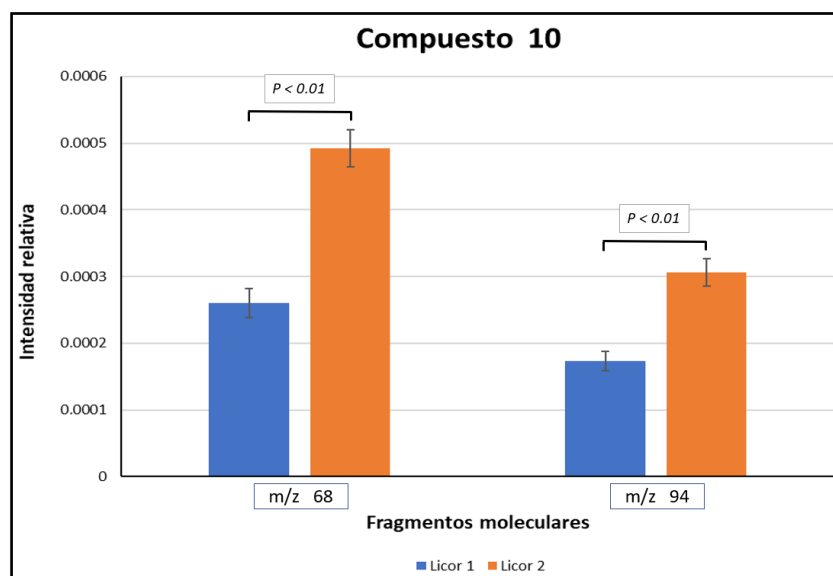


Figura B10. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 10.

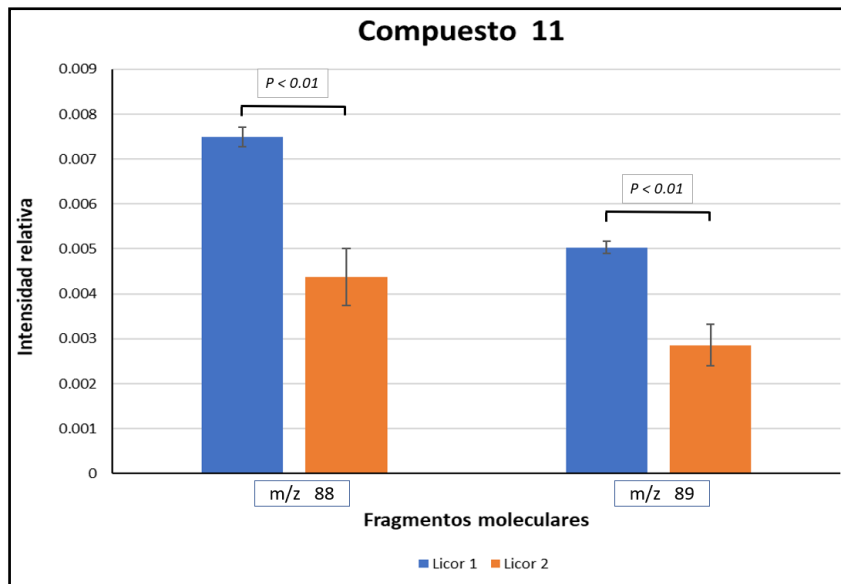


Figura B11. Gráficos de barras comparativas entre licor 1 y licor 2 para los dos fragmentos moleculares más intensos del compuesto marcador 11.

10. Anexo C

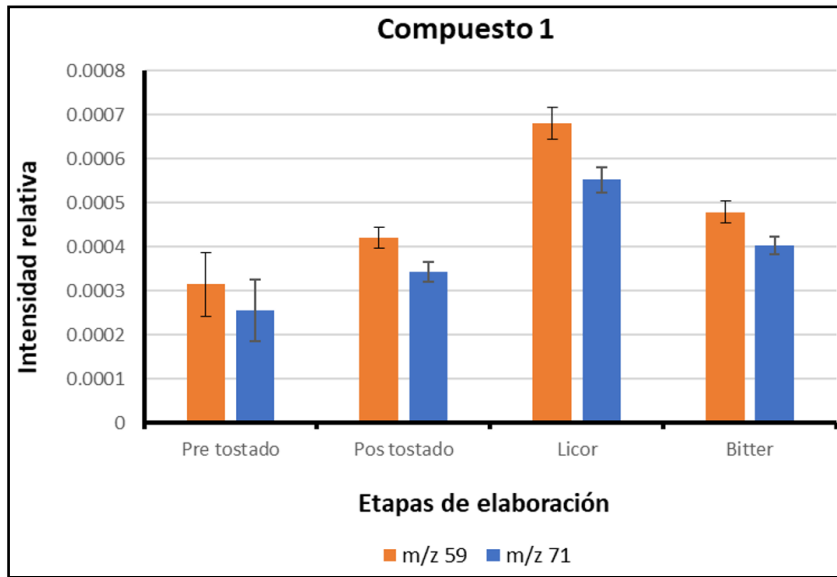


Figura C1. Desarrollo del compuesto marcador 1 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

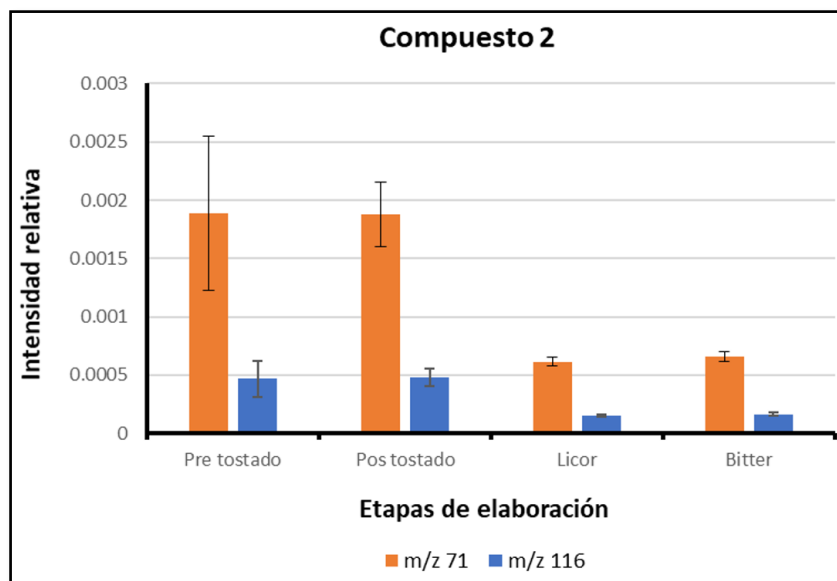


Figura C2. Desarrollo del compuesto marcador 2 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

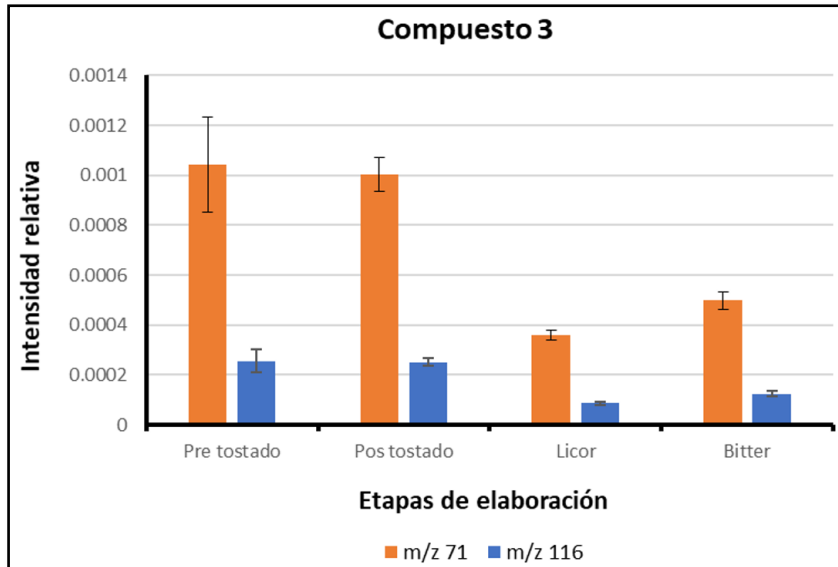


Figura C3. Desarrollo del compuesto marcador 3 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

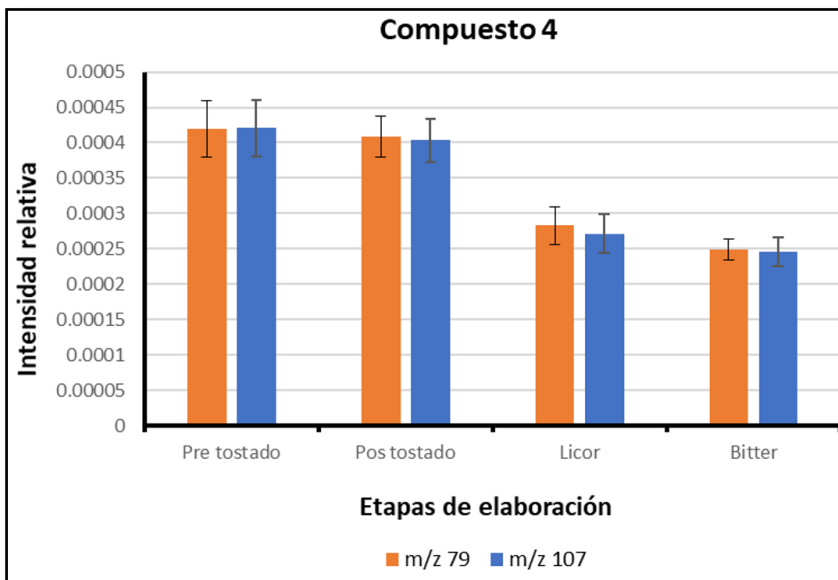


Figura C4. Desarrollo del compuesto marcador 4 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

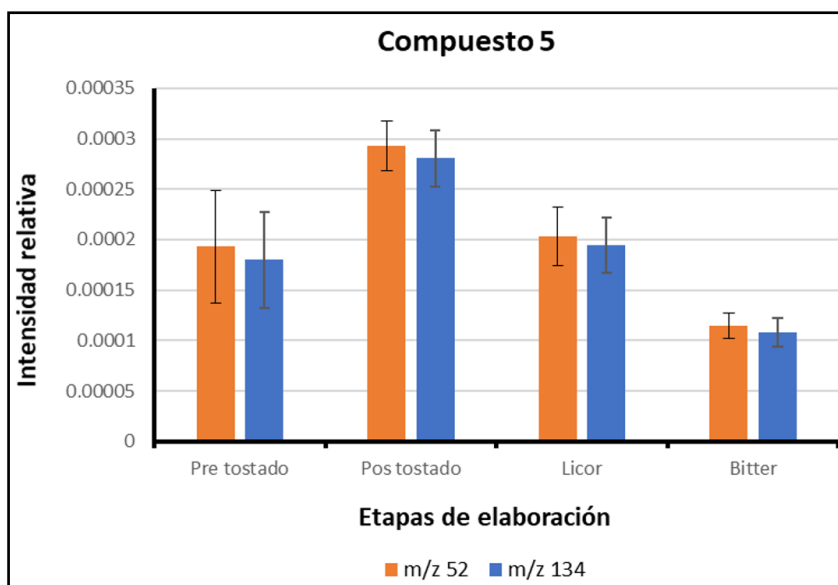


Figura C5. Desarrollo del compuesto marcador 5 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

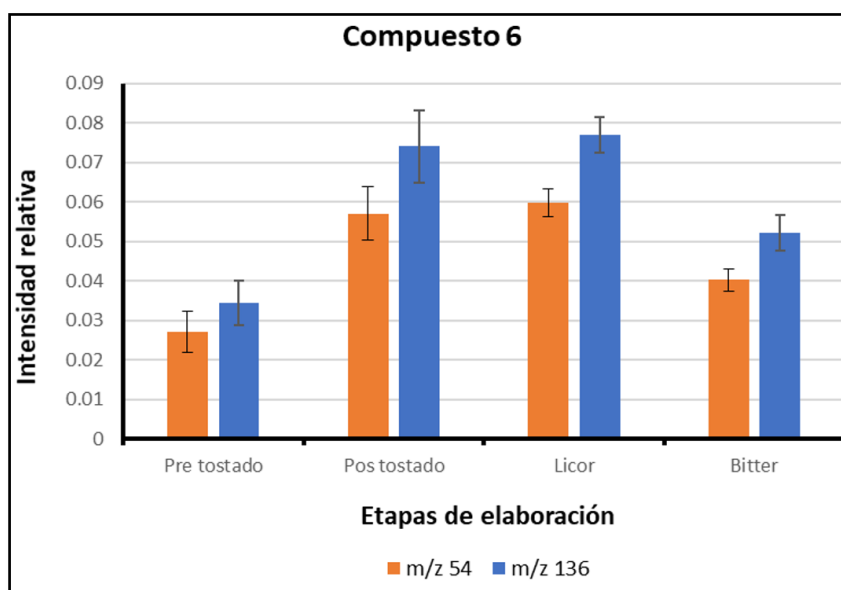


Figura C6. Desarrollo del compuesto marcador 6 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

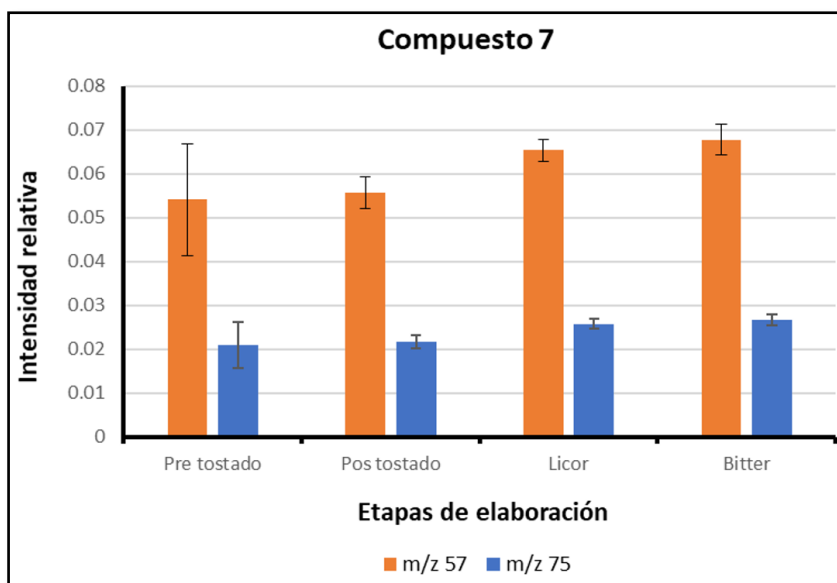


Figura C7. Desarrollo del compuesto marcador 7 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

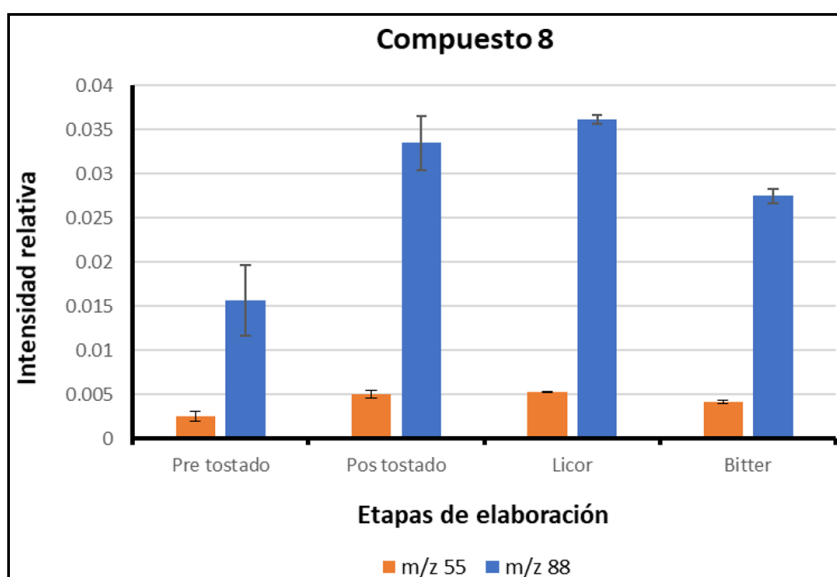


Figura C8. Desarrollo del compuesto marcador 8 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

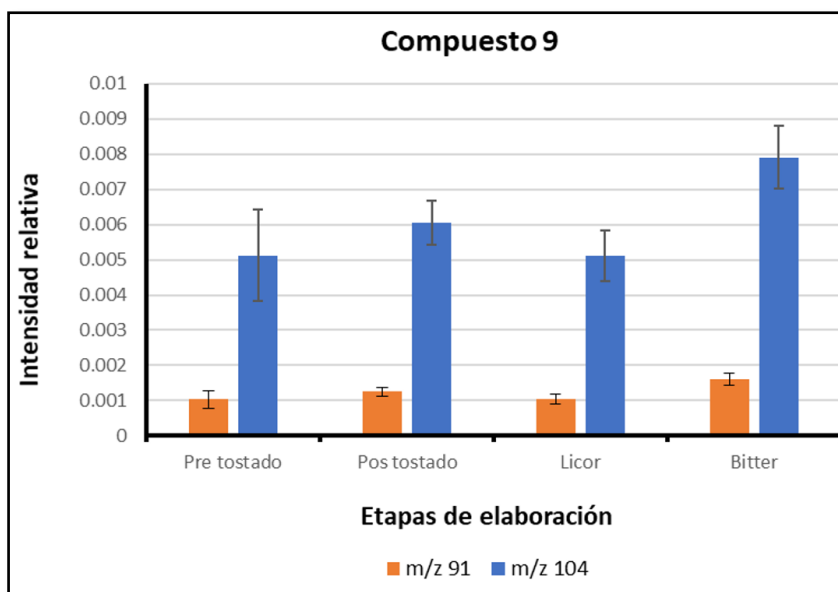


Figura C9. Desarrollo del compuesto marcador 9 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

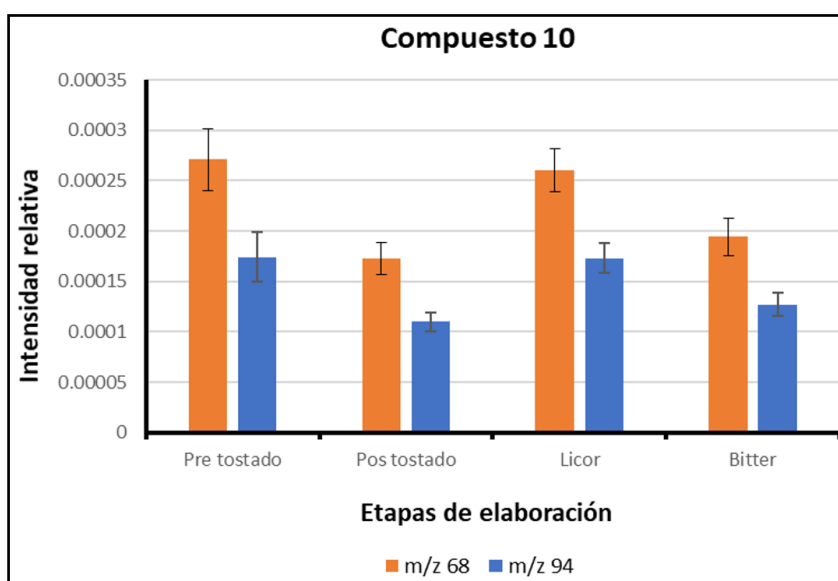


Figura C10. Desarrollo del compuesto marcador 10 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

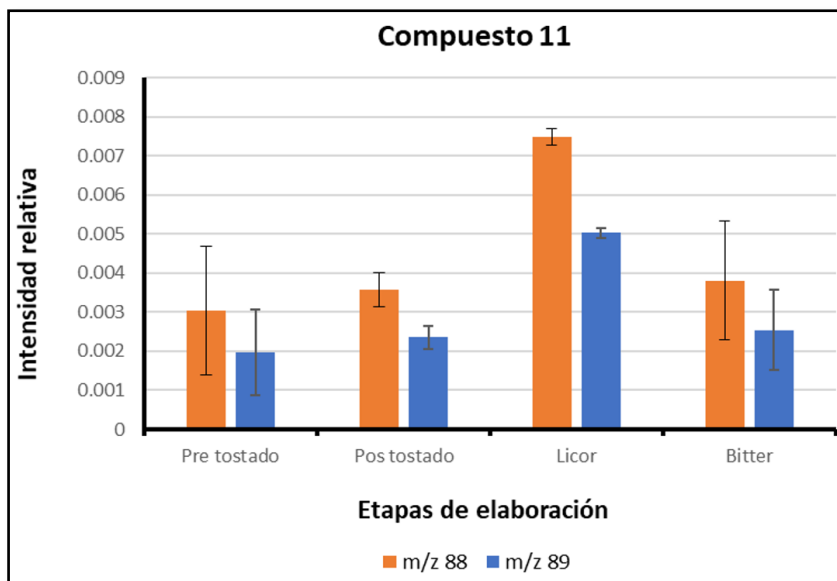


Figura C11. Desarrollo del compuesto marcador 11 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Bitter, para los dos fragmentos más intensos.

11. Anexo D

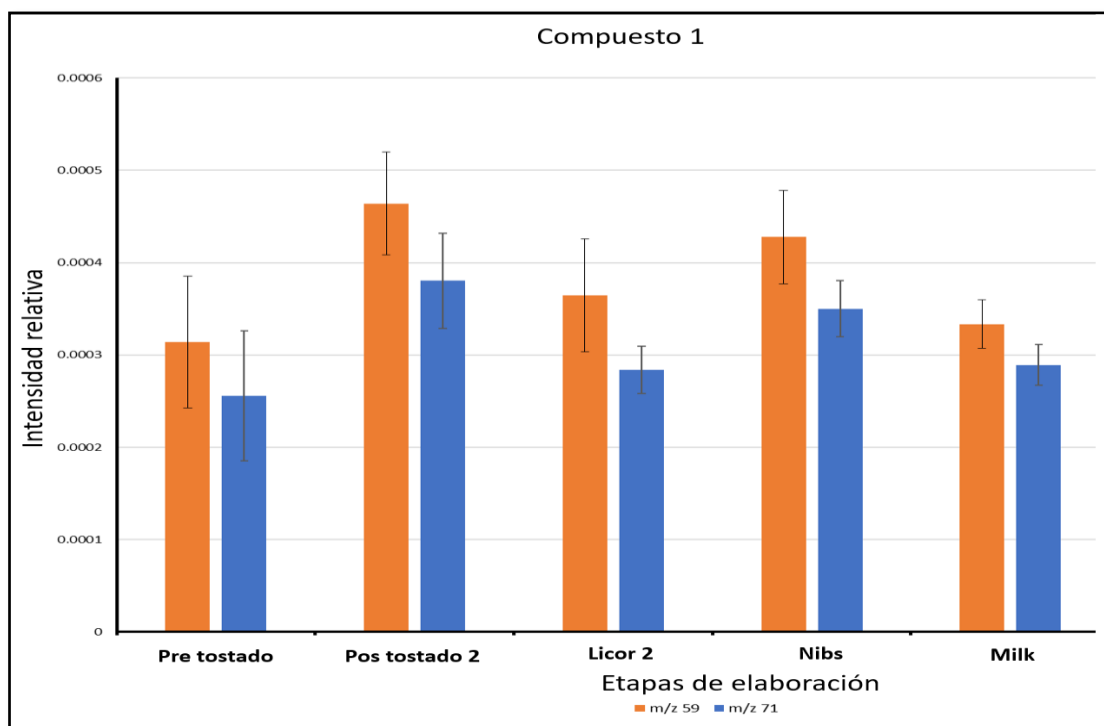


Figura D1. Desarrollo del compuesto marcador 1 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk, para los dos fragmentos más intensos.

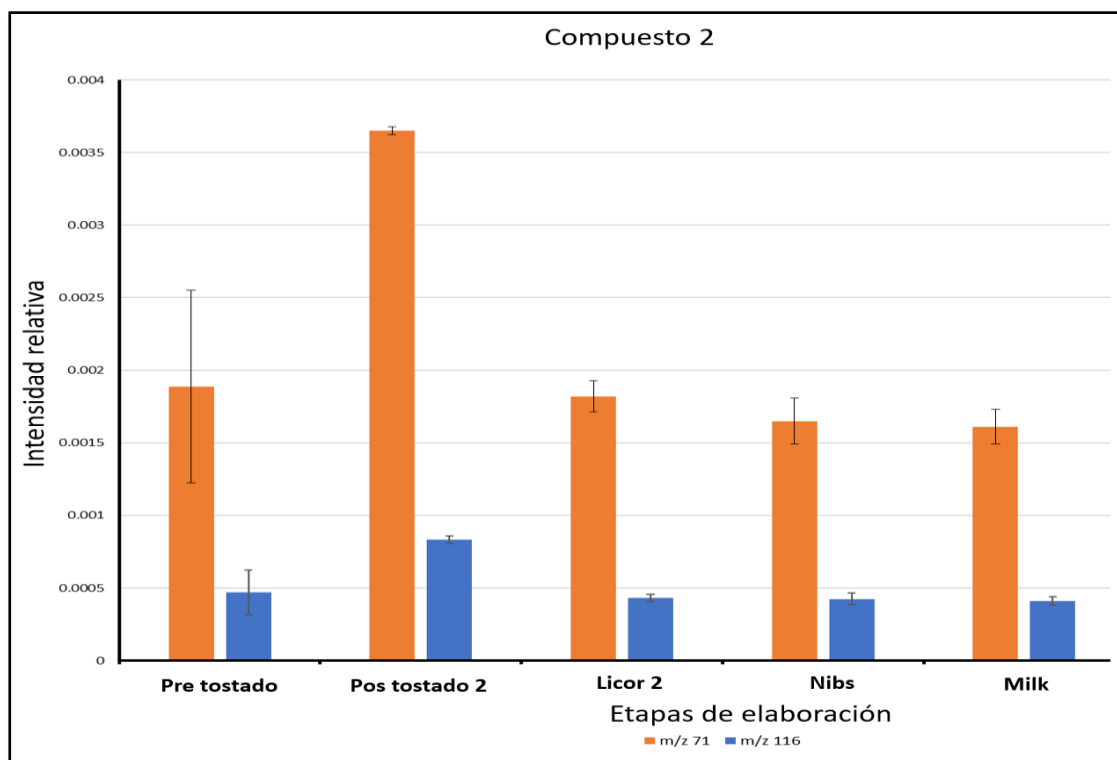


Figura D2. Desarrollo del compuesto marcador 2 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.

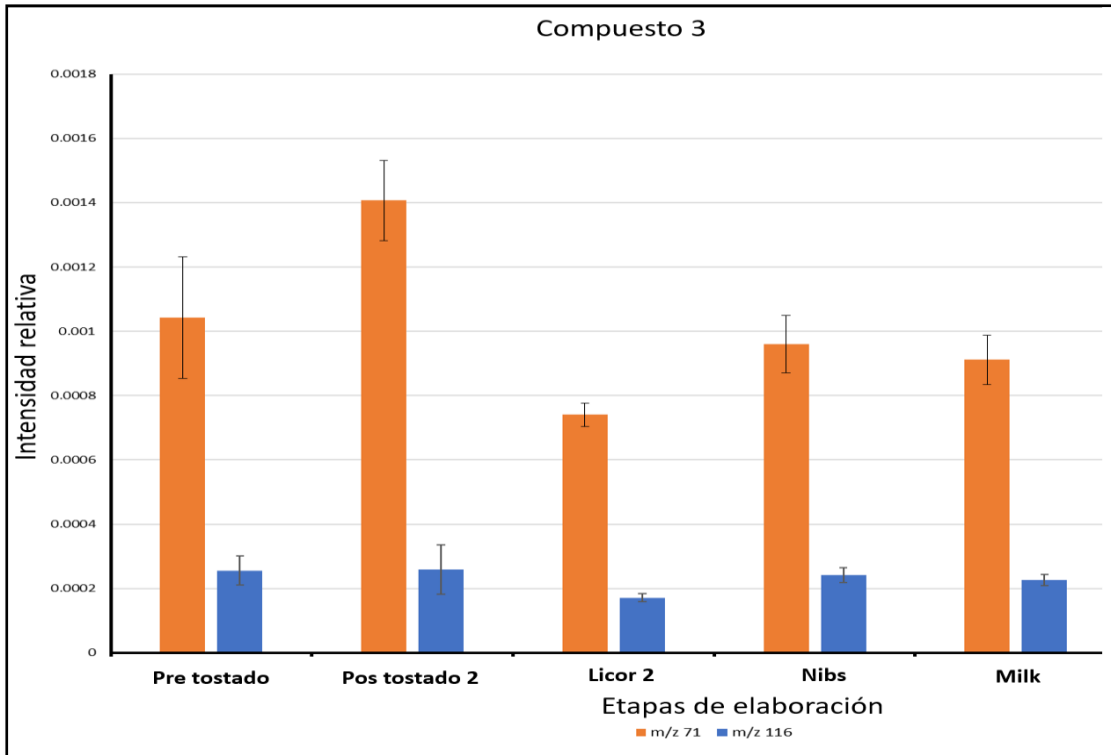


Figura D3. Desarrollo del compuesto marcador 3 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.

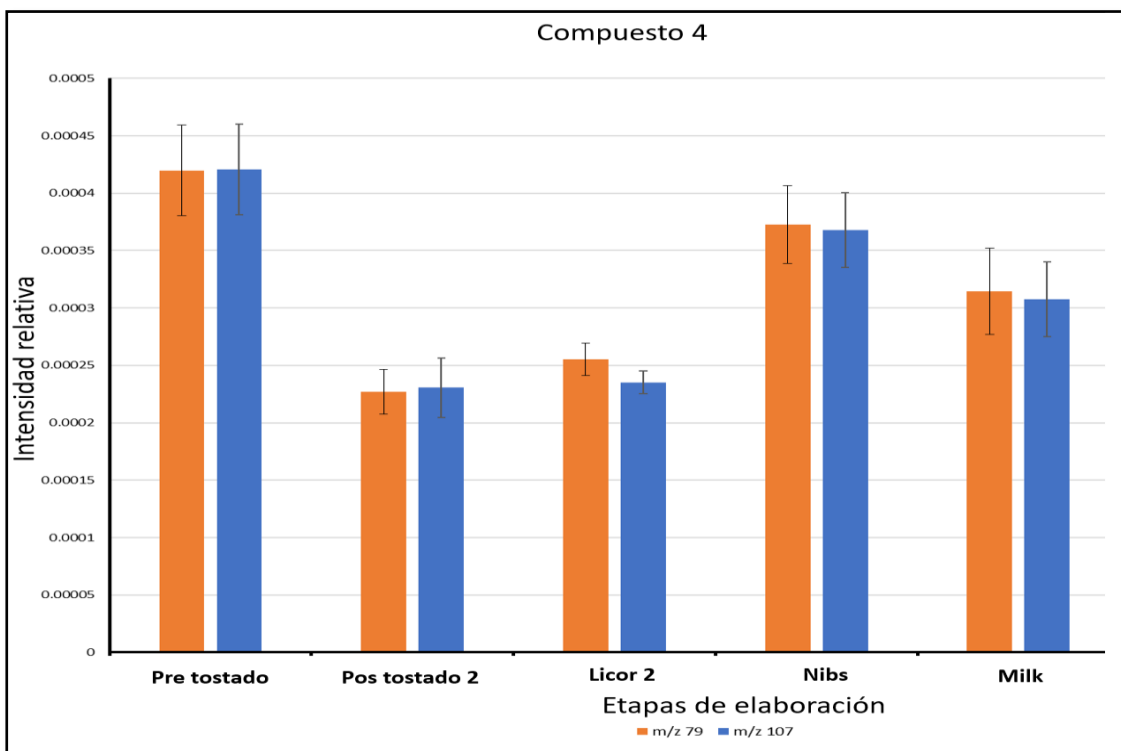


Figura D4. Desarrollo del compuesto marcador 4 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.

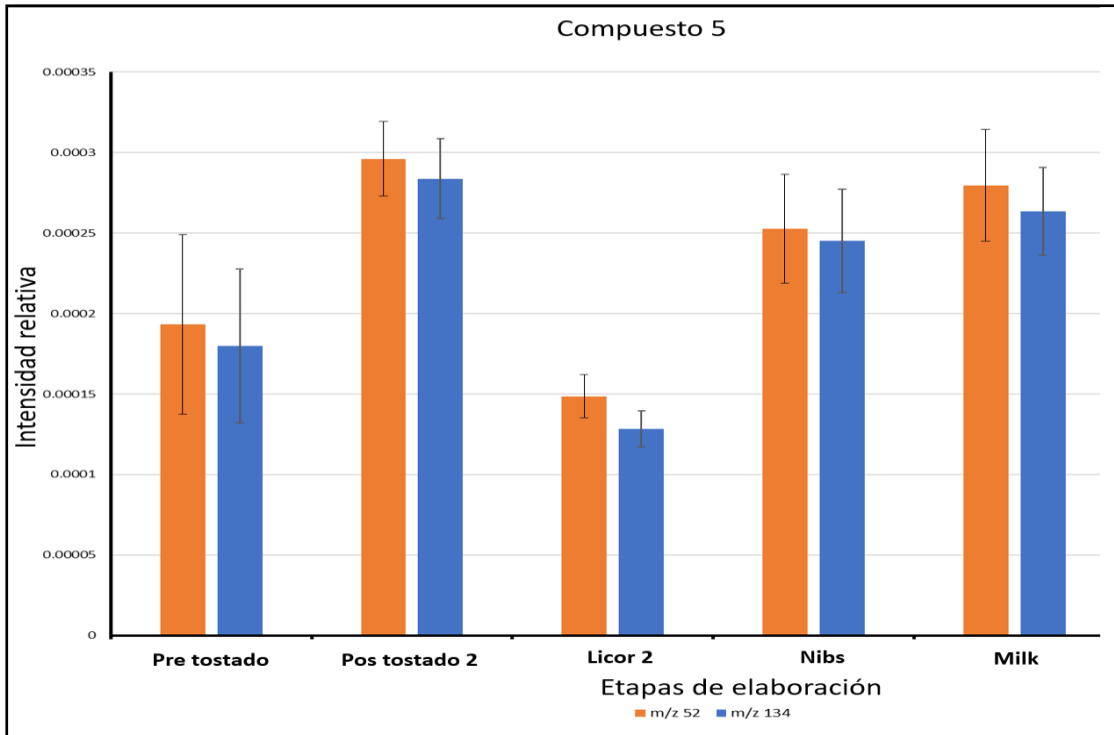


Figura D5. Desarrollo del compuesto marcador 5 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.

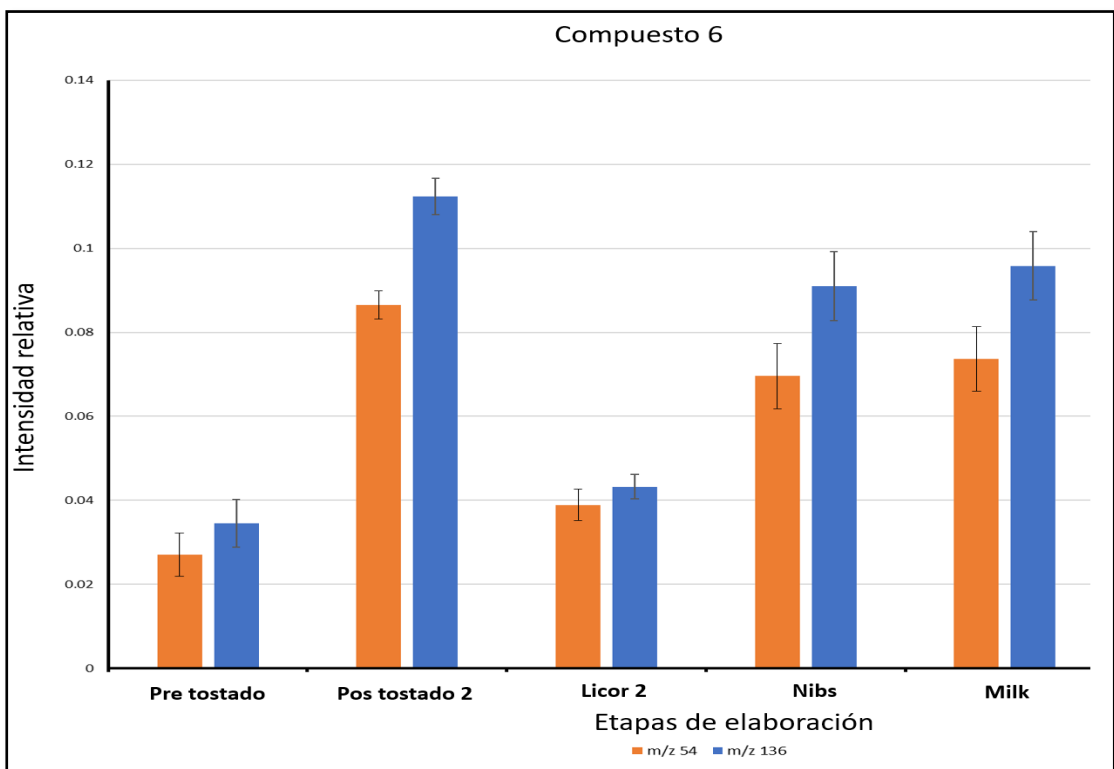


Figura D6. Desarrollo del compuesto marcador 6 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.

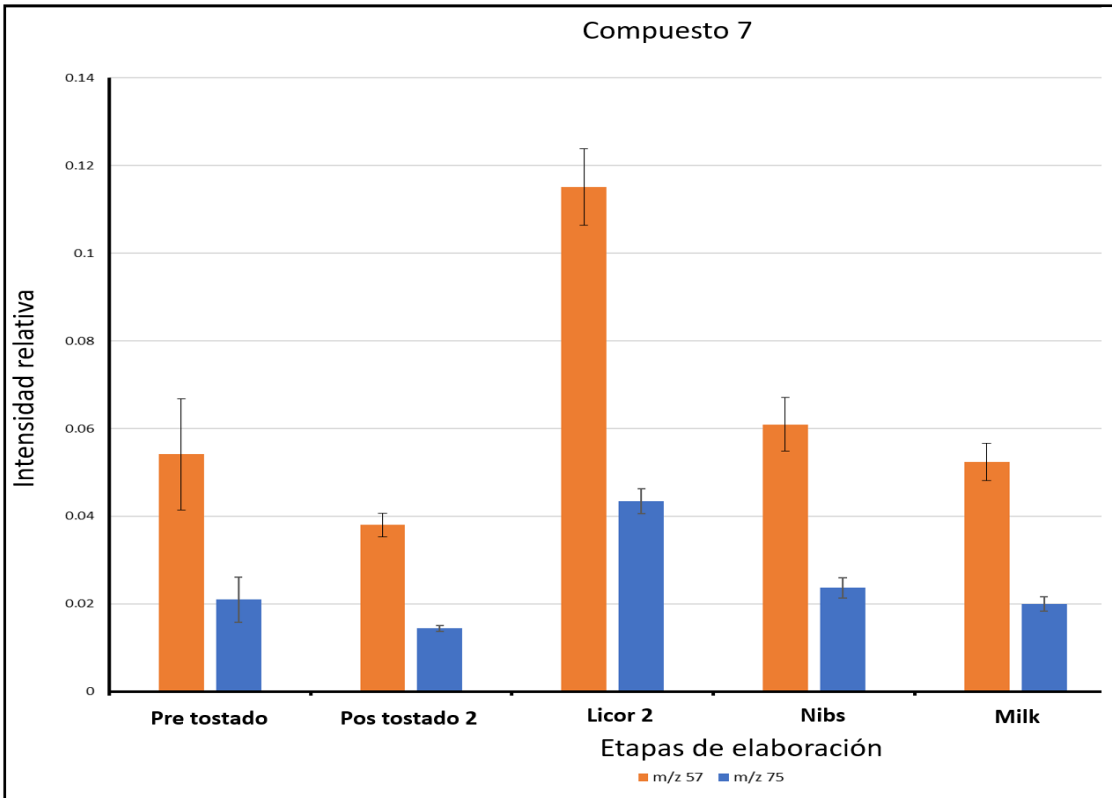


Figura D7. Desarrollo del compuesto marcador 7 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.

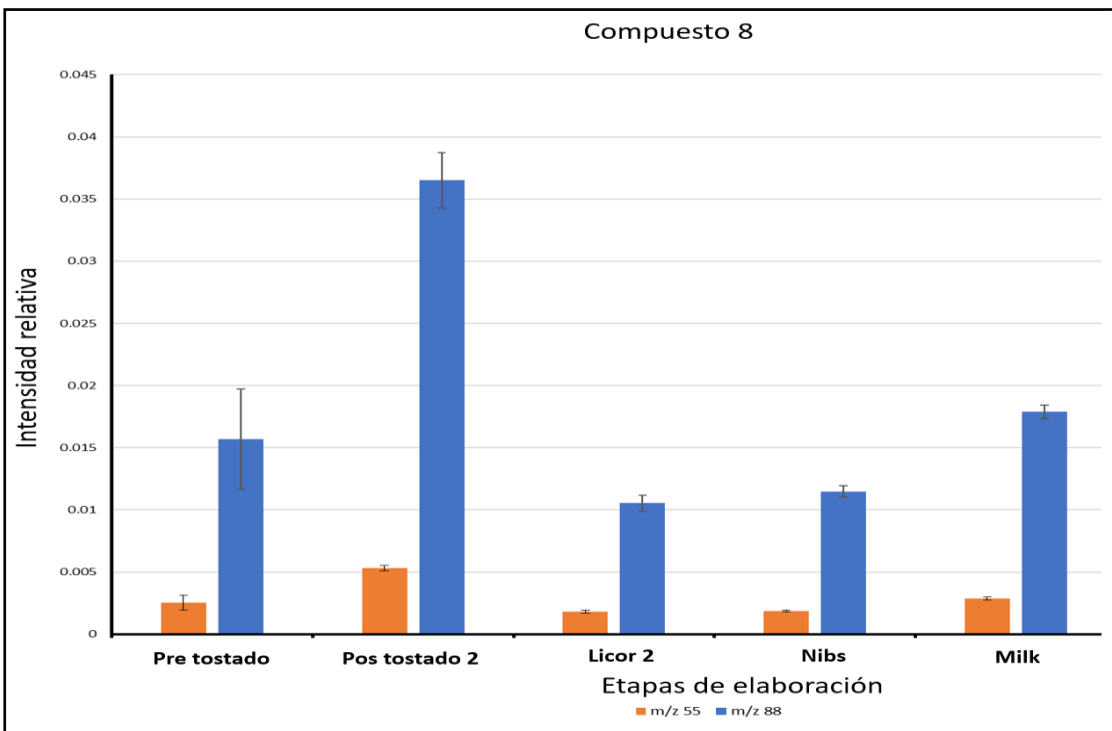


Figura D8. Desarrollo del compuesto marcador 8 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.

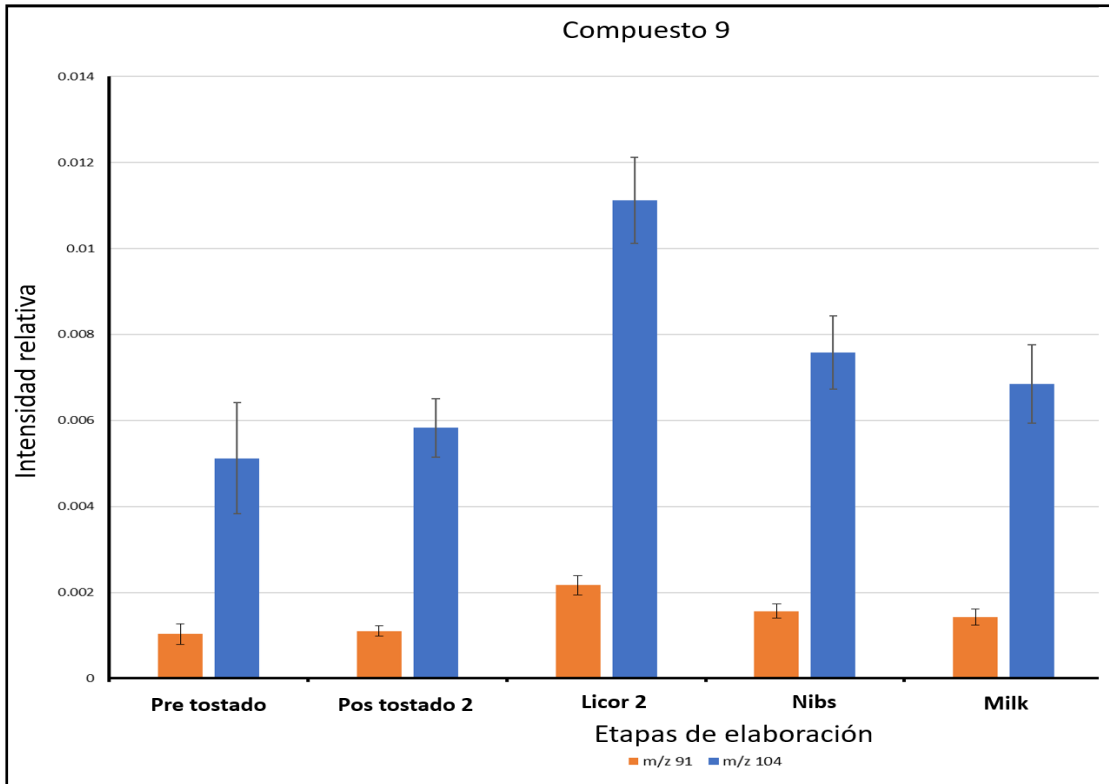


Figura D9. Desarrollo del compuesto marcador 9 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.

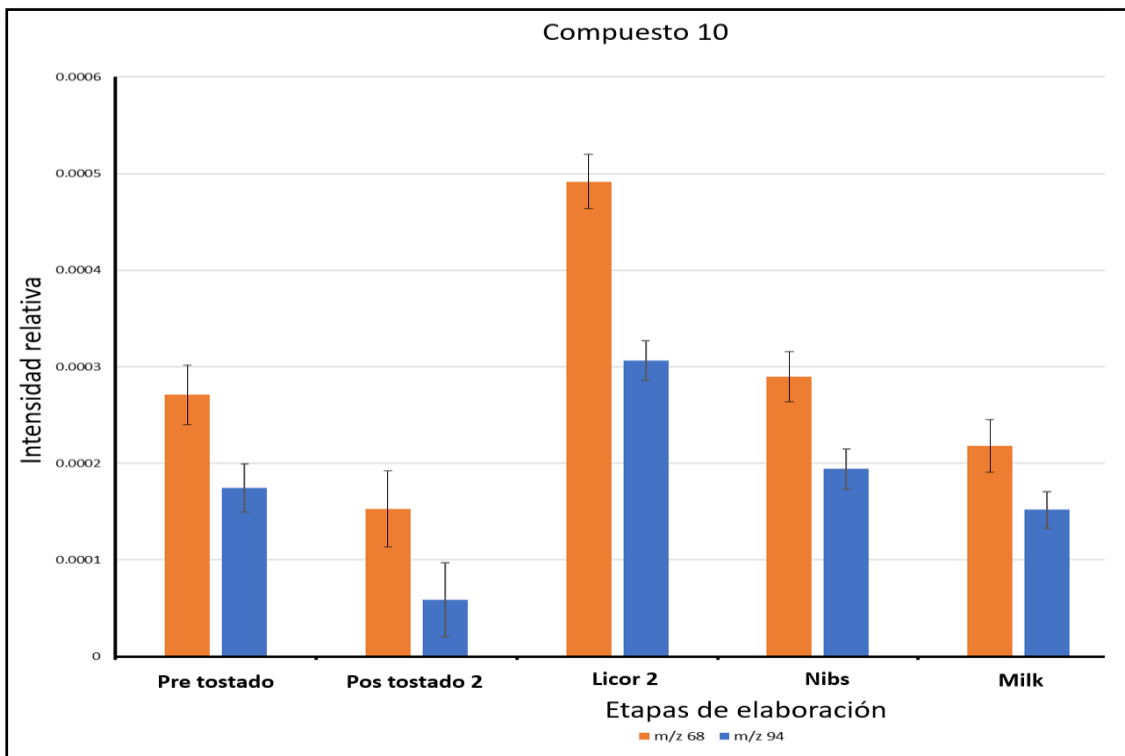


Figura D10. Desarrollo del compuesto marcador 10 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.

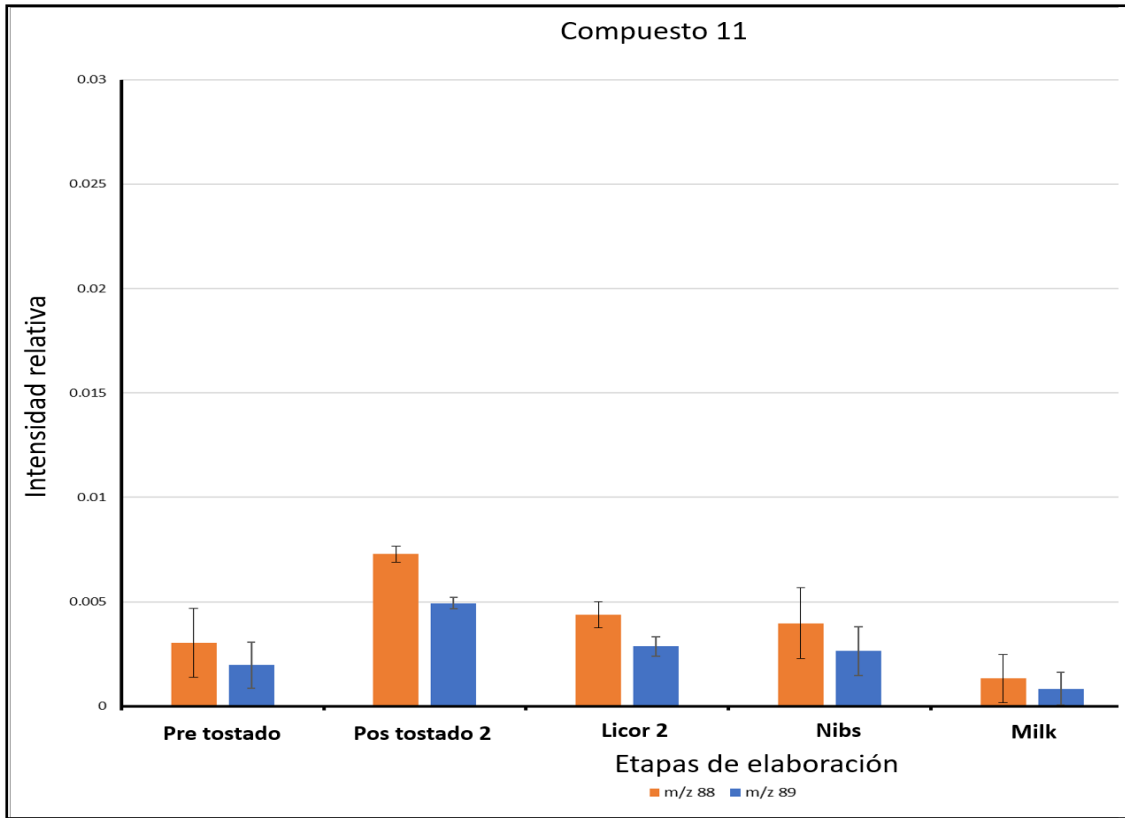


Figura D11. Desarrollo del compuesto marcador 11 durante cada una de las etapas de elaboración del chocolate Nibs y Milk.