

Evaluación del método de extracción SPME-GC-MS para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en licor de cacao de Nariño-Colombia

Edna Otero Rojas¹; Frank Herrera Rúales²; David Arturo Perdomo²; Juan Pablo Jiménez Mora^{2, a}

¹Universidad de Nariño – Departamento de Química. CU Torobajo. Pasto 520002 - Colombia.

²Corporación para la Investigación Aplicada al Desarrollo CIAD. Pasto 52001 - Colombia.

^anaditacion@hotmail.com

Fecha recepción: octubre 16 de 2021

Fecha aceptación: junio 1 de 2022

Resumen

En la presente investigación se determinaron las condiciones óptimas de tiempo, temperatura y tipo de fibra para la extracción por el método HS-SPME de compuestos orgánicos volátiles (COV's) presentes en licor de cacao, mediante la aplicación de un diseño experimental factorial usando la metodología de superficie de respuesta. Las condiciones óptimas determinadas para extraer un mayor número de COV's mediante el análisis multivariable fueron: 50 min, 60 °C y el tipo de fibra DVB/CAR-PDMS. La precisión del método fue adecuada, con valores de coeficiente de variación (% CV) para la repetibilidad de 0,59 a 11,39 % y 4,29 a 12,93 % de reproducibilidad. El desarrollo del método se realizó empleando una muestra de licor de cacao CCN51 como referencia, producido por la asociación Cortepaz en el municipio de Tumaco en el Departamento de Nariño-Colombia, según las condiciones de fermentación, secado y tostado tradicionales de la región. Utilizando las condiciones óptimas de extracción, se identificaron 39 COV's mayoritarios mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los resultados determinaron que el licor de cacao presentó principalmente compuestos tipo aldehído, cetona, alcohol, pirazina, éster, terpeno, ácido y lactona, de los cuales los mayoritarios fueron el ácido acético, 2-propanol y 3-etil-2,5-dimetil-pirazina, con porcentajes (%) relativos de área del 46,16; 8,96 y 4,64 respectivamente.

Palabras clave: *Microextracción en fase sólida; Cromatografía de gases; Licor de cacao; Diseño experimental; Aroma.*

Development and evaluation of SPME-GC-MS method for the analysis of volatile organic compounds in cocoa liquor from Nariño-Colombia

Abstract

In this research, the optimal conditions of time, temperature and fiber type were determined for the HS-SPME extraction method of volatile organic compounds (VOCs) presents in cocoa liquor, for this purpose, a factorial experimental design using the response surface methodology was applied. The optimal conditions determined in order to extract a greater number of VOCs through multivariable analysis were 50 min, 60 °C and the DVB/CAR-PDMS fiber. The precision of the method was adequate with a variation coefficient values (% CV) in terms of repeatability of 0.59 to 11.39 % and 4.29 to 12.93 % in reproducibility terms. The method development was carried out using a sample of cocoa liquor from CCN51 variety as reference, produced by the Cortepaz association in the municipality of Tumaco in Nariño-Colombia, according to the traditional fermentation, drying and roasting conditions implemented in the region. Using the optimal extraction conditions, 39 major VOCs were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The results determined that cocoa liquor mainly presented aldehyde, ketone, alcohol, pyrazine, ester, terpene, acid and lactone compounds, of which acetic acid, 2-propanol and 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine were found to the majority with a relative area percentages (%) of 46.16; 8.96 and 4.64 respectively.

Keywords: *Solid phase microextraction; Chromatography; Cocoa liquor; Experimental design; Fragrance.*

Avaliação do método de extração SPME-GC-MS para a análise de compostos orgânicos voláteis em licor de cacau do Nariño-Colômbia

Resumo

Na presente investigação, foram determinadas as condições ótimas de tempo, temperatura e tipo de fibra para a extração pelo método HS-SPME de compostos orgânicos voláteis (COV's) presentes no licor de cacau, por meio da aplicação de um planejamento experimental fatorial utilizando a superfície de resposta metodologia. As condições ótimas determinadas para extrair um maior número de VOCs através da análise multivariada foram: 50 min, 60 °C e o tipo de fibra DVB/CAR-PDMS. A precisão do método foi adequada, com valores de coeficiente de variação (% CV) para repetibilidade de 0,59 a 11,39 % e 4,29 a 12,93 % de reprodutibilidade. O desenvolvimento do método foi realizado usando como referência uma amostra de licor de cacau CCN51, produzido pela associação Cortepaz no município de Tumaco no departamento de Nariño-Colombia, de acordo com as condições tradicionais de fermentação, secagem e torrefação da região. Usando as condições ótimas de extração, 39 COV's principais foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Os resultados determinaram que o licor de cacau apresentou principalmente compostos como aldeído, cetona, álcool, pirazina, éster, terpeno, ácido e lactona, sendo a maioria ácido acético, 2-propanol e 3-etil-2,5-dimetilpirazina, com uma porcentagens (%) de área relativa de 46,16; 8,96 e 4,64 respectivamente.

Palavras-chave: *Microextração em fase sólida; Cromatografia gasosa; Licor de cacau; Desenho experimental, Aroma.*

Introducción

La calidad sensorial del cacao y sus productos derivados depende de factores genéticos, agroclimáticos y de las condiciones de las etapas del manejo poscosecha (fermentación, secado y tostado) que se emplean para la transformación de los granos frescos en los diferentes productos como cacao en grano seco, tostado o licor [1]. El licor de cacao es uno de los principales productos comerciales del cacao y consiste en granos de cacao fermentados, secos, tostados y molidos cuyo aroma es el resultado perceptible de una cadena larga de transformaciones físicas, químicas y bioquímicas que la almendra de cacao experimenta gracias a factores como la variedad, composición del suelo, clima, altura de cultivo y modo de recolección del fruto, además de condiciones como el tiempo de fermentación, las temperaturas de secado y tueste, todas estas condiciones son determinantes en el desarrollo de la composición química volátil, específicamente contribuyen a la formación de compuestos orgánicos volátiles (COV's), los cuales generan el aroma característico del cacao [2].

La genética y los factores agroclimáticos influyen en el aroma de manera determinante, de acuerdo a la variedad, tipo o a la región donde sea cultivado el cacao se han identificado diferentes características organolépticas, ya que estos aspectos definen los precursores químicos del aroma [3]. Una etapa determinante en el desarrollo de la fracción volátil durante la poscosecha es la fermentación. En este proceso, gracias a la actividad de las levaduras, se producen COV's importantes como alcoholes, ésteres y ácidos carboxílicos, siendo el más importante el ácido acético, ya que además de aportar al aroma contribuye a que ocurran muchas reacciones químicas que generan otros COV's importantes como los ésteres [4]. En la etapa de secado, prosigue el desarrollo de la fracción volátil, además de ácidos y alcoholes, también se evidencia la presencia de ésteres, aldehídos, cetonas, hidrocarburos, pirazinas y furanos; finalmente, siguen en menor cantidad pirroles, terpenos, fenoles y oxazoles, algunos de los compuestos más representativos que se forman en esta etapa son el 2-metilbutanoato de etilo, 2-metilpropanoato de etilo, 2-feniletanol y 2-heptanol, los cuales producen notas aromáticas frutales, florales y cítricas [5]. Por otra parte, en la etapa de tueste el cacao termina de adoptar las propiedades organolépticas más importantes,

es aquí donde compuestos orgánicos volátiles como pirazinas específicas que generan notas aromáticas a chocolate, tostado, nuez y madera, se incorporan a las diferentes familias orgánicas que determinan el aroma final. Compuestos de gran importancia en esta etapa son la tetrametilpirazina, trimetilpirazina, benzaldehído, 2-fenilacetaldehído y el linalool [6].

Debido a la importancia que tiene el conocimiento de la composición de los compuestos volátiles en el licor de cacao como indicadores de calidad y su generación o estabilidad durante los procesos de fermentación, secado y tostado de las semillas de cacao, se han adelantado diferentes investigaciones acerca del desarrollo o implementación de métodos analíticos para la extracción y análisis de los COV's. Entre algunos métodos desarrollados para la extracción se encuentra la destilación-extracción simultánea, la extracción con solventes, la destilación al vacío y la extracción con fluidos supercríticos [7,8], los cuales han sido ampliamente utilizados en diferentes tipos de muestras de cacao, por ejemplo, cacao fresco, seco, tostado y licor de cacao [9,10]. Sin embargo, algunos de estos métodos demandan prolongados tiempos de extracción, calentamiento a elevadas temperaturas y varios pasos previos en la preparación de las muestras, lo cual puede provocar pérdida, degradación o reacciones de analitos con otros componentes de la matriz como lípidos, ácidos grasos o polifenoles, que además pueden convertir a los extractos en incompatibles con técnicas como la cromatografía de gases (CG) o la cromatografía líquida (LC). De igual manera, el calentamiento intensivo de las muestras, puede generar cantidades adicionales de alquiperazinas por interacción entre los sustratos de la reacción de *Maillard* presentes en la matriz, llevando a falsos positivos y errores en la identificación y cuantificación de los COV's [8].

Como una solución a lo descrito anteriormente, la microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME), la cual utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un material sorbente, adsorbe los COV's en determinadas condiciones para luego ser *desorbidos* en el puerto de inyección de un equipo de cromatografía, se ha convertido en una técnica de gran uso por su versatilidad, reproducibilidad y su característica de ser una *técnica verde de extracción* que no requiere usar solventes orgánicos nocivos para la salud o el medio ambiente [11]. Con esta técnica se eliminan interferencias en el análisis, asociadas

a la estabilidad química, térmica y la generación de artefactos indeseables en el análisis de chocolate y cacao [7]. Sin embargo, debido a que se trata de un método indirecto se deben establecer las condiciones óptimas de extracción, principalmente de factores como la temperatura de extracción, el tiempo de extracción y el tipo de fibra a utilizar [9,12]. Respecto a las condiciones de extracción, existen varias investigaciones que emplean diferentes tipos de fibra, tiempos y temperaturas para la extracción de los COV, los cuales son identificados por técnicas cromatográficas, por ejemplo, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Estudios realizados por Millares-García [11] determinaron el uso de una fibra PDMS/DVB/CAR, 15 min de extracción y 60 °C como valores óptimos para identificar una mayor cantidad de COV's por GC-MS, identificando pirazinas, aldehídos, ésteres y ácido acético como principales compuestos de influencia en el aroma característico del cacao. Ducki *et al.* [7], evaluaron los efectos de tiempo y temperatura de extracción de muestras de cacao del oeste del África, en esta investigación, determinaron tiempos de extracción de 15 min a 60 °C de calentamiento de muestra y el uso de una fibra PDMS/DVB/CAR, identificando un total de 42 compuestos. Van Durme *et al.* [13] determinaron la composición volátil de semillas de cacao mediante HS-SPME usando una fibra PDMS/DVB/CAR, con un tiempo de extracción de 25 min a 60 °C, el análisis de COV's se realizó por GC-MS identificando 30 compuestos entre alcoholes, ésteres, pirazinas y ácidos orgánicos. Rodríguez *et al.* [14] investigaron la composición de COV's en semillas de cacao de variedad forastero, de la provincia de Tabasco-México, usando una fibra DVB/CAR/PDMS, 30 min de extracción a 60 °C para identificar un total de 58 compuestos por GC-MS. En semillas de cacao trinitario, criollo y forastero, fueron identificados 53 compuestos en el trabajo realizado por Qin *et al.* [15], determinando principalmente alcohol furfúrico, 3-careno, 2-pentanol, 1-pentanol, 2,3-butanediol, 2-heptanol y bencill acetato en variedad trinitario; α -limoneno, β -cariofileno, β -mirceno, β -linalool y ácido acético en la variedad criollo, finalmente ácido 3-metilbutanoico, 2-(2-butoxi) etanol, anetol y 2,4-pentanediol, la extracción se realizó por HS-SPME con una fibra de DVB-CAR-PDMS, con un tiempo de exposición de la fibra de 30 min a 60 °C. En el trabajo realizado por Tan *et al.* [16] determinaron por HS-SPME y con el uso de nariz electrónica, 23 COV's, las condiciones utilizadas

fueron: fibra PDMS-DVB, 30 min de adsorción a 60 °C. Las condiciones de extracción influyen en la composición y cantidad de COV's extraídos, reportando en las investigaciones temperaturas entre los 24 a 60 °C, rango en el cual es posible evitar pérdidas o degradación de los compuestos más volátiles o termolábiles. Respecto al tiempo de extracción, estos están entre los 15 a 60 min para la extracción de COV's, y hasta 75 min para la extracción de compuestos menos volátiles como pirazinas. Los tiempos de extracción son mucho menores a los de otras técnicas, más aún si se tiene en cuenta que una vez se haya pasado este tiempo, la fibra pasa directamente al equipo cromatográfico sin pasos intermedios de concentración o extracción líquido-líquido. Para el caso de los COV's, el tiempo de equilibrio es muy importante, debido a que un tiempo corto no será suficiente para extraer los compuestos, y si el tiempo es demasiado largo, los analitos más volátiles se pueden degradar. En relación a las fibras, se puede inferir que recubrimientos que mezclen el PDMS, el carboxen y el DVB serían los más adecuados, ya que permiten extraer compuestos de carácter apolar como polares [5,6,12,17,18].

Teniendo en cuenta la diferencia en las condiciones de extracción reportadas y la importancia de determinar las mismas para identificar los COV's en licor de cacao del Departamento de Nariño, como parte del estudio para el mejoramiento de la productividad y calidad sensorial de este importante producto, se desarrolló el presente trabajo, cuyo objetivo fue la optimización de las condiciones de extracción HS-SPME de los COV's para su identificación por GC-MS, en licor de cacao regional de una asociación productora del municipio de Tumaco del Departamento de Nariño-Colombia. El material utilizado de cacao correspondió al clon CCN51, originario del Ecuador, el cual se caracteriza por ser un cultivo precoz, pues inicia su producción a los 24 meses de edad, no necesita de polinización cruzada para su adecuada fructificación tal como la mayoría de los clones y es tolerante a la "Escoba de Bruja", enfermedad que ataca a la mayoría de variedades de cacao destruyendo su producción. Entre las principales características de este clon se encuentran: excelente índice de mazorca (8 mazorcas/libra de cacao seco); excelente índice de semillas (1,45 g/semilla seca y fermentada). Además, es reconocido por su adaptabilidad a casi todas las zonas tropicales y por tener un

alto porcentaje de manteca (54 %), lo que lo hace cotizado por las industrias. Sus mazorcas son de color rojo-anaranjado en estado de madurez. Respecto a las notas del catador se ha establecido que este cacao presenta alta acidez y amargor y bajo sabor a chocolate [19,20].

En esta investigación, se utilizó un diseño experimental tipo factorial, usando la metodología de superficie de respuesta para identificar el tipo de fibra, la temperatura y el tiempo de extracción óptimos como factores influyentes en el análisis de los COV's responsables del aroma [7,11,12,14,17], las cuales se utilizarán para estudiar posteriormente los efectos del manejo poscosecha en la calidad del cacao producido en el Departamento de Nariño-Colombia.

Metodología

Materiales y equipos

Las muestras de licor de cacao fueron proporcionadas por la Asociación Cortepaz con sede en la vereda San Luis Robles en el Municipio de Tumaco, Departamento de Nariño del Suroccidente de Colombia. El licor de cacao se preparó a partir de semillas de cacao fermentadas, secas, tostadas y molidas del clon CCN51 según las técnicas y condiciones culturales definidas por la asociación. La muestra se consideró como material de referencia debido a que se preparó con un solo tipo de material (CCN51) en las condiciones con las que se ha obtenido licor a partir de clones regionales y que ha sido premiado en eventos internacionales.

Se evaluaron tres tipos de recubrimientos de las fibras SPME: DVB/CAR-PDMS, CAR/PDMS y DVB/PDMS (Supelco, Bellefonte-USA) instaladas en un Holder manual (Supelco, Bellefonte-

USA). En relación a la composición de las fases estacionarias de las fibras, estas se catalogan de acuerdo a la polaridad como bipolares y fueron seleccionadas por ser las más empleadas según la revisión bibliográfica [5,7,11,17,18].

Optimización de las condiciones de extracción por HS-SPME

Las condiciones de extracción de las muestras de cacao regional se determinaron mediante la aplicación de un diseño experimental tipo factorial 3³, usando la metodología de superficie de respuesta para determinar los factores que maximizan la variable de respuesta, la cual se expresó como número de COV's extraídos. Se consideraron los factores de: tipo de fibra SPME, temperatura y tiempo de extracción, evaluados en tres niveles según las consultadas en publicaciones de varios autores [11,12,14,17,18,21]. Para la extracción se tomaron 5,0 g de la muestra de licor de cacao CCN51 en un vial ámbar con septa PFTE de 40 mL (Restek, Bellefonte-USA) bajo agitación, usando una barra de agitación cubierta de teflón y una plancha de agitación Heidolph con control de temperatura y agitación [14]. Las muestras se sometieron a las condiciones de extracción acordes al diseño experimental descritas en la [Tabla 1](#). El análisis estadístico se ejecutó con el paquete estadístico STATGRAPHIC Centurion XVI.

En todas las combinaciones del diseño experimental se consideraron 15 min de pre-acondicionamiento de acuerdo a lo recomendado por Rodríguez *et al.* [14]. Los compuestos extraídos en las fibras para cada muestra del diseño se analizaron por GC y se confirmó la identidad por GC-MS con las condiciones descritas a continuación.

Tabla 1. Factores y niveles del diseño experimental.

Factores	Niveles			Descripción
	Bajo	Medio	Alto	
Tipo de fibra ^a	-1	0	1	DVB/CAR-PDMS (1), CAR/PDMS (0) y DVB/PDMS (-1).
Temperatura °C	25	40	60	Temperatura del sistema de extracción.
Tiempo (min)	15	30	60	Tiempo de extracción necesario para alcanzar en mayor número de COV's.

^aLos niveles en el tipo de fibra hacen referencia a las características del recubrimiento de las fibras. La codificación del nivel se realizó aleatoriamente.

Cromatografía de gases (GC)

El análisis de los compuestos volátiles extraídos por HS-SPME para la optimización del método se realizó por GC-FID de acuerdo a lo reportado por Millares-García [11] con algunas modificaciones, usando una columna Zebron ZB-5 (30 m x 0,25 mm y tamaño de película de 0,25 μm , Phenomenex, USA). La desorción se realizó en el puerto de inyección a 250 °C durante 2 min en modo *splitless*. El flujo de gas carrier Helio UAP (Linde-Colombia) fue de 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Las temperaturas de puerto de inyección y detector fueron 250 y 280 °C respectivamente. La programación de temperatura fue de 40 °C durante 2 min, luego se incrementó a razón de 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 280 °C y se mantuvo a esta última durante 5 min hasta terminar la separación [7, 11, 14, 18, 19]. El cálculo de índices de retención lineal (IRL) se realizó mediante la inyección de una serie homóloga de n-alcános (Restek, Bellefonte-USA) analizados bajo las mismas condiciones operacionales. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño.

Cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS)

La identificación de los COV's extraídos en las condiciones óptimas se realizó por GC-MS. Las condiciones instrumentales fueron similares a las usadas en GC-FID (columna, rampa de calentamiento, temperatura y tiempo de inyección, flujo de helio). Los espectros de masas se obtuvieron en el modo *full scan*, la energía de ionización empleada fue de 70 eV (EI) con un barrido de 1.8 scans/s y con un rango de m/z 35-400 $u\text{mas}$. La línea de transferencia se mantuvo a 280 °C, fuente de iones a 230 °C [11, 17, 18, 21, 22]. Los criterios de identificación de los compuestos se establecieron por comparación de los índices de retención lineal (IRLs) y espectros de masa de cada compuesto en las muestras usando como referencia las bases de datos Wiley 275 L y NIST.

Precisión del método de extracción HS-SPME

Determinados los valores óptimos para la extracción por HS-SPME, se estimó como figura de mérito analítico la precisión del método de extracción, para este fin se determinó la repetibilidad del método analítico en las condiciones óptimas de extracción establecidas, extrayendo y analizando una muestra de licor de cacao CCN51 triplicado. Además, se calculó la reproducibilidad intermedia del método utilizando los resultados

cromatográficos de una muestra de licor de cacao CCN51 extraída y analizada tres días diferentes por el mismo analista [5, 6, 12, 23, 24].

Resultados y discusión

Optimización del método

Para la optimización, la metodología de superficie de respuesta (MSR) que se utilizó para optimizar el método permitió el modelado y el análisis de los datos, en los que la extracción de COV's se ve influenciada por los factores experimentales analizados (fibra/tiempo/temperatura), los cuales pueden incrementar o disminuir la cantidad y concentración de compuestos orgánicos volátiles (COV's) adsorbidos en la fibra. La variable de respuesta se estableció de acuerdo al número de COV's total extraídos, cuyas áreas cromatográficas sean mayores a 100 cuentas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$). Como se puede apreciar en el diagrama de Pareto (Figura 1), el tipo de fibra empleada fue el factor más determinante en la extracción de los COV's. Estadísticamente, tiene una influencia significativa y positiva en relación a la variable de respuesta estudiada, esto se debe principalmente a que el tipo de absorbente del que está recubierta la fibra es determinante para extraer una mayor cantidad de compuestos de acuerdo a su polaridad [11, 12, 25]. De la misma manera, se observó que las interacciones cuadráticas tipo de fibra, temperatura y tiempo, junto con la interacción tiempo-temperatura (BB, CC, AA, y AB) presentan un efecto estadísticamente significativo en la extracción de COV's, expresados en número de COV's extraídos.

Con respecto al factor tipo de fibra, la DVB/CAR-PDMS mostró ser la más adecuada para extraer un mayor número de COV's, gracias a que tiene mayor afinidad a compuestos de polaridad relativamente baja, volátiles y semivolátiles (Figura 2), la combinación de las fases estacionarias de esta fibra, juega un rol importante para una mayor eficiencia en la extracción, con una mayor resolución de los cromatogramas en comparación con las fases estacionarias de las otras fibras [5], ya que el licor de cacao se puede considerar como una matriz compleja que tiende a tener diferentes tipos de compuestos [6, 11, 12, 25]. En la Figura 2 se puede apreciar que respecto al factor temperatura un nivel alto (60 °C) favorece la extracción de COV's, lo cual concuerda con algunas investigaciones previas, sin embargo, se debe tener en cuenta que temperaturas superiores

pueden causar degradación de los analitos más termolábiles [5,7,11,26,27]. En cuanto al tiempo, se observa que la extracción se favorece a 50 min y no al tiempo máximo de 60 min, esto se debe a que la fibra a tiempos superiores a 50 min en las condiciones estudiadas, alcanza estados de saturación, por lo que a tiempos mayores ocurre un proceso de desorción de los COV's. Además, el tiempo afecta la transferencia de masa de los analitos en la fibra, requiriendo un tiempo óptimo de 50 min para que la fibra pueda alcanzar su equilibrio. Por su parte, la temperatura afecta directamente la rapidez con que se alcanza el equilibrio, favoreciendo la difusión de los compuestos y ejerce una influencia en la composición de la fase volátil, aumentando la relación de compuestos con baja presión de vapor (semivolátiles) [28]. Mediante la optimización del diseño experimental (análisis multivariable) se estableció los valores óptimos, que presentan la mayor deseabilidad en la extracción de un mayor número de COV's en las muestras de licor de cacao. El proceso de

determinación de la máxima deseabilidad, permitió establecer parámetros teóricos óptimos para el proceso de extracción de COV's, basados en la determinación de la deseabilidad global óptima. Los valores determinados para la extracción fueron: tipo de fibra DVB/CAR-PDMS, temperatura de extracción 60 °C y tiempo de 50 min. En la Figura 3 se puede apreciar el comportamiento estimado en la combinación de dos factores (tiempo y temperatura) manteniendo constante el tipo de fibra DVB/CAR-PDMS, lo que permitió establecer los niveles óptimos de extracción de COV's, mediante la interacción de los tres factores experimentales principales [18], este resultado indica que un aumento de temperatura favorece el alcance de equilibrio entre los tres factores presentes en la extracción de COV's por la técnica de HS-SPME [5,17,18]. La ecuación 1 representa la relación entre el número de compuestos extraídos y las condiciones de extracción.

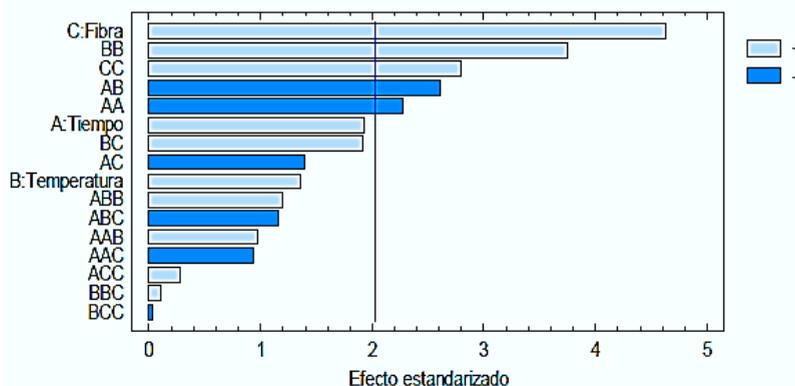


Figura 1. Diagrama de Pareto para la extracción HS-SPME de COV's en licor de cacao.

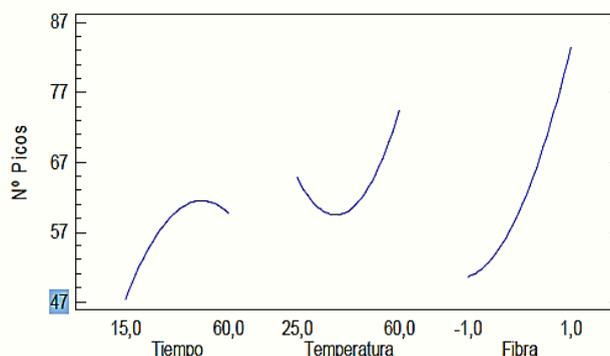


Figura 2. Gráfico de efectos principales para la extracción HS-SPME de COV's en licor de cacao.

$$COV's = -0,41302 + 3,89691 xt + 0,272008 xT - 4,7038 x F \tag{1}$$

Donde t = tiempo; T = temperatura y F = tipo de fibra.

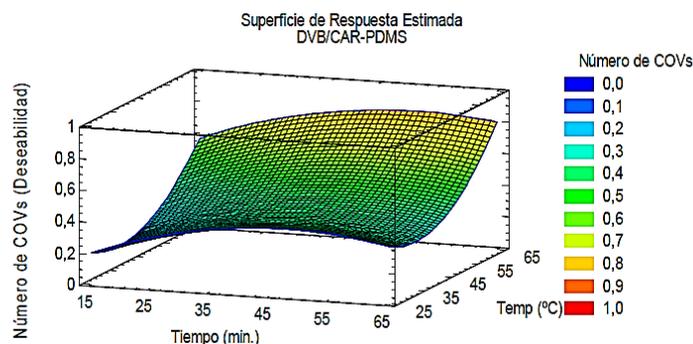


Figura 3. Gráfico de superficie de respuesta para la extracción HS-SPME de COV's en licor de cacao.

Precisión del método HS-SPME

Para estimar la precisión del método de extracción optimizados, se determinaron parámetros estadísticos de desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV %) a los resultados de las áreas cromatográficas de cada compuesto en los experimentos de repetibilidad y reproducibilidad de la extracción HS-SPME (Tabla 2). Para el caso de la repetibilidad de las áreas de 39 compuestos mayoritarios identificados se encontraron valores entre 0,59 y 11,39 de CV %, mientras que para la reproducibilidad entre 4,29 y 12,93 de CV %. El coeficiente de variación para extracciones HS-SPME permite valores hasta del 12 % [14], por lo tanto, se puede afirmar que el método optimizado es preciso para el análisis de COV's presentes en licor de cacao.

Identificación por GC-MS de COV's encontrados en licor de cacao CCN51

Se identificaron un total de 39 COV's mayoritarios en el licor de cacao CCN51 (Figura 4) al utilizar las condiciones óptimas de extracción (fibra: DVB/CAR-PDMS, temperatura: 60 °C, tiempo: 50 min). Los 39 compuestos se pueden clasificar en 8 grupos o tipos de compuestos según su grupo funcional de la siguiente manera: 8 aldehídos, 5 cetonas, 6 alcoholes, 10 pirazinas, 7 éteres, un terpeno, un ácido y una lactona. En la Tabla 3 se presentan los resultados de la identificación de cada compuesto, así como su área cromatográfica, tiempos de retención, índices de retención y la nota aromática que producen según los reportes de las investigaciones realizadas en el tema.

Tabla 2. Precisión de la extracción HS-SPME COV's en licor de cacao.

No de Compuestos Identificados	Parámetro Precisión	
	Repetibilidad (n=3) ^a Rango de CV %	Reproducibilidad ^b (n=3) Rango de CV %
39	0,59 – 11,39	4,29 -12,93

a: tres análisis en un día. b: tres análisis en tres días diferentes.

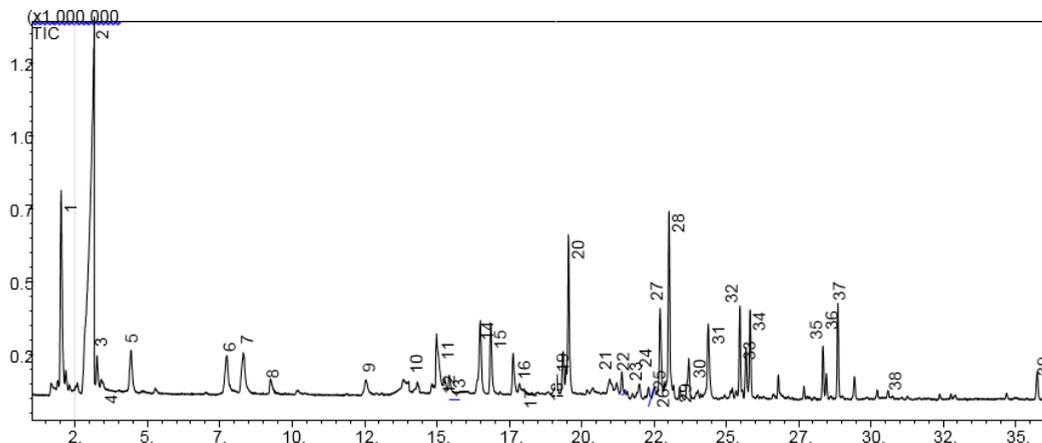


Figura 4. Cromatograma TIC muestra CCN51 cacao.

Tabla 3. Identificación COV's cacao CCN51 HS-SPME.

Tipo	N°	tR ^a	Área	% Relativo	Compuesto	Nota producida [1,29]	IR E ^b	IR T ^c
		min	(μ V*seg)					
Aldehídos	3	3,274	481238	1,62	3- metil butanal	caramelo-chocolate	NC	655
	4	3,418	64410	0,22	2-metil butanal	rancio-chocolate-malta fermentada	NC	641
	16	17,632	366276	1,23	Benzaldehído	dulce-cereza-almendra amarga	976	960
	17	17,846	338851	1,14	5-metil-furfural	picante- caramelo- arce	981	964
	22	21,384	128713	0,43	Bencen acetaldehído	dulce-floral-clavo-miel-cacao-jacinto	1064	1042
	30	23,695	600442	2,02	2-isopropil-5-metil-2-hexenal	uva	1125	1097
	37	28,847	925022	3,11	2-fenil-2-butenal	chocolate tostado	1302	1279
	39	35,735	274835	0,93	5-metil-2-fenil-2-hexenal	chocolate-amargo-almendra	1528	1482
Cetonas	5	4,445	564419	1,90	3-hidroxi-2-butanona	dulce-mantequilla-crema	719	721
	25	22,303	674374	2,27	Acetofenona	dulce- acre-almendra -acacia	1087	1065
	29	23,385	294540	0,99	2-nonanona	coco-herbal-dulce-frutal-queso	1116	1096
	32	25,463	572948	1,93	trans-isomentona	menta fresca-menta dulce	1176	1124
	34	25,816	662013	2,23	cis-isomentona	menta fresca-menta dulce	1187	1132
Alcoholes	1	2,034	2661704	8,96	2-propanol	alcohol-leñoso-almizcle	NC	515
	5	7,746	709482	2,39	2,3-butanediol	frutal-cebolla	809	789
	6	8,321	514198	1,73	1,3-butanediol	inodoro	818	NR
	9	12,546	150143	0,51	2-furanmetanol	alcohol-rancio-dulce-caramelo	882	865
	10	14,831	138762	0,47	2-heptanol	Fresco-herbal-dulce-floral	921	906
	31	24,368	667710	2,25	Bencenoetanol	floral-rosas-seco-agua de rosas	1144	1113
Pirazinas	7	9,261	616900	2,08	2-metil-pirazina	nuez-chocolate tostado	832	826
	11	14,990	813341	2,74	2,5-dimetil-pirazina	café	925	912
	13	15,429	98232	0,33	2,3-dimetil-pirazina	caramelo-chocolate	933	920
	18	19,360	463492	1,56	2-etil-6-metil-pirazina	patata asada	1013	991
	19	19,462	546055	1,84	2-etil-5-metil-pirazina	tostado	1016	994
	20	19,541	880051	2,96	Trimetil pirazina	nuez-cacahuete	1018	1000
	27	22,704	1377789	4,64	3-etil-2,5-dimetil-pirazina	patata-cacao-nuez tostada	1097	1063
	28	23,011	757005	2,55	Tetrametil pirazina	chocolate	1105	1086
	33	25,674	409863	1,38	2,3,5-trimetil-6-etil-pirazina	caramelo	1182	1163
	38	30,577	215555	0,73	3-isopentil-2,5-dimetil-pirazina	alcanfor-tomillo-herbal-pino-agrio	1342	1308

Continuación Tabla 3.

Ésteres	14	16,501	766774	2,58	Butanoato de etilo	frutal-piña-coñac	954	804
	15	16,865	788831	2,66	Acetato de etilo	etereo- dulce-frutas- maleza verde	961	806
	21	21,201	88082	0,30	Acetato de sec- butilo	solvente-banana	1059	NR
	24	21,995	335573	1,13	Meso-diacetato de 2,3-butandiol	NR	1079	1054
	26	22,500	116178	0,39	D,l-diacetato de 2,3-butandiol	NR	1091	1064
	35	26,791	295984	1,00	Caprilato de etilo	piña	1217	1197
	36	28,334	516806	1,74	Fenil acetato de etilo	floral-miel-Rosa- balsámico-cacao	1270	1243
Terpeno	23	21,574	75137	0,25	β -Ocimeno (E)	cítrico-tropical-terpénico- leñoso	1068	1050
Ácidos	2	3,178	13705248	46,15	Ácido acético	vinagre	NC	625
Lactonas	12	15,266	79817	0,27	γ -butirolactona	crema-aceite-caramelo- pan-café	930	908

^aTiempo de retención, ^bíndice de retención experimental, ^cíndice de retención teórico consultado en bases de datos (NIST, Flavornet), NC: no calculado, NR: no reportado. N°: referencia al número de pico del cromatograma de la [Figura 4](#).

Al comparar el número total de compuestos identificados por grupo funcional ([Figura 5A](#)) se puede apreciar que las pirazinas aportan el mayor número de COV's al total extraído del licor de cacao, estos compuestos son importantes debido a que aportan positivamente al aroma y definen el aroma de la muestra a cacao, chocolate, tostado y nueces, por lo cual se esperaría que la muestra tenga un aroma agradable a chocolate [[1,8,30,31](#)], sin embargo, al comparar el área cromatográfica total por cada grupo, se puede apreciar que los ácidos se encuentran en mayor cantidad (área cromatográfica mayor al de todas las pirazinas juntas) siendo el ácido acético el único encontrado en la muestra, el cual si bien es indispensable para la generación de todos los COV's durante el proceso de fermentación, es poco deseado al final del proceso en el aroma, debido a que aporta notas a vinagre o rancias haciendo que la muestra se considere de mala calidad [[1,4,30](#)], esto último destaca la importancia de identificar la mayoría de los COV's involucrados en el aroma, su cantidad y el tipo de aroma que aporta a la muestra [[1,5](#)]. En la [Figura 6](#) podemos apreciar una comparación del área de cada uno de los COV's por grupo funcional, los aldehídos ([Figura 6A](#)) son compuestos que aportan aromas tipo herbal y frutal, en la muestra del licor de cacao el más

abundante fue el 2-fenil-2-butenal, que aporta notas aromáticas a chocolate, en el caso de las cetonas ([Figura 6B](#)) el COV más abundante fue la acetofenona, este compuesto es producido durante la fermentación, Portillo *et al.* [[30](#)] reporta que la acetofenona es generada al cuarto día de fermentación y produce en el aroma notas florales y dulces. Los alcoholes por su parte tienden a aportar notas aromáticas alcohólicas, herbales y a maderada como por ejemplo a brandy, en el caso de la muestra analizada se encontró que el 2-propanol fue el mayoritario el cual le aporta notas a alcohol, leña y almizcle [[1,7,29](#)]. La 3-etil-2,5-dimetil-pirazina fue la más abundante encontrada del grupo de las pirazinas, como la mayoría de compuestos de esta familia se origina por medio de la reacción de Maillard y son los principales COV's responsables del aroma característico del cacao y sus productos derivados, en el caso de muestras de licor se ha reportado que aporta notas a cacao y nuez tostada. Por su parte, el acetato de etilo fue el compuesto mayoritario de la familia de ésteres, este se origina durante las últimas etapas de fermentación y produce notas frutales verdes y dulces. De los terpenos las lactonas y los ácidos solo se encontró un compuesto, el β -Ocimeno-(E) reconocido por aportar aromas cítricos, la γ -butirolactona que

aporta notas a café y cremosos y finalmente el ácido acético que como se mencionó anteriormente, a pesar de su importancia en los procesos de formación de los COV's es poco deseado por su aroma a vinagre [22,28,30,31]. El ácido acético es el más abundante de todos los COV's identificados con un área de 13 705 248 $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$, casi 7 veces más que el que le sigue en abundancia que es el 2-propanol con un área de 2 661 704 $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$,

incluso si se suma el área de los 10 compuestos siguientes al ácido acético se obtiene un área menor (11 177 037 $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$), no obstante, el licor de cacao producido por la asociación está catalogado como fino y de aroma posiblemente por que la suma de los compuestos que aportan positivamente al aroma prevalece sobre el efecto negativo del ácido acético.

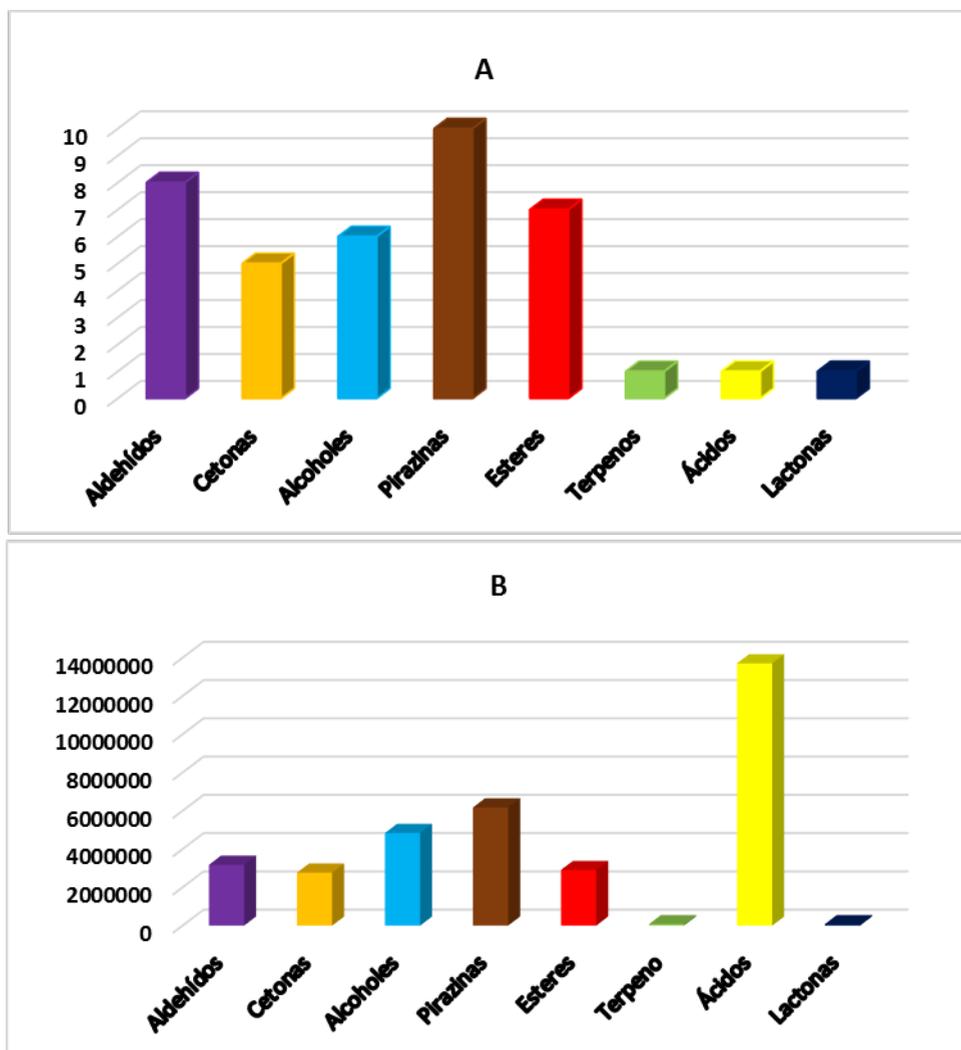


Figura 5. Gráficas del total de COV's identificados por HS-SPME y GC-MS. **A.** Número total por grupo funcional. **B.** Área total por grupo funcional.

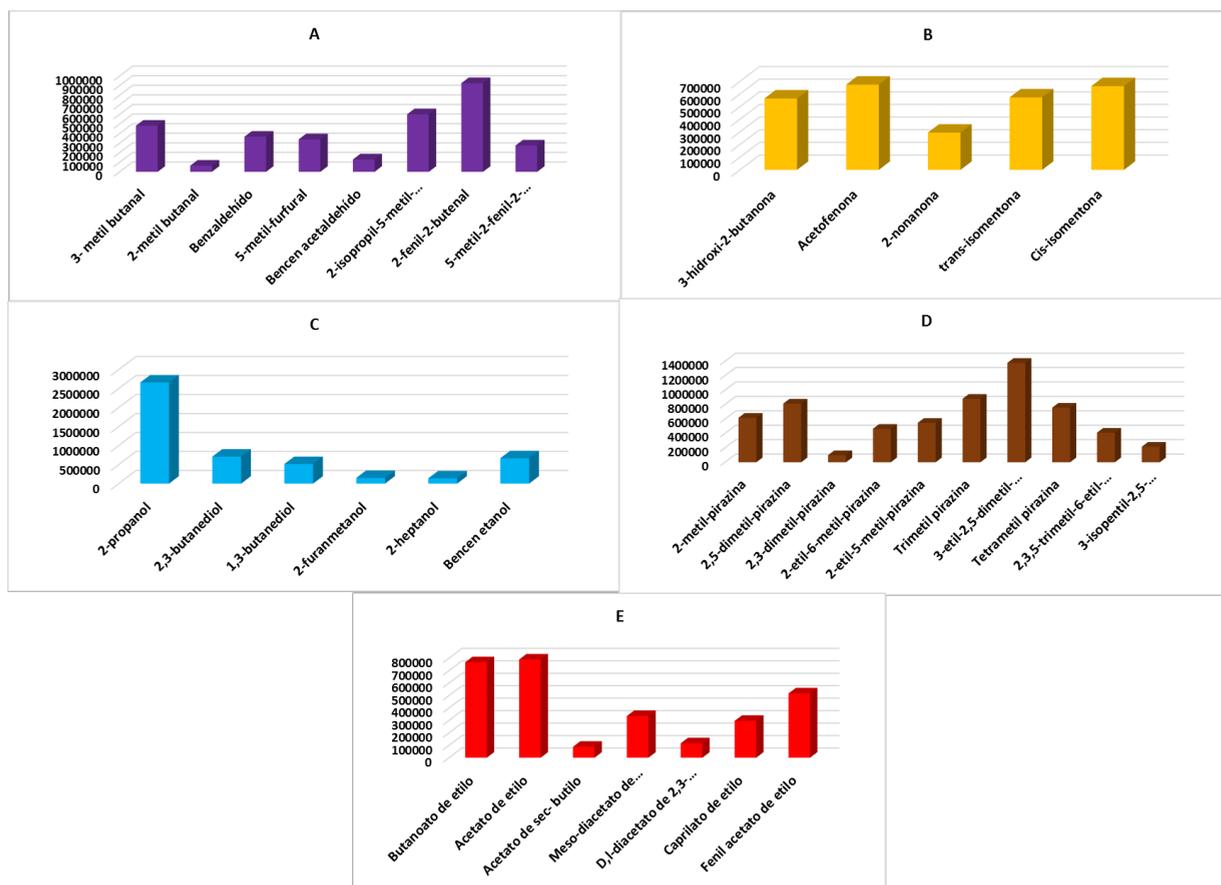


Figura 6. Gráficas COV'S vs Área por grupo funcional. **A.** Aldehídos. **B.** Cetonas. **C.** Alcoholes. **D.** Pirazinas. **E.** Ésteres.

Conclusiones

La extracción de COV's en granos de cacao regional de Nariño por HS-SPME demostró ser una herramienta analítica de gran valor. Los factores estudiados en este trabajo: tipo de fibra, temperatura y tiempo de extracción presentaron influencia estadística en el número de COV's extraídos y posteriormente analizados por GC-MS, encontrando que, a un tiempo de 50 min de extracción, temperatura de 60 °C y la fibra DVB/CAR-PDMS como las condiciones de mayor eficiencia en la extracción de COV's de la matriz de estudio. Además, el método de extracción presentó una adecuada precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad, lo que convierte a HS-SPME en un método de extracción confiable y de gran versatilidad para el análisis de calidad en muestras de la agroindustria del cacao y que debe ser probado en otros tipos de matrices como cacao en grano seco, tostado y chocolates. En las muestras analizadas de licor del clon

de cacao CCN51, los principales tipos de compuestos identificados son aldehídos, cetonas, alcoholes, pirazinas, ésteres, terpenos, ácidos y lactonas, siendo el ácido acético, el 2-propanol y la 3-etil-2,5-dimetil-pirazina los compuestos mayoritarios identificados. Si bien el mayor número de compuestos es del tipo pirazina (ocho compuestos), las cuales aportan al aroma del licor de cacao de manera positiva, el ácido acético fue el compuesto mayoritario, el cual se ha reportado que aporta negativamente al aroma y se encontró en un área (13 705 248 $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) que es superior incluso a la sumatoria de los 10 compuestos mayoritarios que le preceden en área y que aportan positivamente (11177 037 $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$), sin embargo, el licor producido ha sido premiado en varias ocasiones por su calidad aromática. Esto sugiere que existe una competencia entre el número de compuestos, su identidad, su cantidad, así como el tipo y la descripción del aroma de cada compuesto para definir una calidad aromática específica, posiblemente la buena calidad del aroma de las

muestras se debe a la interacción y la sinergia de los compuestos que aportan positivamente al aroma, prevalecen sobre la gran cantidad de ácido acético que aporta negativamente a la calidad, lo cual sugiere profundizar en la identificación y cuantificación de los COV's, así como su formación durante el manejo pos cosecha realizado tradicionalmente.

Agradecimientos

La presente investigación se desarrolló en el marco del proyecto “Estudio para el mejoramiento de la productividad y calidad sensorial (aroma y sabor) del cacao (*Theobroma cacao* L) regional del Departamento de Nariño”, financiado por el Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General De Regalías del Departamento de Nariño. El equipo de investigadores de CIAD agradecen a Agrosavia y a la Sección de Laboratorios de la Universidad de Nariño por su colaboración en esta investigación. Un agradecimiento especial a la Asociación Cortepaz del municipio de Tumaco, por su valiosa colaboración y apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Referencias

- [1] Aprotosoiaie AC, Luca SV, Myron A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products- An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016;15(1):73-91. doi.org/10.1111/1541-4337.12180
- [2] De Brito ES, Garcia NHP, Gallão M, Cortelazzo AL, Fevereiro PS, Braga MR. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *J. Sci. Food Agric.* 2001;81:281-288. [doi.org/10.1002/1097-0010\(20010115\)81:2%3C281::AID-JSFA808%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20010115)81:2%3C281::AID-JSFA808%3E3.0.CO;2-B)
- [3] Kongor JE, Hinneh M, De Walle D, Van Afoakwa EO, Boeckx P, Dewettinck K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Research International.* 2016;82:44-52. doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012
- [4] Schwan R, Fleet G, Sarkar P, Nout MJR, Chen J, Zhu Y, *et al.* *Cocoa and Coffee Fermentations.* Reino Unido: Taylor & Francis Group; 2015.
- [5] Rodríguez J. Estudio de los compuestos volátiles de *Theobroma cacao* L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado (Tesis doctoral). Ciudad de México, México. Instituto Politecnico Nacional. México; 2011.
- [6] Rodríguez J, Escalona-Buendía HB, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E, Jaramillo-Flores ME. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International.* 2011;44(1):250-258. doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028
- [7] Ducki S, Miralles-Garcia J, Zumbe A, Tornero A, Storey DM. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta.* 2008;74:1166-1174. doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.034
- [8] Pini GF, Brito ES, De García NHP, Valente ALP, Augusto, F. A Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) method for the chromatographic determination of alkylpyrazines in cocoa samples. *J. Braz. Chem. Soc.* 2004;15(2):267-271. doi.org/10.1590/S0103-50532004000200017
- [9] Ziegler G. Linalool contents as characteristic of some flavor grade cocoas. *Z Lebensm Unters Forch.* 1990;191:306-309. doi.org/10.1007/BF01202432
- [10] Jinap S, Thien J, Yap TN. Effect of drying on acidity and volatile fatty-acids content of cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.* 1994;65(1):67-75. doi.org/10.1002/jsfa.2740650111
- [11] Miralles-Garcia J. *Chemical Composition and Flavour- Development of Cocoa Products by Thermal and Enzymatic Technologies* (tesis doctoral). Manchester, England: University of Salford, A Greater Manchester University; 2008.
- [12] Reineccius G. *Flavor Chemistry and Technology.* 2 ed. Estados Unidos: Taylor & Francis Group; 2006.
- [13] Van Durme J, Ingels I, De Winne A. Inline roasting hyphenated with gas chromatography-mass spectrometry as an innovative approach for assessment of cocoa fermentation quality and aroma formation potential. *Food Chem.* 2016;205:66-72. doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.004
- [14] Rodríguez J, Escalona-Buendía HB, Contreras-Ramos SM, Orozco-Avila I, Jaramillo-Flores E, Lugo-Cervantes E. Effect of fermentation time

- and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chem.* 2012;132(1):277-288. doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.078
- [15] Qin X, Lai XW, Tan LH, Hao CY, Li FP, Hea SZ, *et al.* Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. *Int. J. Food Prop.* 2017;20(10):2261-2275. doi.org/10.1080/10942912.2016.1236270
- [16] Tan J, Kerr WL. Determining degree of roasting in cocoa beans by artificial neural network (ANN)-based electronic nose system and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J. Sci. Food Agric.* 2018;98(10):3851-3859. doi.org/10.1002/jsfa.8901
- [17] Quijano CE, Pino J. Analysis of volatile compounds of cacao Maraco (*Theobroma bicolor* Humb. et Bonpl.) fruit. *J. Essent. Oil Res.* 2009;21(4):211-216. doi.org/10.1080/10412905.2009.9700150
- [18] Di Carro M, Ardini F, Magi E. Multivariate optimization of headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of methylpyrazines in cocoa liquors. *Microchem. J.* 2015;121:172-177. doi.org/10.1016/j.microc.2015.03.006
- [19] Counet C, Ouwerx C, Rosoux D, Collin S. Relationship between Procyanidin and Flavor Contents of Cocoa Liquors from Different Origins. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:6243-6249. doi.org/10.1021/jf040105b
- [20] Kadow D, Bohlmann J, Phillips W, Lieberei R. Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2013;86:90-98. doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.013
- [21] Bastidas A. Estudio Químico de los Componentes Volátiles (HS-SPME) y Análisis de la Composición de Taninos y Cafeína en un Tipo de Café Tostado y Molido Tradicional Colombiano (Tesis de pregrado). Pasto, Colombia: Universidad de Nariño; 2011.
- [22] Rojas-Monroy G. Caracterización del aroma del café molido de Puerto Rico mediante la técnica de microextracción; en fase sólida (SPME) y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas GC/MS (Tesis de maestría). San Juan, Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico; 2005.
- [23] Balasubramanian S, Panigrahi S. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food Bioprocess Technol.* 2011;4(1):1-26. doi.org/10.1007/s11947-009-0299-3
- [24] Menezes Filho A, Dos Santos FN, De Paula Pereira PA. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta.* 2010;81(1-2):346-354. doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.008
- [25] Ho VTT, Zhao J, Fleet G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2014;174:72-87. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014
- [26] Granda F, Valencia S, Marin JM, Restrepo G. Optimización del método de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía gaseosa para análisis de metanol en agua. *Rev. Colomb. Quim.* 2011;40(2):201-210.
- [27] TGSC Information System. Características organolépticas. Base de datos en línea. (sitio de internet). Disponible en: <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1028161.html>. Acceso el 1 de agosto de 2016.
- [28] Afoakwa EO. *Chocolate Science and Technology*. 2 ed. Reino Unido: John Wiley & Son; 2016.
- [29] Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008;48(9):840-857. doi.org/10.1080/10408390701719272
- [30] Portillo E, Labarca M, Grazziani L, Cros E, Assemat S, Davrieux F, *et al.* Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola.* 2009;9(2):458-468.
- [31] Frauendorfer F, Schieberle P. Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56:10244-10251. doi.org/10.1021/jf802098f