



República Bolivariana de Venezuela
Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Postgrado en Química Analítica
Laboratorio de Espectroscopia Molecular

“Desarrollo de metodologías analíticas para evaluar aminoácidos y azúcares reductores, precursores del aroma y sabor del cacao”

www.bdigital.ula.ve

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del Grado de Doctor en Química Analítica

Lic. Wendy Josefina Orozco Contreras

Tutora: Dra. María del Rosario Brunetto

DONACION

SERBIULA
Tulio Febres Cordero

Mérida – Venezuela

Atribución - No Comercial Junio 2014
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

RESUMEN

La calidad del cacao es uno de los aspectos de mayor importancia en el proceso productivo cacaotero; el nivel que se logre conseguir de la misma, determinará la mayor o menor demanda que tenga el producto en el mercado comercial. Un punto dominante en la calificación del cacao de exportación se basa en las características organolépticas: sabor y aroma

El desarrollo del sabor y aroma del cacao es un fenómeno complejo que depende no sólo de la composición química de la almendra sino que también de como se realicen los procesos de fermentación y tostado. Algunos autores indican que los aminoácidos y azúcares reductores generados en la semilla madura durante la fermentación han demostrado ser los precursores del sabor y aroma ya que forman las pirazinas través de la reacción de Maillard. durante la etapa de torrefacción.

Debido a la importancia de estos procesos, la propuesta de trabajo para esta Tesis fue la puesta a punto y validación de metodologías analíticas y su aplicación a la determinación de aminoácidos y azúcares reductores en almendras de cacaos venezolanos sometidas a las etapas de fermentación y tostado.

Para cumplir con esta propuesta nos planteamos y desarrollamos varios objetivos concretos, que presentamos en esta memoria de la Tesis en los capítulos que se detallan a continuación.

Capítulo I- Introducción y Capítulo II- Marco Teórico. Se presenta una exposición de la teoría básica que fundamenta la investigación desarrollada y los antecedentes de ésta.

Capítulo III- Propuesta de trabajo y objetivos. Corresponde a los objetivos de la Tesis que se plantearon y su justificación. También aquí se presentan las muestras de cacao objeto de estudio.

Capítulo IV- Carbohidratos. Se desarrolló un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM) para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa. Se basa en la derivatización precolumna de los analitos con el reactivo N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) y en la separación cromatográfica de sus derivados por CG. Se estudiaron diversas estrategias como el uso de energías auxiliares de calentamiento para simplificar el proceso de derivatización. La detección de los derivados se realizó por espectrometría de masas, utilizando un detector con una fuente de ionización por impacto electrónico y un analizador de trampa de iones.

Los analitos se extrajeron desde las muestras de cacao con agua (70 °C) empleando sonicación (agitación con ultrasonido) durante 15 minutos.

Para acceder a las características analíticas del método se realizaron estudios de precisión y exactitud. La exactitud del método se evaluó realizando estudios de recuperación. Los porcentajes de las recuperaciones de glucosa, fructosa y sacarosa desde las muestras de cacao se encontraron entre 95 y 108 % con una variación < 4% (n= 5), lo que indica el alto rendimiento del procedimiento de extracción con sonicación y de la reacción de derivatización. Los resultados de los estudios de precisión realizados durante un día y entre días mostraron un coeficiente de variación (CV) < al 3,5 % (n=5) indicando una buena repetibilidad instrumental y de la reacción de derivatización.

El método desarrollado se aplicó a la determinación de fructosa, glucosa y sacarosa en 90 muestras de diferentes variedades de cacao tomadas antes, durante y posteriormente a los procedimientos de fermentación y del tostado. Los resultados mostraron que a medida que transcurre la fermentación el contenido de sacarosa inicial disminuye mientras que los de azúcares reductores (glucosa

y fructosa) aumentan, llegando a un máximo entre el 2° y 3° día de fermentación para los cacaos criollos, 4° y 5° día para los forasteros y entre 4° y 7° día para los trinitarios. Estos resultados indican que los azúcares reductores se forman durante la etapa de fermentación por hidrólisis de la sacarosa cuya concentración fue máxima en las muestras sin fermentar. Por otra parte, se comprobó que relación fructosa/glucosa permite evaluar el grado de fermentación de las muestras de cacao. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron una relación fructosa/glucosa ≥ 3 para todos los casos, demostrando que el proceso de fermentación de las muestras fue el adecuado. Finalmente se observó una reducción muy significativa del contenido de los azúcares reductores (glucosa y fructosa) durante la etapa de torrefacción, comportamiento que justifica su participación junto con los aminoácidos en la reacción de Maillard para generar compuestos que caracterizan el aroma y sabor a chocolate.

Capítulo V- Aminoácidos. La separación y detección de aminoácidos ha sido siempre un desafío desde el punto de vista analítico y en la literatura se describen varios métodos desarrollados. Sin embargo, muchas veces la decisión de una metodología pasa por analizar la infraestructura que se tenga. En este capítulo se presenta el desarrollo de dos metodologías para la determinación de aminoácidos.

1.- Se puso a punto y validó un método por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección UV de arreglo de diodos para la separación y cuantificación de los derivados de aminoácidos. Se utilizó el isotiocianato de fenilo (PITC) como reactivo derivatizante ya que forma derivados (PIC-AA) estables con los aminoácidos primarios y secundarios que pueden detectarse por UV entre los 240 y 255 nm. Luego de la reacción de derivatización la muestra contenía los derivados PTC-AA, exceso de PITC y otros compuestos endógenos que podían interferir en la separación en la columna. Para su eliminación se utilizó la técnica de extracción en fase sólida en una precolumna de extracción selectiva Oasis® HLB (Waters) que se automatizó en un sistema de columnas acopladas en su modalidad de transferencia en circuito. La validación

Wendy Josefina Orozco Contreras

del procedimiento se estimó realizando estudios de precisión y exactitud. Las recuperaciones obtenidas en todos los casos estuvieron comprendidas entre 81 y 109 % con un coeficiente de variación (CV) < 3,85% (n=5). Todo ello demostró que los procedimientos de extracción son adecuados para la extracción de aminoácidos en muestras de cacao. Los resultados en la precisión mostraron que los coeficientes de variación de los análisis realizados durante un día y entre días fueron menores a 3,5 % lo que demuestra la buena repetibilidad del método de cuantificación.

2.- La CG es una herramienta poderosa en la separación de mezclas complejas, gracias a su inherente poder de resolución, así como su sencillo y económico acoplamiento con EM, que permite la identificación inequívoca de los compuestos estudiados. Por ello la utilizamos para poner a punto un método para la determinación de aminoácidos. Al igual que para el caso de los azúcares, los aminoácidos son compuestos polares por lo que su volatilidad es muy baja. Para mejorarla se realizó una reacción de derivatización con BSTFA asistida con radiación de microondas que disminuyó significativamente el tiempo de reacción reportado en la literatura a 60 seg. La separación cromatográfica de los derivados con una buena resolución, sin efecto matriz y en un tiempo de corrida de 21 min se realizó en una columna capilar 5% fenil-metil-polisiloxano HP5ms (Agilent) de 30m x 0,25 mm con un espesor de película de 0,25 μ m con el programa de temperatura: 80 °C(2min)→155 °C(8°C/min) → 300 °C (11 °C/min, 3 min). Los iones seleccionados para llevar a cabo la detección por monitoreo de ion específico (SIM) fueron: m/Z 102 (Gly), 116 (Ala), 142 (Pro), 144 (Val), 158 (Leu e Ile), 156 (Lys), 176 (Met), 202 (Trp), 204 (Ser), 218 (Thr, Tyr y Phe), 232 (Asp), 246 (Glu). Los resultados de los estudios de precisión mostraron una buena repetibilidad del procedimiento CV < 4,6 % (n=5). La exactitud del método se estimó realizando estudios de recuperación; los resultados indicaron que para todos los casos los porcentajes de recuperación estaban comprendidos entre el 95 y 108 % con una DER < 4,2 % (n=5). Las curvas de calibrado fueron lineales

en los intervalos de concentración estudiados para cada analito con coeficientes de regresión lineal (r) $> 0,9900$ sin presencia de interferencia de la matriz.

Los métodos propuestos se aplicaron para la determinación cuantitativa de los aminoácidos libres en las mismas muestras que se utilizaron en el análisis de sacarosa, glucosa y fructosa.

Para ello, los aminoácidos se extrajeron de las muestras de cacao con un procedimiento de extracción sólido-líquido a una temperatura de 70 °C asistida por ultrasonido. Los porcentajes de recuperación obtenidos en todos los casos fueron superiores al 95%. Estos valores demostraron que la extracción asistida por ultrasonido es eficaz y adecuada para la extracción de los aminoácidos en muestras complejas como es el cacao.

Los resultados obtenidos para el análisis de las muestras de cacao fueron ampliamente discutidos y la tendencia que se observó fue un aumento progresivo sobre todo de los aminoácidos hidrofóbicos durante la etapa de fermentación y una disminución progresiva finalizada la torrefacción.

La aplicación de distintos tests estadísticos sobre los resultados obtenidos por ambos métodos, permitió comprobar que ambos métodos son igual de precisos y los resultados aportados por cada uno no presentan diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$). En este sentido, los dos métodos desarrollados pueden emplearse para la determinación de aminoácidos en muestras de cacao.

Capítulo VI- En este capítulo se presentan las conclusiones finales y recomendaciones

Capítulo VII- Se dedica a las referencias bibliográficas

En resumen todos los métodos desarrollados comparten las mismas características generales, tales como: selectividad, precisión, exactitud, tiempo de análisis satisfactorios y bajo impacto medioambiental.

Por otra parte, el aporte metodológico aportado en esta Tesis permitió profundizar en el conocimiento del cacao, particularmente en los cacaos criollos estudiados. En la literatura especializada, no existe ningún trabajo reportado sobre el estudio del contenido de aminoácidos en las almendras antes, durante y posterior al proceso de fermentación y tostado.

www.bdigital.ula.ve



www.bdigital.ula.ve

A mis padres, José Miguel y Silvia Elena

A mi hermano, José Antonio

Por su apoyo y amor incondicional

Los quiero!

vii

Wendy Josefina Orozco Contreras

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Agradecimientos

Durante estos años son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada.

A la Dra. María del Rosario Brunetto, no solo por ofrecerme sus valiosos conocimientos y experiencia profesional, sino también por animarme y alentarme en cada una de las fases de esta investigación y bajo cuya tutoría, colaboración y esfuerzo he podido culminar con éxito esta tesis doctoral. Prof., gracias por todos los consejos, aportes, dedicación y por la amistad brindada durante el transcurso de mi formación profesional!

A la ilustre Universidad de Los Andes (ULA) porque a través de su Postgrado en Química Analítica fue posible realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo de Estudios de Postgrado (CEP) por sus ayudas económicas, permitiéndome asistir a distintos eventos científicos, que me han permitido crecer y fortalecerme en el ámbito profesional.

A la Prof. Yelitza Delgado, por su amistad, sus ideas y comentario, pero sobre todo por su ayuda incondicional durante este camino.

A los miembros del Laboratorio de Espectroscopia Molecular, que hicieron de estos años un ambiente de trabajo agradable y armonioso, gracias por permitirme compartir con todos ustedes.

viii



Tesis Doctoral | Agradecimientos

A mis queridos amigos, por su apoyo, consejos y ánimos en este transitar, les deseo de corazón que tengan muchos éxito en toda y cada una de las áreas de su vida, tanto profesional como personal.

A Hugo, que siempre me has apoyado y has estado a mi lado durante estos años, dándome ánimos para culminar con éxito esta etapa.

Por último, pero no menos importante, a mi familia, por su apoyo incondicional, comprensión y estímulo a siempre ser mejor. En especial a mis padres, por apoyarme de múltiples formas durante el desarrollo de esta tesis, por su constante estímulo, por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría y que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr todos los objetivos que me proponga en la vida

Gracias por todo!!



ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Dedicatoria	vii
Agradecimientos	viii
Índice General	x
Índice de Tablas	xv
Índice de Figuras	xx
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
II. 1. Principales factores que afectan la calidad de las almendras de cacao	7
II. 1.1. Efecto del genotipo sobre la calidad del sabor en el grano de cacao	8
II. 1.2. Ambiente	8
II. 1.3. Tratamiento postcosecha del cacao	9
II. 1.3.1. Cosecha	9
II. 1.3.2. Partida de mazorcas	10
II. 1.3.3. Fermentación	10
II. 1.3.4. Secado	12
II. 1.3.5. Clasificación	13
II. 1.3.6. Almacenamiento	14
II. 1.4. Torrefacción o tostado	14

II. 2. Precusores del aroma y sabor en el cacao (Aminoácidos y Azúcares Reductores)	15
--	----

CAPÍTULO III: PROPUESTA DE TRABAJO

38

III. 1. Muestras de cacao	42
----------------------------------	----

CAPÍTULO IV: CARBOHIDRATOS

47

IV. 1. Generalidades	48
-----------------------------	----

IV. 2. Métodos de análisis	50
-----------------------------------	----

IV. 2.1. Cromatografía de gases	54
--	----

IV. 2.1.1. Componentes de un cromatógrafo de gases	55
---	----

IV. 2.1.2. Detector de espectrometría de masas	58
---	----

IV. 2.1.3. Derivatización en cromatografía de gases	65
--	----

IV. 2.1.3.1. Reacción de sililación	67
--	----

IV. 2.1.3.2. Reacción de acilación	69
---	----

IV. 2.1.4. Microondas	71
------------------------------	----

IV. 2.1.5. Separación y detección de los derivados	78
---	----

IV. 2.1.6. Tratamiento de la muestra para carbohidratos	79
--	----

IV. 3. Propuesta metodológica	87
--------------------------------------	----

IV. 3.1. Objetivo general	88
----------------------------------	----

IV. 3.2. Objetivos específicos	88
---------------------------------------	----

IV. 4. Metodología experimental	89
--	----

IV. 4.1. Reactivos, solventes y patrones	89
---	----

IV. 4.2. Extracción de los carbohidratos de las muestras de cacao	89
--	----

IV. 4.3. Sistema cromatográfico	90
--	----

xi

IV. 4.4. Resultados y discusiones	91
IV. 4.4.1. Reacción de derivatización de azúcares	92
IV. 4.4.1.1. Efecto del tiempo y potencia de irradiación	94
IV. 4.4.1.2. Relación reactivo derivatizante:analito	97
IV. 4.4.2. Separación cromatográfica	98
IV. 4.4.3. Sistema de detección	102
IV. 4.5. Validación del método analítico	112
IV. 4.5.1. Precisión	113
IV. 4.5.2. Exactitud	115
IV. 4.5.3. Linealidad y efecto matriz	118
IV. 4.5.4. Límite de detección y límite de cuantificación	121
IV. 4.6. Análisis y discusión de las muestras	121
IV. 4.7. Conclusiones	131

CAPÍTULO V: AMINOÁCIDOS

V. 1. Definición y estructura	134
V. 2. Clasificación y propiedades	134
V. 3. Análisis de aminoácidos	138
V. 3.1. Cromatografía de gases	139
V. 3.2. Cromatografía líquida de alta resolución	142
V. 3.2.1. Tratamiento de la muestra en CLAR para aminoácidos	149
V. 3.2.1.1. Extracción en fase sólida	153
V. 3.2.1.2. Automatización de la extracción en fase sólida	156
V. 4. Propuesta de trabajo y objetivos	159
V. 4.1. Objetivos	160
V. 4.1.1. Objetivos generales	160

V. 4.1.2. Objetivos específicos	161
V. 4.1.2.1. Para cromatografía líquida de alta resolución	161
V. 4.1.2.2. Para cromatografía de gases	162
V. 5. Parte experimental	162
V. 5.1. Sección: cromatografía líquida de alta resolución	162
V. 5.1.1. Reactivos y solventes	162
V. 5.1.2. Soluciones de trabajo	163
V. 5.1.2.1. Soluciones de patrones de aminoácidos	163
V. 5.1.2.2. Fases móviles	163
V. 5.1.3. Muestras de cacao	164
V. 5.1.3.1. Extracción de los aminoácidos de las muestras de cacao	164
V. 5.1.3.2. Reacción de derivatización de los aminoácidos	165
V. 5.1.4. Instrumentación	165
V. 5.1.5. Procedimiento empleado	167
V. 5.1.6. Resultados y discusiones	170
V. 5.1.6.1. Optimización de la reacción de derivatización	170
V. 5.1.6.1.1. Método de derivatización de Bidlingmeyer y Cohen	171
V. 5.1.6.1.2. Reacción de derivatización asistida por microondas	174
V. 5.1.6.2. Sistema de columnas acopladas	177
V. 5.1.6.2.1. Optimización de la extracción en fase sólida de los PTC-AA	178
V. 5.1.6.2.2. Separación de los derivados en la columna analítica	184
V. 5.1.6.2.3. Montaje del sistema de columnas acopladas	189

V. 5.1.7. Validación del método analítico	194
V. 5.1.7.1. Exactitud y precisión	194
V. 5.1.7.2. Linealidad del método y efecto matriz	200
V. 5.1.7.3. Límite de detección, límite de cuantificación	204
V. 5.1.8. Análisis de muestras de cacao	205
V. 5.1.9. Conclusiones	224
V.5.2. Sección: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)	225
V. 5.2.1. Reactivos y solventes	225
V. 5.2.2. Patrones de aminoácidos y muestras de cacao	226
V. 5.2.3. Sistema cromatográfico	226
V. 5.2.4. Resultados y discusiones	227
V. 5.2.4.1. Reacción de derivatización de los aminoácidos	228
V. 5.2.4.2. Separación cromatográfica	230
V. 5.2.5. Validación del método analítico	233
V. 5.2.5.1. Precisión y exactitud del método	233
V. 5.2.5.2. Linealidad y efecto matriz del método	237
V. 5.2.6. Análisis de las muestras de cacao por CG-EM	239
V. 5.2.6.1. Análisis de correlación de los resultados	240
V. 5.2.7. Conclusiones	245
 CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES FINALES	247
 CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	253
 ANEXOS	282

ÍNDICE DE TABLAS.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Tabla 1. Composición química de cacaos africanos no fermentados	16
Tabla 2. Cambios de los niveles de azúcares en cacaos de Ghana y Nigeria durante la fermentación	17
Tabla 3. Análisis de azúcares de varios granos de cacao comercial	19
Tabla 4. Cambios en azúcares solubles en cacao de Accra (Ghana) durante el tostado	20
Tabla 5. Azúcares presentes en distintas variedades de cacao	21
Tabla 6. Concentración de azúcares totales y reductores durante el proceso de fermentación del cacao	22
Tabla 7. Cambio en monosacáridos y oligosacáridos durante el tostado de granos de cacao	24
Tabla 8. Prueba de medias para el contenido de azúcares reductores y totales en el cotiledón y pulpa + testa de granos de cacao Porcelana durante la fermentación.	26
Tabla 9. Azúcares reductores y totales en el cotiledón y pulpa + testa de mezclas de granos de cacao tipo criollo y forastero durante el proceso fermentativo.	27
Tabla 10. Composición proximal en función del porcentaje de glucosa (g/ 100g expresado en base seca) de los grano de la región de Cuyagua	28
Tabla 11. Característica química del granos de cacao fermentado durante el secado al sol	29
Tabla. 12. Variación del contenido de azúcares en tres tipos de cacao durante la fermentación	30
Tabla 13. Concentración de aminoácidos durante el proceso de fermentación	33
Tabl14. Contenido de aminoácidos durante los procesos de fermentación, secado y tostado	35

CAPÍTULO III: PROPUESTA DE TRABAJO

Tabla 1. Tipos de cacaos producidos en Venezuela clasificados según regiones productoras y calidades	43
---	----

CAPÍTULO IV: CARBOHIDRATOS

Tabla 1. Clasificación de los carbohidratos más importantes en los alimentos	49
Tabla 2. Reactivos de sililación para derivatización de carbohidratos	69
Tabla 3. Comportamiento de los derivados (trimetilsilil-, acetil-, y trifluoroacetil-) de algunos carbohidratos bajo las mismas condiciones cromatográficas	70
Tabla 4. Constantes dieléctricas para diversos solventes	77
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los analitos objeto de estudio	82
Tabla 6. Determinación de carbohidratos en diferentes alimentos	82
Tabla 7. Extracción sólido – líquido para muestras sólidas	86
Tabla 8. Condiciones optimizadas del sistema cromatográfico	104
Tabla 9. Tiempos de retención de los trimetilsilil-derivados	11
Tabla 10. Variaciones de factores en el estudio de la precisión	0
Tabla 11. Características analíticas CG-EM para determinación de fructosa, glucosa y muestras de cacao	114
	117

CAPÍTULO IV: AMINOÁCIDOS

Tabla 1. Estructura y propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos	136
Tabla 2. Reactivos derivatizantes más utilizados para el análisis de aminoácidos	147
Tabla 3. Materiales de relleno de los cartuchos de extracción en fase sólida	154
Tabla 4. Programa del gradiente de elución	186
Tabla 5. Tiempos de retención de los PTH-AA	189
Tabla 6. Programa de tiempos de las válvulas selectoras de columnas	190
Tabla 7. Programa de gradiente de elución para la separación de los PTC-AA en el sistema de columnas acopladas	191
Tabla 8. Tiempos de retención de los PTH-aminoácidos en el sistema de columnas acopladas	192

Tabla 9. Resumen de las condiciones optimizadas de todo el sistema utilizado en la determinación de aminoácidos en muestras de cacao empleando un sistema de columnas acopladas en su modalidad de transferencia en circuito	193
Tabla 10. Características analíticas del método propuesto para patrones acuosos de aminoácidos ácidos	195
Tabla 11. Características analíticas del método propuesto para patrones acuosos de otros aminoácidos	196
Tabla 12. Características analíticas del método propuesto para patrones acuosos de aminoácidos hidrofóbicos	196
Tabla 13. Características analíticas del método propuesto para los aminoácidos ácidos en muestras de cacao	197
Tabla 14. Características analíticas del método propuesto para otros aminoácidos en muestras de cacao	198
Tabla 15. Características analíticas del método propuesto para los aminoácidos hidrofóbicos en muestras de cacao	199
Tabla 16. Estudios de recuperación para el método propuesto en muestras de cacao	199
Tabla 17. Valores del estadístico <i>tr</i> calculado para el coeficiente de regresión lineal del método propuesto	202
Tabla 18. Parámetros asociados a la determinación del <i>t</i>	203
Tabla 19. Valores de <i>t</i> calculado para la determinación del efecto matriz sobre el procedimiento de propuesto	204
Tabla 20. Límites de detección y cuantificación de caca aminoácido	205
Tabla 31. Tiempos de retención de los trimetilsilil derivados de los aminoácidos	232
Tabla 32. Precisión del método utilizado patrones de aminoácidos	234
Tabla 33. Estudios de precisión del método para muestras de cacao	235
Tabla 34. Estudios de recuperación de los aminoácidos de las muestras de cacao	236
Tabla 35. Características analíticas de las rectas de calibrado	238
Tabla 36. Correlación entre dos de los métodos desarrollados para el análisis de aminoácidos en cacaos venezolano. Análisis estadístico	244

ANEXOS

CAPÍTULO IV: CARBOHIDRATOS

Tabla 12. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao forasteros IMC-67 IIF. IC 2003	283
Tabla 13. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao forasteros IMC-67 IF. IC 2003	283
Tabla 14. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao forasteros IMC-67 IIF. IC 2004	284
Tabla 15. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao forasteros IMC-67 IF. IIC 2003	285
Tabla 16. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao criollo Mérida San Juan 2004	285
Tabla 17. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao criollo Mérida Zea 2004	285
Tabla 18. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao criollo Pocolana 2004	286
Tabla 19. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao criollo Guasare 2004	286
Tabla 20. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao trinitario ISC-1 2003	287
Tabla 21. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao trinitario ISC-1 2002	287

CAPÍTULO V: AMINOÁCIDOS

Tabla 21. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao criollo Merideño Zea 2004	288
Tabla 22. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao criollo Porcelana 2004	289
Tabla 23. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao criollo Merideño San Juan 2004	290
Tabla 24. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao criollo Guasare 2004	291
Tabla 25. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao forastero IMC-67 IF. IC 2003	292
Tabla 26. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para	293

cacao forastero IMC-67 IF.IIC 2003

Tabla 27. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao forastero IMC-67 IIF.IC 2003 294

Tabla 28. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao forastero IMC-67 IIF.IC 2004 295

Tabla 29. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao trinitario ISC-1 IF.IC 2002 296

Tabla 30. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao trinitario ISC-1 IF.IC 2003 297

www.bdigital.ula.ve



ÍNDICE DE FIGURAS.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema simplificado de la generación de aromas y sabores en la reacción de Maillard	4
---	---

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Figura 1. Hidrólisis de la sacarosa	17
Figura 2. Cambios de los niveles de azúcares en cacaos de Nigeria (a) y Ghana (b) durante el proceso de fermentación	18
Figura 3. Cambios en la relación azúcares reductores/azúcares totales durante la fermentación	18
Figura 4. Degradación de los azúcares reductores durante el tostado	20
Figura 5. Cambios en la concentración de azúcares totales (a) y reductores (b) durante el proceso de fermentación	23
Figura 6. Variación de la relación fructosa/glucosa para criollos (Guasare y Porcelana); híbridos (ICS-1 y IMC-47)	31
Figura 7. Cambios en la concentración de aminoácidos durante el proceso de fermentación	32
Figura 8. Tendencia de los aminoácidos en cacao Criollo (Mérida-Venezuela) durante el proceso de fermentación y tostado	34
Figura 9. Cambio en las concentraciones de los aminoácidos (a), azúcares (b) y pirazinas (c) durante la etapa de secado y tostado	36
Figura 10. Disminución de las concentraciones de los azúcares reductores y aminoácidos durante el tostado	36

CAPÍTULO III: PROPUESTA DE TRABAJO

Figura 1. Ubicación geográfica de las tres regiones de producción de cacao en Venezuela	44
Figura 2. Generación del aroma del cacao	45
Figura 3. Esquema del procesamiento de las muestras de cacao realizado por el INIA – Mérida, previo a la caracterización química	46

XX

CAPÍTULO IV: CARBOHIDRATOS

Figura 1. Estructuras cíclicas y abierta de la glucosa	48
Figura 2. Fructosa en sus formas cíclicas piranosa y furanosa	48
Figura 3. Tipos de carbohidratos	50
Figura 4. Esquema del acoplamiento CG – EM	53
Figura 5. Esquema de cromatógrafo de gases	55
Figura 6. Diagrama de bloques de un detector de espectrometría de masa	59
Figura 7. Fuente de iones de impacto electrónico	60
Figura 8. Esquema de un analizador de trampa de iones (A). Analizador de trampa de iones del detector de masas Saturno 2000 (B)	62
Figura 9. Esquema del funcionamiento de un electromultiplicador	63
Figura 10. Reacción de sililación de un carbohidrato	68
Figura 11. Esquema de las regiones del espectro electromagnético	72
Figura 12. Procesos de calentamiento empleando un sistema convencional e irradiación microondas	73
Figura 13. Diferencia de gradiente de temperatura en un proceso de calentamiento microonda y convencional	74
Figura 14. Interacción dipolar con el campo (A) y conducción (B)	75
Figura 15. Mecanismo de formación de los trimetilsilil derivados	93
Figura 16. Efecto del tiempo de irradiación con microondas a tres potencias distintas para la reacción de sililación de una mezcla en acetonitrilo de 5 µg/mL de fructosa (A), glucosa (B) y sacarosa (C).	95
Figura 17. Comparación de las áreas de los derivados obtenidos en la reacción de derivatización de una solución de fructosa, glucosa y sacarosa en acetonitrilo de 5 µg/mL por calentamiento convencional (3 horas a 70 °C) y por MW (60 seg a 630W).	96
Figura 18 Estudio de la relación analito:MSTFA (v/v)	97
Figura 19. Composición de la fase estacionaria de la columna	99
Figura 20. Configuración del inyector: modalidad splitless	101
Figura 21. Cromatograma obtenido para una mezcla de patrones de fructosa, glucosa y sacarosa de concentración 5 µg/mL en acetonitrilo	105
Figura 22. Cromatograma obtenido para una solución de fructosa de	106

5 µg/mL en acetonitrilo derivatizada por el procedimiento propuesto	
Figura 23. Espectro de masas de α-Fructofuranosa-TMS (tr=13,48 min)	107
Figura 24. Espectro de masas de β-Fructofuranosa-TMS (tr=13,61 min)	107
Figura 25. Espectro de masas de α-Fructopiranososa-TMS (tr=13,75 min)	108
Figura 26. Espectro de masas de la α- y β-Glucopiranososa-TMS (tr= 13,75 min)	109
Figura 27. Espectro de masas de la sacarosa-TMS	109
Figura 28. Mecanismos de fragmentación de los iones m/z 204, 191, 217	111
Figura 29. Tipos de estudios de precisión	114
Figura 30. Curvas de calibrado de soluciones patrones y de las muestras de cacao (adición de estándar) para: (a) fructosa, (b) glucosa y (c) sacarosa	120
Figura 31. Tendencia de los azúcares durante el proceso de fermentación en cacaos forasteros	123
Figura 32. Tendencia de los azúcares durante el proceso de fermentación de cacaos criollos	124
Figura 33. Tendencia de los azúcares durante el proceso de fermentación en cacaos trinitarios	125
Figura 34. Cambios del contenido de azúcares entre el primer y último día de fermentación para distintos tipos de cacao	128

CAPÍTULO V: AMINOÁCIDOS

Figura 1. Estructura general de los aminoácidos	134
Figura 2. Comportamiento de los aminoácidos en medio ácido y básico	137
Figura 3. Componentes de un cromatógrafo de CLAR	143
Figura 4. Clasificación de la cromatografía líquida de alta resolución	146
Figura 5. Diagrama esquemático del tratamiento de muestra de acuerdo con su naturaleza	151
Figura 6. Modalidades de los sistemas de columnas acopladas	158
Figura 7. Esquema del procedimiento de extracción de los aminoácidos desde el licor de cacao desgrasado.	165
Figura 8. Sistema de columnas acopladas en su modalidad de transferencia en circuito. Válvulas VS1 y VS2 en su posición de carga.	168
Figura 9. Sistema de columnas acopladas en su modalidad de	169

transferencia en circuito. Válvulas VS1 y VS2 en su posición de inyección.

Figura 10. Sistema de columnas acopladas en su modalidad de transferencia en circuito. Válvulas VS1 y VS2 en su posición de carga. 170

Figura 11. Mecanismo de reacción del PITC con los aminoácidos. 171

Figura 12. Esquema del procedimiento de derivatización de los aminoácidos de acuerdo a Bidlingmeyer y Cohen 172

Figura 13. Efecto del tiempo de derivatización sobre el rendimiento de la reacción 173

Figura 14. Efecto del tiempo de irradiación a una potencia de 200W 175

Figura 15. Efecto del tiempo de Irradiación a una potencia de 340W 176

Figura 16. Comparación de las área obtenidas por el método de derivatización tradicional (15 min a temperatura ambiente) y utilizando microondas (40 seg a 340W). 176

Figura 17. Relación entre los aminoácidos y el reactivo derivatizante 177

Figura 18. Composición del empaque Oasis HBL 179

Figura 19. Comparación del factor de retención (k) y el pH para compuestos ácidos, básicos y neutros 180

Figura 20. Condiciones óptimas para establecer los tiempos de limpieza de la muestra y extracción de los analitos en la columna. 181

Figura 21. Cromatograma obtenido para un blanco. 187

Figura 22. Cromatograma obtenido para una mezcla de patrones de 20 µg/mL de los 15 aminoácidos 188

Figura 23. Cromatograma de la separación de los PTC-AA obtenido en el sistema de columnas acopladas a partir de una mezcla de patrones de aminoácidos de concentración de 30 µg/mL 191

Figura 24. Cromatograma de una muestra de cacao en el sistema de columnas acopladas. 192

Figura 25. Curva de calibrado para la fenilalanina en el intervalo de concentración estudiado en la solución patrón y en el licor de cacao enriquecido con los analitos 200

Figura 26. Curva de calibrado para la Isoleucina en el intervalo de concentración estudiado en la solución patrón y en el licor de cacao enriquecido con los analitos 201

Figura 27. Tendencia de los aminoácidos durante el proceso de fermentación en muestras de cacaos 206

Figura 28. Tendencia de los aminoácidos durante el proceso de fermentación de cacaos criollos 208

Figura 29. Tendencia de los aminoácidos durante el proceso de fermentación en cacaos forasteros	209
Figura 30. Tendencia de los aminoácidos durante el proceso de fermentación en cacaos trinitarios	210
Figura 31. Cambios de los aminoácidos libres entre el primer y último día de fermentación para distinto tipos de cacao	213
Figura 32. Estudio comparativo de aminoácidos libres en distintas variedades de cacaos criollos	215
Figura 33. Estudio comparativo del contenido de aminoácidos libres en una variedad de cacao forastero (IMC – 67) para distintos ciclos de cosecha y periodos de fermentación en un mismo año.	216
Figura 34. Estudios comparativos del contenido de aminoácidos libres en muestras de cacao forasteros (IMC - 67) y trinitarios (ICS - 1) en distintos años de fermentación.	218
Figura 35. Efecto del tostado en el contenido de aminoácidos, azúcares reductores y pirazinas en muestras de cacaos forasteros.	222
Figura 36. Efecto del tostado en el contenido de aminoácidos, azúcares reductores y pirazinas en muestras de cacaos criollos.	222
Figura 37. Efecto del tostado en el contenido de aminoácidos, azúcares reductores y pirazinas en muestras de cacao trinitario.	223
Figura 38. Reacción de sililación de los aminoácidos con BSTFA.	228
Figura 39. Efecto del tiempo de irradiación (30, 60 y 180 seg) a una potencia de irradiación de 310W	229
Figura 40. Efecto del tiempo de irradiación (30, 60 y 180 seg) a una potencia de irradiación de 630W	230
Figura 41. Cromatograma de una solución patrón de aminoácidos derivatizados con BSTFA.	231
Figura 42. Cromatograma de una muestra de cacao tratada de acuerdo al procedimiento propuesto.	232
Figura 43. Curvas de calibrado de soluciones patrones y de las muestras de cacao (adición estándar) para: (a) ácido glutámico y (b) glicina	239
Figura 44. Representación gráfica de la concentración de ácido glutámico en las muestras de cacaos analizadas por las dos metodologías propuestas.	241



CAPÍTULO I:

www.bdigitalula.ve

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Venezuela siempre ha sido considerada como un país con una gran tradición cacaotera, especialmente, como un productor de cacao fino y extrafino de aroma y sabor característicos de muy alta calidad. Sin embargo, para 1993 su condición fue rebajada a productor parcial^[1] como consecuencia de la proliferación de otros tipos más rústicos desarrollados a fin de aumentar la productividad del árbol y su tolerancia a las enfermedades y plagas, afectando de esta manera su calidad.

La calidad del cacao es uno de los aspectos de mayor importancia en el proceso productivo cacaotero y se manifiesta a través de las características físicas (tamaño, peso, grosor de cáscara, color, contenido de grasa) y organolépticas de la almendra. El nivel que se logre conseguir de ésta, determinará la mayor o menor demanda que tenga en el mercado el producto final del proceso agrícola, es decir, el cacao en grano^[2,3]. De acuerdo con numerosos estudios y opiniones, la calidad refleja los efectos combinados del genotipo, de los factores edafoclimáticos, del manejo agronómico recibido en la plantación y de la tecnología de postcosecha utilizada^[3-7].

El sabor, determinado por el gusto y el aroma, son las características principales que determinan la calidad de los granos de cacao, los cuales se desarrollan durante las tecnologías de postcosecha, principalmente en las etapas de fermentación, secado y tostado de los granos.

Durante el proceso de fermentación, tienen lugar una serie de reacciones bioquímicas en el interior de la almendra que originan la muerte del embrión y la formación de los precursores del aroma (aminoácidos, péptidos y azúcares reductores), los cuales interaccionan en la etapa de tostado desarrollando el aroma específico del cacao^[8].

El tostado o torrefacción es una de las operaciones tecnológicas más importante en el procesamiento de los granos de cacao. Consiste en el tratamiento térmico de los granos, los cuales se exponen a temperaturas entre los 100 – 150 °C durante 15 a 45 minutos, dependiendo de la variedad de cacao, y causa la formación del color marrón característico de las almendras, el agradable aroma a chocolate y la textura de los granos tostados^[9]. El sabor y el aroma de origen térmico^[3,10] producidos en esta etapa son el resultado de la combinación de entre 400 – 500 compuestos generados durante la reacción de Maillard, entre los que se incluyen las alquilpirazinas, aldehídos, éteres, tiazoles, furanos, ácidos, pirroles, cetonas, alcoholes y ésteres^[11]. De todos éstos, los que contribuyen mayoritariamente con el aroma característico del chocolate son las alquilpirazinas^[12].

Esta reacción, también conocida como reacción de oscurecimiento o pardeamiento no enzimático^[13], consiste en la condensación entre un compuesto con un grupo carbonilo reductor (azúcares, aldehídos o cetonas), y un compuesto con un grupo amino libre, entre los que se encuentran los aminoácidos, proteínas o cualquier otro compuestos nitrogenado^[14] (Figura 1) fue descrita por primera vez en 1912 por el químico francés Louis Camille Maillard^[15] quién observó que la glucosa u otros azúcares reductores reaccionaban con los aminoácidos formando aductos que sufrían una serie de deshidrataciones y rearrreglos para formar finalmente los productos responsables de las características organolépticas de los alimentos^[15,16].

El tipo de aminoácido que participa en la reacción de Maillard es crucial en la formación del sabor y aroma a chocolate ya que influye en la formación de los compuestos heterocíclicos importantes para el carácter final del aroma. Por ejemplo, la leucina y la glucosa producen aromas descritos como “chocolate dulce”, mientras que la treonina, glutamina y glucosa dan notas de “chocolate” cuando se calientan a 100 °C. Pero, a 180 °C, la valina y

glucosa originan aromas a “chocolate fuerte” con un olor bastante penetrante. La formación de estos aromas es indicativo que la reacción ha tenido lugar^[3].

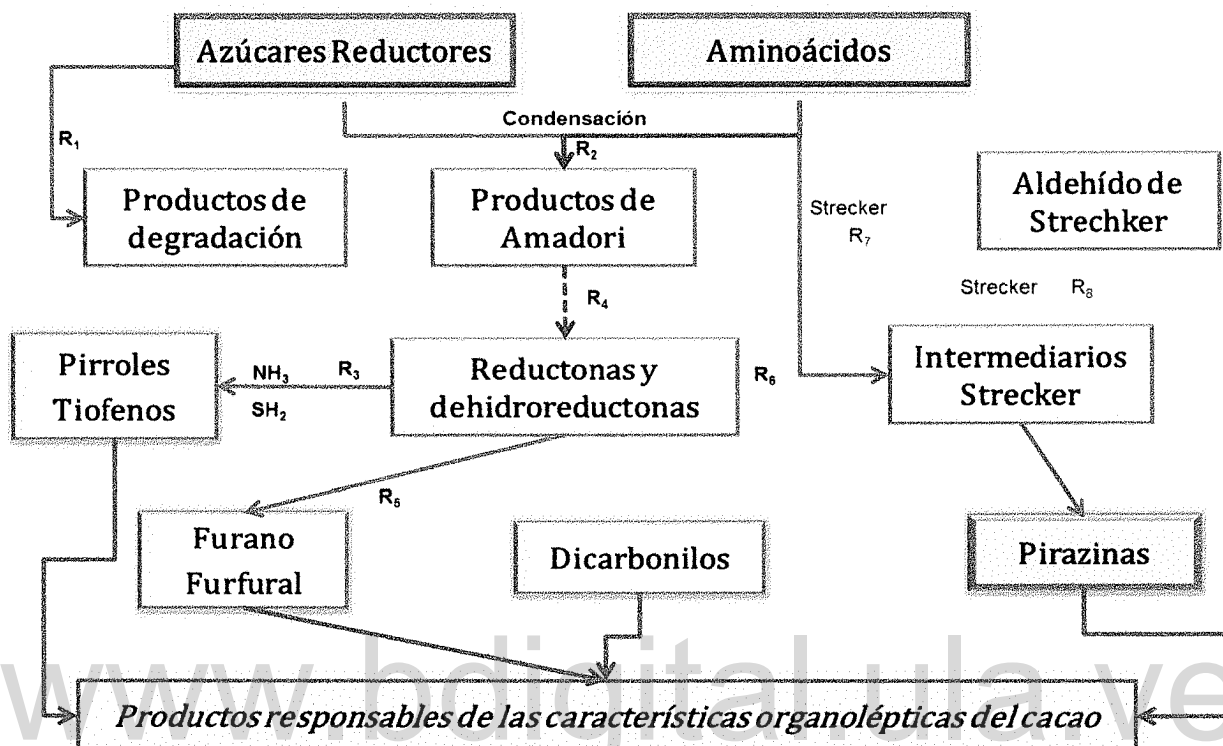


Figura 1. Esquema simplificado de la generación de aromas y sabores en la reacción de Maillard

A medida que ocurre esta reacción durante la torrefacción o tostado, los precursores del aroma formados en la fermentación son parcialmente modificados o eliminados. En vista de esto, se ha establecido que la reacción de Maillard, es la responsable de la disminución de la concentración de los aminoácidos y de los azúcares reductores durante el proceso de tostado en los granos de cacao, así como también de la formación de las alquilpirazinas^[9].

En base a lo anterior, podemos decir que el complejo perfil aromático que presentan los granos de cacao proviene, en gran medida, de compuestos que están presentes antes del tostado y que contribuyen a la impresión general

del aroma y sabor durante el proceso de tostado. En consecuencia, para poder evaluar correctamente la calidad del cacao, no basta con estudiar los compuestos asociados directamente con el aroma y el sabor; también es necesario estudiar los compuestos que los originan en las almendras: antes, durante y después de los procesos de fermentación y tostado.

Entre los precursores del aroma, los aminoácidos y los azúcares reductores cumplen un rol relevante y protagónico. Sin embargo, en Venezuela, a pesar de ser considerada como uno de los mejores productores de cacao fino y de aroma de excelente calidad, la información disponible sobre este tema es realmente escasa^[17-21]. De hecho, en la literatura especializada no se encontraron trabajos que aborden este tema para cacaos criollos. En contraste, a nivel internacional, sí se ha abordado este tema, realizando diversos trabajos dirigidos al estudio del comportamiento de los aminoácidos y el efecto que ejercen sobre el aroma final del cacao, utilizando para ello una gran variedad de cacaos^[3,22-29].

En los últimos años, el Gobierno Nacional ha venido implementando importantes medidas con el cacao nacional; en el 2010 puso en marcha el Plan Socialista del Cacao Venezolano con el propósito de mejorar su calidad para diversificar y reorientar su producción.

En este sentido, dentro del marco de esta tesis se quiere contribuir con este propósito y para ello se propone desarrollar metodologías analíticas para evaluar el efecto que tienen los aminoácidos libres y azúcares reductores, en el desarrollo del perfil aromático de algunos cacaos que se cultivan en diferentes regiones de Venezuela a medida que transcurren los procesos de fermentación y tostado. Esta información permitirá mejorar y fortalecer la base productiva del país en este importante rubro, priorizando la tendencia actual de producir un cacao fino de aroma y sabor característico.



CAPÍTULO II:

www.bdigitalrula.ve
MARCO TEÓRICO

II. MARCO TEÓRICO

II. 1. Principales factores que afectan la calidad de las almendras de cacao

La calidad aromática de un chocolate está relacionada con el origen de las almendras, con la fermentación y secado y con el tostado^[30]. El aroma del cacao incluye varias fracciones: una fracción constitutiva (presente en la almendra fresca), una fracción desarrollada durante la fermentación y secado y por último una fracción formada durante el tostado^[31].

Es importante señalar que ni las células con pigmentos, ni las células de reserva de los cotiledones de las almendras frescas contienen alguna sustancia que darán el aroma a chocolate, por lo tanto, las almendras no fermentadas son incapaces de producir un aroma tal, incluso después del tostado, lo cual confirma que las sustancias aromáticas del cacao únicamente se crean durante el proceso de fermentación^[32].

La calidad final del producto en cuanto a sabor y aroma es influenciada por diversos factores importantes, entre ellos la variedad del material genético, condiciones de clima y suelo, manejo agronómico y la tecnología de poscosecha. Sin embargo, este último factor constituye el factor más importante para preservar y mejorar las características organolépticas del cacao, especialmente la correcta fermentación y secado de las almendras es esencial para el desarrollo de los compuestos precursores del aroma y sabor del cacao^[3,4].

II. 1.1. Efecto del genotipo sobre la calidad del sabor en el grano de cacao

El genotipo tiene influencia en la calidad e intensidad del sabor del chocolate de acuerdo a cada variedad de cacao, probablemente porque determina la cantidad de precursores y la actividad enzimática que contribuyen a la formación del sabor^[3].

El aroma está muy relacionado con las variedades de cacao. Recordemos que las principales variedades de cacao cultivadas son tres: el Criollo, el Forastero y el Trinitario un híbrido del Forastero y el Criollo^[32].

Las variedades de cacao son clasificadas por su calidad aromática de acuerdo a los compuestos aromáticos que presentan. En términos generales, la variedad Forastero ha sido clasificada como de calidad aromática baja, la Trinitario como de calidad intermedia y la Criollo como de calidad alta^[33]. Por su parte Beckett^[34], clasificó al cacao Forastero como de grado comercial, mientras que al Criollo y Trinitario lo clasificó como de grado fino.

II.1.2. Ambiente

Ciertas características de las almendras de cacao se ven afectadas por el ambiente durante el desarrollo de la planta. Algunos factores que modifican las características relacionadas con el aroma del cacao son: la riqueza de los suelos, las condiciones climáticas y un adecuado uso de las prácticas culturales asociadas con el manejo de la plantación^[35]. Por ejemplo, la deficiencia de agua y nutrientes en el suelo reduce el tamaño de las mazorcas y las almendras^[36]. En ese sentido, los cacaos pueden ser genéticamente iguales, pero las diferentes condiciones edafoclimáticas donde se desarrollan condicionan diferencias en sus características químicas.

II.1.3. Tratamiento poscosecha del cacao

Se denomina así al conjunto de prácticas interrelacionadas que tienen que ver con la transformación biológica que deben sufrir las almendras una vez cosechadas y que permiten la expresión de su real potencial de calidad, su valoración y demanda por los procesadores de la industria chocolatera. Constituye en buena parte el aspecto de máxima importancia para preservar y presentar al mercado un producto de calidad. El buen proceso de poscosecha asegura que el grano sea apreciado por la industria, lo que justifica un mejor precio y garantiza su comercialización al mercado nacional y de exportación^[37].

El proceso para desarrollar la máxima calidad posible del cacao, exige ejecutar sistemáticamente los pasos desde la selección de las mazorcas que se cosechan, la quiebra y el desgrane, un correcto proceso de fermentación y secado, y finalmente una exigente limpieza y clasificación del grano.

Si se ejecutan sistemáticamente los pasos que se describen a continuación, se logrará entregar un producto de la mejor condición.

II.1.3.1. Cosecha

El procesamiento del cacao comienza desde la selección y cosecha (“el corte”) de las mazorcas maduras. Del árbol de cacao sólo se explotan las semillas (granos o almendras) que se encuentran dentro de los frutos, que son los llamados mazorcas. Es necesario asegurarse de la madurez adecuada de los frutos antes de la cosecha, para evitar la mezcla de granos con distintos niveles de desarrollo y la pérdida de calidad en la fermentación, provocada por esta situación. Es posible identificar el momento de cosecha por el cambio de color de la mazorca: las verdes cambian a amarillo y las rojas se tornan anaranjadas. Las mazorcas inmaduras pueden no tener suficiente azúcar en la pulpa para una fermentación satisfactoria^[3,4].

II.1.3.2. Partida de mazorcas

Es la operación que consiste en partir la mazorca y extraer las almendras, las que una vez separada de la placenta, serán sometidas a la fermentación. Antes de comenzar a partir las mazorcas, debe separarse las sanas de las afectadas por enfermedades o plagas para beneficiar solamente granos provenientes de frutos sanos y no dañar la calidad final del producto.

El fruto al partirse debe tomarse de la punta y el sitio de quiebra debe estar cerca del pedúnculo para facilitar la extracción de la semilla. Otra forma es partir la mazorca atravesada con lo cual se acelera el proceso de desgranado. La extracción de las semillas de la cáscara, se denomina desgranada, "desengullada" o "deguyada"^[3,4].

Las semillas se transportan en cajas de madera, envases o sacos plásticos hacia el lugar de fermentación.

II.1.3.3. Fermentación

La fermentación es un proceso bioquímico, al cual se someten las almendras de cacao frescas con la finalidad de: la eliminación de la baba o mucílago azucarado y, dentro de la almendra, provocar la muerte del embrión, la transformación de los cotiledones y la formación de las sustancias precursoras del sabor y aroma a chocolate que dan la calidad propia al cacao.

El método y tiempo de fermentación, la frecuencia de remoción de las almendras, así como las condiciones atmosféricas de la zona afectan la calidad del cacao^[3].

Las almendras adecuadamente fermentadas se identifican por un color café o chocolate y con incrustaciones o estrías pronunciadas. Una



fermentación deficiente provoca un color violeta o blanquecino que se observa al partir la almendra^[38].

En las almendras sin fermentar la característica predominante es el sabor amargo y astringente, completamente ausente de aroma, siendo útil sólo para el aprovechamiento de manteca.

La fermentación del cacao es un proceso espontáneo que debe realizarse en un lugar protegido pero suficientemente ventilado.

Existen diferentes métodos de fermentación, siendo los más comunes: cajones de madera, rumas o montones y en sacos ya sea de yute o polipropileno; sin embargo, los mejores resultados en la calidad del producto final se obtienen en cajones de madera^[20,21,39,40].

El número de días de la fermentación no puede generalizarse, depende del material genético, el método de fermentación y la cantidad por fermentar. Por lo general el tipo criollo necesita de 3 a 4 días; el tipo trinitario requiere entre 5 a 6 días y los tipos forasteros necesitan de 5 a 8 días^[32,41].

Durante la fermentación la temperatura en la masa de almendras puede subir hasta 50° C aproximadamente. Cuando la temperatura llega a 45° C, los embriones de la semilla mueren, y ese momento marca el inicio de los cambios bioquímicos que luego darán el sabor y el aroma a chocolate^[42].

Una parte del aroma es de origen bioquímico, inducido por microorganismos, y otra proviene de reacciones químicas promovidas por las altas temperaturas que se alcanzan durante la fermentación^[43]. En ese sentido la fermentación puede caracterizarse como un proceso con dos etapas: **a.** Una etapa de hidrólisis o alcohólica, en condiciones anaeróbicas, donde intervienen microorganismos como levaduras, que transforman el azúcar de la pulpa en alcohol y anhídrido carbónico, a la vez que comienza a elevarse la temperatura. Adicionalmente hay penetración de aire y se favorece la oxidación del alcohol a

ácido acético, con la intervención de bacterias acéticas inoculadas por insectos^[8]. El ácido acético provoca la muerte del embrión y de las almendras al penetrar en el tejido cotiledonar. Las enzimas se ponen en contacto con los polifenoles y proteínas y se inician las reacciones hidrolíticas que dan lugar a cambios en los pigmentos cianidinglucósidos, provocando el inicio de la formación de los precursores del sabor a chocolate^[18,44-46]. Toda esta fase hidrolítica ocurre a temperaturas cercanas a 45 °C y con pH de 4,0 a 5,0. **b.** La etapa de oxidación se inicia inmediatamente cuando hay mayor penetración de oxígeno y consiste esencialmente en la oxidación y condensación de los compuestos polifenólicos en productos complejos, aminoácidos volátiles solubles e insolubles que tienen poco o ningún sabor. Paralelamente con la condensación oxidativa, disminuye el contenido de humedad, hasta el punto en que la falta de agua detiene la actividad enzimática. Cuando el oxígeno tiene acceso a las células de los cotiledones durante la fase de condensación oxidativa, el color de la superficie de las almendras se vuelve pardo y esto se realiza en toda la almendra, conforme se inicia el secado y se facilita la penetración del oxígeno al interior del cotiledón^[3,4,42,43].

La fermentación termina cuando los granos se ven hinchados, el embrión ha muerto, el exceso de humedad se ha reducido considerablemente y la temperatura desciende a la del medio ambiente. Un indicador de fermentación satisfactoria es la presencia de un anillo periférico de color pardo, indicativo de que debe iniciarse el tendido del cacao para su secado.

II.1.3.4. Secado

El secado tiene como finalidad eliminar el exceso de humedad de los granos de cacao. Cuando finaliza el proceso de fermentación las almendras tienen alrededor de 50 a 56% de humedad, el que deberá reducirse a un rango de 7% - 8 %, límite considerado como crítico para el almacenamiento y así

evitar el desarrollo de hongos (mohos). Cuando la humedad baja más de un 6 % las almendras se vuelven quebradizas, pero si no se seca al punto indicado son más susceptibles al ataque de hongos, que puede producir micotoxinas patógenas (ocratoxina) que representa un riesgo para la salud humana^[4].

Durante el secado continúa el proceso de fermentación, las almendras de cacao terminan los cambios para obtener el sabor y aroma a chocolate, por lo que es recomendable un secado lento durante los dos primeros días. También en ese momento cambian los colores, apareciendo el color marrón (café), típico del cacao fermentado y secado correctamente.

Las condiciones más favorables del secado se obtienen cuando se realizan con el calor del sol, que es la fuente más barata y adecuada. Si se utiliza secado artificial debe tenerse cuidado para que la temperatura no sobrepase los 60 grados centígrados. El proceso debe ser lento y a bajas temperaturas al principio del secado, por lo cual el primer día de asoleada, es aconsejable utilizar la plena exposición solo durante las primeras y las últimas horas del día. Posteriormente, no habrá inconveniente para hacer el secado durante todo el día.

Para el secado al sol, se utilizan estructuras como las paseras, casaelbas, camillas de madera o carros corredizos tipo elba. Si el secado se realiza en patios de cemento o áreas pavimentadas, se corre el riesgo por contaminación por elementos nocivos^[47].

Adicionalmente durante el proceso de secado, es necesario remover la masa de cacao frecuentemente para la distribución pareja del calor y el secado uniformes^[41].

II.1.3.5. Clasificación

Consiste en eliminar todas las impurezas, placentas, granos mohosos, partidos, germinados y vanos (sin almendra), esto mediante proceso manual o

Wendy Josefina Orozco Contreras

haciendo pasar las almendras a través de zarandas, dejando solamente los granos bien fermentados y secos, a fin de obtener uno de mayor valor comercial.

Las características más importantes que debe reunir el cacao de calidad comercial son:

⇒ Los granos deben estar fermentados y completamente secos a la humedad requerida, libre de olores y sabores anormales o extraños y de evidentes signos de adulteración.

⇒ Granos libres de insectos

⇒ Granos uniformes, libres de pedazos de mucílago y otros cuerpos extraños.

II.1.3.6. Almacenamiento

Es la etapa final del beneficio. Los granos de cacao son altamente higroscópicos y si están mal almacenados absorben humedad y olores extraños. Para lograr un buen almacenamiento, los granos de cacao secos se deben guardar en sacos de yute y almacenarlos en ambientes techados, secos, blancos o de color claro, bien ventilados.

II.1.4. Torrefacción o tostado

En este punto, es importante recordar que los procesos post-cosecha de fermentación y secado los realiza el productor. Por el contrario, la torrefacción o tostado, que es la etapa donde finalmente se desarrolla el aroma característico que asociamos con el chocolate, es efectuado por la industria.

El tostado del cacao se lleva a cabo con el propósito de facilitar la eliminación de la cascarilla y para que los precursores del sabor (azúcares, aminoácidos, y otros que se forman durante la fermentación) se combinen y produzcan los olores y sensaciones típicas del sabor a chocolate y otras notas sensoriales como: sabor floral, frutal y nuez, dependiendo del tipo de cacao.

Durante este proceso en particular, la temperatura y la duración del tostado influyen de forma crítica en la cantidad y el tipo de compuestos aromáticos que se generan térmicamente^[48].

Muchos de estos compuestos se forman, como ya se dijo, a través de la reacción de Maillard, donde participan los precursores (aminoácidos y azúcares) formados durante la fermentación^[50]. Como consecuencia, la concentración de estos precursores hacia el final de esta etapa sufre una reducción significativa en su concentración^[49-52].

www.bdigital.ula.ve

II. 2. Precursores del aroma y sabor en el cacao

(Aminoácidos y Azúcares Reductores)

Los aminoácidos y los azúcares juegan un rol protagónico como precursores del aroma de cacao y por ello es necesario conocer su perfil antes, durante y después de los procesos de fermentación y tostado. Por ello a continuación presentamos una revisión bibliográfica del tema.

En la Tabla 1 se muestra la composición química de granos de cacao sin fermentar^[53]. En ella se puede observar que los azúcares libres en los granos de cacao sin fermentar representan entre el 2 – 4% del peso, donde la sacarosa es el azúcar en mayor proporción (90%), seguido de la fructosa y glucosa (6%) y trazas de galactosa, rafinosa, melobiosa, sorbosa, manotriosa, xilosa, arabinosa, manitol e inositol

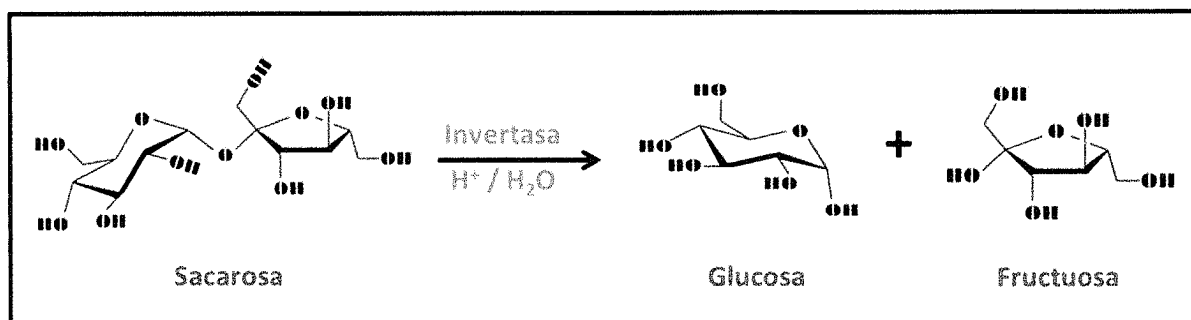


Tabla 1. Composición química de cacaos africanos no fermentados^[53]

Constituyente	Grano seco (%)
Grasa	53,05
Agua	3,65
Ceniza	2,63
Nitrógeno:	
Nitrógeno Total	2,28
Nitrógeno de Proteína	1,50
Nitrógeno de Amonio	0,028
Nitrógeno de Amida	0,188
Metilxantinas:	
Teobromina	1,71
Cafeína	0,085
Carbohidratos:	
Fructosa	0,09
Glucosa	0,07
Sacarosa	2,48
Almidón	6,10
Pectinas	2,25
Fibra	2,09
Celulosa	1,92
Pentosanas	1,27
Mucílago y gomas	0,38
Polifenoles	13,5
Ácidos:	
Acético (libre)	0,014
Oxálico	0,29

La sacarosa es un azúcar no reductor por lo que no participa en la reacción de Maillard que tiene lugar durante la etapa de tostado. Sin embargo a medida que transcurre el proceso de fermentación de los granos, esta azúcar se hidroliza en glucosa y fructosa por acción de la enzima invertasa (Figura 1)^[54].



**Figura 1.** Hidrólisis de la sacarosa

Rohan y Stewart^[52] estudiaron la formación de azúcares reductores durante el proceso de fermentación en granos de cacao africano provenientes de Ghana y Nigeria. Los resultados que obtuvieron se muestran en la Tabla 2 y las Figuras 2a y 2b, donde se observa la máxima inversión de la sacarosa entre el 4 y 5 día de fermentación. Además, el aumento del contenido de los azúcares reductores (precursores del aroma) y su formación durante el proceso de fermentación, sugiere que éstos compuestos pueden utilizarse con el fin de determinar el grado de fermentación de los granos de cacao.

Tabla 2. Cambios de los niveles de azúcares en cacaos de Ghana y Nigeria durante la fermentación^[52]

Tiempo de Fermentación	% Azúcares Reductores (AR)		% Azúcares Totales (AT)		Relación AR/AT x 100	
	Ghana	Nigeria	Ghana	Nigeria	Ghana	Nigeria
0	0,12	0,33	1,44	2,20	11,0	14,9
24	0,24	0,67	1,37	1,98	17,5	33,8
48	0,62	1,22	1,38	1,79	49,0	68,0
72	0,90	1,28	1,31	1,72	65,0	74,5
96	1,04	1,34	1,25	1,57	83,0	85,4
120	1,22	1,22	1,22	1,40	100	87,1
144	0,94	1,11	1,01	1,28	93,9	87,1
168	---	1,16	---	1,46	---	80,0

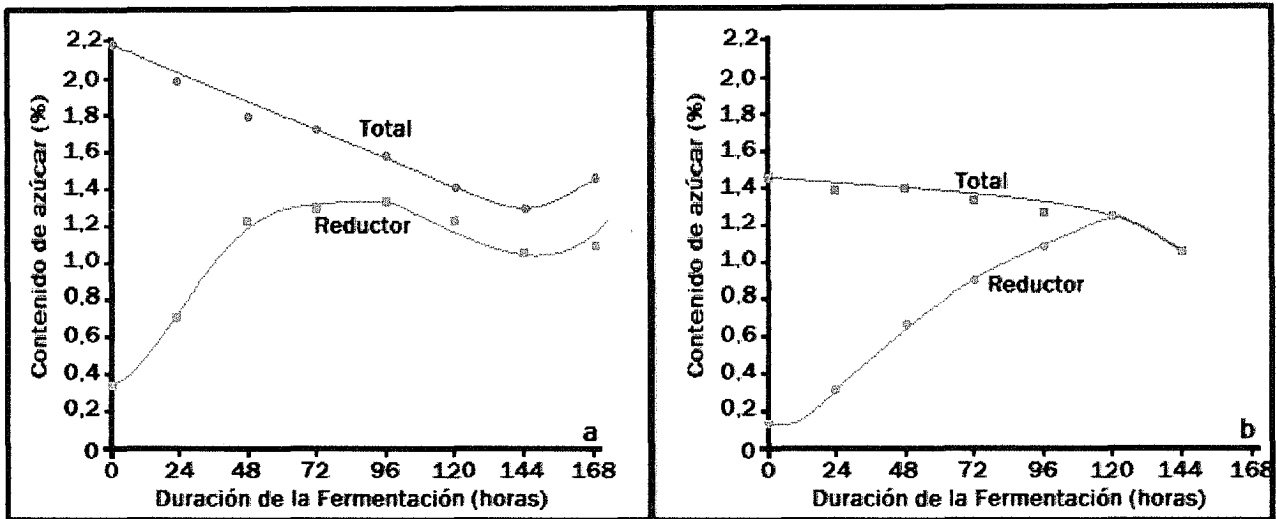


Figura 2. Cambios de los niveles de azúcares en cacaos de Nigeria (a) y Ghana (b) durante el proceso de fermentación^[52]

En ese sentido, la relación azúcar reductor/azúcar total es un parámetro significativo para evaluar el grado de fermentación y tiene la ventaja de que es independiente de la concentración inicial de azúcares en los granos sin fermentar (Figura 3).

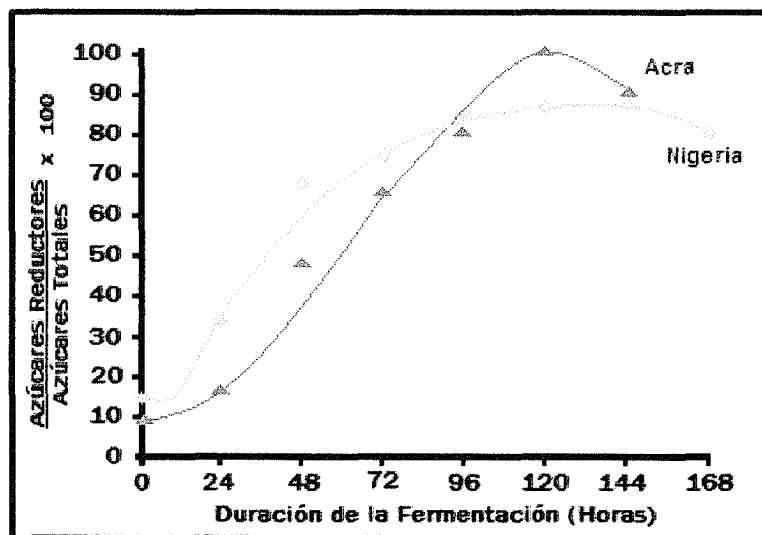


Figura 3. Cambios en la relación azúcares reductores/azúcares totales durante la fermentación^[52]

Estos mismos autores también analizaron los azúcares reductores y totales en muestras granos de cacaos comerciales^[52]. En la Tabla 3 se muestran los resultados. Se puede observar que la relación azúcar reductor/azúcar total es alta para el cacao de Arriba lo que sugiere un grano bien fermentado. Mientras que para los cacaos Carúpano y Sánchez la relación es baja indicativo de cacaos no fermentados adecuadamente.

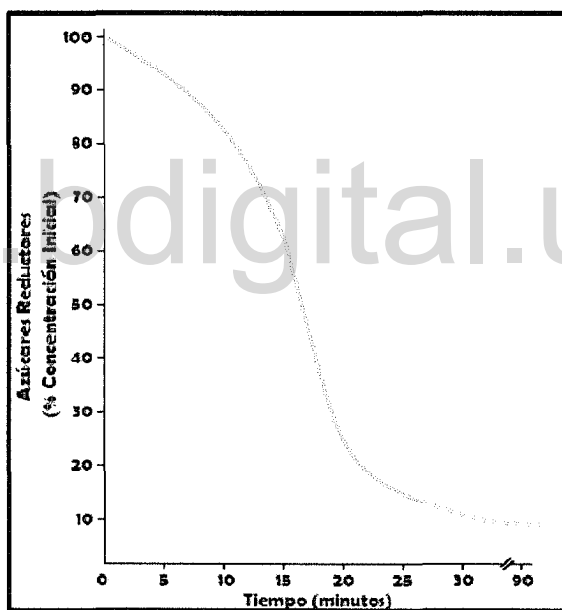
Tabla 3. Análisis de azúcares de varios granos de cacao comercial^[52].

Muestra	Azúcares Reductores (AR)	Azúcares Totales (AT)	AR/AT x 100
Arriba (Ecuador)	0,34	0,39	87
Bahía (Brasil)	1,27	2,27	56
Carúpano (Venezuela)	0,84	3,48	24
Grenada	0,68	1,63	39
India	0,47	2,15	22
Nueva Guinea (Indonesia)	0,45	0,75	59
Puerto Cabello (Venezuela)	1,38	1,84	75
Samoa	0,92	2,25	41
Sánchez (República Dominicana)	0,68	2,84	24
Trinidad	1,27	2,53	50

En otro trabajo, estos autores estudiaron el efecto del tostado sobre el contenido de los azúcares reductores^[49] en muestras de cacao provenientes de Ghana. Ellos observaron la desaparición de estos compuestos a medida que transcurría el tostado (Tabla 4, Figura 4). Paralelamente observaron una considerable disminución de los azúcares no reductores (sacarosa), como consecuencia de su hidrólisis a azúcares reductores durante proceso de calentamiento de esta etapa.

Tabla 4. Cambios en azúcares solubles en cacao de Accra (Ghana) durante el tostado^[49]

Tiempo de tostado (min)	Azúcares Reductores	Azúcares no Reductores
0	1,48	0,61
5	1,33	-
10	1,11	-
15	0,66	-
20	0,38	-
25	0,24	-
28	0,18	-
28 + 1h a 140 °C	0,12	0,14

**Figura 4.** Degradación de los azúcares reductores durante el tostado^[49]

Uno de los inconvenientes de los trabajos anteriores es la forma en cómo se llevaba a cabo el análisis de los carbohidratos, ya que hasta ese momento se determinaban como azúcares totales o reductores totales. En vista de esto, Reineccius^[55] desarrolló un método por cromatografía de gases que le permitió separar y cuantificar los carbohidratos presentes en muestras de

diferentes variedades de cacao y estudió su comportamiento durante la etapa de fermentación. Los resultados que obtuvo se presentan en la Tabla 5 donde se puede ver que el método le permitió identificar: pentinol, fructosa, sorbosa, α -glucosa, β -glucosa, inositol y sacarosa en las cuatro variedades de cacao. Por otra parte, él atribuye las diferencias en el contenido de estos azúcares entre las distintas variedades a la influencia de variables asociadas con los procesos de cosecha, fermentación y secado. Así, los cacaos provenientes de Ghana y Bahía, eran granos sometidos a procesos de fermentación que duraron varios días y presentaron pequeñas cantidades de sacarosa. Sin embargo, los cacaos Arriba y Sánchez presentaron concentraciones de sacarosa 10 y 20 veces mayores debido a que el primero había sido parcialmente fermentado y el segundo no se había fermentado.

Tabla 5. Azúcares presentes en distintas variedades de cacao^[55]

Variedades de Cacao (% de Azúcares totales libres)				
Azúcar	Sánchez (República Dominicana)	Arriba (Ecuador)	Bahía (Brasil)	Ghana (África)
Pentinol	2,4	4,5	2,7	3,0
Fructosa	19,4	21,8	52,3	57,0
Sorbosa	2,4	3,3	9,8	6,1
α y β - Glucosa	18,5	14,0	3,3	8,2
Manitol	2,2	2,3	21,4	8,9
Inositol	1,6	1,5	4,2	2,3
Sacarosa	53,6	51,4	4,2	14,0
mg/ 100g de granos				
Sacarosa	1000	683	55	120
Azúcares reductores	747	510	855	612
Azúcares Totales	1856	1332	1308	858

Otro aspecto sobresaliente de este trabajo fue la gran diferencia entre la concentración de fructosa y glucosa en los granos bien fermentados de Bahía y Ghana, cuya relación fructosa-glucosa fue de 16:1 y 7:1, respectivamente. Mientras, que en cacaos parcialmente fermentados, como los de Arriba, la

relación fue de 2:1 y para granos sin fermentar (Sánchez) la concentración de glucosa y fructosa fue prácticamente la misma (1:1). Este comportamiento está relacionado con la fermentación ya que es durante esta etapa que se produce la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa.

Estudios más recientes corroboran los resultados obtenidos por Rohan y Reineccius. Puziah y col.^[29] estudiaron los cambios en los precursores del sabor y las pirazinas durante la fermentación de granos de cacao de Malasia, cuyo proceso de fermentación tiene una duración de 6 días. Los cambios observados por estos autores para los azúcares reductores y totales se presentan en la Tabla 6 y Figuras 5.

Tabla 6. Concentración de azúcares totales y reductores durante el proceso de fermentación del cacao^[29]

Azúcar	Día de Fermentación (g/kg)						
	0	1	2	3	4	5	6
Sacarosa	18,78	15,02	12,04	8,00	4,90	2,70	2,03
Fructosa	0,33	0,58	1,13	1,40	2,23	1,83	1,66
Glucosa	0,21	0,73	0,45	0,51	0,48	0,43	0,43
Manitol	0,26	0,33	0,72	0,89	1,00	0,87	0,51
Inositol	0,18	0,24	0,34	0,34	0,48	0,32	0,30

En los granos de cacao sin fermentar, el azúcar mayoritario era la sacarosa con un 95% (18,78 g/kg) del contenido total de azúcares presentes, seguidos con un 2,7% de la fructosa y glucosa, y bajas concentraciones de manitol e inositol. A medida que transcurría el proceso de fermentación los azúcares totales, formados principalmente por sacarosa, disminuían significativamente. Este comportamiento ocurría de forma paralela con la formación de los azúcares reductores (fructosa, glucosa, manitol e inositol) (Figura 5a). Los autores atribuyeron esto a que durante la muerte del embrión

por el aumento de la temperatura y la concentración de ácido acético, el medio era propicio para que la enzima invertasa catalizara la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa. De esta forma se originaba un aumento en la concentración de los azúcares reductores que alcanzaban su máxima concentración durante el cuarto día de fermentación. A partir de entonces, disminuían levemente hasta el final de la fermentación. La relación fructosa-glucosa en las muestras utilizadas fue de 4:1 lo que indicaba que los granos de cacao habían sido sometidos a un adecuado proceso de fermentación.

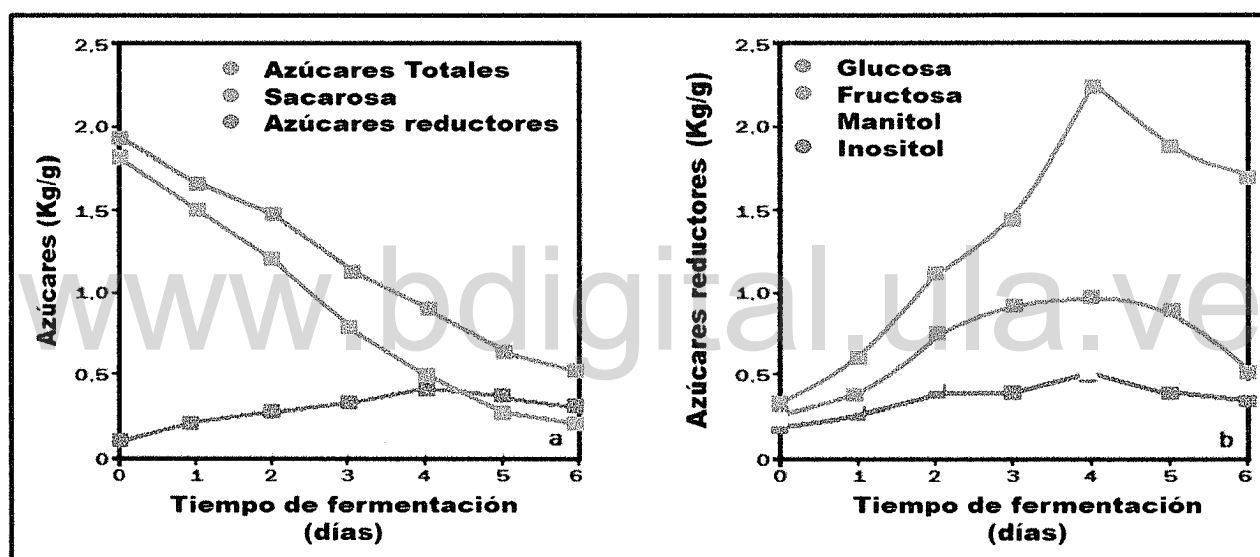


Figura 5. Cambios en la concentración de azúcares totales (a) y reductores (b) durante el proceso de fermentación^[29].

Por su parte Redgwell y col.^[27] estudiaron el efecto del tostado sobre los carbohidratos de bajo peso molecular en tres variedades de granos de cacao. La composición de los azúcares en las distintas variedades se presenta en la Tabla 7. Para las muestras de los cacaos sin fermentar, el azúcar mayoritario fue la fructosa, comportamiento similar al reportado por Reinecius^[55]. En los cacaos de Ghana y Costa de Marfil la fructosa estuvo presente en mayor concentración que la sacarosa, sin embargo, en los cacaos

de Ecuador, se observa el comportamiento inverso, lo que fue atribuido a diferencias en las condiciones de fermentación ya que estos cacaos eran sometidos a cortos procesos de fermentación en comparación con las otras dos variedades. Las concentraciones de glucosa y estaquiosa se encontraron en cantidades similares, seguidas de la rafinosa y verbascosa.

Tabla 7. Cambio en monosacáridos y oligosacáridas durante el tostado de granos de cacao ^[27].

Mono- y Oligosacáridos (mg/20g)						
Grano	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Rafinosa	Estaquiosa	Verbascosa
Ghana						
Sin tostar	12,4	83,6	31,6	4,0	15,1	1,9
Tostado	0,9	11,9	28,2	5,4	10,6	1,3
Costa de Marfil						
Sin tostar	15,9	56,0	31,0	3,0	12,2	0,9
Tostado	1,0	8,7	40,5	5,5	14,4	0,9
Ecuador						
Sin tostar	16,8	34,4	96,6	20,1	20,1	0,8
Tostado	2,1	12,1	124,8	22,2	22,2	0,9

También observaron que durante el tostado ocurría una disminución significativa de la fructosa y una desaparición casi completa de la glucosa en casi todas las variedades. Sin embargo, no observaron un cambio significativo en las concentraciones de sacarosa, rafinosa, estaquiosa o verbascosa, ya que los únicos azúcares que pueden interaccionar con los aminoácidos durante el tostado a través de la reacción de Maillard son la glucosa y la fructosa (azúcares reductores).



En Venezuela, se dispone relativamente de poca información sobre el contenido de azúcares en los granos de cacao criollo. Por lo general, la determinación de los azúcares se ha llevado a cabo a través del análisis de azúcares totales y/o reductores totales.

Entre los trabajos que más destacan se encuentra el de Portillo y col.^[21], cuyo objetivo fundamental fue el de evaluar el efecto del tipo de fermentador, la frecuencia de remoción, el aguante de la mazorca y el tiempo de fermentación sobre el contenido de taninos, azúcares reductores totales y totales en el cacao criollo Porcelana. La evolución de cada uno de estos compuestos químicos se realizó tanto en el cotiledón como en la pulpa + testa de los granos del cacao. Para el caso de los azúcares reductores y totales, los resultados obtenidos demostraron que existe un efecto de cada uno de los factores estudiados sobre su evolución. Sin embargo, el factor más significativo fue el tiempo de fermentación. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8 donde se aprecia como el contenido de azúcares disminuía significativamente durante el proceso de fermentación para las dos fracciones estudiadas. También se observa como el descenso de los azúcares reductores y totales fue superior en la fracción pulpa + testa (superior al 50%) que en el cotiledón.

Para el caso de la frecuencia de remoción y el aguante de la mazorca se observó que el contenido de los azúcares fue superior cuando la masa se removió cada 12 horas y las mazorcas se aperturaron el mismo día de la cosecha, ya que cuando se disminuyó la frecuencia de remoción a 24 horas el contenido de ambos azúcares disminuyó. El porcentaje de los azúcares reductores cambió de 1.60 a 1.22% y el de los azúcares totales de 2.58 a 1.81%. En el caso de los tratamientos en los que se retrasó cinco días el desgrane de las mazorcas, los azúcares reductores se mantuvieron constantes y los totales decrecieron con la reducción de la frecuencia de remoción. En vista de todos estos resultados, ellos recomiendan que el cacao criollo

Porcelana debe fermentarse durante 72 horas como máximo, con remociones cada 24 horas, aguante cero y realizar el proceso en cajones cuadrados ya que el contenido de azúcares reductores se favorece con este tratamiento, lo cual es fundamental en la calidad del producto final (chocolate).

Tabla 8. Prueba de medias para el contenido de azúcares reductores y totales en el cotiledón y pulpa + testa de granos de cacao Porcelana durante la fermentación^[21]

Fracción	Tipo de fermentador (cajón) / Tiempo de fermentación (horas)	% Azúcares Reductores	% Azúcares Totales
Cotiledón	0	1,60a	2,34 ^a
	24	1,15b	2,13 ^a
	48	1,05c	1,75b
	72	1,05c	1,62b
	96	0,82d	1,30c
Pulpa + Testa	0	3,22a	4,87 ^a
	24	3,16a	4,34b
	48	2,59b	3,75c
	72	2,05c	2,97d
	96	1,43d	2,36e

Medias de valores con letras diferentes dentro de la misma columna y fracción indican diferencias estadísticamente a un nivel de significancia del 5%

Otro trabajo importante es el de Graziani y col.^[56], quienes evaluaron el efecto del mezclado, de diferentes variedades de cacao, durante la fermentación sobre determinados parámetros químicos. Utilizaron mezclas de cacao de tipo criollo y forastero (100:0; 75:25; 50:50 y 0:100) de la localidad de Cumboto, Estado Aragua. Las mezclas se fermentaron por 4 días en cajas de madera, removiéndose la masa de cacao a las 24 y 72 horas de iniciado el proceso. Los análisis de humedad, taninos, proteínas, pH, acidez total, azúcares reductores y totales fueron realizados en cotiledón y en la pulpa +

testa a los 0, 2 y 4 días de la fermentación. En la Tabla 9 se presentan los resultados que obtuvieron; se puede observar un descenso de los azúcares (reductores y totales) a medida que transcurría la fermentación para todas las mezclas.

Tabla 9. Azúcares reductores y totales en el cotiledón y pulpa + testa de mezclas de granos de cacao tipo criollo y forastero durante el proceso fermentativo [56]

Mezcla	Día	Cotiledón		Pulpa + Testa	
		% Azúcares Reductores	% Azúcares Totales	% Azúcares Reductores	% Azúcares Totales
1	0	0,45	1,13	2,89	4,15
	2	0,36	0,95	1,42	2,89
	4	0,27	0,64	0,62	0,96
2	0	1,19	1,22	0,35	4,67
	2	0,55	0,92	2,22	2,70
	4	0,25	0,62	0,47	0,85
3	0	0,81	1,25	2,68	3,51
	2	0,52	1,06	1,56	2,76
	4	0,47	0,88	0,65	1,11
4	0	1,22	1,33	3,69	2,76
	2	0,35	0,56	1,88	2,83
	4	0,26	0,38	0,73	0,89

Al inicio del proceso el contenido de azúcares reductores y de azúcares totales fue de 0,91 % y de 1,23 % en el cotiledón y de 3,15% y 4,07% en la pulpa + testa. Estos valores disminuían gradualmente durante los días de fermentación, comportamiento que atribuyeron a la conversión de los azúcares en alcohol por acción de las levaduras, cuyo desarrollo es favorecido por el alto contenido inicial de azúcares en la pulpa, el bajo pH y el ambiente anaeróbico que predominaba durante la primera fase de la fermentación. Por otra parte, los azúcares también eran eliminados a través del exudado, de allí que las

mayores pérdidas en las dos fracciones evaluadas, se detectaban en los dos primeros días de fermentación. Estos resultados fueron similares a los reportados por Portillo^[57] y Torres^[58] en la fermentación de cacaos venezolanos.

Álvarez y col.^[19] evaluaron parámetros físicos y químicos de varios granos de cacaos fermentados y secados artesanalmente en la región de Cuyagua, Estado Aragua y tostados en condiciones experimentales y controladas de laboratorios (150 °C por 30 min). Los resultados los compararon con una muestra comercial (mezcla de todos los genotipos). En la Tabla 10 se pueden apreciar que obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los azúcares totales entre los 5 genotipos y la muestra comercial. Los valores obtenidos se encuentran en un intervalo de variabilidad comprendido entre 19,94 a 25,05%.

Tabla 10. Composición proximal*, en función del porcentaje de glucosa (g/ 100g expresado en base seca) de los granos curados y tostados de cacao de la región de Cuyagua.

Código Genotipo	Azúcares Totales
MAR - 4	19,94 ± 0,02 ^a
CMR - 5	25,05 ± 0,02 ^e
CRP - 1	23,38 ± 0,02 ^b
CRP - 2	24,01 ± 0,02 ^d
MCP - 1	23,91 ± 0,02 ^c
Comercial	23,79 ± 0,02 ^c

*Los resultados se expresan como promedio ± la desviación estándar de tres determinaciones. Letras distintas indican diferencias significativas (P < 0.05).

Estos resultados en conjunto con los otros parámetros estudiados (humedad, proteína cruda, grasa cruda, ceniza, fibra cruda y polifenoles) para estos genotipos permitieron establecer un perfil de calidad en relación a la composición química de las almendras fermentadas, secas y tostadas de cacao de las variedades predominantes de la región de Cuyagua.

Wendy Josefina Orozco Contreras

Nogales y col.^[59] también analizaron los cambios que sufren los azúcares totales y otros parámetros químicos durante el secado natural al sol de granos de cacao del tipo criollo también cosechados en Cuyagua. La fermentación la realizaron durante 5 días empleando los dos diseños de los cajones de madera (cuadrado y rectangular) más utilizados en la región costera del estado Aragua. El secado lo llevaron a cabo por 5 días con 6 horas diarias de exposición al sol en un patio de cemento.

Los resultados que obtuvieron para los distintos parámetros estudiados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Característica química del grano de cacao fermentado durante el secado al sol^[59]

Característica Química	Días de Secado				
	0	1	2	3	5
% Azúcares totales	2.38a	2.30b	2.13c	1.90d	1.78e
% Humedad	52.44a	25.15b	20.57c	16.43d	7.95e
% Acidez Total	0.57a	0.25b	0.25b	0.20b	0.24b
pH	5.87b	5.82b	5.80b	6.09a	5.83b
% Cenizas	3.91a	3.63b	3.66b	3.67b	3.69b
% Proteínas	12.87b	11.51c	12.81b	13.40ab	14.02a
% Taninos	0.40b	----	0.38b	----	0.45a

Letras distintas indican diferencias a un nivel de significación del 5%

Para los azúcares totales, se observa una disminución de su contenido a medida que transcurrían los días de secado. Este comportamiento lo atribuyeron a la participación de los azúcares reductores en las reacciones de oscurecimiento enzimático (Reacción de Maillard) para formar fracciones volátiles de pirazinas. Esta reacción que es favorecida por las altas temperaturas, también ocurre cuando éstas son bajas (30–50 °C), pero durante un período más largo. Adicionalmente destacaron que la concentración de sacarosa también disminuía por hidrólisis enzimática, reacción que continuaba

hasta que la enzima invertasa era inactivada por el incremento de la temperatura y la pérdida de humedad.

Otro trabajo reportado en la literatura es el de Zambrano y col.^[60], que determinaron el contenido de glucosa, fructosa y azúcares totales en granos de cacao provenientes de distintos tipos de cultivares venezolanos (criollos, forasteros e híbridos) durante el proceso de postcosecha y torrefacción. En la Tabla 12 se presenta la variación de los azúcares durante el proceso de fermentación.

Tabla 12. Variación del contenido de azúcares en tres tipos de cacao durante la fermentación^[60]

Tipo	Cultivar	Tiempo (días)	Glucosa (mg/g)	Fructosa (mg/g)	Azúcares totales (mg glucosa/g)	G + F (%)	F/G
Criollos	Porcelana	0	1,86	2,38	41,2	10,3	1,3
		1	3,24	2,89	30,6	20,0	0,9
		2	4,38	5,47	30,0	32,8	1,2
		3	6,77	7,64	30,6	47,1	1,1
		$\Delta x/x_1$	+ 2,6	+ 2,2	-26%	+3,6	-15%
	Guasare	0	2,24	2,46	55,9	8,4	1,1
		1	2,28	2,48	45,4	10,5	1,1
		2	6,70	11	34,3	51,6	1,6
		3	11,70	19,09	35,7	86,2	1,6
		$\Delta x/x_1$	+ 4,2	+ 6,8	-36	+ 9,3	+ 60
Híbridos	ICS-1	0	1,71	1,72	47,4	7,3	1
		1	3,81	4,39	35,2	23,3	1,2
		2	8,04	12,34	23,4	87,1	1,5
		3	8,84	8,31	23,6	74,9	1
		$\Delta x/x_1$	+ 4,2	+ 4,1	-50 %	9,3	+45 %
	IMC-67	0	0,94	0,95	50,7	3,7	1
		1	2,97	3,41	41,2	15,5	1,2
		2	6,38	9,12	22,7	68,4	1,4
		3	5,49	8,40	17,3	80,4	1,5
		$\Delta x/x_1$	4,8	7,8	-66 %		+50 %
Forastero	Ghana	2002	0,84	7,20	17	47,4	8,6
		2003	1,06	8,96	23,4	42,8	8,4
		C.V (%)	1,16	± 15	± 22	± 7,2	± 1,7

Se puede observar que durante la fermentación, el contenido de azúcares totales disminuía en un 25% en criollos y forasteros y en un 50% en los cacaos híbridos, los cuales habían sido sometidos a procesos de fermentación más prolongados. Paralelamente se puede observar que los niveles de fructosa y glucosa aumentaban de 2 a 8 veces su concentración, dependiendo del tipo de cacao. Además, la proporción de fructosa tendía a incrementarse 1,5 veces sobre la glucosa mientras avanzaba el proceso fermentativo. Ellos concluyen que la relación fructosa/glucosa en función del tiempo de fermentación podría utilizarse como criterio para evaluar la fermentación de los cacaos venezolanos (Figura 6).

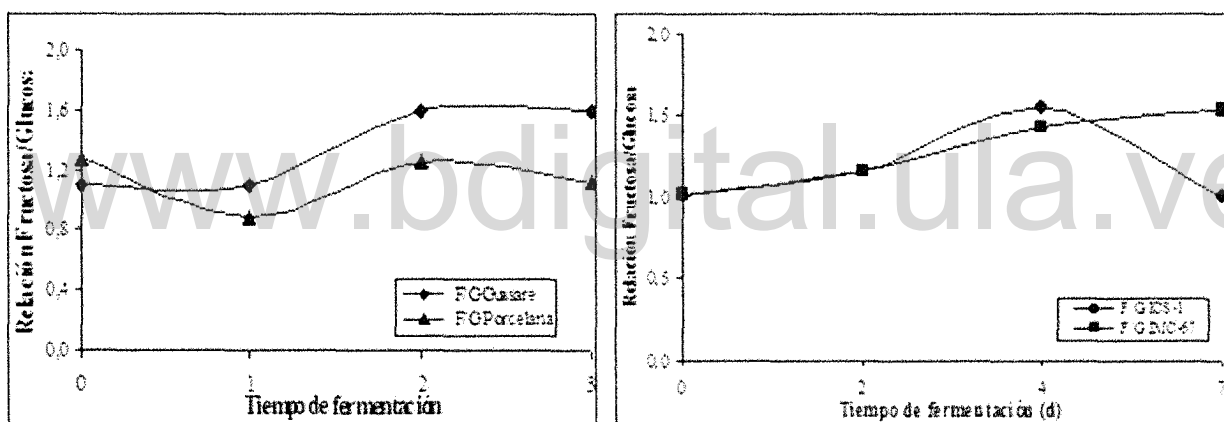


Figura 6. Variación de la relación fructosa/glucosa para criollos (Guasare y Porcelana); híbridos (ICS-1 y IMC-47)^[60].

En la formación de los compuestos asociados con el aroma característico del cacao, los aminoácidos son igual de importantes que los azúcares, los cuales interaccionan entre sí a través de la reacción de Maillard y la degradación de Strecker durante el proceso de tostado.

Es importante señalar que los granos frescos (sin fermentar) presentan pequeñas cantidades de aminoácidos libres y a medida que tiene lugar el proceso de fermentación su concentración se incrementa por la acción

de ciertas enzimas (endo- y exoproteasas), que actúan sobre las proteínas liberando así los aminoácidos que las conforman.

En ese sentido, Kirchhoff y col.^[23,24] reportaron que la cantidad y composición de los aminoácidos libres en los granos de cacao cambiaba durante la fermentación y encontraron que la proporción entre los aminoácidos hidrofóbicos:ácidos:otros era de 33:30:37 para el cacao Ghana y 41:26:33 para el Malasia en granos sin fermentar. Estos valores cambiaban a 58:16:26 y 58:20:21 en granos fermentados, respectivamente.

Puziah y col.^[29] también estudiaron los cambios de los aminoácidos durante el proceso de fermentación en granos de cacaos híbridos, encontrando que los granos sin fermentar presentaban una proporción de 30:18:52 entre los aminoácidos hidrofóbicos:ácidos:otros y donde los aminoácidos predominantes eran la leucina, prolina y lisina. Durante el proceso de fermentación la concentración de los aminoácidos libres se incrementaba de forma lineal hasta alcanzar su máximo el 4º día, después del cuál permanecían relativamente constantes (Figura 7 y Tabla 13).

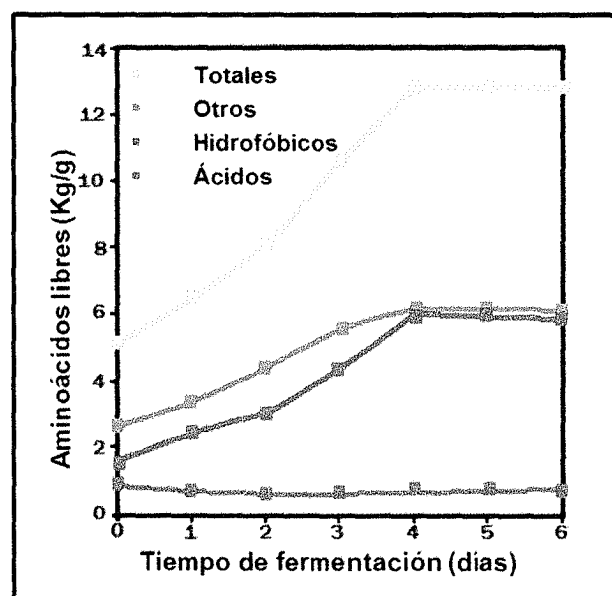


Figura 7. Cambios en la concentración de aminoácidos durante el proceso de fermentación^[29]

Wendy Josefina Orozco Contreras

Tabla 13. Concentración de aminoácidos durante el proceso de fermentación del grano de cacao^[29]

Nombre	Días de Fermentación (g/ kg)						
	0	1	2	3	4	5	6
Ac. Aspártico	0,53	0,23	0,18	0,23	0,25	0,26	0,24
Ác. Glutámico	0,40	0,48	0,45	0,47	0,51	0,54	0,55
Tirosina	0,18	0,20	0,32	0,51	0,72	0,72	0,72
Valina	0,20	0,23	0,35	0,55	0,79	0,73	0,73
Isoleucina	0,06	0,05	0,13	0,30	0,46	0,45	0,45
Prolina	1,26	1,82	2,25	2,61	2,07	1,40	1,40
Lisina	1,04	1,06	1,14	1,50	1,58	1,69	1,69
Leucina	0,75	1,32	1,46	1,56	2,09	2,05	2,05
Cisteína	0,21	0,19	0,37	0,23	0,57	0,92	0,92
Alanina	0,29	0,45	0,40	0,55	0,66	0,66	0,64
Fenilalanina	0,07	0,10	0,33	0,81	1,27	1,31	1,32
Metionina	Trazas	0,03	0,03	0,09	0,21	0,21	0,21
Triptófano	0,14	0,13	0,17	0,24	0,23	0,18	0,18
Serina	Trazas	Traza	0,03	0,16	0,25	0,29	0,29
Histidina	0,03	0,07	0,10	0,19	0,18	0,18	0,19
Glicina	Trazas	Trazas	0,01	0,07	0,10	0,15	0,16
Arginina	Trazas	0,08	0,16	0,34	0,56	0,69	0,76
Treonina	Trazas	Trazas	0,03	0,08	0,18	0,25	0,38

Durante este proceso tenía lugar un aumento significativo de las concentraciones de leucina, fenilalanina, tirosina, valina e isoleucina (aminoácidos hidrofóbicos) y una disminución de casi el 15% de la concentración de los aminoácidos ácidos. La proporción de aminoácidos en los granos de cacao fermentados era de 46:6:48 (hidrofóbicos:ácidos:otros). Las variaciones entre sus resultados y los reportados por Kirchhoff fueron atribuidas a: los diferentes períodos de cosecha, madurez del fruto, variedad y origen de los granos de cacao, así como también, a los procedimientos de fermentación utilizados.

Un comportamiento similar se observó para los cacaos criollos venezolanos en el estudio realizado por Rivas y col^[61]. Durante el proceso de

fermentación, la concentración de los aminoácidos aumentaba significativamente como consecuencia de su formación dentro de las almendras. La relación entre los aminoácidos hidrofóbicos:ácidos:otros antes y después del proceso de fermentación fue de 30:6:64 y 41:5:54, respectivamente. Ellos también reportaron que durante las etapas de secado y tostado donde ocurría un incremento de la temperatura, había una disminución significativa en la concentración de los aminoácidos, ya que durante estos procesos estos compuestos interaccionaban con los azúcares reductores formando las pirazinas vía reacción de Maillard (Figura 8).

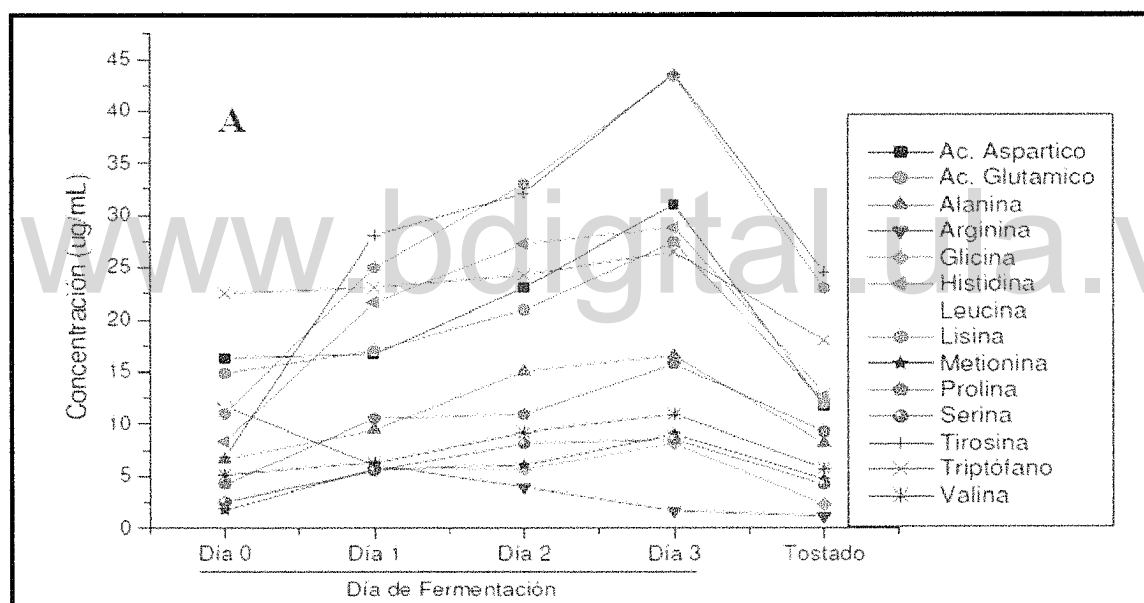


Figura 8. Tendencia de los aminoácidos en cacao Criollo (Mérida-Venezuela) durante el proceso de fermentación y tostado^[61]

En el trabajo realizado por Brito y col^[62] en cacaos forasteros de Brasil, también se observó una disminución de aproximadamente el 32% de los aminoácidos durante el proceso de tostado (Tabla 14). Todos los aminoácidos presentaron una disminución en su concentración excepto el ácido glutámico. Además, la menor disminución se observó para la lisina y la mayor para la histidina.

Tabla 14. Contenido de aminoácidos durante los procesos de fermentación, secado y tostado^[62]

Aminoácido	Fermentación		Secado	Tostado
	0h	72h		
Ácidos Aspártico	9,8	13,0	15,7	6,5
Ácido Glutámico	7,4	11,7	4,3	5,8
Leucina	7,4	14,8	17,6	12,3
Alanina	9,7	18,1	21,2	12,0
Fenilalanina	3,3	11,7	10,8	5,9
Tirosina	3,6	1,8	11,0	3,0
Valina	5,6	11,0	12,5	6,4
Isoleuceina	4,1	9,0	8,8	3,3
Lisina	72,6	49,4	73,0	69,7
Arginina	18,0	23,5	23,5	19,1
Histidina	2,0	4,9	5,4	0,7
Treonina	4,6	11,8	8,8	3,6
Serina	15,8	27,8	18,8	14,5
Glicina	4,3	8,6	8,4	2,9
Metiodina	2,9	7,2	5,6	1,4
Prolina	11,3	14,0	6,4	5,6
Cisteína	1,3	2,7	2,6	0,4

Por su parte, Puziah y col^[63], evaluaron no solamente el contenido de aminoácidos sino que también el de azúcares reductores y el de pirazinas durante el proceso de secado y tostado. En la Figura 9 se puede observar que la disminución en la concentración de los aminoácidos y los azúcares ocurre de forma paralela con un incremento en las concentraciones de las pirazinas lo que confirma que durante estas etapas tiene lugar la reacción de Maillard.

Rohan y Stewart^[51] reportaron que la degradación de los aminoácidos por acción de los azúcares reductores durante el tostado, en granos de cacao de Accra (África) era incompleta. Los cambios de concentración que obtuvieron para los azúcares y los aminoácidos durante el tostado se presentan en la Figura 10; se puede observar como los aminoácidos son parcialmente degradados ya que los reactivos degradantes (azúcares reductores) limitan la

reacción como consecuencia de su agotamiento en el sistema. Ellos concluyen que la producción de azúcares reductores, por hidrólisis de la sacarosa, durante la fermentación es de fundamental importancia y debe ser controlada para obtener una cantidad tal que permita obtener una degradación total de los aminoácidos durante el tostado de acuerdo a la reacción de Maillard.

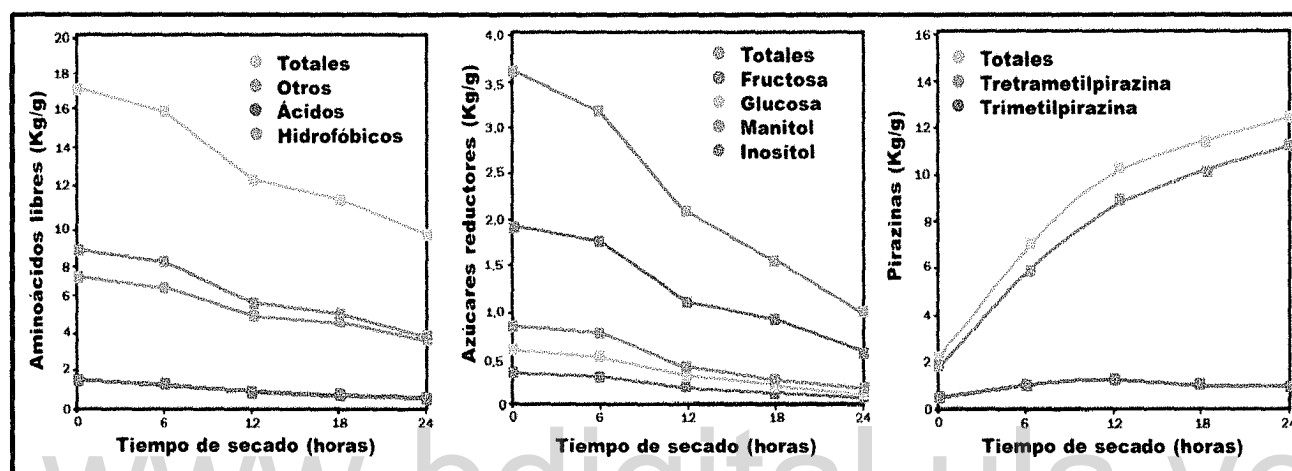


Figura 9. Cambio en las concentraciones de los aminoácidos (a), azúcares (b) y pirazinas (c) durante la etapa de secado y tostado^[63].

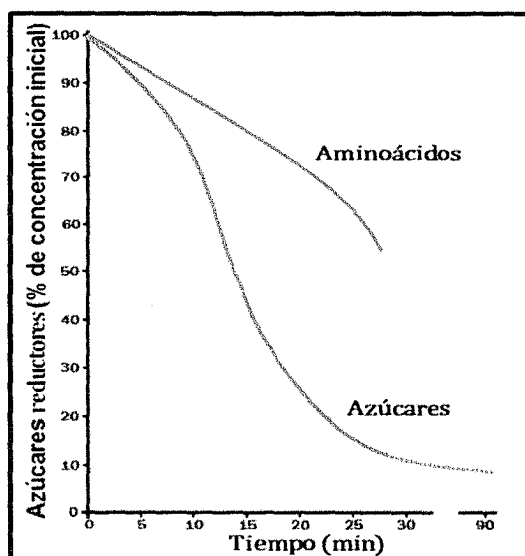


Figura 10. Disminución de las concentraciones de los azúcares reductores y aminoácidos durante el tostado^[51].

Wendy Josefina Orozco Contreras

La importancia de los aminoácidos libres en la reacción de Maillard está determinada por el tipo aminoácido involucrado en la formación de los compuestos asociados directamente con el aroma y sabor del cacao. Se cree que la alanina, el ácido glutámico, la leucina, la fenilalanina, la valina y la treonina son los que más influyen en aroma^[64], ya que, de acuerdo con sistemas modelos, pueden originar distintos tipos alquilpirazinas al condensar con los azúcares reductores^[3]. Se debe destacar que la función principal de los aminoácidos es la de proveer el nitrógeno para el anillo y la de los azúcares es proporcionar la fuente de carbón para las pirazinas^[50].

www.bdigital.ula.ve



CAPÍTULO III:

www.bdigital.ula.ve

PROPUESTA DE TRABAJO

III. PROPUESTA DE TRABAJO

El aroma del cacao y en particular del cacao tostado, como hemos visto en la revisión bibliográfica, ha sido objeto de numerosos trabajos. Unos se refieren a la puesta en evidencia del desarrollo de la fracción aromática térmica obtenida durante la etapa del tostado. Así mismo otros reflejan la importancia de la fermentación y el secado en la expresión de los materiales en la calidad aromática.

La manufactura del chocolate depende de los constituyentes del grano de cacao y asimismo involucra una serie de etapas (tratamiento postcosecha, acondicionamiento, tostado, descascarillado o conchado, entre otras) que permiten que se formen el sabor y el aroma característicos del chocolate.

La fermentación es la etapa clave del procesamiento del grano de cacao donde se produce la muerte del grano y facilita la extracción de la pulpa y el posterior secado. Durante esta etapa, ocurre la iniciación de la formación de los precursores del aroma, el desarrollo de color, y una reducción significativa en la amargura.

En las reacciones térmicas durante el tostado ocurren modificaciones importantes incluyendo las reacciones de Maillard con las contribuciones de los azúcares reductores y los aminoácidos.

El chocolate tiene un carácter distintivo sabor, con notas específicas relacionadas también con el genotipo del grano.

Por ello, una composición inicial del grano apropiada puede traducirse, a través de tratamientos postcosecha y subsecuentes tecnologías de procesamiento, en un sabor y aroma de alta calidad. Sin embargo, durante

estas etapas, si no se toman las debidas precauciones, se pueden generar defectos sensoriales.

A manera de ejemplo, según Gill *y col.* ^[65] el aroma de las almendras frescas del cacao es poco desarrollado, tanto cuantitativamente como cualitativamente. Esto ha sido corroborado por un gran número de investigadores que han reportado que los granos de cacao sin fermentar no desarrollan ningún aroma al momento de ser tostados^[18,44]

Si bien se conoce cómo las etapas anteriormente citadas inciden en la calidad sensorial del chocolate, aún los procesos bioquímicos y químicos que conducen a la formación y desarrollo del aroma y sabor de chocolate no se entienden completamente.

En ese sentido, para la mejor comprensión de las variaciones sensoriales dadas en el chocolate, se requieren más investigaciones que permitan optimizar los tratamientos post-cosechas de los granos de cacao (de diferentes genotipos), los subsecuentes procesos ejecutados en la elaboración del chocolate, y la calidad sensorial del mismo.

El cacao es un cultivo de notable importancia económica para Venezuela; declarado recientemente, por el gobierno nacional, como producto de primera necesidad. Y debido al alto valor nutricional y amplio consumo en la alimentación del pueblo venezolano y del mundo en general; la producción de cacao, chocolates y subproductos pasan a constituir una prioridad en el país.

Durante los últimos años las compañías procesadoras de cacao, y en particular aquéllas encargadas de la producción de chocolate, han comprendido que la calidad sensorial constituye el éxito de un producto y, para ello, es necesario conocer los factores que determinan la calidad sensorial de dicho producto.

Es por ello que, para caracterizar la influencia del tratamiento postcosecha, en especial el rol de la fermentación, secado y tostado, sobre el desarrollo del aroma de los cacaos y en particular del cacao Criollo venezolano se necesita el perfil de los compuestos químicos precursores que participan en las diferentes etapas; entre ellos los aminoácidos y los azúcares reductores.

En ese sentido la propuesta de trabajo para esta Tesis es desarrollar metodologías analíticas que permitan la determinación de aminoácidos y azúcares reductores en almendras de cacaos venezolanos sometidos a las diferentes etapas del beneficio post-cosecha.

Es importante señalar, que la realidad de los laboratorios nacionales es muy heterogénea, laboratorios muy bien dotados y otros con severas limitaciones en instrumentación y accesorios.

En consecuencia es importante proporcionar metodologías de análisis teniendo en cuenta esta realidad.

Por ello se propone:

⇒ *Desarrollar y validar métodos de análisis para determinar aminoácidos y azúcares reductores en muestras de cacaos sometidas a las diferentes etapas del beneficio post-cosecha, utilizando tanto la cromatografía líquida de alta resolución con detección por UV arreglo de diodos, como la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas.*

Para la realización de este trabajo se cuenta con muestras de cacao cultivados en diferentes regiones de Venezuela cuyas características se detallan a continuación.

III.1. MUESTRAS DE CACAO

Las muestras de cacao que se analizarán pertenecen al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas en Mérida (INIA-Mérida) y fueron seleccionadas por el Prof. Alexis Zambrano de la ULA en función del estudio que se iba a realizar dentro del marco de esta Tesis. Estas muestras fueron suministradas en envases plásticos herméticamente cerrados que se guardaron bajo refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

Los tipos de cacao que formaban parte de las muestras se detallan a continuación:

a. Criollos:

- ✓ Mérida San Juan
- ✓ Mérida Zea
- ✓ Porcelana
- ✓ Guasare

b. Trinitarios y Forasteros:

- ✓ ICS – 1 (Trinitario)
- ✓ Chuao (Trinitario)
- ✓ IMC – 67 (Forastero)
- ✓ Ghana (Forastero)

Los cacaos de las variedades Guasare, Zea y San Juan provienen del banco genético de San Juan de Lagunillas (INIA-Mérida, Venezuela) mientras que la variedad Porcelana de la Estación Local Chama (CORPOZULIA, Venezuela). Las variedades ICS-1 (Trinitario), IMC-67 (Forastero) y Chuao se obtuvieron de árboles genéticamente identificados que crecen en el banco genético de Ocumare de la Costa (INIA-Aragua, Venezuela).

En la Tabla 1 se resumen algunas de las características más sobresalientes de los diferentes tipos de cacao producidos en Venezuela, según la región productora de origen y en la Figura 1 la ubicación geográfica de cada una de estas zonas de producción.

Tesis Doctoral | Propuesta de trabajo

Tabla 1. Tipos de cacaos producidos en Venezuela clasificados según regiones productoras y calidades^[1].

Región	Calidad	Denominación	Procedencia	Características
ORIENTAL	Fino de primera	Río Caribe fermentado	Región de Carupano – Edo. Sucre	✓ Granos de tamaño medio (100 granos pesan 115g) con un mínimo de 80% de fermentación ✓ Granos procedentes de cacaos Trinitarios de calidad y de híbridos de viejos cacaos Criollos ✓ Producción de calidad heterogénea.
	Fino de segunda	Río Caribe Natural	Estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro	✓ Granos de tamaño pequeño (100 granos pesan 100g) con algo más de 20% de fermentación ✓ Granos procedentes de cacaos Trinitarios de calidad y de híbridos de viejos cacaos Criollos
		Delta Amacuro	Delta Amacuro	✓ Granos de tamaño pequeño sin fermentar procedentes de cacao híbridos de Escavina
CENTRO NORTE	Extrafino	Chuao Ocumare	Chuao. Edo Aragua. Ocumare de la Costa, Edo. Aragua	✓ Granos procedentes de un mosaico de cacaos Forasteros, Trinitarios y Criollos con una producción muy reducida
	Fino de primera	Caranero Superior	Barlovento, Edo. Miranda	✓ Granos de tamaño mediano (100 granos pesan de 118 – 120g) con un nivel de fermentación superior al 80% ✓ Granos procedentes de cacaos Trinitarios mezclados con Criollos locales
		Puerto de Cabello	Edo. Aragua	✓ Granos procedentes de viejos cacao Criollos con cacaos Trinitarios
	Fino de segunda	Caracas Natural	Barlovento, Edo. Aragua	✓ Granos de tamaño pequeño (100 granos pesan 100g) con algo más del 25% de fermentación ✓ Granos procedentes de cacaos Trinitarios mezclados con Criollos locales
ANDES – SUR DEL LAGO – LLANOS	Extrafino	Porcelana	Sur del Lago; El Vigía, Edo Mérida y Sta Barbara, Edo Zulia	✓ Grano procedentes de cacaos Criollos
		Guasare	Sierra de Perija, Edo Zulia	
	Fino de primera	Sur del Lago Clasificado	Estados Mérida, Tachira, Zulia y Barinas	✓ Granos de tamaño grande (100 grano pesan de 120 – 122g) con un grado de fermentación superior al 90% ✓ Granos procedentes de híbridos Criollos y Trinitarios de calidad
	Fino de segunda	Sur del Lago Natural	Sur del Lago	✓ Granos de tamaño pequeño (100 granos pesan de 100 – 105g) con un grado de fermentación entre 30 y 40% ✓ Granos procedentes de híbridos Criollos y Trinitarios de calidad
		Victoria	Alto Apure, Edo Aragua	✓ Granos procedentes de cacaos híbridos Escavina con cacaos Criollos Ocumare

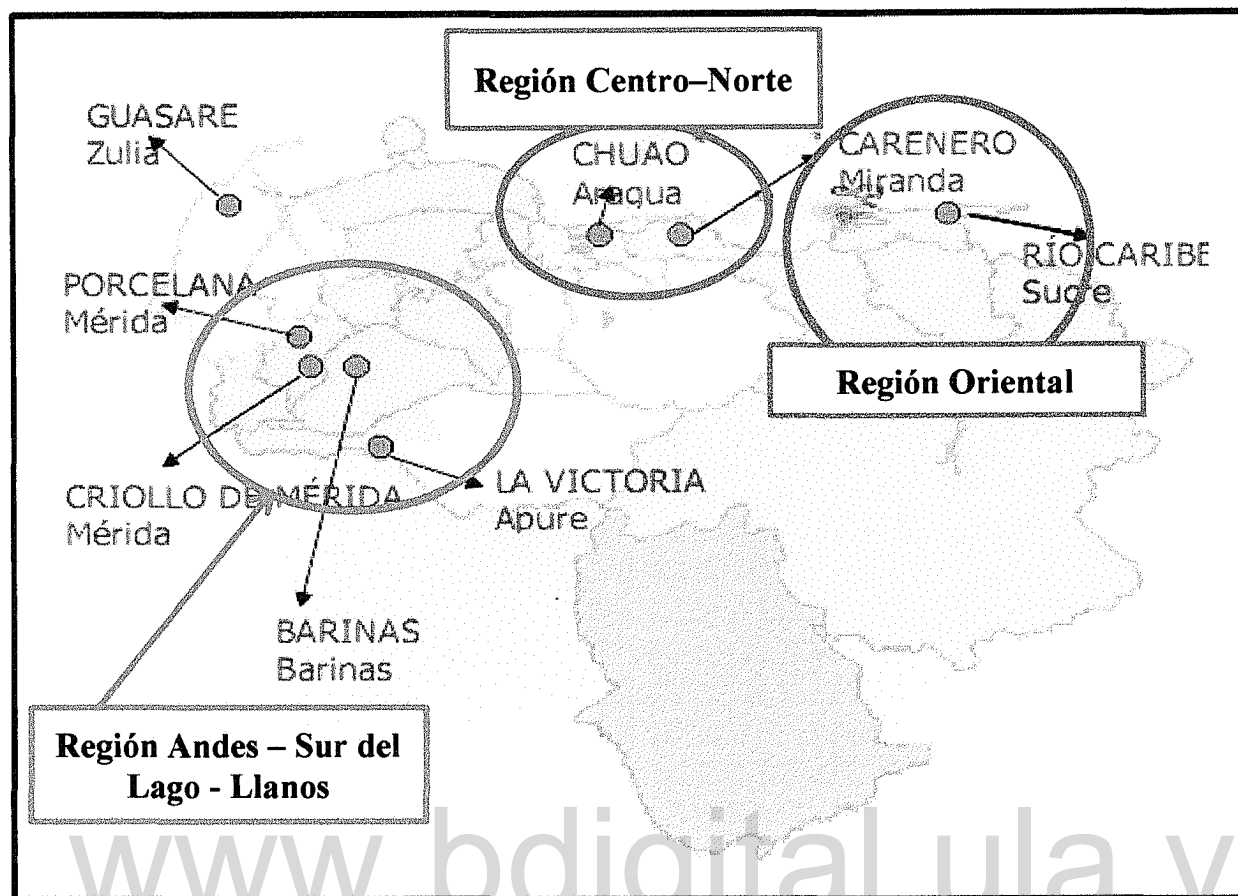


Figura 1. Ubicación geográfica de las tres regiones de producción de cacao en Venezuela

La “calidad del cacao” es un término que involucra varios factores, entre los que destacan el tamaño del grano, contenido de grasa y dureza, presencia de metales pesados, índice de mazorca, entre otros, los cuales se refieren a la calidad física del grano. No obstante, este término, también toma en consideración el aroma y sabor que presenten los granos, de ahí que se hable también de calidad aromática, la cual depende de los procesamientos que tengan lugar después de la cosecha (fermentación y secado) y procesamiento industrial (tostado).

Ambos enfoques sobre la calidad del cacao son importantes. Sin embargo, la prioridad siempre ha sido obtener un cacao de gran calidad aromática. De ahí, que el efecto de los distintos pasos involucrados en el

tratamiento postcosecha sobre los granos de cacao haya sido objeto de un gran número de estudios (Figura 2).

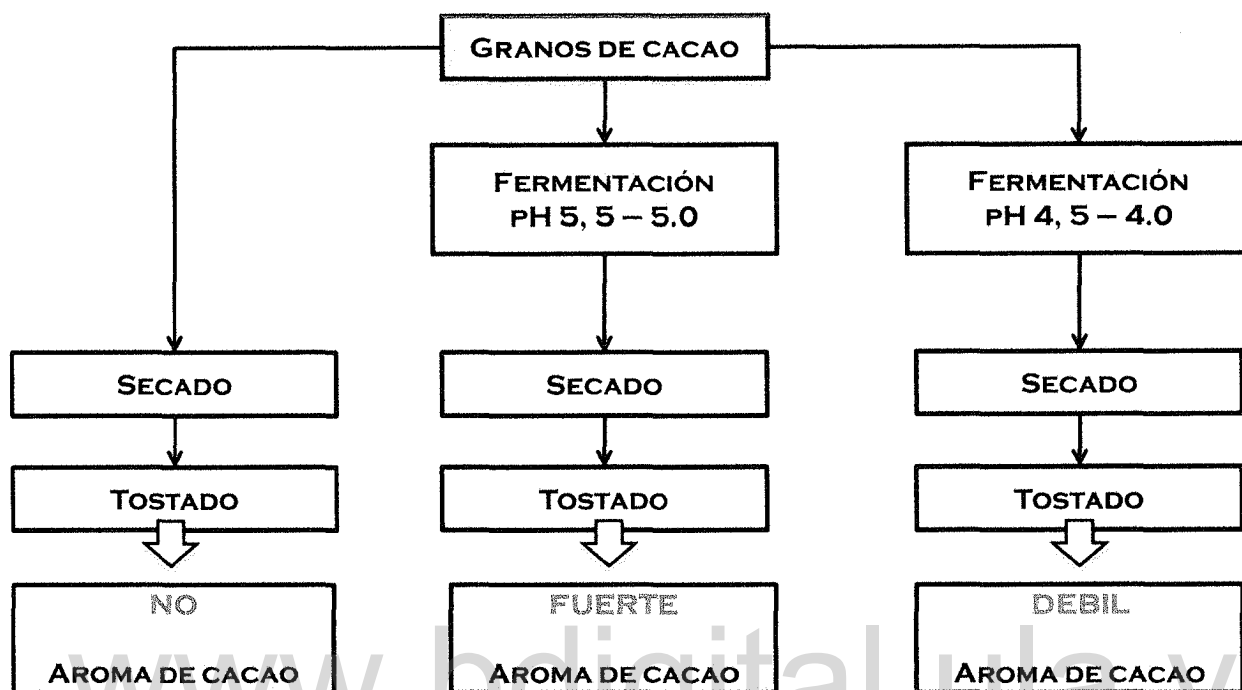


Figura 2. Generación del aroma del cacao

Para la obtención del polvo y del licor de cacao se siguió el protocolo presentado en el esquema que se muestra en la Figura 3. El único parámetro que se modificó, dependiendo del tipo de cacao, fue el tiempo de fermentación.

Una vez cosechado el cacao, las semillas se sometieron a un proceso de fermentación durante 3 días para los cacaos criollos. Este último proceso se realizó por triplicado en cajones de madera de 60 cm³. El volteo de la masa fermentante se realizó cada 24 h. Se tomaron tres réplicas para cada día de fermentación para someterlas al análisis. Finalizado el tiempo de fermentación, se efectuó el proceso de secado durante 6 días.

Las muestras de forasteros y trinitarios se trataron como los cacaos criollos una vez concluido el proceso postcosecha pero los tiempos de

fermentación fueron de cinco a siete días que son los que corresponden a estas variedades de cacao.

Posteriormente, una parte de las muestras, se molieron, tamizaron (≤ 42 mesh) y se desgrasaron de acuerdo al método de extracción con Soxhlet y se almacenaron a -20 °C para su conservación y análisis.

Es importante señalar que las metodologías postcosecha para las distintas muestras se realizaron de forma controlada en el Campo Experimental San Juan de Lagunillas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), municipio Sucre, estado Mérida.

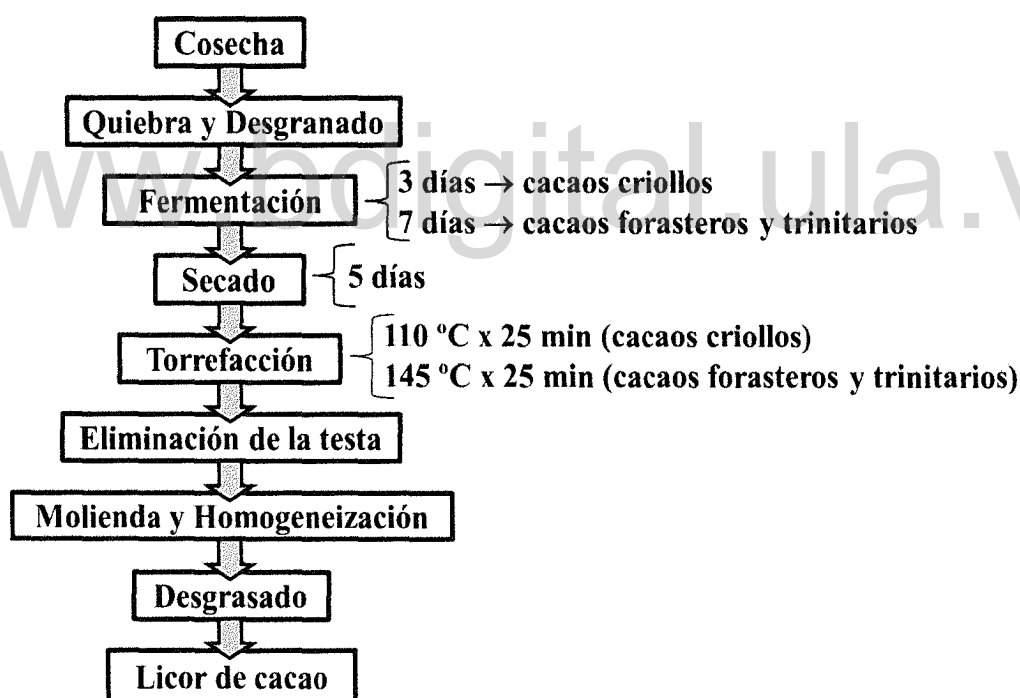


Figura 3. Esquema del procedimiento del tratamiento de las muestras de cacao realizado por el INIA-Mérida, previo a la caracterización química

CAPÍTULO IV:

www.bdigital.ula.ve
CARBOHIDRATOS

IV. CARBOHIDRATOS

IV. 1. Generalidades

Los carbohidratos, también conocidos como azúcares, se pueden definir químicamente como polihidroxialdehídos, polihidroxiketonas y compuestos que por hidrólisis los forman^[66,67]; esta es la definición más próxima a su realidad estructural y que sugiere más su reactividad^[68]. En consecuencia, la química de los carbohidratos es esencialmente la química de los grupos carbonilo, hidroxilo y de los enlaces acetales formados entre estos dos grupos funcionales (Figuras 1 y 2).

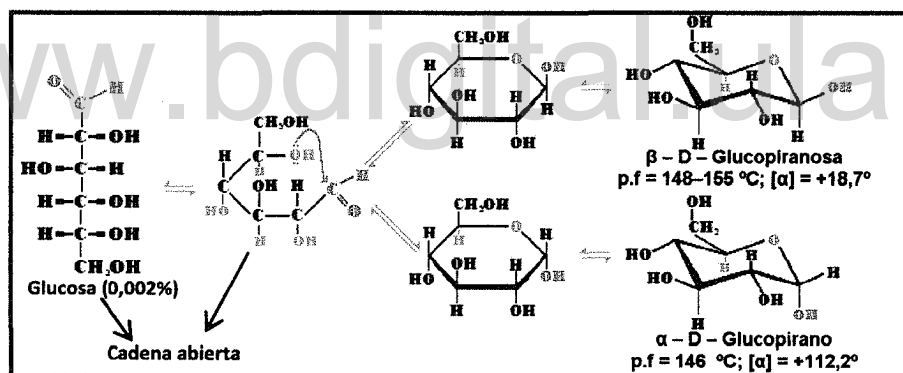


Figura 1. Estructuras cíclicas y abierta de la glucosa

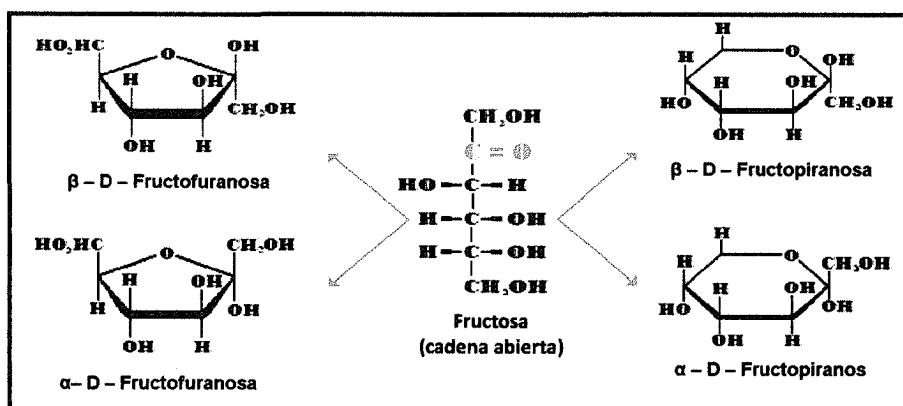


Figura 2. Fructosa en sus formas cíclicas piranosa y furanosa

Es muy común referirse a este tipo de compuestos como sacáridos del latín *sacchārum* que significa dulce. Este término es bastante inapropiado ya que muchos de los sacáridos, si no es que la mayoría, no son dulces. Sin embargo, esta terminología es la base de una de las clasificaciones más comunes de los carbohidratos (Tabla 1), ya que permite hablar de manera más conveniente acerca de unidades individuales de carbohidratos, los monosacáridos. Éstos pueden unirse entre sí para dar dímeros, trímeros y finalmente polímeros.

Tabla 1. Clasificación de los carbohidratos más importantes en los alimentos^[13]

Carbohidratos	Ejemplos.
Monosacáridos (1 unidad de azúcar)	<i>Pentosas:</i> Xilosa, arabinosa, ribosa, etc <i>Hexosas:</i> <i>Aldohexosas:</i> glucosa, galactosa, manosa, etc. <i>Cetohexosas:</i> fructosa, sorbosa, etc
Oligosacáridos (de 2 a 10 unidades de azúcar)	<i>Disacáridos:</i> lactosa, sacarosa, maltosa, etc. <i>Trisacáridos:</i> rafinosa, etc <i>Tetra y pentasacáridos:</i> estaquiosa, verbascosa, etc.
Polisacáridos (más de 10 unidades de azúcar)	<i>Homopolisacáridos:</i> almidón, glucógeno, celulosa, etc. <i>Heteropolisacáridos:</i> hemicelulosa, pectinas, etc

Los monosacáridos consisten en una sola unidad de polihidroxicetona o polihidroxialdehído, dependiendo de si el grupo

carbonilo corresponde al de una cetona (como la fructosa) o al de un aldehído (como la glucosa).

Los oligosacáridos consisten en cadenas cortas de unidades de monosacáridos unidas por enlaces glicosídicos, los más abundantes son los disacáridos siendo el más común de éstos la sacarosa.

Los polisacáridos consisten en cadenas largas de cientos de unidades de monosacáridos, como son la celulosa (cadena lineal) o el glucógeno (cadenas ramificadas) (Figura 3)^[69]

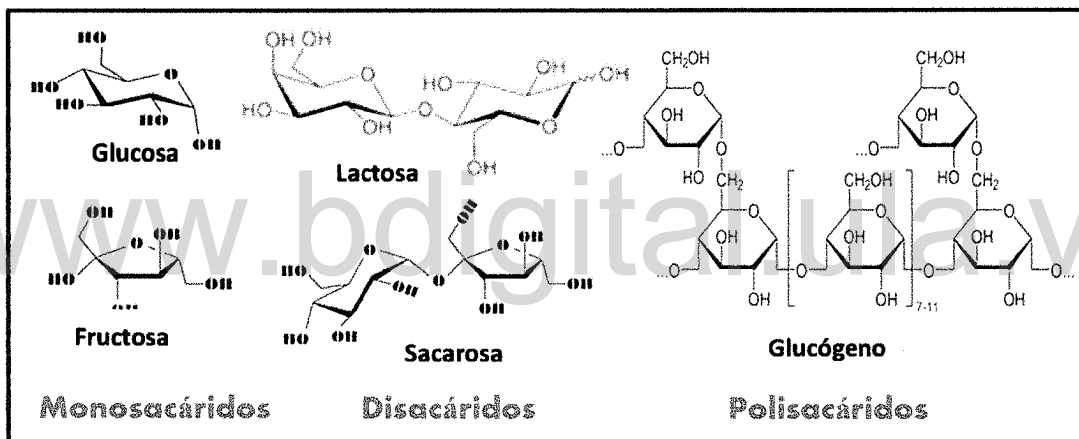


Figura 3.- Tipos de carbohidratos

IV.2. Métodos de análisis de carbohidratos

Los carbohidratos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y en los alimentos, generalmente, se encuentran asociados al aroma, color, madurez y calidad de los mismos.

Existe una gran variedad de métodos de análisis de carbohidratos producto de la gran diversidad y variabilidad en su composición química, y de su papel sobre los alimentos y otras matrices.

La evolución de estos métodos podría decirse que se ha llevado a cabo en el siguiente orden: **1.** Determinación cualitativa de azúcares a través de pruebas de color (métodos colorimétricos), **2.** Adaptación de estas pruebas colorimétricas para la determinación cuantitativa de los azúcares reductores, **3.** Determinación cualitativa por cromatografía de papel, **4.** Determinación de los derivados de azúcares por cromatografía de gases, **5.** Análisis cualitativo y cuantitativo por cromatografía de capa fina, **6.** Desarrollo de métodos enzimáticos y **7.** Determinación por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)^[70].

En la literatura se han reportado un gran número de métodos no cromatográficos, como los espectrofotométricos ^[70-72], enzimáticos^[73,74], electroquímicos^[75-77], isotópicos^[78], espectrometría de masas con ionización electrospray^[79,80], espectroscopia infrarrojo por transformadas de Fourier^[81], análisis por inyección en flujo^[82,83], los cuales han contribuido en la determinación de carbohidratos en diferentes matrices.

Sin embargo, de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada para alimentos en general y para cacao en particular, se pudo constatar que en la actualidad los métodos más empleados para el análisis de estos compuestos involucran las técnicas de separación en sus distintas modalidades. Ésto es debido a la complejidad de las matrices estudiadas, ya que junto a los azúcares a determinar siempre hay otros compuestos con propiedades y estructuras similares en las muestras de alimentos.

En ese sentido, la tradicional química húmeda y los ensayos enzimáticos han sido reemplazados por los métodos cromatográficos que son en la actualidad una herramienta imprescindible para la determinación rápida y específica de azúcares. Esto supone una notable mejora frente a los análisis tradicionales donde las interferencias presentes

en la matriz y el consumo elevado de tiempo suponen serios inconvenientes.

Entre ellos, se destacan principalmente la cromatografía de gases (CG) y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), los cuales permiten la separación, identificación y cuantificación simultánea de los carbohidratos presentes en las muestras reales^[84,85].

La cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas que ha sido ampliamente utilizada para determinar carbohidratos en diferentes matrices. Sin embargo, la detección sensible y directa de los carbohidratos separados ha sido un problema durante mucho tiempo, debido a la ausencia de cromóforos y fluoróforos en su estructura molecular. Para poder ser detectados por UV o fluorescencia son necesarias reacciones de derivatización pre o postcolumna. En la literatura hay algunas revisiones que resumen los avances tanto de la técnica de derivatización postcolumna de carbohidratos^[86] como precolumna^[87]. Así mismo un gran número de reactivos de derivatización para monosacáridos se han reportado, tales como 3-metil-1-fenil-2-pirazolin^[88], 8-aminopyrene 1,3,6-trisulfonato^[89], benzamidina^[90], FMOC-hidrazina^[91], éster etílico del ácido p-aminobenzoico etil éster^[92], y clorohidrato de fenilhidracina^[93]. Dentro de las diferentes modalidades de la cromatografía líquida, la de intercambio de aniones es una de las más utilizadas para la determinación de carbohidratos. En fases móviles fuertemente alcalinas, los carbohidratos bajo su forma aniónica se separan por cromatografía de intercambio aniónico. Además, los carbohidratos son electroquímicamente activos y por ello, la cromatografía de intercambio iónico con un detector amperométrico por impulsos se ha utilizado con muy buen rendimiento^[94-97].

Por su parte, la cromatografía de gases, es una técnica complementaria más no competitiva con la cromatografía líquida. Se basa

en la excelente combinación de buena selectividad y resolución, de un amplio intervalo dinámico de concentración y alta sensibilidad. Además, permite un fácil acoplamiento con la espectrometría de masas (EM) como sistema de detección, simplificando la identificación de forma prácticamente inequívoca de cualquier compuesto ya que proporciona un espectro de masas característico de cada molécula^[98] (Figura 4).

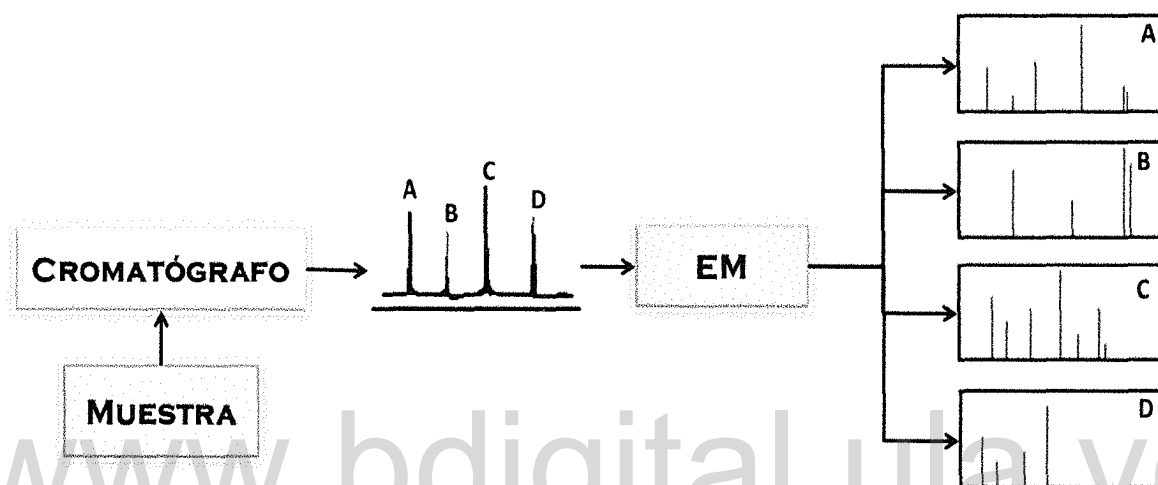


Figura 4. Esquema del acoplamiento CG-EM.

Es por ello que el acoplamiento CG-EM se ha convertido en una herramienta potente y accesible para cuantificar sustancias en diversas matrices. En ese sentido, su utilización ha aumentado significativamente en laboratorios que realizan análisis rutinarios ya que los beneficios que proporciona, superan muchos de los inconvenientes causados por la etapa de derivatización necesaria para el análisis de compuestos polares que no presentan la volatilidad necesaria^[99].

En el marco de los carbohidratos, se han utilizado ambas técnicas cromatográficas^[100-103] donde la selección de una u otra depende principalmente del instrumental que se tiene en el laboratorio y de los costos generados.

En el laboratorio disponíamos de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas y adicionalmente, de los reactivos necesarios para la utilización de esta técnica en el análisis de carbohidratos y por ello la seleccionamos para la realización de este trabajo. A continuación presentamos algunas consideraciones teóricas de la cromatografía de gases y del detector espectrómetro de masas.

IV.2.1. Cromatografía de gases

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, consiste en que entran en contacto dos fases mutuamente inmiscibles, siendo una de ellas estacionaria y la otra móvil. La mezcla de la muestra, que se pone en contacto con la fase móvil, produce una serie de interacciones (particiones) repetitivas entre la fase estacionaria y la fase móvil, a medida que se desplaza por el sistema arrastrada por dicha fase móvil.

Las interacciones se basan en las diferencias de propiedades físicas y químicas de los componentes de la muestra. Estas diferencias determinan la velocidad de emigración de los componentes individuales, bajo la influencia de la fase móvil que se desplaza a través de una columna que contiene la fase estacionaria^[103]. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativamente y/o cuantitativamente [101].

En la cromatografía de gases (CG), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona

con las moléculas del analito, su única función es la de transportarlo a través de la columna [104].

IV.2.1.1. Componentes de un cromatógrafo de gases

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases son: gas portador, puerto de inyección, columna dentro de un horno, detector y registrador; todos estos componentes se muestran esquemáticamente en la Figura 5.

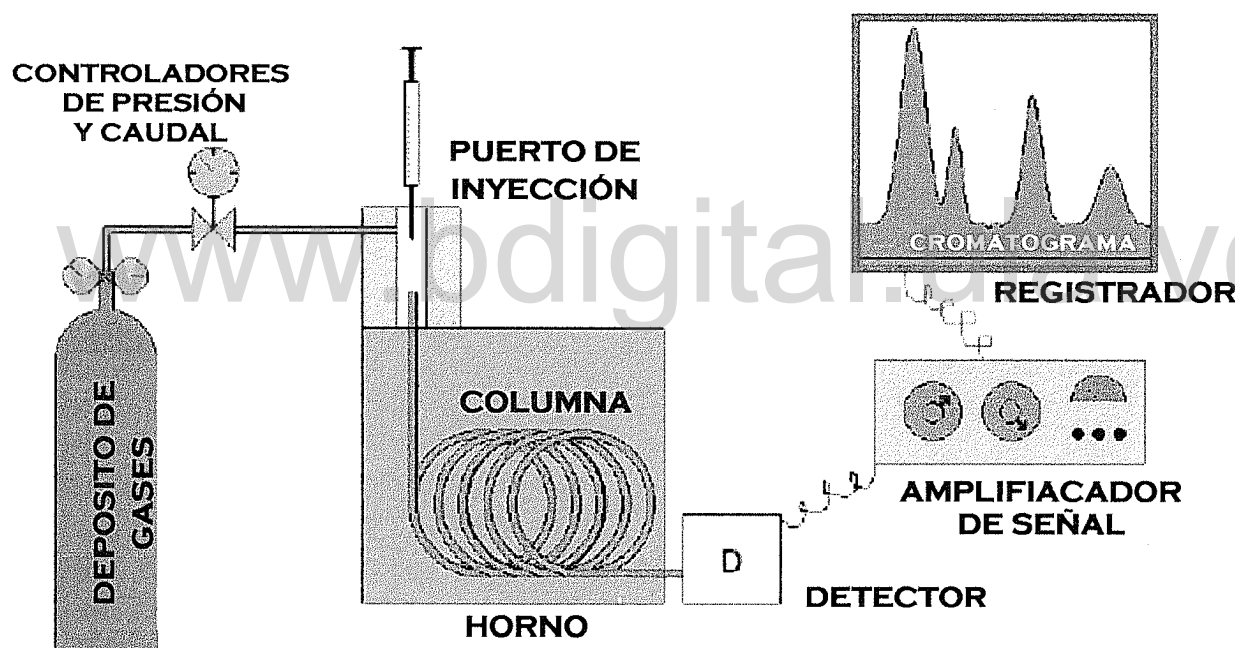


Figura 5. Esquema de cromatógrafo de gases

El gas portador (fase móvil) es un gas inerte puro (>99%) y seco, generalmente He, N o Ar y se elige en función del detector y de la velocidad requerida para el análisis (tipo de columnas: capilar o de relleno). Proviene de cilindros y el caudal, que pasa por la columna, ha de ser conocido y controlado con reguladores de presión, manómetros y medidores de flujo.

La muestra se introduce en el inyector con una microjeringa a través de un *septum* de goma. Allí se produce la vaporización instantánea de la misma y su introducción en la corriente de gas de arrastre. La temperatura del bloque ha de ser mayor al punto de ebullición del componente menos volátil. La eficiencia de la columna obliga a que la muestra sea de un tamaño adecuado. Así, inyecciones lentas o de volumen excesivo producen ensanchamiento de los picos cromatográficos disminuyendo la eficiencia. Cuando se utilizan columnas capilares que requieren muy pequeños volúmenes de muestra, el inyector incorpora un divisor de flujo (split) para que se introduzca en la columna una cantidad menor de muestra aproximadamente de un 1% del total. Sin embargo, cuando las sustancias a separar se encuentran a muy bajas concentraciones se puede realizar la inyección sin divisor (splitless).

La columna se halla dentro de un horno de temperatura variable, lugar donde se realiza la separación de los componentes de la muestra. Existen dos tipos de columnas de relleno (diámetro (d): 2 y 4 mm) y capilares ($d < 1$ mm). Sin embargo hoy en día, las de relleno han sido desplazadas por las capilares. En los cromatógrafos actuales se utilizan las columnas capilares en las que la fase estacionaria se fija sobre las paredes interiores del capilar de sílice fundida, de diámetro interior generalmente de 0,32 y 0,25 mm, de longitudes entre 5 a 60 m que poseen una eficiencia hasta 4.000 platos teóricos/m muy útil cuando se trata de separar muestras complejas. La temperatura de la columna depende de los puntos de ebullición de los componentes de la mezcla. El horno debe poderse calentar y enfriar rápidamente. Además la temperatura se debe poder programar para trabajar en régimen de gradiente de temperatura

El detector produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de componente a medida que cada uno por separado fluye a través de él. Esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en

función del tiempo el cromatograma. Idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador (o el software de control) calcula además, el área correspondiente de cada pico, la cual es proporcional a la concentración del analito.

Los tipos de detectores convencionales utilizados en cromatografía de gases se clasifican en:

- De conductividad térmica, (TCD: siglas en inglés).
- De ionización de flama, (FID: siglas en inglés)
- De quimioluminiscencia del azufre, (SCD: siglas en inglés)
- De captura de electrones, (ECD: siglas en inglés)
- De emisión atómica (AED: siglas en inglés)
- Fotometría de llama (emisión de llama), (FPD: siglas en inglés)
- Termoiónico (llama alcalina), (TID: siglas en inglés)

En los últimos tiempos el acoplamiento de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas ha adquirido una gran importancia ya que ha permitido que se puedan identificar y cuantificar con una gran fiabilidad sustancias presentes en alimentos.

Este acoplamiento, que se realiza a través de una interfase que “conecta” el sistema cromatográfico con el detector, en el caso de la cromatografía de gases, se resolvieron hace tiempo, posibilitando que dicha técnica sea considerada de rutina en los laboratorios agroalimentarios.

El proceso de análisis por espectrometría de masas es complejo por lo que a continuación se resume el fundamento del mismo.

IV.2.1.2. Detector de espectrometría de masas

La espectrometría de masas está basada en el diferente comportamiento que presentan los iones que se forman por las diferentes técnicas de ionización, al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Así dichos iones son separados en un analizador en función de su relación masa/carga (m/z) y detectados posteriormente^[105].

En forma general un espectrómetro de masas debe ser capaz de cumplir con cuatro funciones:

⇒ Ser capaz de vaporizar sustancias de volatilidades muy diferentes

⇒ Una vez volatilizada la muestra, originar iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa

⇒ Una vez generados los iones, separarlos en función de su relación masa/carga

⇒ Una vez separados los iones, detectar los iones formados y registrar la información adecuadamente.

Por ello, para poder cumplir con estas funciones, un espectrómetro de masas deberá constar de los componentes (Figura 6):

1. Sistema de introducción de la muestra
2. Fuente de iones
3. Analizador para la separación de iones



4. Sistema detector y registrador

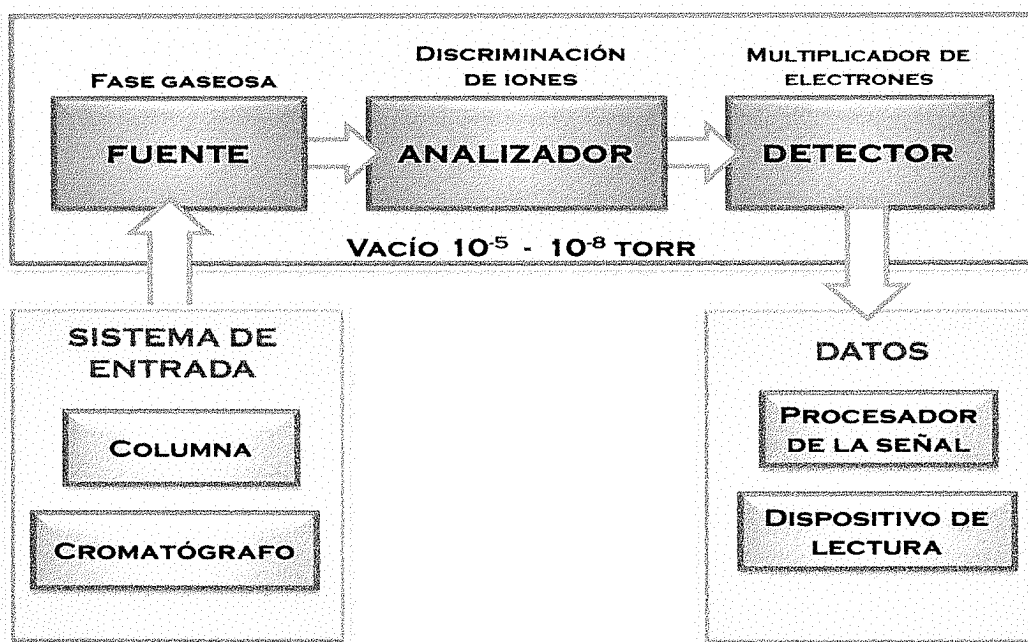


Figura 6. Diagrama de bloques de un detector de espectrometría de masa

Sistema de introducción de la muestra. Se realiza desde el cromatógrafo de gases a través de una interfase por lo que la introducción de la muestra se realiza directamente en fase gaseosa. La interfase o línea de transferencia une la columna capilar y la fuente de ionización. Por una parte, la presión de la columna es muy alta y en la fuente de ionización hay un alto vacío. En esas condiciones, las funciones de la interfase son las siguientes: quitar las moléculas de gas transportador e introducir las moléculas de analito en el espectrómetro de masas.

Fuente de iones. Existen dos métodos para producir la ionización de la muestra en estado gaseoso, la ionización por impacto o bombardeo electrónico y por ionización química.



✓ *Ionización por impacto electrónico.* Las moléculas de muestra son bombardeadas por medio de un haz de electrones de elevada energía generados por un filamento incandescente por medio de una diferencia de potencial variable entre 5 y 70 V entre el filamento y la fuente de iones (Figura 7) Por ello los electrones adquieren energía entre 5 y 70 eV. Para enfocar los electrones dentro de una trayectoria determinada, se utiliza un campo magnético dispuesto paralelamente a la dirección en que se mueven los electrones hasta llevarlo a un ánodo donde son recogidos.

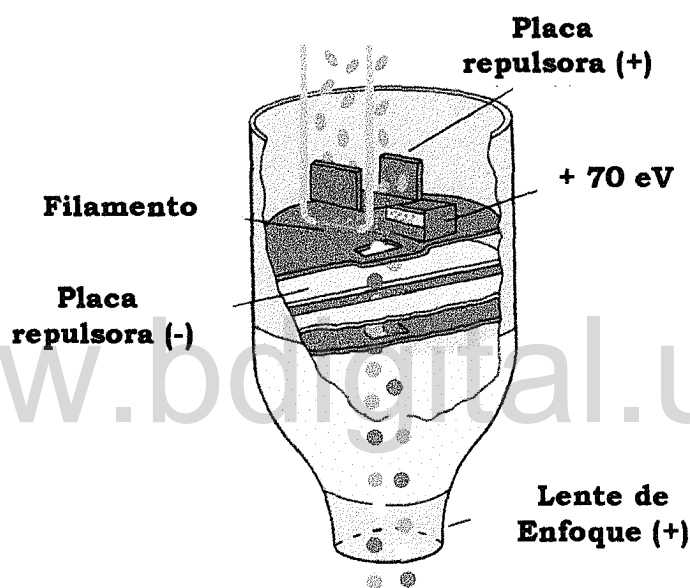


Figura 7. Fuente de iones de impacto electrónico

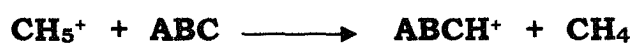
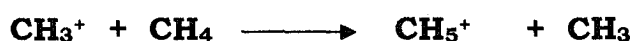
El haz de moléculas procedente del cromatógrafo de gases, atraviesa el haz de electrones de alta energía y entran en colisión con ellos generando reacciones que en forma general se describe por:



Una vez ionizada y fragmentada la molécula, se utiliza una placa con carga positiva ubicada detrás de la fuente de iones, para repeler los iones y expulsarlos fuera del haz de electrones utilizando un potencial

eléctrico elevado entre 1 y 10 kV que se establece entre la placa y la fuente.

✓ *Ionización química.* En este método se utiliza como agente ionizante un ion que va a transferir su carga a las moléculas de los componentes de la muestra por medio de una reacción bimolecular. La fuente de iones es igual al caso anterior, pero para producir la ionización química se introduce metano en la fuente a una presión de 1 mm de Hg. De esta forma los electrones ionizan al metano originándose a continuación la reacción bimolecular.



Analizador. A la salida de la fuente de iones, se tiene una mezcla de diversos iones que deben ser separados para detectarlos en forma individual. Para este fin se utiliza el analizador que dispersa el haz de iones del analito que emerge de la fuente de iones de acuerdo a su relación carga/masa.

Los analizadores más utilizados en los diferentes equipos son: el de campo magnético, el analizador cuadrupolar y el de trampa de iones. El detector Saturno 2000 utiliza este último y por ello a continuación detallamos su funcionamiento.

✓ *Analizador de trampa de iones.* Consiste de un electrodo de anillo y un par de electrodos colectores (Figura 8). Los tres electrodos forman una cavidad en la que se producen la ionización, la fragmentación y el análisis de masas.

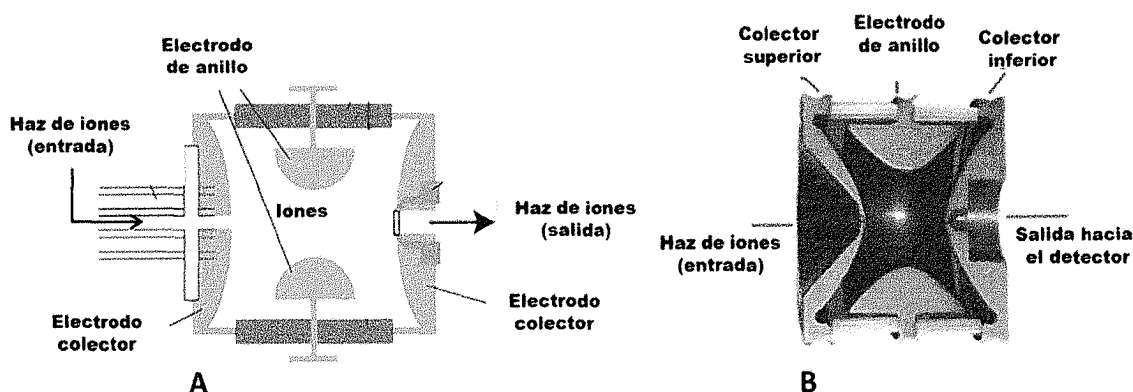


Figura 8. Esquema de un analizador de trampa de iones (A). Analizador de trampa de iones del detector de masas Saturno 2000 (B)

Durante el proceso de análisis de masas se aplica entre los electrodos superior e inferior un potencial de radiofrecuencia de 525 kHz (voltaje de modulación axial), al mismo tiempo sobre el electrodo central se aplica otro voltaje de radiofrecuencia de 1,1 MHz. Estos 2 voltajes de radiofrecuencia originan un campo electromagnético cuadrupolar en el que quedan confinados los iones con una trayectoria oscilante, dependiendo, el movimiento exacto de cada ión de los voltajes aplicados y de su relación m/z .

Posteriormente, estos iones se desestabilizan y pasan desde la cavidad del electrodo de anillo hacia el detector a través de una abertura situada en el colector inferior. Un cambio gradual en la amplitud del campo de radiofrecuencia, dará lugar a que los iones sean eyectados de la trampa en orden creciente de su relación m/z lo que dará lugar al espectro de masas.

Detector. Las corrientes de iones que salen del analizador son de intensidades pequeñísimas (10^{-8} a 10^{-14} A) y originan problemas a la hora

de realizar la detección que debe ser muy rápida y precisa. El detector convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada en un computador (Figura 9).

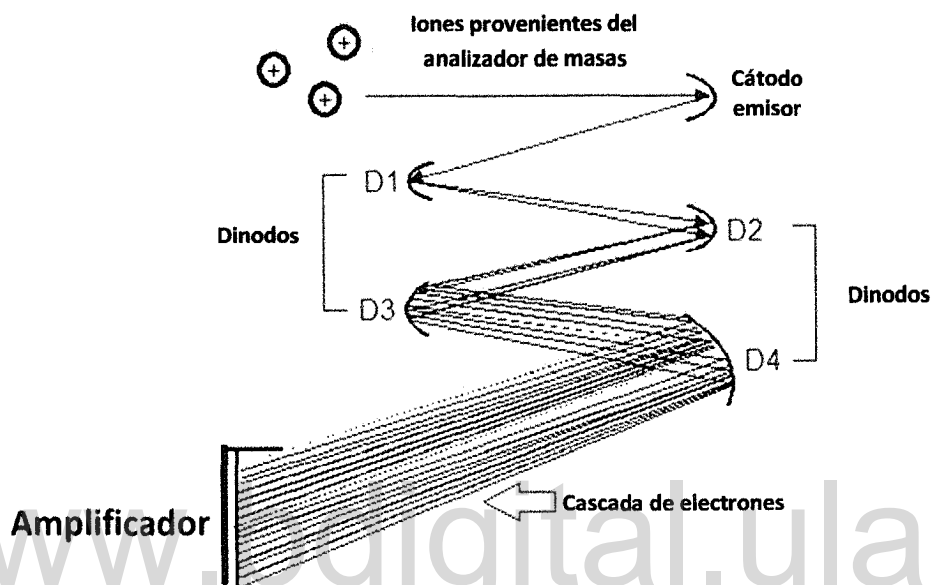


Figura 9. Esquema del funcionamiento de un electromultiplicador

Existen varios tipos de detectores pero el que posee el Saturno 2000 es un multiplicador o amplificador de electrones. Éste utiliza la energía cinética de los iones que inciden sobre una placa que tiene su superficie recubierta de óxidos de tierras raras. Al chocar los iones contra la placa, ésta emite una corriente de electrones que son acelerados hacia una segunda placa de la que se vuelven a arrancar electrones que son acelerados hacia una tercera placa y el procedimiento se repite. Por lo general se utilizan entre 10 a 16 placas y se consiguen amplificaciones de corriente iónica con un factor de multiplicación de 10^5 o mayores. El parámetro fundamental a controlar en el detector es el voltaje del multiplicador de electrones

Sistema de vacío. Para que tengan lugar los procesos en el interior del espectrómetro debe existir un ambiente de alto vacío (10^{-5} a 10^{-8} torr) para que el recorrido de los iones formados sea sin colisiones en su camino al detector. Para lograr el nivel de alto vacío requerido, el detector Saturno 2000 cuenta con bombas difusoras y turbomoleculares.

La cromatografía de gases ofrece excelentes resultados para compuestos orgánicos volátiles o compuestos susceptibles de ser volatilizados sin descomposición^[104]. Su principal limitación es la labilidad térmica de los solutos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización. En ese sentido, la temperatura juega un papel decisivo en la separación por CG.

Para poder llevar a cabo un análisis por CG, el analito debe poseer una apreciable volatilidad por debajo de los 350 °C y no debe encontrarse en solución acuosa, ya que esta deteriora la fase estacionaria de la columna. Por lo general, se requiere de un tratamiento previo de la muestra, antes de ser introducida al sistema cromatográfico.

Los carbohidratos son compuestos polares cuyas estructuras moleculares contienen grupos funcionales con hidrógenos activos ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$), por lo que tienden a formar enlaces de hidrógenos intramoleculares, disminuyendo así su volatilidad. En consecuencia, es necesaria su transformación en derivados volátiles y estables, para la aplicación exitosa de esta técnica de separación.

En este contexto, juegan un papel muy importante las reacciones de derivatización de los analitos que permiten su transformación en especies aptas para su separación y detección por CG^[99,104-108].

IV. 2.1.3. Derivatización en cromatografía de gases

La derivatización se define como: la alteración fisicoquímica de un compuesto a fin de obtener un producto apropiado para su determinación y en cromatografía de gases; sus objetivos principales son los siguientes:

- ⇒ Aumentar la volatilidad del analito.
- ⇒ Facilitar la separación, mejorando la selectividad y eficiencia cromatográfica
- ⇒ Disminuir la degradación térmica de la muestra al estabilizar los compuestos termolábiles
- ⇒ Mejorar la respuesta del detector al incorporar derivados con grupos funcionales que aumenten la señal de respuesta

Es importante indicar que toda conversión química del analito debe estar justificada, a fin de obtener una metodología más rápida, conveniente y precisa^[109]. Es por ello que, antes de plantear este tipo de prácticas, se deben tomar en cuenta los factores de los que depende una reacción química y su influencia en el análisis, tales como:

✦ El **mecanismo**; que se define como la descripción completa, paso a paso, de cuales son exactamente los enlaces que se rompen y forman, así como el orden de los productos observados.

✦ La **termodinámica**; que es el estudio de los cambios de energía que acompañan a las transformaciones físicas y químicas. Compara la estabilidad de los reactivos y los productos, permitiendo predecir que compuestos están favorecidos por el equilibrio.

✦ La **cinética**; que es el estudio de las velocidades de reacción y la determinación de los productos se forman con más

rapidez. También ayuda a predecir cómo cambia la velocidad cuando se modifican las condiciones de reacción^[66].

En vista de esto, se puede tener el derivado apropiado mediante la selección de condiciones de reacción adecuadas (cantidad de sustrato y reactivo, catalizadores, solvente, temperatura, presión, gases de arrastre, etc), a fin de que el derivado sea suficientemente volátil y estable para su análisis por CG.

La *volatilidad* es el elemento clave que debe ser modificado, ya que la separación en cromatografía de gases se realiza a través de gradientes de temperatura, discriminando a las sustancias por sus puntos de ebullición. Este se define como la *presión ejercida por la fase vapor* del compuesto en equilibrio dinámico con su fase líquida. Si es *alta* a temperatura ambiente, quiere decir que la molécula es *volátil* y si por el contrario es *baja*, entonces es *no volátil*.

La presión de vapor aumenta con la temperatura y el valor en la que se iguala con presión externa (generalmente la presión atmosférica) se conoce como punto de ebullición. Éste se encuentra directamente relacionado con las fuerzas intermoleculares, debido a que mientras mayor sea la fuerza entre los átomos que conforman la estructura, más alto será su valor.

Existen diversos tipos de interacciones moleculares, sin embargo una de las más fuertes es la de *enlace de hidrógeno*, que se produce en moléculas que poseen grupos con hidrógenos unidos a átomos electronegativos (específicamente N, O y F). Es por ello que este tipo de compuestos tendrán un punto de ebullición alto, ya que requieren de una mayor energía para que ocurra la ruptura de los enlaces y en consecuencia el cambio de fases^[66,67].

Por ello, los compuestos que poseen enlaces de hidrógeno intermoleculares tales como los alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos, aminas, carbohidratos, etc., deben derivatizarse a fin de que puedan ser retenidos y posteriormente eluidos de la columna a temperaturas razonables sin descomposición térmica.

Existen varias reacciones orgánicas que pueden emplearse para modificar analitos polares, sin embargo, debido a lo antes mencionado, se deben utilizar aquéllas bajo condiciones no rigurosas y de velocidad rápida.

Los parámetros a tomar en cuenta antes de aplicar estas metodologías de derivatización son: la estructura molecular del analito y el grupo funcional a transformar, así como también conocer los componentes de la matriz, específicamente los que posean grupos funcionales con hidrógenos activos que pueden competir por el reactivo derivatizante^[109].

Las reacciones orgánicas más utilizadas para la formación de los derivados volátiles en los carbohidratos son: *sililación* y *acilación*. Ambas reacciones involucran a los grupos hidroxilos a fin de evitar los puentes de hidrógenos y las interacciones de éstos con los empaques de las columnas y otros sitios nucleofílicos del sistema analítico.

IV. 2.1.3.1. Reacción de sililación

La sililación consiste en sustituir los hidrógenos activos de los carbohidratos por grupos trimetilsilil [(CH₃)₃Si-; TMS] para dar un TMS-éter (Figura 10). La sustitución de los hidrógenos activos por los grupos TMS reduce la polaridad del compuesto y disminuye la formación de puentes de hidrógeno, lo que trae como resultado un incremento en la

volatilidad. Además, tiene lugar un aumento de la estabilidad por la disminución de los sitios activos en la molécula.

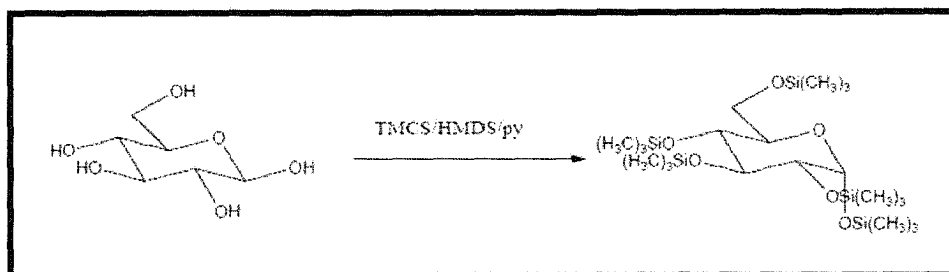


Figura 10. Reacción de sililación de un carbohidrato

La sililación es el procedimiento más utilizado en la derivatización de carbohidratos ya que puede llevarse a cabo en solo paso. Por lo general, la reacción se lleva a cabo empleando un calentamiento convencional a temperaturas entre los 75 y 100 °C con tiempos de reacción entre los 10 y 80 minutos, dependiendo del reactivo derivatizante que se utilice^[69].

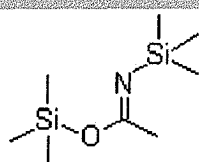
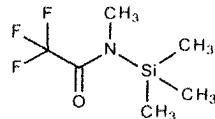
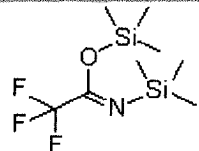
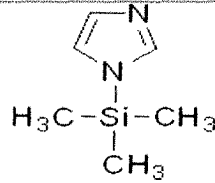
Los derivados obtenidos son poco polares y bastante volátiles. La formación de estos compuestos se ve favorecida con el uso de piridina como solvente ya que solvata al $(\text{CH}_3)_3\text{Si-X}$ con la subsiguiente debilitación del enlace Si-X, favoreciendo la formación de los TMS-derivados. Sin embargo, en muchos casos, el mismo reactivo derivatizante actúa como solvente eliminando así la necesidad de otro solvente en el medio de reacción.

Los TMS-derivados pueden obtenerse a partir de una amplia variedad de reactivos, los más utilizados se listan en la Tabla 2.

Estos reactivos pueden utilizarse solos o en mezclas y cada uno de ellos difiere en su reactividad, selectividad, reacciones secundarias y en el carácter de los productos de reacción. Además, son hidrolíticamente

inestables por lo que deben ser protegidos de la humedad, la cual los destruye. Sin embargo, algunos permiten preparar sus derivados en presencia de pequeñas cantidades de agua [110].

Tabla 2. Reactivos de sililación para derivatización de carbohidratos

Reactivo	Abreviatura	Estructura
N, O - Bis(trimetilsilil) acetamida	BSA	
N-metil-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida	(MSTFA)	
Hexametildisilazano	HMDS	$(\text{CH}_3)_3\text{SiNHSi}(\text{CH}_3)_3$
N, O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida	BSTFA	
Trimetilclorosilano (TMCS)	TMCS	$(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$
Trimetilsilimidazol	TMSI	

IV. 2.1.3.2. Reacción de acilación

69

Esta reacción consiste en la esterificación de los carbohidratos con ácidos carboxílicos, usualmente ácido acético o ácido trifluoroacético.

Wendy Josefina Orozco Contreras

La derivatización de los carbohidratos a través de esta reacción se puede resumir en tres pasos básicos:

1. Reducción de la aldosa a alditol con un exceso de borohidruro de sodio disuelto en hidróxido de amoníaco, a temperatura ambiente.
2. Remoción del borato generado mediante evaporaciones sucesivas con metanol en medio ácido.
3. Acetilación con ácido acético o trifluoroacético utilizando piridina como catalizador

Al comparar los trimetilsilil derivados (TMS) con los acetatos, especialmente con los trifluoroacetatos, se observa que estos últimos son los más volátiles (ver Tabla 3).

Tabla 3. Comportamiento de los derivados (trimetilsilil-, acetil-, y trifluoroacetil-) de algunos carbohidratos bajo las mismas condiciones cromatográficas

Analito	Trimetilsilatos		Acetos de aditales		Trifluoroacetatos de aditales	
	t _R (min)	T (°C)	t _R (min)	T (°C)	t _R (min)	T (°C)
Manitol	10.5	205	6.8	168	5.7	157
Glucosa	10.3	202	6.6	166	5.0	150
Sacarosa	20.1	300 (isoterma)	17.4	274	14.8	248

Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes de las reacciones de acilación se encuentra directamente relacionado con la etapa de reducción de las diferentes cetosas y/o aldosas. En ocasiones estas pueden transformarse en el mismo alditol, por ejemplo, la sorbosa y la glucosa originan el mismo alcohol glucitol luego de la reducción. Además, las cetosas por lo general dan más de un alcohol, por ejemplo la fructosa se reduciría a una mezcla de D-glucitol (sorbitol) y D-manitol.

Por otra parte, el empleo de este tipo de reacciones de derivatización requiere de un gran número de etapas, entre las que se incluyen evaporaciones sucesivas a fin de eliminar interferentes previo a la acetilación, haciendo el procedimiento lento y tedioso.

En vista de todo esto, se puede decir que las reacciones de derivatización constituyen una etapa adicional en el tratamiento de muestra para el análisis por CG, que traen como consecuencia un gasto adicional de tiempo y reactivo. Los procedimientos convencionales de derivatización implican reacciones con largos tiempos de reacción y altas temperaturas. Ante esta situación, en los últimos años, se han venido desarrollando metodologías que permiten disminuir y mejorar los tiempos de análisis. Dentro de estas metodologías se encuentran aquellas que consisten en la aceleración de la reacción por fuentes auxiliares de energías, entre la que destaca la derivatización asistida por radiación de microondas (MW, de sus siglas en inglés Microwave).

La radiación con MW ofrece nuevas alternativas en la derivatización de analitos, en términos de reducir los tiempos de reacción y el consumo de solventes, permitiendo efectuar con rapidez procesos de calentamiento que en muchos casos no se consiguen a través de métodos clásicos, siendo éste un parámetro importante en sustancias sensibles a la temperatura^[111].

IV. 2.1.4. Microondas

La radiación por MW es un tipo de radiación electromagnética en la región entre la radiación infrarroja y la radiación de radiofrecuencias con longitudes de onda que oscilan entre 1 cm y 1 m correspondiente a un rango de frecuencia entre los 300 – 300000 MHz^[112] (Figura 11).

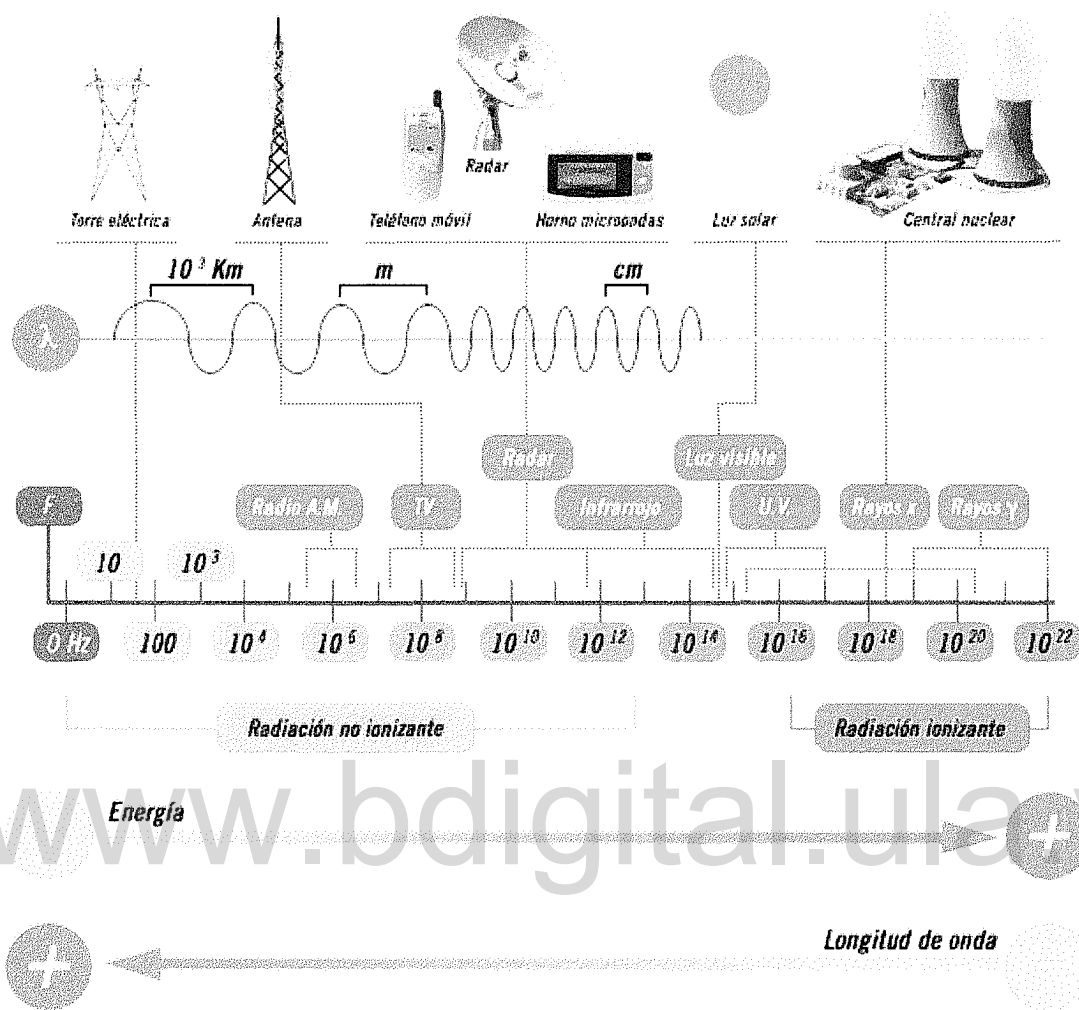


Figura 11. Esquema de las regiones del espectro electromagnético

Para evitar interferencias con las frecuencias de telecomunicaciones y celulares, las MW se usan en las banda ISM (de sus siglas en inglés Industrial, Scientific and Medical, bandas reservadas internacionalmente para uso no comercial de radiofrecuencia electromagnética en áreas industrial, científica y médica) que son 27.12, 915 y 2450 MHz. En vista de esto, tanto los hornos domésticos de MW como los sistemas de laboratorio trabajan a 2,45 GHz. A esta frecuencia los fotones tienen una energía cercana a 0,0016 eV, la cual es muy baja

para romper enlaces químicos y deja claro que este tipo de radiación no pueden inducir reacciones químicas^[111 - 113].

El calentamiento por MW es completamente diferente del convencional (Figura 12). En el convencional, el calentamiento es dirigido a través de la sustancia pasando primeramente por las paredes del recipiente para finalmente llegar al disolvente y los reactivos. En este caso, el calentamiento depende de las corrientes de convección y de la conductividad térmica de los materiales que deben penetrar, lo que provoca que la temperatura del tubo de reacción sea mayor que la de la mezcla de reacción.

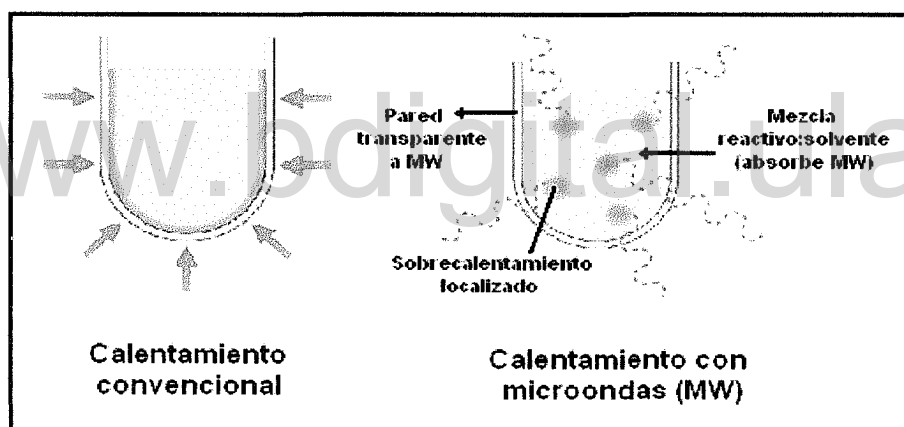


Figura 12. Procesos de calentamiento empleando un sistema convencional e irradiación microondas

En la radiación por MW, el calentamiento se produce por acoplamiento de las MW con las moléculas del disolvente, reactivos o catalizadores presentes en la mezcla de reacción. Los recipientes empleados son transparentes a las microondas por lo que la radiación pasa a través de las paredes directamente a todo el volumen de la

reacción, lo que provoca un gradiente de temperatura inverso con respecto al calentamiento convencional^[114-115] (Figura 13).

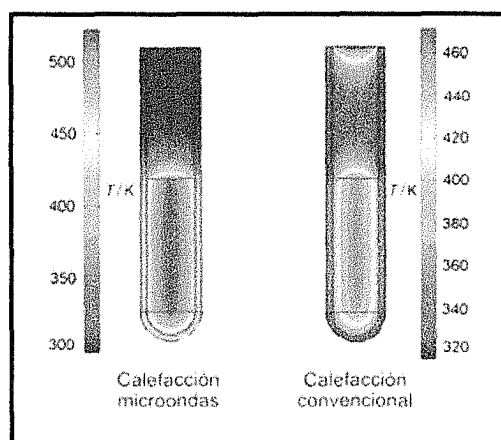


Figura 13. Diferencia de gradiente de temperatura en un proceso de calentamiento microonda y convencional

Las MW, como cualquier radiación electromagnética, consisten en un campo eléctrico y un campo magnético, donde la componente eléctrica es la que provoca el calentamiento por dos mecanismos principales:

- ♦ Rotación dipolar
- ♦ Conducción iónica

La rotación dipolar, también conocida como interacción de dipolos o polarización dipolar, consiste en el alineamiento de los dipolos en el campo eléctrico aplicado (Figura 14.A). A medida que el campo aplicado oscila, los dipolos tienden a orientarse con el campo eléctrico alterno y, en el proceso, a través de la fricción y de las pérdidas dieléctricas, se produce calor. La cantidad de energía generada en este proceso está directamente relacionada con la capacidad de la sustancia de alinearse con la frecuencia del campo aplicado. Es importante mencionar que si el dipolo no tiene

suficiente tiempo para realinearse o si por el contrario, se reorienta demasiado rápido con el campo aplicado, no tiene lugar el calentamiento. Sin embargo, ya que la frecuencia de los sistemas comerciales de MW se encuentra dentro de estos extremos (2,45 GHz), los dipolos moleculares tienen el tiempo para alinearse con el campo pero no de seguirlo de forma precisa. A esta frecuencia el campo eléctrico oscila $4,9 \times 10^9$ veces por segundo, lo que origina un calentamiento rápido de las moléculas. [112, 114, 116, 117].

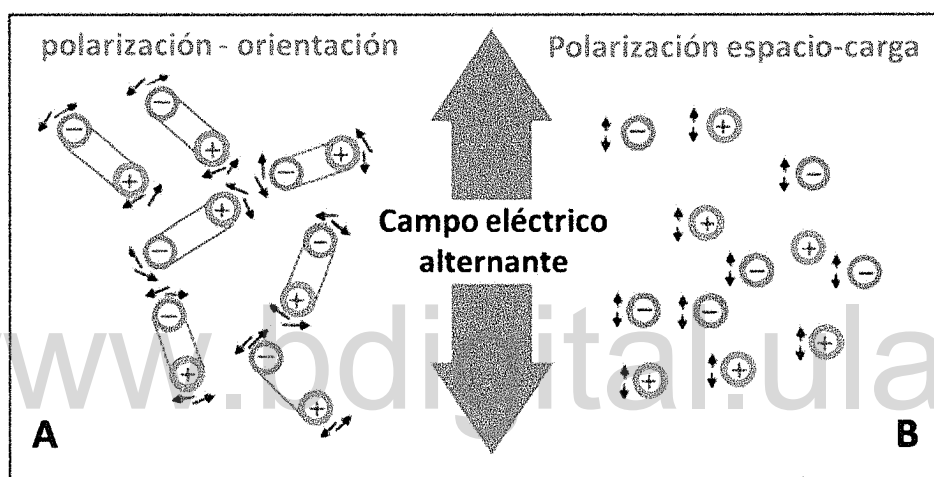


Figura 14. Interacción dipolar con el campo (A) y conducción (B)

Por otro lado, la conducción iónica se genera cuando hay especies iónicas libres o iones libres presentes en la disolución, los cuales oscilan de un lado a otro provocando colisiones con los átomos o moléculas vecinas. Estas colisiones causan agitación o movimiento produciendo calor (Figura 14.B). En general, estas pérdidas dependen del tamaño, carga, conductividad de los iones disueltos y de la interacción de estos últimos con el disolvente[111].

Es conveniente destacar que la rotación dipolar disminuye al incrementarse la temperatura en el material, mientras que la conducción

iónica eleva la temperatura. Esto quiere decir que las microondas generan en primer lugar una mayor rotación, pero a medida que la temperatura se incrementa, la rotación comienza a disminuir y aumenta la conducción iónica.

En vista de que la transferencia de energía se produce por pérdidas dieléctricas, el calentamiento por MW de una muestra depende de:

1. *Factor de pérdida dieléctrica* (ϵ''), que mide la eficiencia de la conversión de la energía electromagnética en calor.
2. *Constante dieléctrica* (ϵ') de la sustancia, que es una medida de la capacidad de las moléculas para ser polarizadas por un campo eléctrico.

www.bdigital.ula.ve

En este sentido, la relación $\epsilon''/\epsilon' = \tan \delta$, denominada *factor de disipación* o *pérdida tangencial*, es una medida de la capacidad de una muestra para convertir la radiación electromagnética en calor. Para que haya un calentamiento efectivo debe haber un balance entre un valor moderado de ϵ' , que permita una adecuada penetración en la muestra y valores altos de ϵ'' y $\tan \delta$ [115]. En la Tabla 4 se muestran los valores de estos parámetros para varias sustancias y permite clasificar a los disolventes en muy absorbentes ($\tan \delta > 0,5$), medianamente absorbentes ($\tan \delta = 0,1 - 0,5$) y poco absorbentes ($\tan \delta < 0,1$) [114,117].

Si dos solventes con constantes dieléctricas comparables, acetona y etanol, se calientan a la misma potencia durante el mismo tiempo, la temperatura final debe ser mucho mayor en etanol que en acetona. Esto se debe a que el etanol posee un factor de disipación mayor que la acetona al

acoplarse mejor con la radiación de microondas, resultando un aumento de temperatura más rápido.

Tabla 4. Constantes dieléctricas para diversos solventes^[114]

Solvente	Punto de ebullición (°C)	Constante dieléctrica (ϵ')	$\tan \delta$
Agua	100	80,4	0,123
Ácido fórmico	100	58,5	0,722
DMSO	189	45,0	0,825
DMF	153	37,7	0,161
Acetonitrilo	82	37,5	0,062
Etilenglicol	197	37,0	1,350
Metanol	65	32,6	0,659
Etanol	78	24,3	0,941
Acetona	56	20,7	0,054
2-Propanol	82	18,3	0,757
Diclorometano	40	9,1	0,127
THF	66	7,4	0,047
Ácido acético	113	6,2	0,174
Cloroformo	61	4,8	0,091
Tolueno	111	2,4	0,040
Hexano	64	1,9	0,020

Al aplicar la radiación por MW para asistir diversas reacciones químicas es importante optimizar ciertos parámetros, como lo son:

- El solvente a utilizar debe poseer un momento dipolar (μ) adecuado, gracias a que la energía de microondas actúa sobre el mismo para favorecer la extracción y/o reacción de los analitos.

- La permeabilidad del contenedor debe tener un factor de disipación bajo.

- El reactivo derivatizante así como el solvente, deben poseer un momento dipolar que favorezca su reacción con el analito, así como

también la estabilidad apropiada para evitar su degradación y la presencia de productos colaterales.

- Forma de aplicar la energía MW ya que es importante asegurar su reproducibilidad al colocar la muestra.

- Tiempo de irradiación, potencia y temperatura: los cuales dependen de diversos parámetros tales como: cantidad de muestra, condiciones de reacción, punto de ebullición y estabilidad de los reactantes, entre otras^[116].

Los distintos autores^[117-119] que han empleado MW para acelerar reacciones de derivatización reportan su gran efectividad, con recuperaciones de los analitos similares y mayores que con los métodos convencionales, mejorando los límites de cuantificación y disminuyendo el tiempo de reacción solo a unos pocos segundos. En base a esto se puede concluir que las principales ventajas del empleo de MW frente al calentamiento convencional son tres: drástica reducción de los tiempos de reacción, aumento del rendimiento y diferencias en la selectividad.

IV. 2.1.5. Separación y detección de los derivados

En los últimos tiempos, la separación de todos estos compuestos se ha llevado a cabo utilizando columnas capilares y la selección del tipo de fase estacionaria va a depender de las propiedades fisicoquímicas que presenten los derivados formados. Por lo general, en el análisis de azúcares, las fases estacionarias de preferencia son las medianamente polares, especialmente aquéllas cuya composición es 5% fenil 95% dimetilpolisiloxanos, ya que han permitido obtener una mejor resolución entre los derivados obtenidos de una mezcla compleja de carbohidratos de diferente polaridad^[120-125].

En lo que respecta a la detección, el detector más utilizado para la determinación de los derivados ha sido el detector de ionización de llama (FID))^[126-128] que ha permitido llegar a límites de detección de hasta 5 ng. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo del acoplamiento CG-EM ha permitido no sólo la separación eficiente sino que también la confirmación de una gran variedad de carbohidratos en base a los espectros de masa de sus derivados^[121-125,129-131], en un intervalo que va desde los 40 hasta los 700 uma.

En este punto es importante señalar que la derivatización de los analitos influye significativamente en la detección por EM ya que mejora la selectividad de la respuesta, permitiendo:

- Simplificar el proceso de identificación.
- Dirigir la fragmentación del compuesto de tal forma de facilitar la elucidación de su estructura
- Incrementar la abundancia del ion molecular (u otro relacionado a éste) a fin de favorecer la determinación del peso molecular.
- Mejorar la sensibilidad del análisis al promover la formación de iones de alta abundancia.

IV. 2.1.6. Tratamiento de la muestra para carbohidratos

Los alimentos son matrices complejas por lo que la determinación de carbohidratos en ellos requiere de un tratamiento previo su introducción en el sistema cromatográfico.

El tratamiento o preparación de la muestra permite convertir una matriz real, en una con formato más simple y apropiado para su análisis,

Wendy Josefina Orozco Contreras

esto se logra disolviendo la muestra en un solvente adecuado y eliminando, en la medida de lo posible, todas aquellas posibles interferencias.

Dentro de los objetivos que se buscan con esta etapa, sobre todo en el análisis de carbohidratos por CG, se tienen:

- Realizar el tratamiento que permita aislar los analitos de la matriz y asegurar su completa disolución en un solvente adecuado.
- Transformar los analitos a la mejor forma química para el método de ensayo que va a emplearse. En caso de CG, mejorar la volatilidad de los analitos la cual debe encontrarse por debajo de los 350 – 400 °C, como ya se dijo.
- Eliminar, en la medida de lo posible, los compuestos endógenos que puedan interferir durante el análisis, ya sea porque producen una señal indistinguible del analito o porque la atenúan.
- No agregar nuevas interferencias (provenientes de reactivos o recipientes de reacción).
- Asegurar la completa ausencia de agua del extracto final, ya que hidroliza los enlaces siloxano en la columna y conlleva a una pérdida de la resolución y deterioro de la columna.
- Diluir o preconcentrar los analitos para que sus concentraciones se encuentren dentro del mejor intervalo para el método a aplicar

En muchas ocasiones hay que utilizar un criterio de selección de tratamiento de muestra, ya que se hace difícil cumplir todos los requisitos mencionados anteriormente y por lo tanto, se debe elegir el que proporcione los mejores resultados.

Uno de los factores más importantes al momento de definir un protocolo para el tratamiento de la muestra, es conocer las propiedades

fisicoquímicas de los analitos a estudiar. En el caso de los carbohidratos se tiene [132]:

✦ Su peso, tamaño y forma molecular. Los pesos moleculares de estos compuestos se encuentran en un intervalo que va desde el de la tetrosa ($C_4H_8O_3$) hasta aquellos polisacáridos con varios miles de unidades de monosacáridos. Por lo general, los monosacáridos se encuentran en forma de anillos hemiacetálicos y el número y tipo de isómeros que pueden formar es mucho mayor que el que cualquier otro grupo de compuestos.

✦ Su solubilidad. Son compuestos solubles en agua o en solventes polares y esta propiedad es función de su peso molecular. La gran mayoría son solubles en agua pero también existen otros como la celulosa y otros polisacáridos que no son solubles en agua. La solubilidad en alcoholes y solventes polares (piridina, dimetilsulfóxido y dimetilformamida) se limita solo a carbohidratos pequeños.

✦ Su reactividad. Presentan una gran reactividad química, pueden reaccionar con ácidos, bases, grupo aminos y otros reactivos. Por ello, es fácil hacer derivados o introducir grupos protectores para grupos funcionales específicos. Por otra parte, a fin de mantener la molécula sin ningún cambio es necesario mantener el pH cerca de la neutralidad.

Los tres analitos a estudiar en este capítulo son sólidos blancos y cristalinos de sabor dulce, muy solubles en agua, poco solubles en alcohol e insolubles en solventes no polares como éter etílico, cloroformo y benceno. En la Tabla 5 se presenta un resumen de sus características fisicoquímicas. En general, son compuestos que no poseen propiedades de emisión de fluorescencia y sólo absorben en el UV a longitudes de onda muy cortas, en el rango de 190 a 210 nm^[98, 132].

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los analitos objetos de estudio

Nombre	Fórmula Molecular	PM (g/mol)	PF (°C)	Densidad (g/mL)	Solubilidad
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,15	146	1,56	agua, etanol, acetona acetonitrilo
Fructosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,15	103	1,60	agua, etanol, metanol, piridina
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,29	186	1,58	agua, piridina, etanol

Para algunas matrices el tratamiento de la muestra es bastante sencillo, solo consta de una disolución y/o filtración de la muestra^[133]. En algunos otros trabajos además de la dilución y filtración se involucra una etapa de extracción como se puede observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Determinación de carbohidratos en diferentes alimentos^[133]

Matriz	T.M	Inositol	Xilitol	Sorbitol	Manitol	Ribosa	Xilosa	Arabinosa	Manosa	Glucosa	Fructosa	Galactosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	Celobiosa
Extracto de papa	D,F									X	X				X	
Té instantáneo	D, F									X	X			X	X	
Cerveza	S, D															
Extracto de malta	D									X			X			
Vodka	D									X	X				X	
Jugo de manzana	D															X
Refresco de cola	D									X	X				X	
Jugo de naranja	D, F	X								X	X				X	
Café instantáneo	E,D,F				X		X	X	X	X	X	X			X	
Dulces	E,D,F									X	X		X	X	X	
Chocolate	E,D,F	X	X	X	X		X	X		X	X			X	X	
Productos lácteos	Dialisis	X		X						X	X	X		X	X	

T.M:tratamiento de la muestra; D: Dilución; E: Extracción; F: Filtración

La extracción es uno de los métodos más utilizados en el tratamiento de la muestra. En la mayoría de los procesos de extracción, la muestra se pone en contacto con un agente extractante (sólido, líquido o fluido supercrítico) en unas determinadas condiciones, de tal forma que se debiliten completamente las interacciones “analito–matriz” a la vez que se incrementan las interacciones “analito–extractante”, aislando selectivamente las sustancias de interés.

Por lo general, los carbohidratos se han extraído utilizando los métodos tradicionales como lo son la extracción líquido – líquido y la extracción sólido – líquido.

La extracción líquido-líquido (ELL) consiste en separar los componentes de una mezcla en solución mediante su distribución en dos fases inmiscibles puesta en contacto íntimo entre sí. Consiste en un único equilibrio entre ambas fases y los resultados pueden mejorarse modificando la relación de volúmenes, ya que es una variable que actúa como factor multiplicativo de la relación de distribución. La selectividad y la eficiencia del proceso de extracción está gobernada críticamente por la elección de los dos disolventes inmiscibles. El equilibrio de extracción está influido por varios factores como: el pH para evitar ionización de bases o ácidos, formación de pares de iones con analitos ionizables, o por adición de sales a la fase acuosa para reducir la solubilidad del analito (salting out).

Su aplicabilidad en la extracción de carbohidratos se ve limitada por la gran variedad estructural de estos analitos así como su baja solubilidad en solventes orgánicos ya que, por lo general, los carbohidratos deben ser retirados y/o recuperados de medios acuosos.

En el caso de muestras sólidas, la separación de los carbohidratos se lleva a cabo a través de una extracción sólido – líquido

(ESL). Esta técnica, también es conocida como lixiviación, consiste en la separación de uno o varios solutos contenidos en una fase sólida mediante su contacto con un disolvente líquido que los disuelve selectivamente, pudiendo tratarse de una simple disolución física o de una reacción química que libera al soluto de la matriz sólida.

Para la extracción sólido-líquido se suele emplear un aparato Soxhlet, que es un aparato de extracción continua.

La extracción Soxhlet es un método estándar y el instrumento es sencillo. Consiste de: un matraz de base redonda que contendrá el disolvente orgánico volátil, un contenedor intermedio de vidrio en el cual se coloca la muestra dentro de un cartucho (dedal) poroso al disolvente y un refrigerante. El procedimiento consiste en poner la muestra sólida finamente pulverizada en el cartucho que se sitúa en la cámara del extractor Soxhlet. El matraz se calienta con una manta calefactora hasta que el disolvente orgánico se evapora y el vapor atraviesa el cartucho que contiene la muestra ascendiendo por el contenedor hasta el refrigerante. Cuando el vapor de disolvente llega al refrigerante este condensa y cae en forma líquida de nuevo en dirección al matraz pero, en su camino, este golpea con la muestra disolviéndola. El analito disuelto en el disolvente descarga sobre el matraz. Cuando el proceso de disolución se da por finalizado se añade una última etapa: la evaporación. El disolvente se evapora por calentamiento concentrando la muestra^[134]. La extracción Soxhlet se utiliza cuando el solvente extractante es orgánico y volátil y normalmente requiere de grandes volúmenes (superiores a 150 mL) de éstos. Además, el reflujo con tales disolventes y la muestra sólida debe realizarse a lo largo de 6 a 24 horas por lo que el procedimiento implica un trabajo tedioso y largo en el tiempo^[134].

Sin embargo, cuando trabajamos con cantidades pequeñas de muestras (<1g) también puede emplearse un método directo, extracción por agitación con ultrasonidos (sonicación)^[135,136].

Los ultrasonidos son ondas sonoras con una frecuencia de vibración entre 16 kHz a 1 GHz. Esas ondas generan en el medio un fenómeno conocido como cavitación acústica, que consiste en la formación de burbujas y su posterior implosión^[135]. El colapso de estas burbujas genera microgradientes con elevadas presiones y temperaturas, durante intervalos de tiempo cortos^[135-137], que no son perceptibles en el sistema como un conjunto debido al pequeño tamaño de las burbujas.

En Química Analítica, la irradiación con ultrasonidos ha sido utilizada como una herramienta poderosa, para la extracción de diferentes analitos de muestras sólidas. La muestra sólida se deposita en un tubo de vidrio, se añade la cantidad suficiente de disolvente y, generalmente, se introduce en un baño de ultrasonidos, aunque también existe la posibilidad de introducir una aguja sónica en la muestra^[135,136,138]. El efecto mecánico de ultrasonidos favorece la penetración del disolvente en el sólido, acelerando la transferencia de masa y mejorando la eficiencia de la extracción^[136,136]. Después de la extracción, el extracto que contiene los analitos de interés se separa por centrifugación y/o filtración. Con esta técnica se acorta el tiempo de extracción debido a que se produce un incremento en la presión, que favorece la penetración y el transporte de los compuestos, y un incremento de la temperatura que aumenta la solubilidad y favorece la difusividad.

Las variables que afectan al sistema, y por lo tanto a la eficiencia de la extracción, son la frecuencia e intensidad de la radiación, tiempo de extracción, temperatura y tamaño de partícula de la muestra.

Se trata de un método simple, que ofrece la posibilidad de realizar varias extracciones simultáneamente [135-137].

Por lo general, la utilización de ultrasonidos ayuda a las técnicas de análisis químicos de diferentes formas:

- ⇒ Favorecer la extracción sólido-líquido.
- ⇒ Reducir extracción secuencial.
- ⇒ Acelerar la extracción sólido – líquido de especies orgánicas.

El agua es uno de los solventes más utilizados en la extracción de los carbohidratos sobre todo los monosacáridos y disacáridos y varios autores la han utilizado como solvente de extracción^[71,70,98] (Tabla 7) y particularmente en muestras de cacao^[10,27,29,55].

Tabla 7. Extracción sólido-líquido para muestras sólidas^[98]

Mátriz	Extractante	Tratamiento luego de la extracción
Ajo y Cebolla	H ₂ O con recirculación	Centrifugación, filtración y dilución con KCl 0,01 M
Galletas, chocolate y tortas	H ₂ O y sonificación	Dilución y filtración
Caramelo y Chicle	H ₂ O a 60 °C	Centrifugación, filtración de la suspensión, dilución y filtración
Dulces	H ₂ O y sonificación	Dilución y Filtración
Queso	H ₂ SO ₄ Diluido	Centrifugación y Filtración
Té	H ₂ O hirviendo	Filtración y Dilución

IV.3. Propuesta metodológica

La cromatografía de gases es una técnica rápida, genera separaciones eficientes con buena resolución entre los picos, presenta una excelente capacidad de separar mezclas complejas y se encuentra accesible en muchos laboratorios de análisis de rutina. Sin embargo, al determinar carbohidratos a través de esta técnica, deben tomarse en cuenta los grupos polares que poseen sus estructuras moleculares, por lo que se requiere de su transformación para lograr la volatilidad necesaria antes de la introducción al sistema cromatográfico.

Para solventar esta limitación se piensa realizar la derivatización de los analitos utilizando el reactivo de sililación N-metil-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) que los transformará en derivados volátiles y estables térmica e hidrolíticamente. Además los derivados presentarán patrones de fragmentación específicos en el espectrómetro de masas, lo cual favorecerá su confirmación.

Adicionalmente, con el fin de acelerar las reacciones de derivatización de los aminoácidos y carbohidratos, pensamos asistir la reacción con radiación por microondas.

En ese sentido, teniendo en cuenta todas estas premisas, se propone desarrollar

→ *Una metodología por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masa y derivatización asistida por microondas para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de cacao venezolanos a medida que transcurre el proceso de fermentación y tostado.*

Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

IV.3.1. Objetivo general:

⊕ Desarrollar y validar un método para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de cacaos cultivados en Venezuela por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas y derivatización asistida por microondas.

IV.3.2. Objetivos específicos:

⊕ Seleccionar un reactivo de sililación para derivatización de los azúcares presentes en muestras de cacao que permita su separación por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas

⊕ Seleccionar la columna analítica y optimizar un método por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas que permita la separación, detección y cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa.

⊕ Estudiar los parámetros involucrados en la reacción de derivatización asistida por microondas (tiempo y potencia de reacción)

⊕ Aplicar la metodología desarrollada para determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de distintos tipos de cacaos cultivados en diferentes regiones de Venezuela.

IV. 4. Metodología experimental

IV. 4.1. Reactivos, solventes y patrones

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, los solventes de grado HPLC y el agua fue purificada en sistema Milli-Q SP TOC (Water. Millipore, Milliford, MA, USA). El acetonitrilo fue suministrado por J. T Baker (Phillisbrug, NJ, USA) y los gases Aire (99,999%), Nitrógeno (99,999%) y Helio (99,999%) se obtuvieron a través de AGA de Venezuela.

El reactivos derivatizante utilizado en este trabajo fue el N-metil-N- trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), proporcionado por Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)

Los patrones de glucosa, fructosa y sacarosa se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, España). Las soluciones madres de los distintos analitos (10.000 µg/mL) se prepararon en agua y se almacenaron en frascos ámbar, bajo refrigeración a 4 °C. Las soluciones de trabajo a los diferentes niveles de concentración se prepararon diariamente por disoluciones sucesivas en acetonitrilo.

IV.4.2. Extracción de los carbohidratos de las muestras de cacao

En un tubo de ensayo se pesaron 0,800 g de polvo de cacao desgrasado y se sometieron a un proceso de extracción con 15 mL de agua desionizada (18 Ω). El tubo se colocó en un baño ultrasónico a 60 °C durante 15 min. El extracto obtenido se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000 r.p.m. El sobrenadante se transvasó a un matraz aforado de 25 mL, se enrasó con agua y se filtró al vacío utilizando filtros Millipore de 0,22 µm (Waters Corporation. Milford, Massachussets

USA). Finalmente, se tomaron 200 μL del filtrado, se llevó a sequedad en un baño de agua a 80 °C con flujo de nitrógeno y se realizó la reacción de derivatización de los azúcares. Los derivados se analizaron por el sistema cromatográfico propuesto

IV. 4. 3. Sistema cromatográfico

Se utilizó un cromatógrafo de gases VARIAN modelo 3800 acoplado a un espectrómetro de masas VARIAN Saturno 2000 (con analizador de trampa de iones) y un automuestreador VARIAN modelo 8200 con un carrusel para 48 viales de 2,0 y 0,1 mL.

El procesamiento de los datos y el control de los parámetros instrumentales se llevaron a cabo mediante un computador Dell (OptiPlexGxa) equipado con el software correspondiente. La identificación de los analitos se realizó utilizando las librerías WILEY y NIST integradas al software del equipo

El inyector se utilizó bajo la modalidad de splitless (división controlada de la muestra), con un tiempo de cierre para la válvula solenoide de 0,7 min.

La separación de los analitos se realizó en una columna capilar de sílice fundida con un 5% fenil, 95% metilpolisiloxano (VA-5MS) de 30 m x 0,25 mm de espesor de película suministrada por VARIAN. El programa de temperatura del horno que permitió la mejor resolución de los analitos fue: 100 °C (3 min) hasta 170 (1min) con una rampa de temperatura de 15 °C/min, luego hasta 300 °C (4 min) a 7 °C/min, empleando como gas de arrastre helio a un flujo de 1,0 mL/min.

La modalidad utilizada para el detector de masas fue de impacto electrónico (70 eV), las temperaturas de la línea de transferencia, manifold

y trampa de iones fueron 230, 40 y 280 °C, respectivamente. Los iones seleccionadas para el monitoreo de ion específico (SIM) fueron: m/z 147, 217, 437 para la fructosa, 191, 204, 217 para la glucosa y 204, 217, 361 para la sacarosa.

IV. 4.4. Resultados y discusiones

El término optimización se utiliza generalmente en química analítica para designar aquellos experimentos que tienen como fin descubrir las condiciones en las cuales debe aplicarse un procedimiento para producir la mejor respuesta posible. Es decir, consiste en encontrar los valores que debe tomar cada factor para asegurar un buen rendimiento.

Para optimización de los parámetros instrumentales de los sistemas propuestos en este trabajo se utilizó el método univariado, los cuales estudian la influencia de cada factor por separado, es decir, variando un parámetro a la vez mientras los demás factores permanecen constantes.

En este sentido, los distintos parámetros a optimizar se presentan a continuación:

a. *Reacción de derivatización asistida por microondas:*

⇒ Tiempo de Irradiación

⇒ Potencia de Irradiación

b. *Separación cromatográfica:*

⇒ Selección de la columna cromatográfica

⇒ Condiciones cromatograficas para obtener una buena resolución entre los analitos en un tiempo de análisis satisfactorio (programa de temperatura del horno, programa de temperatura del inyector y flujo del gas portador).

c. Sistema de detección:

⇒ Condiciones del detector de masas para lograr la mejor sensibilidad para la detección de los distintos aminoácidos en las muestras de licor de cacao (modalidad de impacto electrónico, temperatura de la línea de transferencia, de la trampa y del manifold).

IV. 4.4.1. Reacción de derivatización de azúcares

Los requisitos fundamentales para separación y análisis por CG es que los analitos deben ser térmicamente estables, volátiles y no encontrarse en solución acuosa. En consecuencia, los carbohidratos, que son compuestos altamente polares, muy hidrofílicos y muy poco volátiles, y como ya se dijo, deben modificarse a fin de poder disminuir su polaridad y así, transformarlos en derivados volátiles y estables antes de su análisis.

En este sentido, como se mencionó anteriormente, se han desarrollado diversos métodos de derivatización para los azúcares, donde los más comunes involucran reacciones de acilación y sililación.

En las reacciones de acilación, los analitos con hidrógenos activos son transformados a ésteres, tioésteres y amidas mediante la acción de ácidos carboxílicos y/o derivados. Debido a la presencia de ácido residual en el medio, los derivados no pueden inyectarse directamente en el cromatografo y es necesario un paso previo de limpieza del derivado [139].

En el caso de las reacciones de sililación, los hidrógenos activos son sustituidos por grupos trimetilsilil, donde la alta volatilidad y buena estabilidad térmica de los derivados formados los ha convertidos en los más populares para el análisis de sacáridos por CG. Además, que a diferencia de la acilación, los derivados pueden inyectarse directamente al equipo y la reacción puede llevarse a cabo en un solo paso.

En la Tabla 2 (página 69) se presentan los reactivos más utilizados para este tipo de reacciones.

Para este estudio, se evaluó el uso del N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) como agente derivatizante, ya que permite obtener derivados más volátiles en comparación a sus análogos (BSTFA, BSA, etc). La reacción general para este tipo de reacción se presenta en la Figura 15.

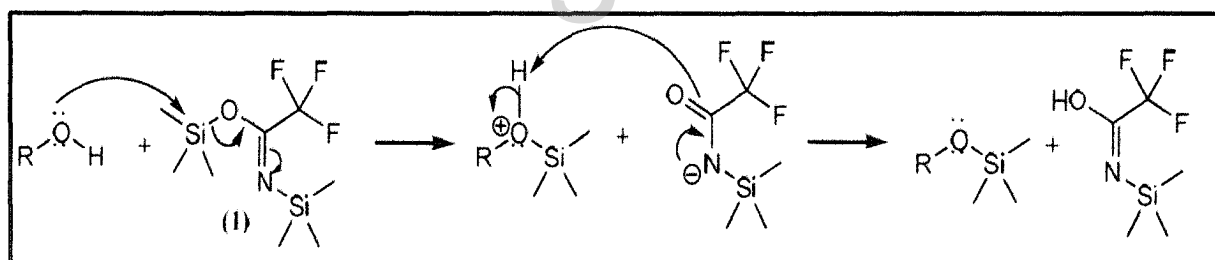


Figura 15. Mecanismo de formación de los trimetilsilil derivados.

La reacción ocurre a través de un ataque nucleofílico SN_2 ; el heteroátomo más electronegativo del analito ataca el átomo de silicio del agente derivatizante lo que reduce las interacciones dipolo – dipolo y aumenta la volatilidad de la molécula^[104,107,109]. El empleo de MSTFA mejora los rendimientos de la reacción, al poseer un buen grupo saliente, más electronegativo, capaz de estabilizar la carga negativa durante el estado de transición.

En general, este tipo de reacciones involucran largos tiempos de reacción (entre 1 y 3 horas) a temperaturas superiores a los 70 °C [123,139,140]. En este sentido, con el fin de poder disminuir estos tiempos de reacción, se propuso emplear la radiación de microondas como forma de calentamiento.

Para ello, se estudió la reacción de derivatización de los analitos con MSTFA asistida por MW. Se evaluó el efecto, sobre la reacción de derivatización, del: tiempo y la potencia de irradiación y la relación reactivo derivatizante: analito (v/v).

IV. 4.4.1.1. Efecto del tiempo y potencia de irradiación

Para evaluar el efecto de estas dos variables sobre la reacción de derivatización de cada analito se siguió el siguiente protocolo. En un vial se colocaron 50 μL de la solución patrón de los analitos de concentración 5 $\mu\text{g/mL}$ en acetonitrilo y se le adicionaron 100 μL del reactivo MSTFA. El vial se sometió a irradiación por MW en un horno de microondas doméstico (LG Intelowave, MS-0745V) a una potencia determinada y durante un tiempo de irradiación. Los tiempos estudiados fueron 30, 60, 90 y 120 seg a tres potencias distintas 210, 420 y 630 W, es decir, a tres temperaturas distintas de reacción. Los resultados obtenidos para cada analito se presentan en la Figura 16.

En los gráficos se puede apreciar en general como a medida que se incrementa el tiempo de irradiación tiene lugar un aumento en el área de pico del analito. Adicionalmente, el cambio en el área es mayor para una potencia de 630 W. De igual forma, se observa que al usar esta potencia de irradiación la reacción presenta un máximo a los 60 seg, a valores superiores prácticamente permanece constante. Por otra parte, es importante mencionar que a 90 y 120 seg de irradiación ocurría una

sobrepresión en el vial que contenía la muestra, motivo por el cual se estableció como tiempo óptimo de irradiación 60 seg a una potencia de 630 W.

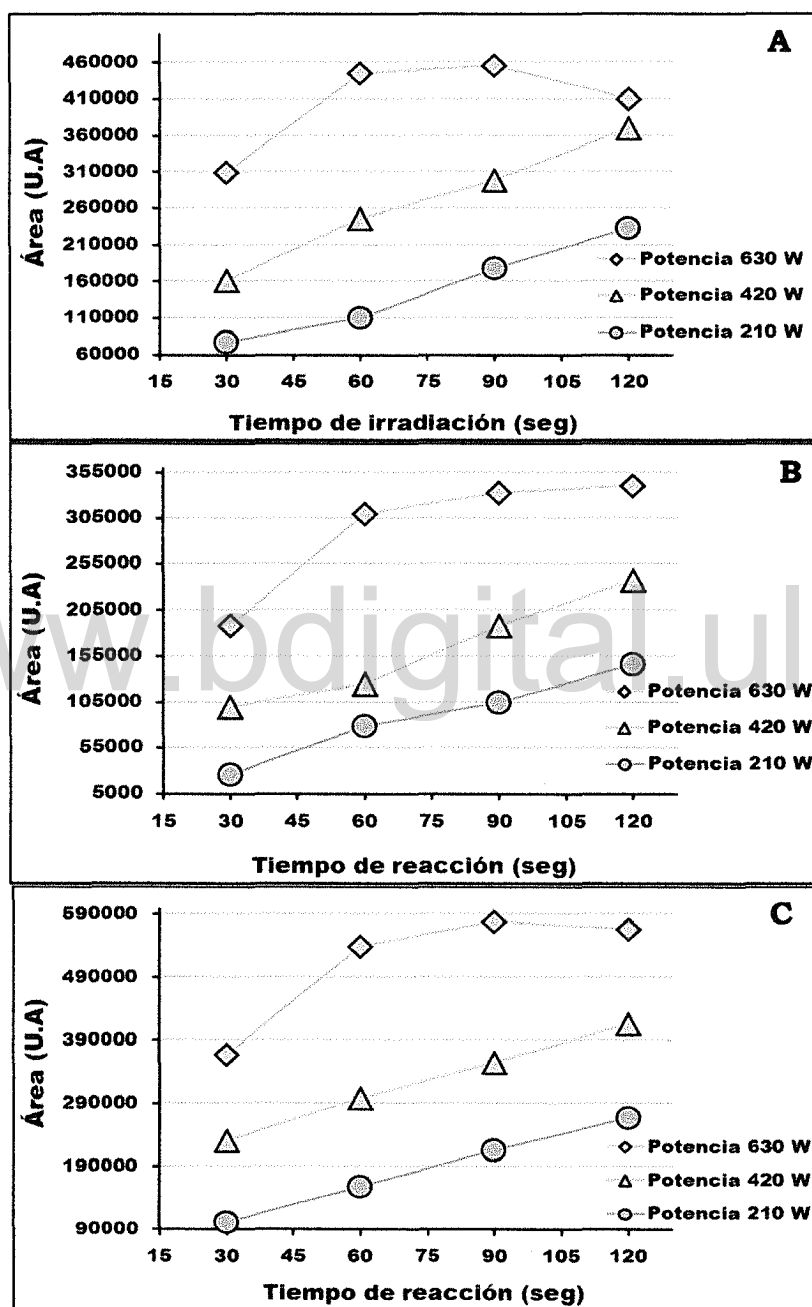


Figura 16. Efecto del tiempo de irradiación con microondas a tres potencias distintas para la reacción de sililación de una mezcla en acetonitrilo de 5 $\mu\text{g/mL}$ de fructosa (A), glucosa (B) y sacarosa (C).

A fin de complementar estos estudios y corroborar que el calentamiento por MW no disminuía la eficiencia de la reacción de derivatización, se llevó a cabo la sililación de los analitos en estudio usando calentamiento convencional en un baño termostatzado a 70°C durante 3 horas^[123].

Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico de barras de la Figura 17; se puede apreciar como el empleo de radiación por MW incrementa significativamente la velocidad de la reacción, ya que el área de los derivados obtenidos por calentamiento por irradiación con MW son mayores que las obtenidas por el método de calentamiento convencional. En consecuencia, se puede decir que el uso de MW nos permitió disminuir significativamente el tiempo de reacción de 3 horas a 1min, sin afectar los rendimientos de la reacción.

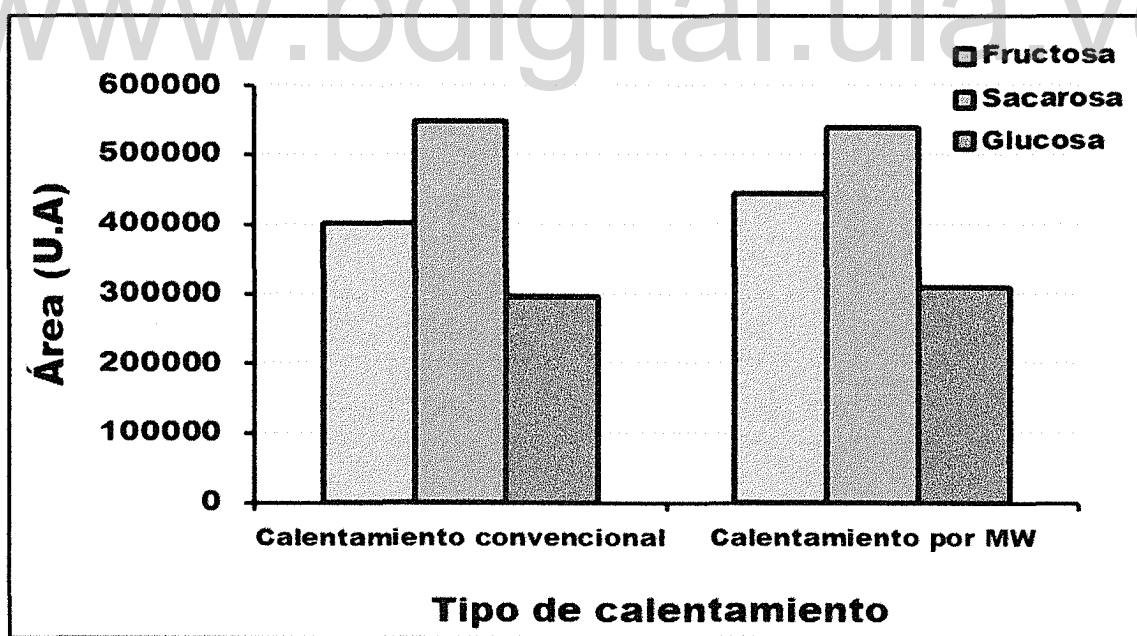


Figura 17. Comparación de las áreas de los derivados obtenidos en la reacción de derivatización de una solución de fructosa, glucosa y sacarosa en acetonitrilo de 5 µg/mL por calentamiento convencional (3 horas a 70 °C) y por MW (60 seg a 630W).

IV. 4.4.1.2. Relación reactivo derivatizante: analito

Con el objeto de asegurar la completa derivatización de los analitos en estudio, se llevó a cabo un estudio de la relación volumétrica del reactivo derivatizante en función del volumen de la mezcla de los analitos. Para ello se seleccionó un volumen fijo de mezcla y se varió el volumen de reactivo derivatizante. El estudio se realizó para dos niveles de concentración de los analitos de acuerdo a los valores reportados para muestras de cacao en la literatura^[29]: 0,18 – 18,78 g/Kg. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 18 donde se observa: que luego de la relación 1:2 (v/v) las variaciones en las áreas de los analitos son pequeñas. Sin embargo, a fin de obtener el máximo de conversión de los analitos en derivados volátiles se seleccionó como relación analito:reactivo derivatizante la de 1:4 (v/v) para el resto de los análisis.

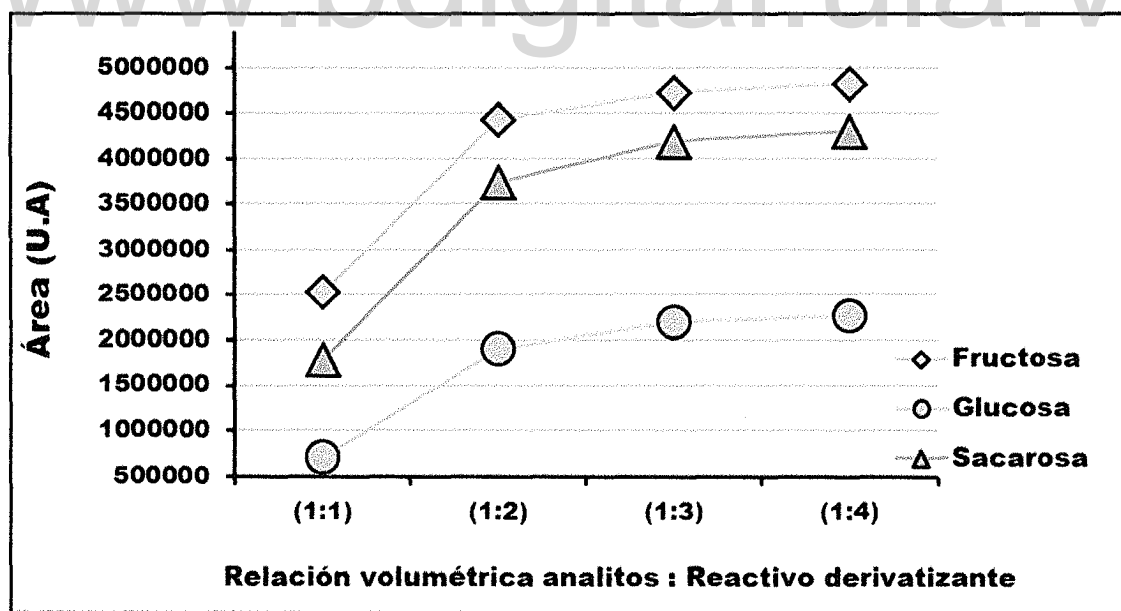


Figura 18. Estudio de la relación analito:MSTFA (v/v)

IV. 4.4.2. Separación cromatográfica

Resolución (Rs): magnitud que expresa el poder de resolución de la columna y se define:

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_2 + w_1}$$

tr: tiempos de retención de dos analitos contiguos
w: anchos de los picos a la base

Esta magnitud depende:

- ▶ *Parámetros termodinámicos:* determinan la retención (t_r : depende de la naturaleza de la fase estacionaria y de la temperatura)
- ▶ *Parámetros cinéticos:* determinan la eficiencia de la columna (w : ancho del pico a la base, depende de: flujo del gas de arrastre, características de la columna)

Por ello la optimización de una separación con una buena resolución pasa por:

- ⇒ *Selección de la columna:* naturaleza de las fase estacionaria, longitud y diámetro, espesor de fase estacionaria.
- ⇒ *Naturaleza del gas de arrastre* y flujo del gas de arrastre.

Para obtener una buena retención lo primero fue seleccionar una columna con una fase estacionaria que retuviera los derivados. Teniendo en cuenta que los derivados sililanzados (TMS-azúcares) son compuestos de baja polaridad, se seleccionó:

● Una columna capilar Agilent HP-5ms (5% fenil - 95% metilpolisiloxano), de 30 m x 0,25mm con un espesor de película de 0,25 μm . (Figura 19)

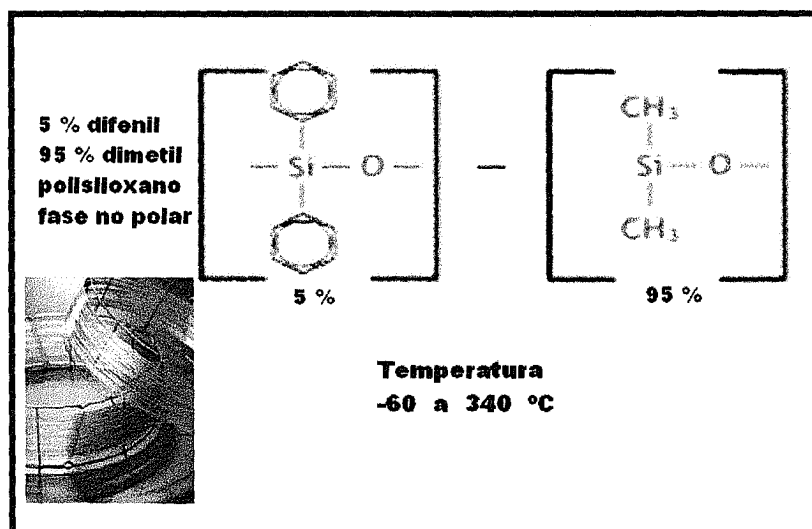


Figura 19. Composición de la fase estacionaria de la columna

Es una columna del tipo WCOT (wall coated open tubular) o de pared cubierta. Consiste en un tubo capilar de sílice fundida con una cubierta protectora de poliimida en su exterior y cuya pared interna está cubierta por una película de la fase estacionaria. Para este tipo de columna capilar se recomienda el empleo de Helio como gas de arrastre, debido a su gran difusibilidad e inercia química.

Una vez seleccionada la columna cromatográfica y el gas de arrastre, se procedió a la separación de los derivados y los parámetros involucrados en la optimización fueron:

⇒ Flujo del gas portador

⇒ El programa de temperatura en la columna que determina los tiempos de retención de los analitos

⇒ *La temperatura del inyector*, que permitiera la completa volatilización del extracto de la muestra inyectado.

⇒ *El volumen de muestra a inyectar*, influye en la eficiencia de la columna.

El flujo del gas portador afecta la duración del proceso cromatográfico, así como también lograr una buena eficiencia en la separación. A medida que se aumentaba, se obtenían picos más finos y tiempos de retención menores. Sin embargo, flujos superiores a 1 mL/min reducen la sensibilidad del detector de masas debido a que el gas portador inhibe la ionización y la fragmentación de los analitos. Adicionalmente aumentaba el sangramiento de la columna. En vista de esto, se fijó a 1ml/min el flujo de He para la separación de los analitos.

La temperatura es el factor clave en CG y existen dos zonas donde esta variable debe controlarse con precisión: en la zona de inyección y en la columna (horno).

En el inyector, la temperatura debe ser relativamente alta, consistente con la estabilidad térmica de la muestra pero que permita la volatilización de toda la muestra antes de entrar a la columna. Teniendo en cuentas estas premisas, se fijó a 280 °C la temperatura del inyector.

El otro parámetro que se optimizó fue la cantidad de muestra a inyectar en la columna que depende de la capacidad de carga de la columna y está relacionada con la eficiencia (obtención de picos finos y simétricos) y con la sensibilidad necesaria para detectar los analitos en las muestras de cacao. En consecuencia, se debe lograr un buen compromiso entre una buena resolución y los parámetros mencionados. En este trabajo se utilizó la modalidad "Splitless" en la cual la totalidad de la muestra es

100

inyectada en la columna, la línea "Split" se encuentra cerrada por la válvula solenoide un tiempo programado (Figura del Split 20). Cuando la transferencia de la muestra ha sido completa, se abre la línea "Split" para limpiar el inyector. De esta forma se logra una sensibilidad mayor que el "Split" que por el contrario divide la muestra antes de su entrada en la columna. El mejor resultado se obtuvo realizando la inyección con la modalidad Splitless con un tiempo de cierre de la válvula solenoide de 0,7 min y se fijó para el resto de los análisis.

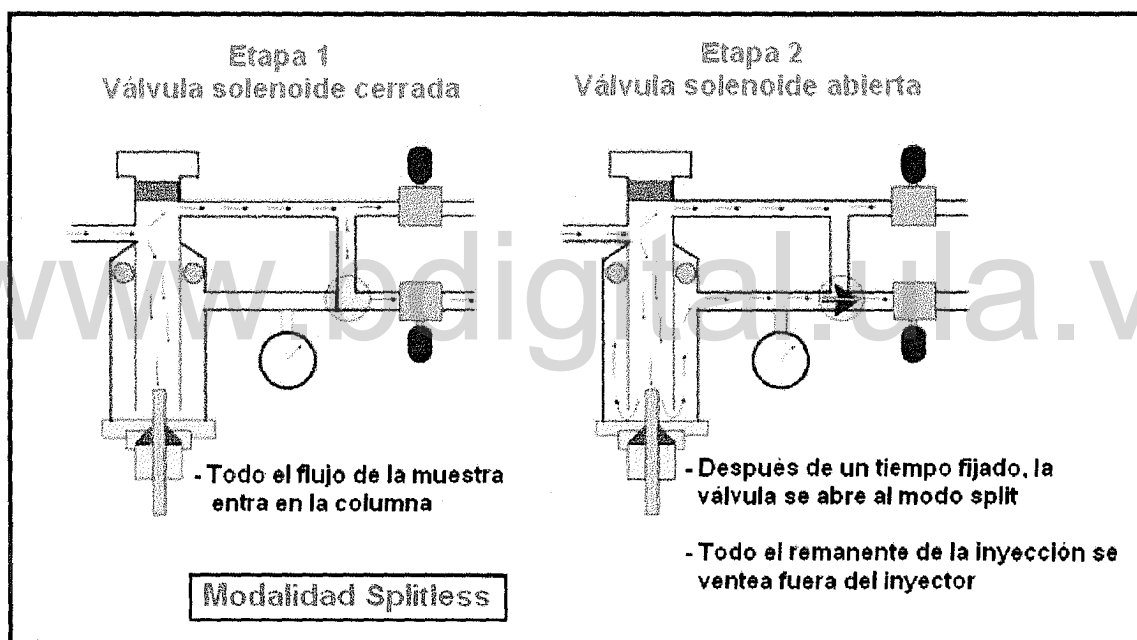


Figura 20. Configuración del inyector: modalidad splitless

La temperatura de la columna es una variable fundamental para lograr la separación ya que influye sobre la constante o relación de distribución de los analitos (reparto entre la fase gaseosa y la fase estacionaria). Por ello la columna se introduce dentro de un horno de temperatura controlada. La temperatura óptima depende del punto de ebullición de los analitos y del grado de separación requerida. A altas

temperaturas los componentes de la muestra pasarán la mayor parte del tiempo en la fase gaseosa, por lo que eluyen con rapidez pero con una resolución. A bajas temperaturas, los analitos pasaran más tiempo en la fase estacionaria y se eluirán con lentitud, la eficiencia disminuye por el ensanchamiento de los picos y la resolución es incompleta. Por ello es necesario la optimización de la temperatura y en general, caben dos posibilidades: **(a) Modalidad Isotérmica**, en la que la temperatura permanece constante durante toda una corrida. **(b) Modalidad gradiente de temperatura**, en la que durante el proceso de separación cromatográfica se varía de manera gradual y estrictamente controlada. Para el caso de mezcla de varios componentes con diferentes puntos de ebullición, se ajusta la llamada rampa de temperatura con lo cual ésta va aumentando ya sea de forma continua o por etapas (*gradiente de temperatura*). En nuestro caso, se trabajó con la modalidad gradiente de temperatura y se optimizó variando la temperatura inicial, final y las velocidades de calentamiento (rampa). Se estableció el siguiente programa de temperatura para la columna: 100 °C (3 min) hasta 170 °C a una velocidad de calentamiento de 20,0 °C/min y luego hasta 300 °C (3min) a una velocidad de 7 °C/min.

IV. 4.4.3. Sistema de detección

Como se mencionó anteriormente, el detector espectrómetro de masas se basa en la ionización de una muestra en estado gaseoso usando diversos procedimientos para ello. Los iones producidos son separados de acuerdo con su relación masa/carga, finalmente son enviados a un detector el cual los registra y los cuantifica en función de su abundancia relativa. Dependiendo del método que se emplee para producir la ionización de la muestra, van a depender los parámetros involucrados en la optimización de la detección.

Para el desarrollo de este trabajo se empleó ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, por lo que las variables a tener en cuenta durante la detección fueron:

✓ **Corriente de emisión del filamento**, que controla la emisión y aceleración de los electrones que van a colisionar con las moléculas de los analitos que emergen de la columna en la cámara de ionización. Al variar la corriente del filamento se encontró que a medida que aumentaba, la señal crecía, pero a valores superiores a 30 μA también aumentaba el ruido de fondo y la relación señal/ruido disminuía por lo que se perdía sensibilidad. Por ello se estableció 20 μA como corriente del filamento.

✓ **Voltaje del electromultiplicador (detector)**, el cual es fijado directamente por el equipo, el valor aportado fue de 2550 V. Sin embargo, hay una variable que puede manejarse y que indirectamente influye en el voltaje del electromultiplicador que es el *multiplicador offset* que puede variarse entre 0 – 200V y aumenta el voltaje del detector en el momento de la salida del analito aumentando así la sensibilidad. Este parámetro se estableció en 100 V.

✓ **Modulación axial de la trampa de iones (analizador)**, influye directamente en la calibración de la misma y se fijó en 3,9 V.

✓ **Temperatura del trampa, del manifold de la trampa y línea de transferencia** se fijaron en 280, 40 y 250 °C, respectivamente.

Por otra parte, en vez de hacer las medidas en todo el intervalo de la masa molecular (en el caso de CG-MS entre 40-650 u.m.a.) el instrumento se programó para medir masas concretas. A esta forma de trabajar se le denomina monitorización de ion específico (SIM). De esta forma se obtienen cromatogramas de menor número de picos y límites de detección mejores.

En la Tabla 8 se resumen las condiciones optimizadas tanto del sistema de separación como el de detección.

Tabla 8. Condiciones optimizadas del sistema cromatográfico

EQUIPO	PARÁMETRO	VALOR
AUTOMUESTREADOR	Volumen de inyección	1 µL
	Modalidad de inyección	splitless
	Temperatura del inyector	280 °C
	Columna capilar HP-5ms (5% fenil – 95% metilpolisiloxano) Agilent	30 m x 0,25mm, espesor de película: 0,25 µm
	Programa de temperatura de la columna	100 °C(3min) → 170 °C (20 °C/min) → 300 °C (7 °C/min, 3min)
	Gas portador	Helio
	Flujo del gas portador	1 mL/min
	Volumen de inyección	Splitless (0,7) min
CROMATÓGRAFO DE GASES	Modalidad	Impacto electrónico (70 eV)
	Corriente del filamento	20 µA
	Temperatura de la línea de transferencia	240 °C
	Temperatura del manifold	40 °C
	Temperatura del trampa	280 °C
	Voltaje del electromultiplicador	2550 V
ESPECTRÓMETRO DE MASAS		

Bajo estas condiciones se inyectó una mezcla de todos los derivados preparados a partir de una solución patrón de fructosa, glucosa y sacarosa de 5 $\mu\text{g/mL}$ en acetonitrilo y tratada con el procedimiento propuesto. En la Figura 21 se muestra el cromatograma obtenido.

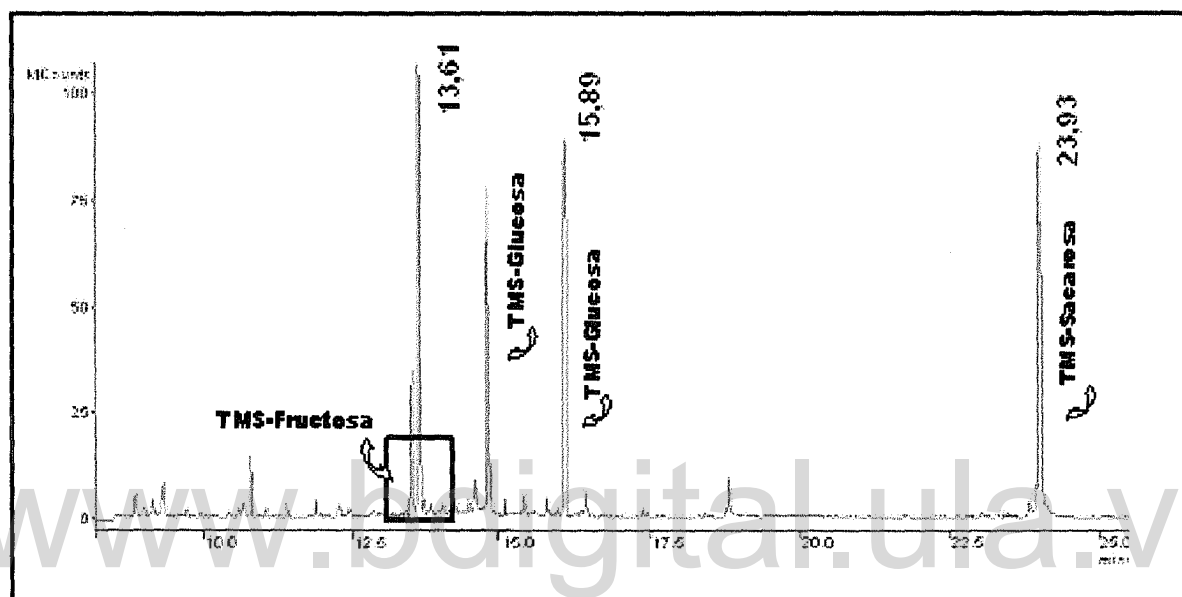


Figura 21. Cromatograma obtenido para una mezcla de patrones de fructosa, glucosa y sacarosa de concentración 5 $\mu\text{g/mL}$ en acetonitrilo

Se puede apreciar que luego de la sililación se observan varios picos del derivado para cada analito. La identificación de cada uno de estos picos se llevó a cabo inyectando de manera individual cada uno de los patrones derivatizados.

Para el caso de la fructosa, el cromatograma obtenido se presenta en la Figura 22. Se observa que el derivado TMSi-fructosa inyectado genera 3 picos (13,48, 13,61 y 13,75 min), los cuales se han asociado al predominio de ciertas formas tautoméricas de la fructosa, los anómeros α - y β - de las formas furanosa y piranosa^[109].

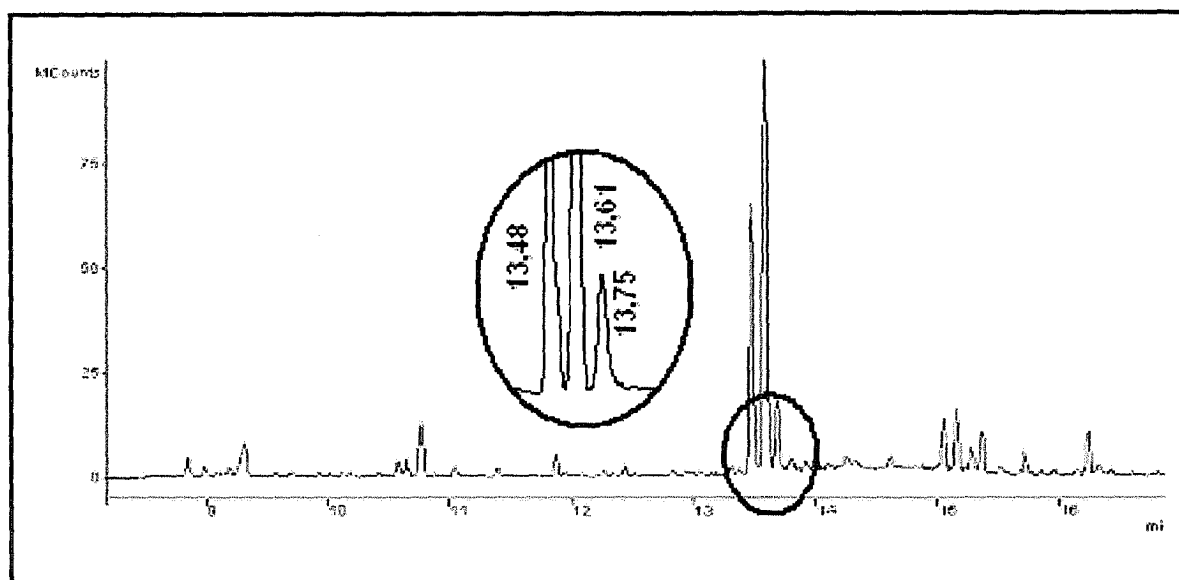


Figura 22. Cromatograma obtenido para una solución de fructosa de 5 µg/mL en acetonitrilo derivatizada por el procedimiento propuesto

Es importante recordar que se define anómero a los isómeros de los monosacáridos de más de 5 átomos de carbono que han desarrollado una unión hemiacetalica que les permitió tomar una estructura cíclica y determinar 2 diferentes posiciones para el grupo hidroxilo, α o β si su orientación es bajo el plano o sobre el plano respectivamente^[66,67].(Figura 1 y2)

Estos anómeros poseen diferentes propiedades, lo que permite su separación por CG y su identificación puede llevarse a cabo por EM.

En las Figuras 23, 24 y 25 se muestran los espectros de masas obtenidos para cada uno.

Los dos primeros picos del cromatograma a tiempos de retención 13,48 y 13,61 min (Figura 22) presentan el mismo espectro de masas (Figuras 23 y 24), cuyo ion de fragmentación más abundante es el m/z

217 y corresponde a las formas α - y β - furanosa del TMS-fructosa de acuerdo con lo reportado en la bibliografía [123,140,141].

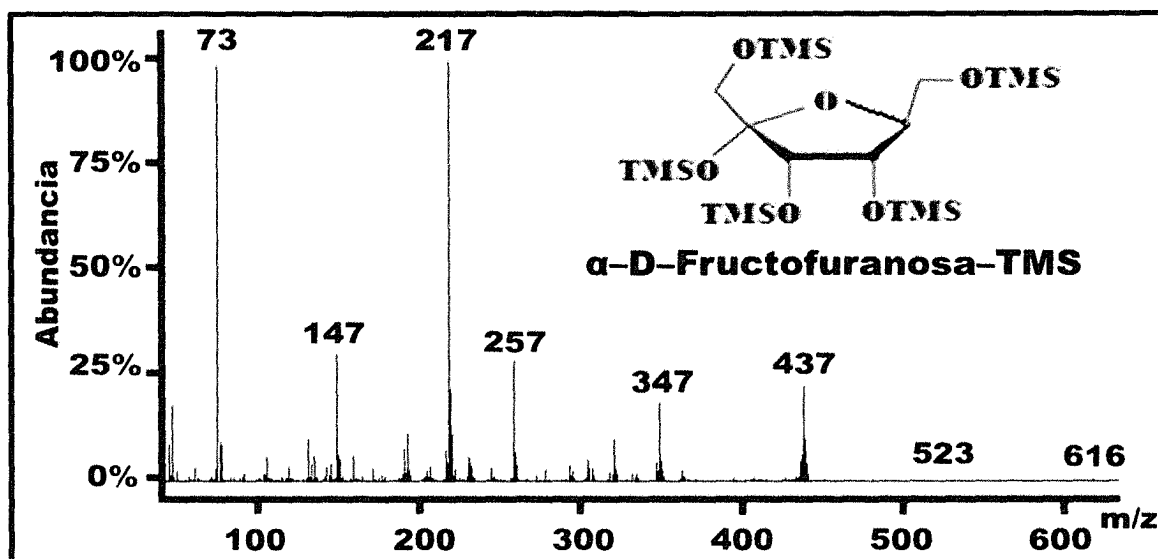


Figura 23. Espectro de masas de α -Fructofuranosa-TMS (tr=13,48 min)

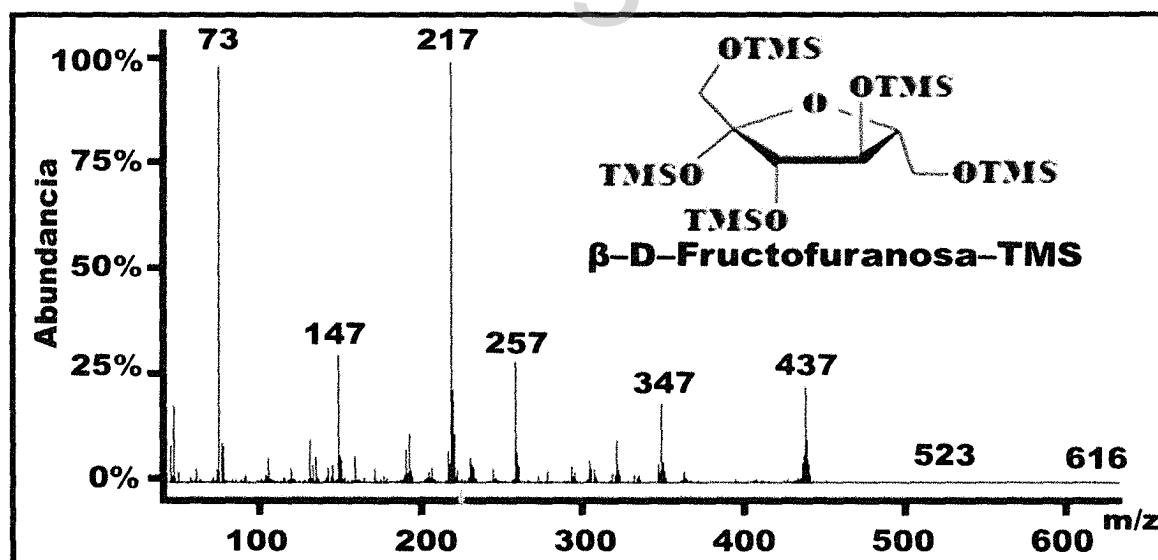


Figura 24. Espectro de masas de β -Fructofuranosa-TMS (tr=13,61 min)

En consecuencia, ambos anómeros solo pueden diferenciarse en función de su tiempo de retención en el cromatograma.

En el caso del pico a tiempo de retención 13,75 min (Figura 22), su espectro de masas (Figura 25) muestra una disminución de la intensidad del ion de fragmentación m/z 217 y la aparición de los iones m/z 204 y 191, los cuales son característicos de la forma piranosa de la TMSi-fructosa^[107,140,141]. Estos dos últimos iones no se observan en el espectro de masas de las formas furanosas del derivado (Figura 23 y 24), por lo que esta diferencia podría utilizarse para diferenciar entre estas dos formas tauméricas de los derivados TMSi de azúcares.

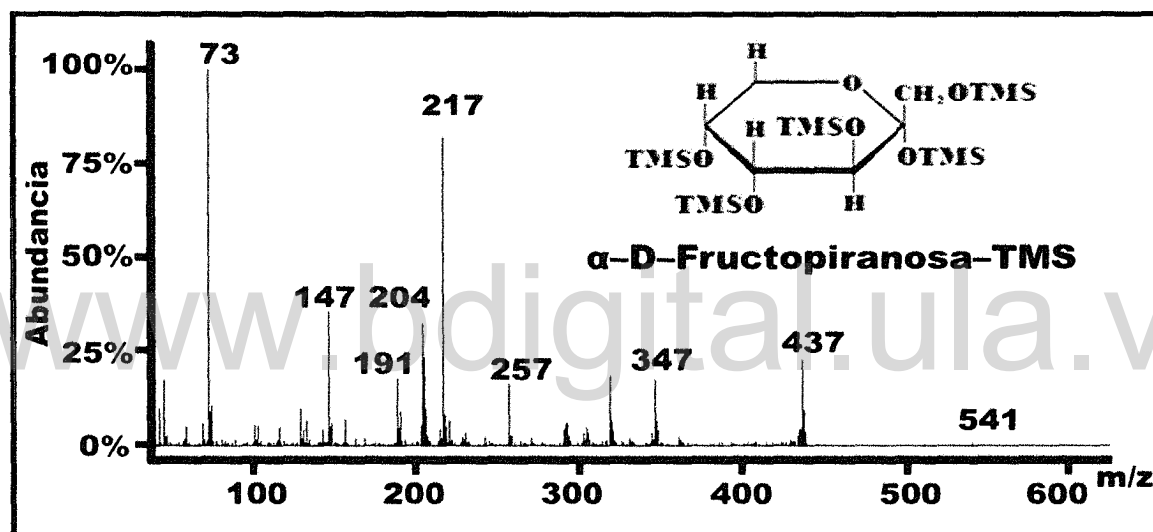


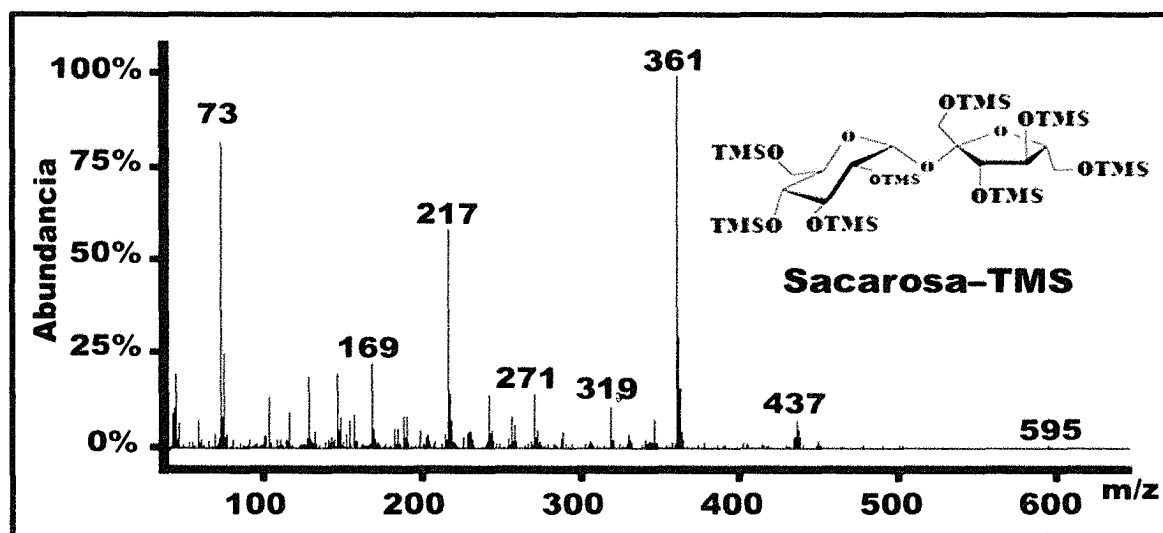
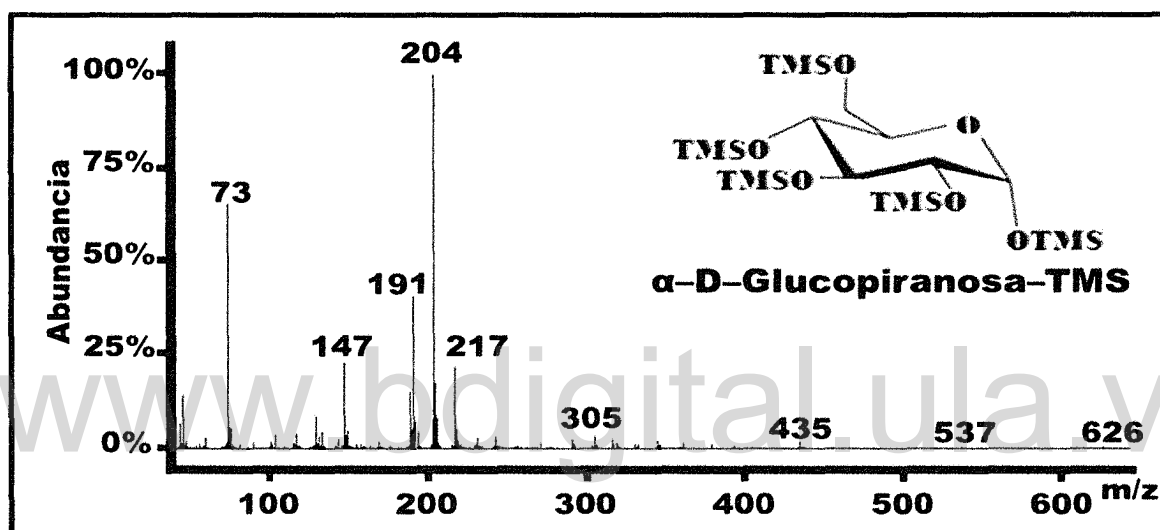
Figura 25. Espectro de masas de α -Fructopiranososa-TMS ($t_r=13,75$ min)

En el cromatograma (Figura 22) se puede apreciar como los derivados de las formas α - y β -Fructofuranosa predominan sobre la forma piranosa y que el pico correspondiente al derivado β -Fructofuranosa presenta la mayor área.

Una vez identificados cada uno de los picos asociados a los derivados de la fructosa, para su cuantificación se seleccionó aquél que presentó mayor área y el mismo comportamiento durante todo el intervalo de concentraciones estudiado (0,5 – 30 $\mu\text{g/mL}$). En este sentido, se utilizó

el pico a 13,61 min correspondiente a la β -Fructofuranosa-TMS para llevar a cabo la cuantificación de la fructosa.

El mismo protocolo se aplicó para la identificación y selección de los picos correspondientes a los derivados de la glucosa y sacarosa. Los espectros de masas obtenidos para estos derivados se presentan en la Figura 26 y 27.



En estos espectros se puede observar que para el caso de la glucosa el ion de fragmentación característico y de mayor abundancia es el m/z 204 correspondiente a la forma piranósido, mientras que para la sacarosa es el m/z 361 típico de un disacárido [140,141].

En la Tabla 9 se resumen los tiempos de retención y los iones específicos para cada uno de los derivados formados.

Tabla 9. Tiempos de retención de los trimetilsilil derivados

Compuesto	Tiempo de retención (min)	m/z
Fructosa	13,48 (α -furanosa)	217 , 437, 147 y 204 _(piranosa)
	13,61 (β -furanosa)	
Glucosa	13,75 (α -piranosa)	204 , 191, 217
	14,83 (α -piranosa)	
	15,89 (β -piranosa)	
Sacarosa	23,93	217, 361

Los iones monitoreados y los picos utilizados para llevar a cabo los análisis son los que se encuentran marcados en negrita

Adicionalmente, de acuerdo con los espectros de masas presentados anteriormente (Figura 23 a 27) y analizando los patrones de fragmentación para los derivados, pudimos asociar a cada uno de los picos el posible ión que lo origina y compararlos con los reportados en la bibliografía. Los mecanismos de fragmentación se detallan en la Figura 28.

En ese sentido, los iones de fragmentación más abundantes son el m/z 204 y 217 que corresponderían a los iones $(\text{Me}_3\text{SiOCH}=\text{CH}-\text{OSiMe}_3)^+$ y $\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}-\text{CH}=\text{OSiMe}_3$, respectivamente. El pico m/z 191

también presenta una intensidad moderada y correspondería al ion $(\text{Me}_3\text{SiO}-\text{CH}^+=\text{OSiMe}_3)$.

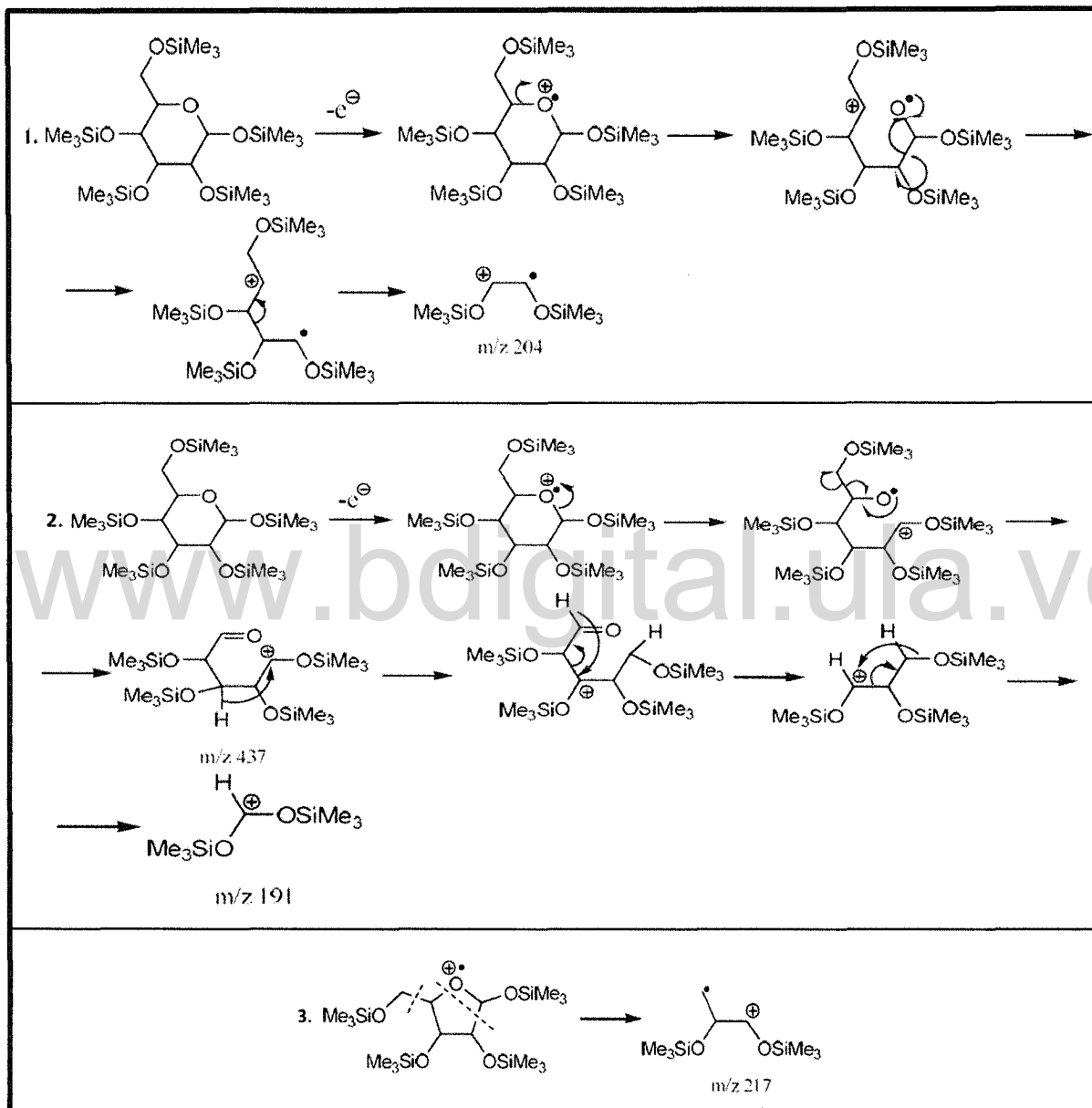


Figura 28. Mecanismos de fragmentación de los iones m/z 204, 191, 217

Otros picos característicos son el m/z 73, 103 y 147, correspondientes a los iones:



Numerosos estudios de los derivados TMSi de los carbohidratos por GC-MS han sido reportados y dilucidado el mecanismo de fragmentación^[142].

En nuestro caso, del análisis de los espectros de masas, a cada pico en el espectro se le puede asignar el ion de fragmentación correspondiente.

Un procedimiento de sililación produce múltiples picos y si se analiza una mezcla de azúcares se obtiene un cromatograma complejo. Sin embargo, el cromatograma se simplifica gracias a, la alta eficacia proporcionada por las columnas capilares que permite separaciones satisfactorias de los picos y a la modalidad de monitoreo de ion específico del detector de espectrometría de masas. El número de picos, sus tiempos de retención y las proporciones relativas son característicos de cada monosacárido y disacárido.

En conclusión, el análisis de los espectros de masas obtenidos para cada uno de los picos de los derivados en el cromatograma permitió confirmar la identidad de los correspondientes a glucosa, fructosa y sacarosa y seleccionar aquéllos que se utilizarían para la cuantificación.

IV. 4.5. Validación del método analítico

El objetivo principal de la validación analítica es el de asegurar que un procedimiento analítico dará resultados reproducibles y confiables^[143]. Algunos de los requisitos o criterios de validación que debe cumplir un

método analítico y que deben ser determinados en el procedimiento de validación son: precisión, exactitud, linealidad y efecto matriz, límite de detección y límite de cuantificación.

IV. 4.5.1. Precisión

La precisión es el grado de correlación o cercanía entre los resultados analíticos individuales que se obtienen al aplicar repetidamente el método a varias muestras. Para llevar a cabo los estudios de repetibilidad y reproducibilidad generalmente esta reconocida la realización de al menos 5 determinaciones para cada uno^[144,145]

La precisión puede calcularse matemáticamente a través del coeficiente de variación o variabilidad (CV) según:

S: es la desviación estándar

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad S = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n - 1}}$$

$\bar{X}$ es el valor medio obtenido de las diferentes repeticiones

X_i es el valor individual obtenido para cada una de las diferentes determinaciones

n es el número de determinaciones (repeticiones realizadas)

Un método será más preciso, en tanto menor coeficiente de variación se obtenga, es decir, cuanto más se acerquen entre sí los resultados obtenidos de varios análisis realizados a una misma muestra.

En este punto es importante diferenciar entre los términos repetibilidad y reproducibilidad de un método, ambas son medidas de precisión (Figura 29), pero generalmente se confunden. En la Tabla 10 se

resumen los factores que pueden o no variar en un estudio de repetibilidad y de reproducibilidad.

Tabla 10. Variación de factores en el estudio de la precisión

	Repetibilidad	Reproducibilidad
Instrumento	Igual	Diferente
Día de análisis	Igual	Diferente
Analista	Igual	Diferente
Laboratorio	Igual	Diferente

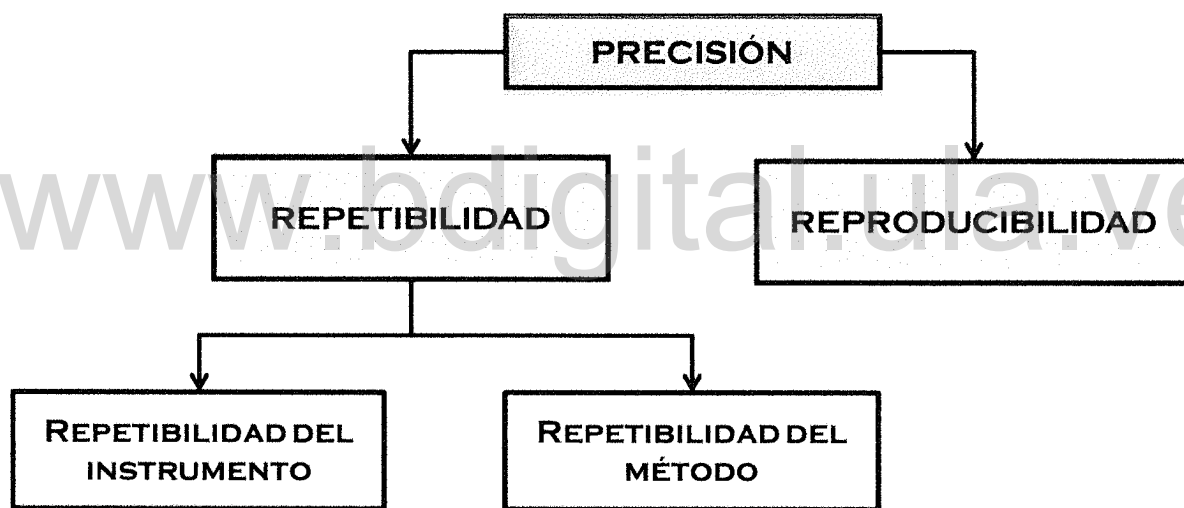


Figura 29. Tipos de estudios de precisión

En este estudio de precisión se prepararon 5 réplicas de los derivados de soluciones mezcla de patrones de los analitos a diferentes niveles de concentración y se inyectaron cada una un mínimo de 5 veces. Los resultados obtenidos entre días y durante un mismo día se presentan en la Tabla 11. Se puede apreciar que el coeficiente de variación (CV) es menor al 3,10 % para los estudios realizados en un mismo día, indicando

una buena repetibilidad instrumental y de la reacción de derivatización. En el caso de los estudios de precisión en días diferentes, se obtuvo un CV < 3,5 % lo que se interpreta como una buena estabilidad del sistema cromatográfico empleado.

IV. 4.5.2. Exactitud

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible a un valor verdadero. Es un concepto cualitativo y no es posible medirlo sino a través de la veracidad o justeza y precisión. La veracidad o justeza: es la proximidad de la concordancia entre el valor promedio obtenido en una serie de resultados del método y el valor de referencia aceptado de la propiedad analítica que se está midiendo, o sea, el contenido verdadero de un analito dentro de la muestra en estudio. La veracidad se expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad del analito presente en la muestra o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero^[144,145].

La determinación del porcentaje de recuperación se puede llevar a cabo a través de dos procedimientos: método de adición de patrón y comparación con otro método analítico ya validado. En el método de adición de patrón:

- ▶ Se trabaja con el extracto del analito obtenido de la matriz original por un procedimiento adecuado.

- ▶ De esta solución se toman como mínimo dos alícuotas, a una de ellas se le añade una cantidad conocida de un patrón de referencia del analito, y ambas se analizan en paralelo.

► Los resultados obtenidos de ambas determinaciones se procesan y la diferencia (muestra + patrón) – (muestra sin patrón) indica la cantidad cuantificada del patrón añadido por el método en cuestión.

► Este valor se compara con la cantidad de patrón añadido (valor verdadero) y los resultados se expresan como porcentaje de recuperación.

Si la adición del patrón del analito se realiza desde las primeras fases del estudio (directamente a la matriz) el % Recuperación indica la veracidad del método, es decir que permite evaluar también la eficiencia del proceso de aislamiento o extracción del analito de interés de la matriz en la cual se encuentra presente^[146]..

La exactitud del método se estimó realizando estudios de recuperación de los analitos desde muestras de cacao. Para ello, se analizaron muestras de cacao enriquecidas con los analitos a diferentes niveles de concentración y se compararon las áreas de los picos obtenidos con las obtenidas para las soluciones de patrones al mismo nivel de concentración.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para los tres azúcares estudiados se presentan en la Tabla 11, donde se puede observar que para todos los casos se encuentran entre 95 – 108% con un coeficiente de variación < 4% (n=5). Estos resultados confirman la exactitud del método confirmando la buena eficiencia del proceso de extracción sólido – líquido de los analitos desde las muestras de cacao.

Tesis Doctoral | Carbohidratos

Tabla 11. Características analíticas del método CG – EM para determinación de fructosa, glucosa y sacarosa en soluciones patrones y muestras de cacao

ANALITO	FRUCTOSA		GLUCOSA		SACAROSA	
Parámetro	Patrón	Muestra	Patrón	Muestra	Patrón	Muestra
Intervalo lineal ($\mu\text{g/mL}$)	1,0 - 30	1,0 - 30	1,0 - 30	0,2 - 30	1,0 - 30	1,0 - 30
Ecuación de la recta	489658x	488972x+4e+5	239240x	238408x+5e+5	442522x	453045x+3e+5
Coefficiente de correlación (r)	0,9966	0,9994	0,9939	0,9995	0,9989	0,9998
Reproducibilidad mismo día (5,15,20 $\mu\text{g/mL}$) % C.V (n=5)	3,10	3,25	3,11	2,99	2,80	3,02
	2,25	2,43	2,03	2,34	1,29	2,55
	2,49	3,11	2,41	2,76	1,63	2,21
Reproducibilidad entre días (5,15,20 $\mu\text{g/mL}$) % C.V (n=5)	3,01	2,56	2,45	2,99	2,22	2,78
	2,89	3,02	1,78	2,21	1,98	2,30
	2,76	3,31	3,02	3,21	2,56	2,22
% de Recuperación (5, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$) (n=5)	98,5 $\pm$ 2,06		99,0 $\pm$ 3,68		99,0 $\pm$ 2,76	
	98,0 $\pm$ 2,33		107,0 $\pm$ 3,01		102 $\pm$ 3,05	
	108,0 $\pm$ 3,11		101,0 $\pm$ 2,99		103 $\pm$ 3,67	
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	0,08		0,08		0,09	
Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	0,04		0,04		0,06	

IV. 4.5.3. Linealidad y efecto matriz

La linealidad se refiere a la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado^[144-146].

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones de concentraciones crecientes del analito que se determina o sobre muestras problemas a las que se han adicionado cantidades crecientes de un patrón del analito. En ambos casos el procedimiento se conoce como “curva de calibrado”. Posteriormente se determina la proporcionalidad existente entre la concentración y la respuesta del método analítico, calculando por el método de ajuste mínimos cuadrados la ecuación de regresión lineal del tipo: **Y= mx + a**, donde: x = concentración, m = pendiente, y = respuesta del método, a = intercepto. Los términos m (pendiente) y a (intercepto) pueden ser calculados a través de las siguientes expresiones matemáticas^[143]:

$m = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$	$a = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$
---	-----------------------------------

Al calcular la ecuación se obtiene un coeficiente de correlación **r** cuyo valor demuestra que el método considerado presenta una buena linealidad, en el rango de concentraciones estudiadas. Es una medida del grado de relación o proporcionalidad entre X y Y

En el estudio de linealidad, para establecer el intervalo lineal de trabajo se realizaron curvas de calibrado de soluciones patrones de azúcares a distintos niveles de concentración. En cada curva de calibrado se incluyó un

mínimo de seis puntos más un blanco y se midieron al menos tres veces cada punto. En la Tabla 11 se presentan las ecuaciones de regresión lineal para cada analito y el intervalo de concentraciones estudiados, cuya selección se basó en los niveles de concentración reportados por la bibliografía para los azúcares en muestras de cacao para los distintos días de fermentación y tostado. Se puede observar que los coeficientes de regresión lineal (r) fueron $> 0,9950$ para los tres analitos lo que indica que existe buena linealidad en el intervalo de concentración estudiado.

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes, es decir, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución patrón del analito no proporciona la misma respuesta instrumental. Este efecto puede determinarse mediante la comparación de la recta de regresión lineal obtenida (pendiente) para el analito puro, con la correspondiente al analito + matriz (adición de patrón). La no correspondencia de las rectas indica problemas por efecto matriz y está relacionada con la exactitud del método.

La determinación del efecto matriz se realizó construyendo curvas de calibrado por adición de patrón empleando como soluciones muestras de cacao enriquecidas con los mismos analitos a los mismo niveles de concentración que los de las curvas de calibrado de patrones. En la Figura 30 se presentan las gráficas correspondientes para los tres analitos y en la Tabla 11 las curvas de regresión lineal para todos los casos. Se puede observar que no existen diferencias entre las curvas de calibración de patrones con las de adición de patrón por lo que podemos concluir que no hay efecto de la matriz en el análisis. Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio estadístico (t de Student) con el fin de comparar las pendientes de las rectas de calibrado y las de la adición estándar. Los resultados mostraron que no existía diferencia significativa, con un 95% de confianza. En consecuencia, se pueden utilizar las

curvas de calibración de los patrones para determinar la concentración de los distintos azúcares en las muestras de cacao.

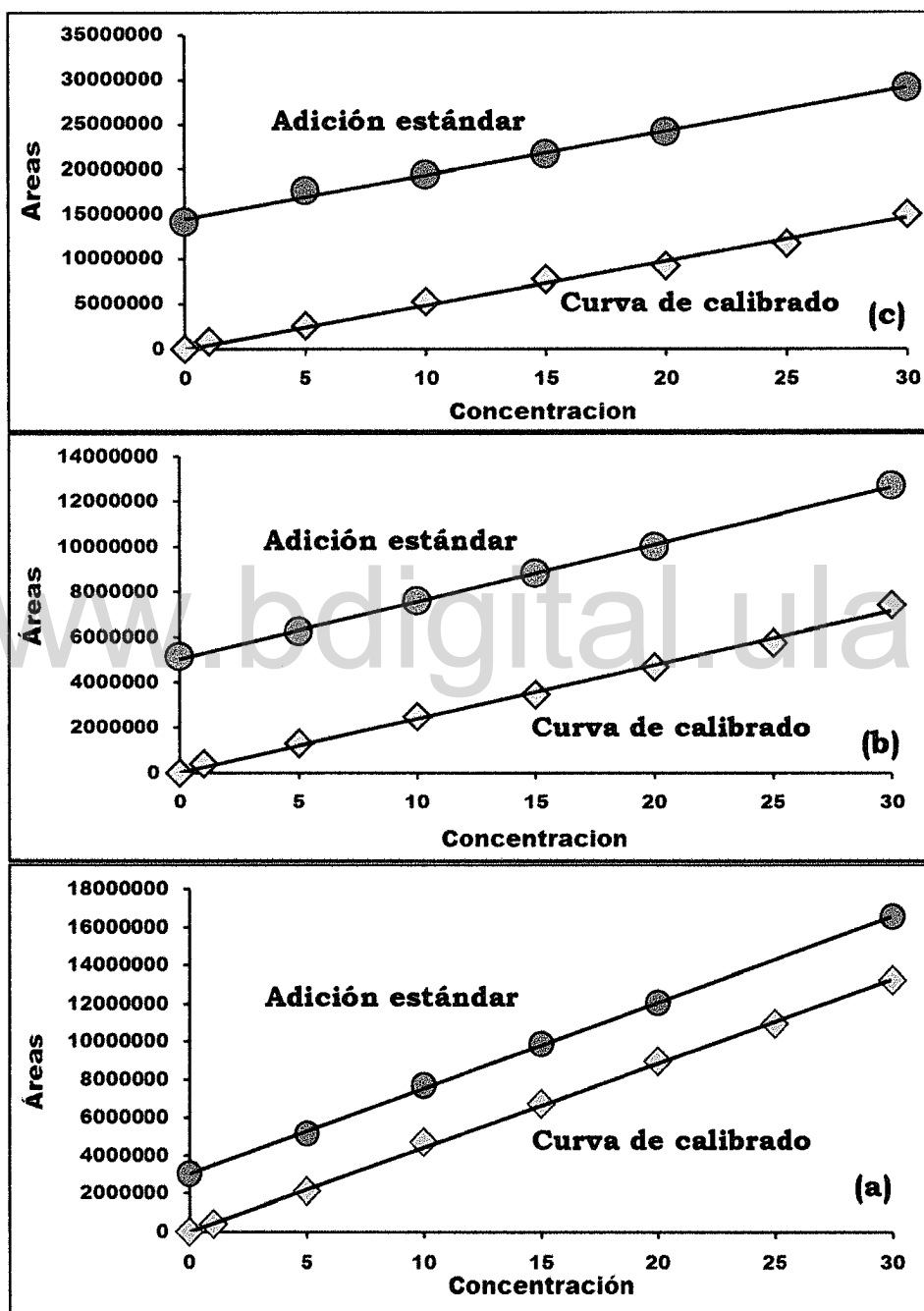


Figura 30. Curvas de calibrado de soluciones patrones y de las muestras de cacao (adición de estándar) para: **(a)** fructosa, **(b)** glucosa y **(c)** sacarosa

IV. 4.5.4. Límite de detección y límite de cuantificación

Para un método analítico determinado, se entiende por límite de cuantificación (LQ) de dicho método, la mínima cantidad o concentración del analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud. Mientras que el límite de detección (LD) se define como la mínima concentración del analito en la muestra que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar bajo en las condiciones experimentales indicadas^[146].

En el caso de los métodos cromatográficos, el LD se define como la concentración de los analitos que cumplen con una relación señal:ruido de 3:1 y para nuestro caso fueron de 0,04, 0,04 y 0,06 $\mu\text{g/mL}$ para fructosa, glucosa y sacarosa.

Por su parte, el LQ definido como la concentración de analito que proporciona un área de pico que guarda una relación 10:1 con respecto al ruido de fondo (señal / ruido de 10:1) con una buena reproducibilidad y exactitud fue de 0,08 $\mu\text{g/L}$ para fructosa, 0,08 para glucosa y 0,100 para sacarosa.

IV. 4.6. Análisis y discusión de las muestras de cacao

El método desarrollado se aplicó a la determinación de fructosa, glucosa y sacarosa en las muestras de cacao tomadas antes, durante y posteriormente a los procedimientos de fermentación y del tostado (Capítulo III, sección III.1, página 42). En las Tablas 12–21 (Anexos, páginas 283 - 287) se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los analitos en cada una de las muestras analizadas de acuerdo al procedimiento descrito.

Por otra parte, en las Figuras 31 a 33 se presentan los resultados correspondientes al estudio de los analitos durante el proceso de fermentación. En ellas se grafican el contenido de fructosa, glucosa y sacarosa en función de los días de fermentación para cada variedad estudiada. Se puede apreciar como a medida que transcurre la fermentación el contenido de sacarosa disminuye mientras que los de azúcares reductores (glucosa y fructosa) aumentan, llegando a un máximo entre el 2° y 3° día de fermentación para los cacaos criollos, 4° y 5° día para los forasteros y entre 4° y 7° día para los trinitarios. Adicionalmente se observa que la disminución de la sacarosa es paralela a la formación de los azúcares reductores. Hacia el final de la fermentación los cambios en el contenido de sacarosa son menos pronunciados, mientras que para los azúcares reductores, principalmente para la fructosa, se observa un drástico incremento de su concentración. Este comportamiento es consecuencia de que durante el inicio de la fermentación ocurre la muerte del embrión y a partir de ese momento comienzan las actividades enzimáticas que favorecen la formación de estos precursores. En este caso se produce la hidrólisis enzimática de la sacarosa por la acción de la enzima invertasa. Como producto de la misma se forman la glucosa y la fructosa. Resultados similares fueron reportados por Cross^[31,48] y Hashim y col.^[46] en granos de cacao Sánchez provenientes de República Dominicana (5 días de fermentación) y mezclas de cacaos híbridos de Malasia (6 días de fermentación), respectivamente. En ambos casos, observaron que los azúcares reductores alcanzan su máxima concentración alrededor del 4° día de fermentación, a partir de entonces, sus concentraciones disminuyen sutilmente hasta el final de la fermentación.

Por otra parte, si observamos las Tablas 12 a 21, se puede apreciar como en las almendras sin fermentar el carbohidrato predominante es la sacarosa con valores entre 8-12 g/Kg, lo que representa más del 95% de total de azúcares presentes en los granos. Sin embargo, las cantidades para la

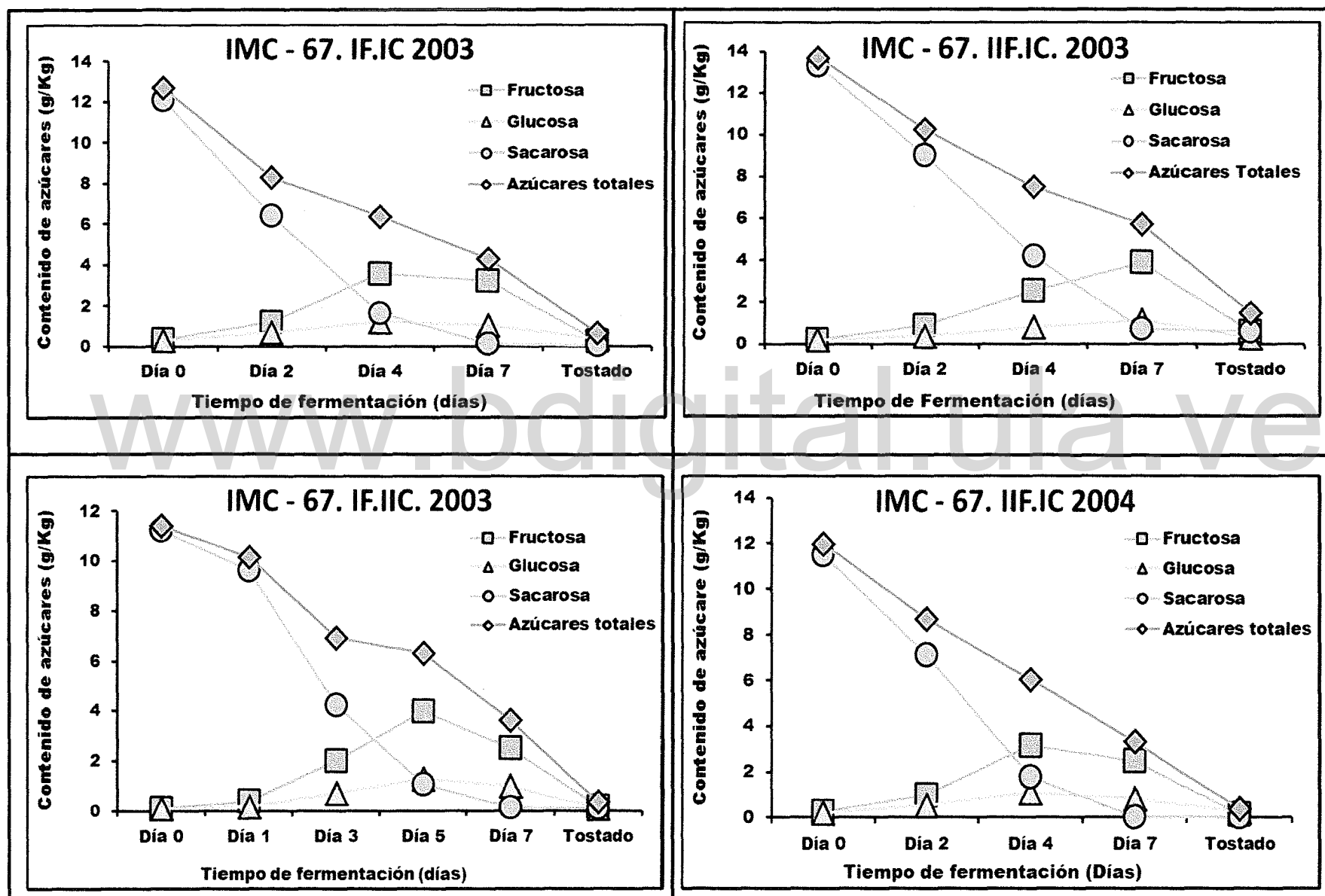


Figura 31. Tendencia de los azúcares durante el proceso de fermentación en cacaos forasteros

Tesis Doctoral Carbohidratos

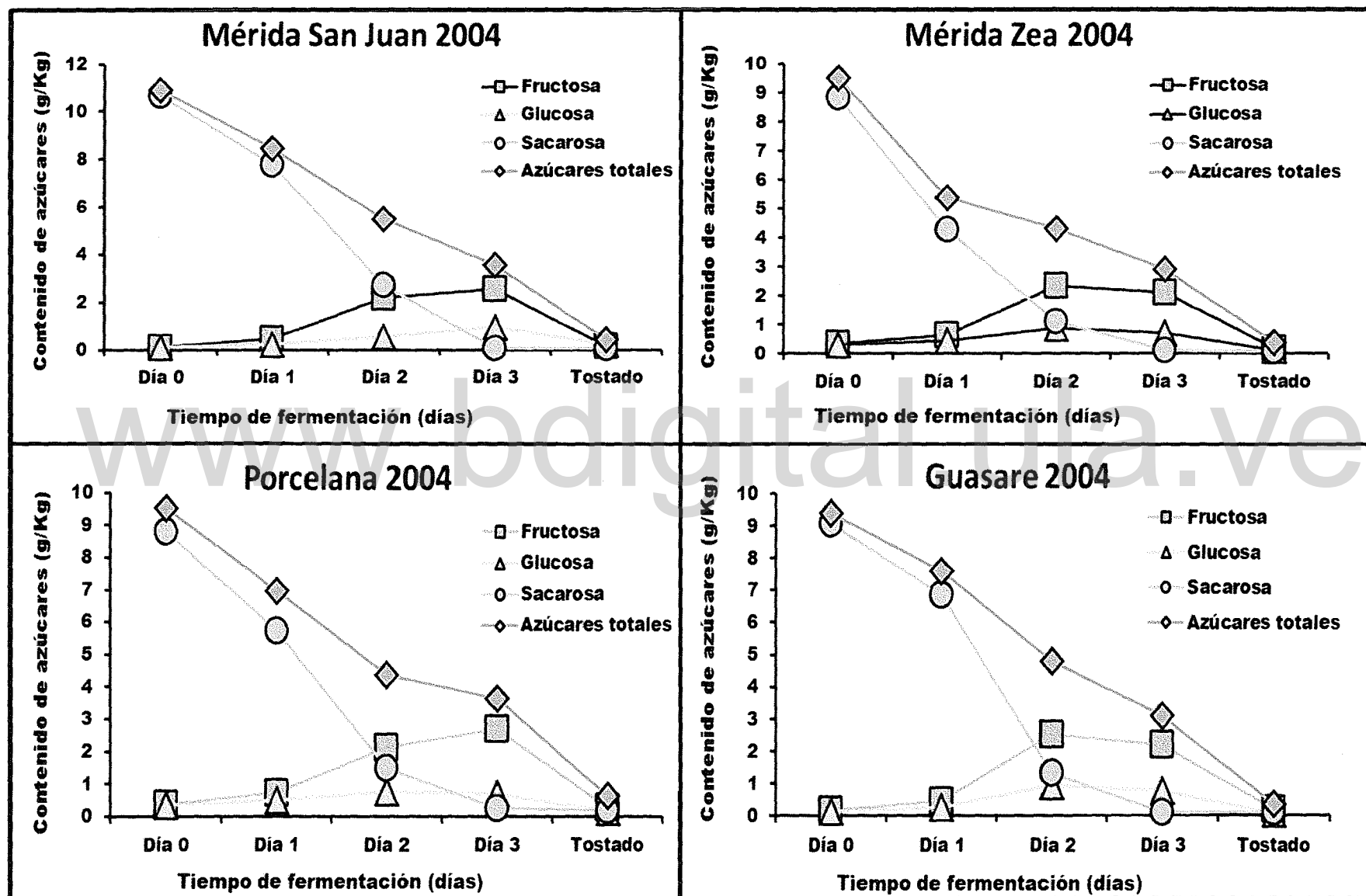


Figura 32. Tendencia de los azúcares durante el proceso de fermentación de cacaos criollos

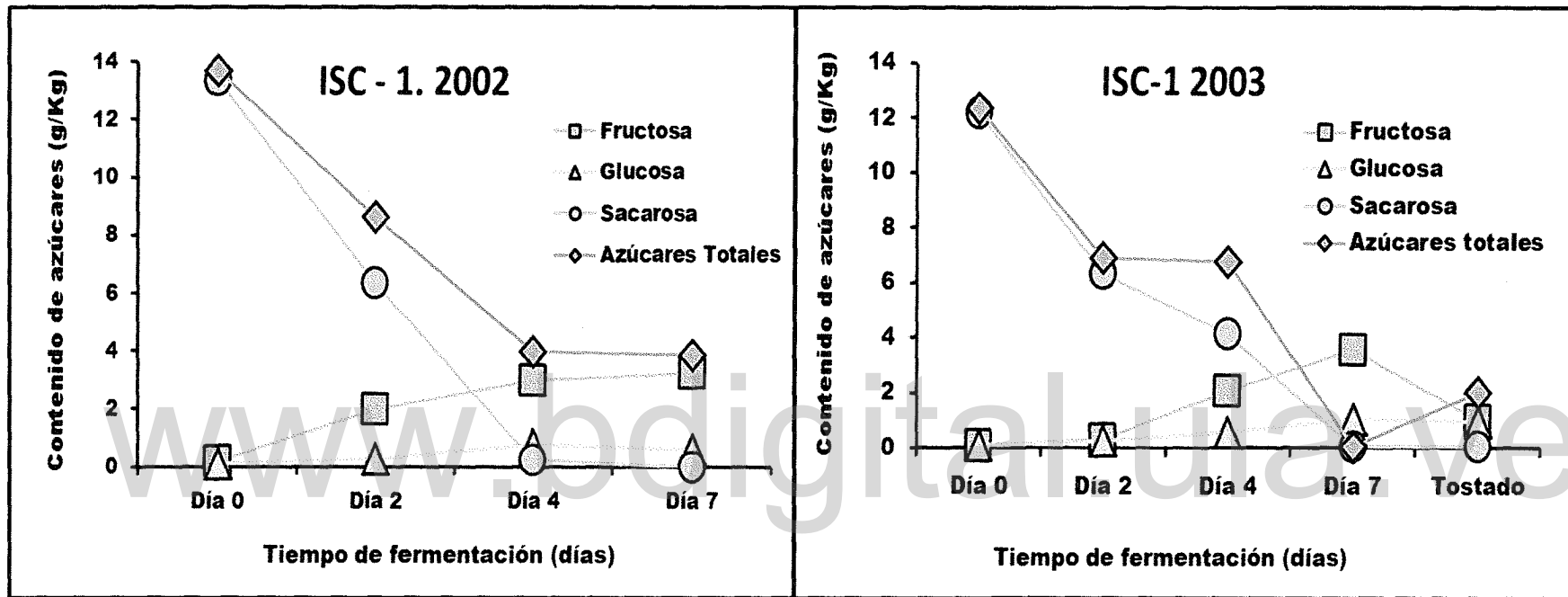


Figura 33. Tendencia de los azúcares durante el proceso de fermentación en cacaos trinitarios

glucosa y la fructosa se encuentran entre 0,097–0,375 g/Kg y 0,083–0,357 g/Kg respectivamente que representan menos del 5% restante de los azúcares totales presentes en los granos.

Estos resultados están de acuerdo con los de la bibliografía consultada. Comportamientos similares han sido reportados por varios autores, entre los que destacan Reineccius y col.^[55], quienes estudiaron estos azúcares en granos de cacao provenientes de Trinidad, encontrando un contenido de 15,8 g/Kg para la sacarosa y trazas de fructosa, glucosa y otros azúcares reductores en las almendras sin fermentar. Por su parte, Berbert^[147], en su investigación reporta que el contenido de sacarosa en los granos sin fermentar representa alrededor del 90% (24,8 g/Kg) de los azúcares totales, mientras que la fructosa y la glucosa solo contribuyen con el 6%.

Hashim y col.^[46], también encontraron un comportamiento similar y reportan concentraciones de sacarosa, fructosa y glucosa de 18,78 g/Kg (95% de los azúcares totales), 0,33 g/Kg y 0,21 g/Kg, respectivamente.

En este punto es importante indicar, que si bien la tendencia de los resultados es la misma, hay diferencias en las cantidades individuales para cada analito con respecto a las reportadas en la literatura y también entre las reportadas. Evidentemente esto se debe a las diferencias entre las formas de realizar los procedimientos de cosecha y fermentación (número y tiempos de volteo) así como también al tipo y origen de los granos.

En las Tablas 12-21 se aprecia también que hacia el final de la fermentación, las concentraciones de fructosa se encuentran entre 2,2 y 3,8 g/Kg y las de glucosa entre 0,78 y 1,05 g/Kg respectivamente. Sin embargo, de acuerdo con la estequiometría de la reacción de hidrólisis de la sacarosa, se esperaba que el incremento de ambos azúcares reductores fuera en una proporción de 1:1 (p/p). Por el contrario se observa que, a medida que

transcurre la fermentación, el contenido de fructosa es 2, 3 y hasta 4 veces, en algunos casos, mayor que el contenido de la glucosa. De acuerdo con varios autores^[55,62], esta diferencia puede atribuirse a que una fracción de la glucosa sufre un proceso de polimerización a medida que transcurre la fermentación, de ahí que se encuentre en menor proporción.

Algunos autores^[55,60] han reportado que el contenido de azúcares reductores al final de la fermentación puede significar un criterio para evaluar el proceso de fermentación del cacao. Así mismo otros refieren que el contenido de sacarosa hacia el final de la fermentación es un parámetro indicativo de cómo se realizó el proceso de fermentación. Según Hashim^[46], cuando las muestras de cacaos presentan un contenido de sacarosa al final de la fermentación menor a 1 g/Kg se habla de una buena fermentación para estos granos. En nuestro caso como ya se ha mencionado, durante la fermentación de las almendras de cacao, los niveles de sacarosa disminuyeron drásticamente desde valores entre 8-12 g/Kg hasta valores entre 0,78 y 1,30 g/Kg. En este sentido podríamos concluir que de acuerdo a estos resultados, los granos de los cacaos estudiados fueron sometidos a un adecuado proceso de fermentación.

Adicionalmente, otro parámetro que permite evaluar el grado de fermentación de los granos es la relación fructosa/glucosa^[55], un valor de la relación de 1:1 (p/p) se asocia a granos poco o no fermentados y 2:1 a granos ligeramente fermentados, es decir, a medida que se incrementa la relación a favor de la fructosa mayor será el grado de fermentación que presenten los granos de cacao. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la relación fructosa/glucosa fue ≥ 3 para todos los casos, demostrando una vez más que los granos se encontraban bien fermentados.

En la Figura 34 se han agrupado los resultados obtenidos en un gráfico de barras donde se muestra el contenido de sacarosa, glucosa y

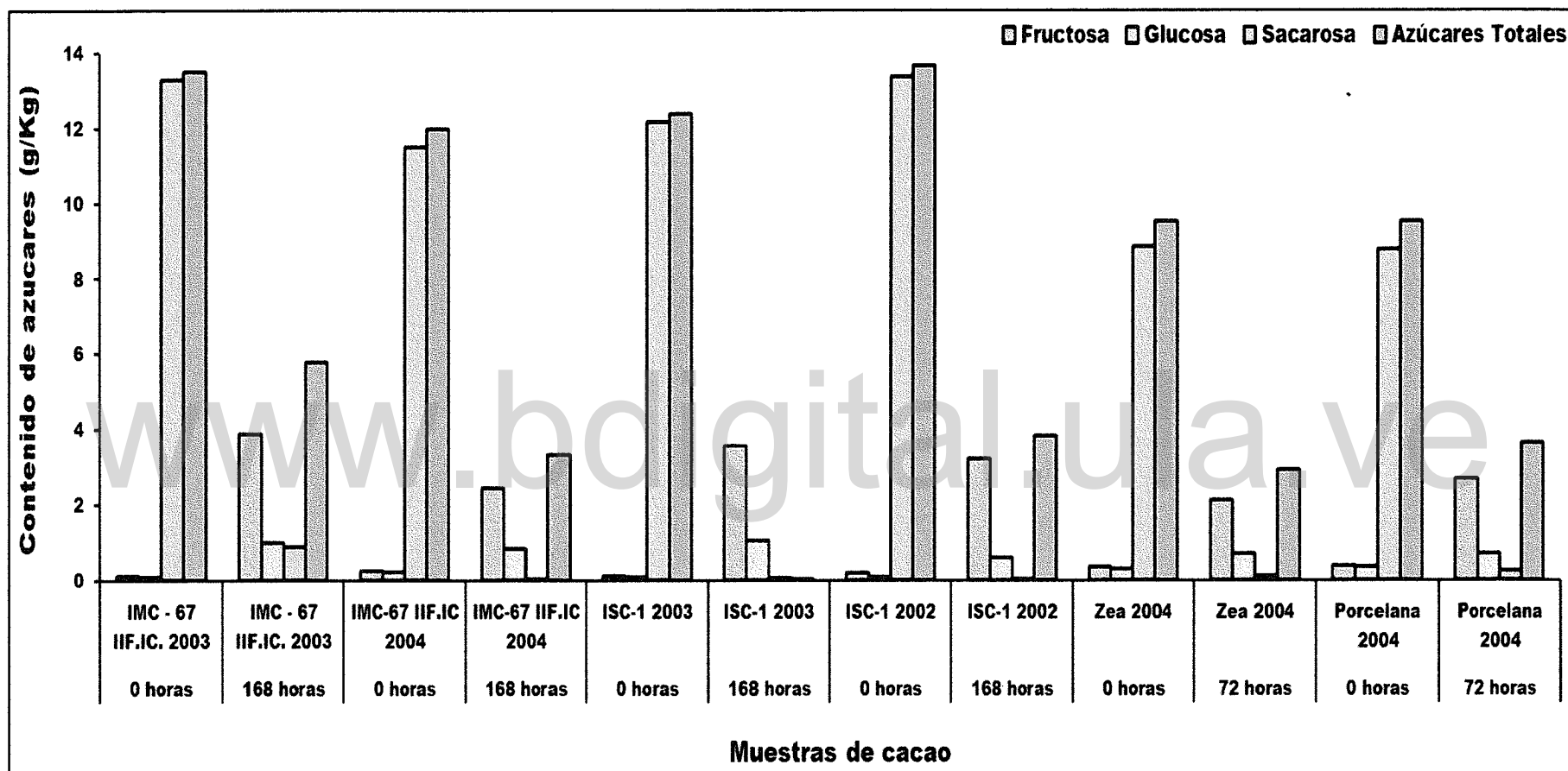


Figura 34. Cambios del contenido de azúcares entre el primer y último día de fermentación para distintos tipos de cacao

fructosa para el día cero (sin fermentar) y para el último día de fermentación para las diferentes variedades de cacao estudiadas. Se puede observar la variabilidad en los contenidos de sacarosa antes de comenzar la fermentación (Tiempo=0). También, como ya lo discutimos, se aprecia que a mayor contenido de sacarosa en los granos sin fermentar mayor será el contenido de fructosa y glucosa al final de la fermentación. Esta variabilidad nos demuestra que la formación de este tipo de precursores no solo pueden ser atribuidas al genotipo y a las condiciones bajo las cuales se realice la fermentación sino que también depende de otros factores entre los que destacan las condiciones bajo las cuales se ha desarrollado la planta como radiación solar, precipitación, edad de la planta en el momento de la cosecha. Estos factores edafoclimáticos influyen directamente en la formación de sacarosa en los granos de cacao. Esto fue confirmado por Zambrano y col^[17] en su estudio sobre la evaluación química de precursores de aroma y sabor durante la fermentación del genotipo cacao criollo merideño cultivado en dos condiciones edafoclimáticas diferentes. Ellos concluyeron que las condiciones edafoclimáticas generaron cambios en el comportamiento químico de los precursores de aroma y sabor.

Una vez finalizada la fermentación los granos de cacao se someten a la torrefacción o tostado etapa en la cual se expresa el aroma y sabor a chocolate. Durante esta etapa, se agregan nuevos compuestos volátiles a la fracción aromática ya sea aumentando el contenido de algunos que ya estaban disponibles o disminuyendo el nivel de otros^[31]. Varios trabajos realizados sobre la caracterización del impacto de los compuestos volátiles sobre el aroma del cacao, reflejan la importancia de la fermentación y el secado en la expresión de los materiales en la calidad aromática [48,148,149]. Es decir que sin los precursores necesarios y en las cantidades adecuadas como resultado de una buena fermentación, la

torrefacción no puede cumplir a cabalidad su función de culminar el desarrollo aromático. Ésto limita el impacto de la fracción volátil en la percepción sensorial del aroma y sabor a chocolate.

Por ello en esta etapa tienen lugar cambios importantes en el contenido de los precursores estudiados en este trabajo: azúcares y aminoácidos. Esto es debido a la participación de estas especies, como reactivos, en la reacción de Maillard para la formación de los compuestos heterocíclicos (pirazinas entre otros) con aromas y sabores característicos^[150].

En nuestro caso, de acuerdo a los resultados obtenidos (Tablas 12–21. Anexos, páginas 283–287) se observa que la reducción del contenido de los azúcares reductores (glucosa y fructosa) es muy significativa. Adicionalmente si comparamos con la reducción de los otros precursores estudiados los aminoácidos (Capítulo V), encontramos que la de estos últimos es parcial. En base esto podríamos decir que quienes limitan la reacción de Maillard que ocurre durante la torrefacción parecen ser los azúcares reductores. Resultados similares ya fueron ya reportados por otros investigadores^[55,151].

Por otro lado, la presencia de fructosa como azúcar reductor predominante favorece la formación de especies volátiles, ya de acuerdo con Kato y col.^[140], las cetosas son alrededor de tres veces más reactivas que las aldosas en la formación de este tipo de compuestos. Comportamiento que podría explicar el por qué la formación de las pirazinas durante el tostado, es mucho mayor y más rápido cuando los granos han sido sometidos a adecuados procesos de fermentación^[46] y corroborando la importancia y el efecto que juegan los azúcares reductores, principalmente la fructosa, en el desarrollo de especies aromáticas durante el tostado a través de la reacción de Maillard.

IV.4.7. Conclusiones

Se optimizó y validó un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas para la determinación simultánea fructosa, glucosa y sacarosa en muestras de cacao.

Se utilizó el N-metil-N- trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) como agente derivativizante de los azúcares para su transformación en derivados volátiles y térmicamente estables para su separación e identificación por CG-EM. La reacción se asistió con irradiación por MW permitiendo disminuir los tiempos de reacción de 3 horas a 1 min, favoreciendo así el aumento en la frecuencia de análisis.

El reactivo derivatizante (MSTFA) también favoreció la detección de los derivados por espectrometría de masas, al incorporar grupos funcionales en las moléculas de carbohidratos que aumentaron su señal de respuesta, permitiendo la identificación de los distintos iones de fragmentación asociados con los analitos estudiados.

El empleo de sonicación (agitación con ultrasonido) durante la extracción de los analitos con agua de las muestras de cacao, favoreció el procedimiento disminuyendo el tiempo de extracción de 30 a 15 minutos con relación a lo reportado en la bibliografía.

Los porcentajes de las recuperaciones de glucosa, fructosa y sacarosa desde las muestras se encontraron entre 95 y 108 % con una variación < 4%, lo que indica que el proceso de extracción con sonicación fue cuantitativo.

☞ La validación del procedimiento descrito se realizó con estudios de precisión y exactitud. Para todos los casos los coeficientes de variación para evaluar la dispersión de los valores obtenidos fueron menores a 3,5 %. Estos resultados indican una buena precisión del método y asegura una buena estabilidad del sistema cromatográfico utilizado.

☞ Se comprobó que no hay efecto de matriz en el método, por lo que las muestras de cacao pueden ser evaluadas con una curva de calibración preparada a partir de estándares de los analitos.

☞ La metodología propuesta se aplicó a la determinación de fructosa, glucosa y sacarosa en muestras de cacao Criollo, Trinitario y Forasteros venezolanos durante el transcurso de la fermentación. Los resultados obtenidos indicaron un aumento progresivo de la fructosa y glucosa a medida que transcurre la fermentación, al mismo tiempo que tiene lugar una disminución del contenido de sacarosa en los granos. No se observaron diferencias significativas en el contenido de alguno de los analitos estudiados que permitiera la diferenciación entre los distintos tipos de cacao. Sin embargo, se podría decir que el contenido de azúcares reductores (fructosa y glucosa) al final de la fermentación depende del contenido inicial de sacarosa en los granos.

CAPÍTULO V:

www.bdigitalula.ve
AMNOCABOS

V. AMINOÁCIDO

V. 1. Definición y estructura

Los aminoácidos, como su nombre lo indica, son bifuncionales. Son compuestos que contienen un grupo amino básico y un grupo carboxilo ácido unido al carbono α (el carbono α de un ácido orgánico es el inmediato al carboxilo)^[68]. Por ello, se consideran como α - aminoácidos y su estructura general se indica en la Figura 1, donde R corresponde a la cadena lateral y puede ser desde un protón como en el caso del aminoácido más sencillo (glicina), hasta un resto alifático, aromático o heterocíclico portador de otros grupos funcionales.

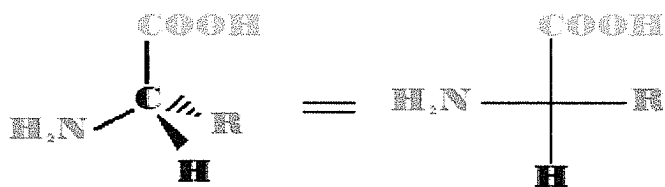


Figura 1. Estructura general de los aminoácidos

V. 2. Clasificación y propiedades

Los aminoácidos se diferencian sólo en la naturaleza química de la cadena lateral (R), las propiedades fisico-químicas, como la carga neta, la solubilidad, la reactividad química y las posibilidades de establecer puentes de hidrógeno dependen de las características que presente esta cadena. En este

sentido, desde el punto de vista de la polaridad de la cadena lateral se puede realizar la siguiente clasificación:

- ***Aminoácidos con cadena lateral sin carga y apolar:***

alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Son menos solubles en el agua que los aminoácidos polares y su hidrofobicidad aumenta con la longitud de la cadena lateral.

- ***Aminoácidos con cadena lateral sin carga y polar:***

serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Tienen grupos funcionales neutros y polares que son capaces de formar enlaces de hidrógeno con algunas moléculas.

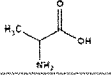
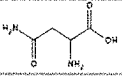
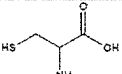
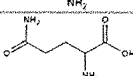
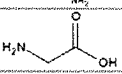
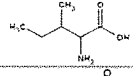
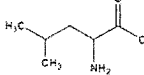
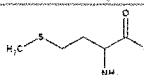
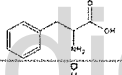
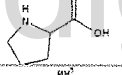
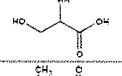
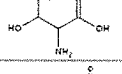
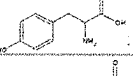
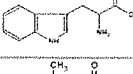
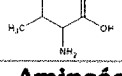
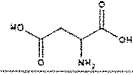
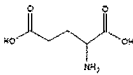
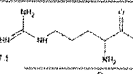
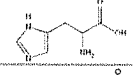
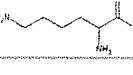
- ***Aminoácidos de cadena lateral cargada:***

ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina y arginina, cuya cadena lateral posee una carga negativa o positiva a pH fisiológico.

En base a esta clasificación, en la Tabla 1 se presenta un resumen de algunas de las propiedades fisicoquímicas de los principales aminoácidos constituyentes de las proteínas. Todos ellos son aminoácidos excepto dos, que son iminoácidos, la prolina y la hidroxiprolina pero se consideran como aminoácidos por su similitud estructural. En general, estos aminoácidos son sólidos, con estructuras cristalinas muy variadas y puntos de fusión entre los 200 y 300 °C pero tienden a descomponerse antes de alcanzar esas temperaturas.

A pesar de que generalmente los aminoácidos se escriben con un grupo carboxílico ($-\text{COOH}$) y un grupo amino ($-\text{NH}_2$), su estructura real es iónica y depende del pH. En una solución ácida, el grupo $-\text{COO}^-$ se protona y se obtiene el grupo $-\text{COOH}$, y la molécula tiene una carga total positiva. Si el pH aumenta, el grupo $-\text{COOH}$ pierde su protón aproximadamente a $\text{pH} = 2$. A este punto se le denomina pK_{a1} , primera constante de disociación ácida. Si el

Tabla 1. Estructura y propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos^[153]

Nombre	Abreviaturas	PM	Estructura	pKa (COOH)	pKa (NH ₃ ⁺)	pKaCad. Lat	PI	Sol.	PF
Aminoácidos Neutros									
Alanina	Ala (A)	89		2,34	9,69	---	6,01	Agua	297
Asparagina	Asn (N)	132		2,02	8,80	---	5,41	Agua	236
Cisteína	Cys (C)	121		1,96	10,28	8,18	5,07	Agua	---
Glutamina	Gln (Q)	146		2,17	9,13	---	5,65	Agua	186
Glicina	Gly (G)	75		2,34	9,60	---	5,97	Agua	233
Isoleucina	Ile (I)	131		2,36	9,60	---	6,02	Agua	284
Leucina	Leu (L)	131		2,36	9,60	---	5,98	Agua	337
Metionina	Met (M)	149		2,28	9,21	---	5,74	Agua	283
Aminoácidos Neutros									
Fenilalanina	Phe (F)	165		1,83	9,13	---	5,48	Agua	283
Prolina	Pro (P)	115		1,99	10,60	---	6,30	Agua	220
Serina	Ser (S)	105		2,21	9,15	---	5,88	Agua	228
Treonina	Thr (T)	119		2,09	9,10	---	5,60	Agua	257
Tirosina	Tyr (Y)	181		2,20	9,11	10,1	5,66	HCl dil	344
Triptofano	Trp (W)	204		2,83	9,39	---	5,89	Agua	289
Valina	Val (V)	117		2,32	9,62	---	5,96	Agua	315
Aminoácidos Ácidos									
Ácido Aspártico	Asp (D)	133		1,88	9,60	3,65	2,77	Agua	2,69
Ácido Glutámico	Glu (E)	133		2,19	9,67	4,25	3,22	Agua	247
Aminoácidos Básicos									
Arginina	Arg (R)	174		2,17	9,04	12,48	10,8	Agua	230
Histidina	His (H)	155		1,82	9,17	6,00	7,59	Agua	287
Lisina	Lis (K)	146		2,18	8,95	10,53	9,74	Agua	255

pH sigue aumentando, el grupo —NH_3^+ pierde su protón a un pH entre 9 y 10. A este punto se le denomina pK_{a2} , segunda constante de disociación ácida. Por encima de este pH, la molécula tiene una carga total negativa (Figura 2)^[67,152].

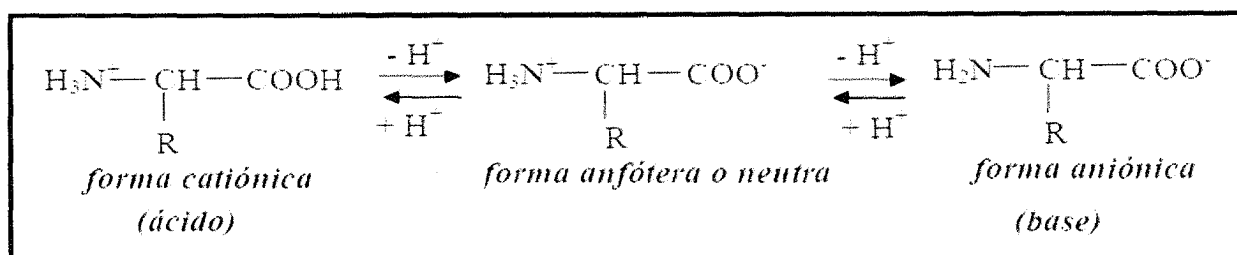


Figura 2. Comportamiento de los aminoácidos en medio ácido y básico

El pH en el cual las dos formas del aminoácido se encuentran en la misma proporción (el ion dipolar o zwitterión presenta una carga neta de cero) se le conoce como **pH isoelectrónico** o **punto isoelectrónico** (pI) y por lo general depende de la estructura del aminoácido (Tabla 1).

Esta naturaleza dipolar de los aminoácidos hace que tengan algunas propiedades características ^[66], ejemplo de ello es su solubilidad en agua, la cual es muy variada y se encuentra muy influenciada por el pH de la disolución, siendo mínima en su pI y aumenta al aumentar la temperatura. La adición de ácidos o álcalis por lo general, aumenta la solubilidad del aminoácido por formación de sales. Del mismo modo, la solubilidad aumenta en presencia de otros aminoácidos. Como regla general, se puede considerar que son más solubles en agua los aminoácidos que tienen grupos polares adicionales, por ejemplo - OH, - SH, - COOH, - NH₂.

V 3. Análisis de aminoácidos

Los aminoácidos, péptidos y proteínas son componentes importantes de los alimentos. Por un lado proporcionan los elementos necesarios para la síntesis proteica. Por otro lado, los aminoácidos y péptidos contribuyen directamente al sabor de los alimentos y son precursores de los componentes aromáticos y las sustancias coloreadas que se forman mediante las reacciones térmicas y/o enzimáticas que ocurren durante la obtención, preparación y almacenamiento de los mismos.

En la literatura se han reportado una gran diversidad de métodos para el análisis de aminoácidos en distintas matrices, los cuales involucran el empleo de diferentes técnicas analíticas^[154,155,156,157,158,159].

Los métodos colorimétricos^[155], espectrofotométricos^[158,159], electroquímicos^[156] no son selectivos y por lo general se han aplicado a la determinación individual aminoácidos.

Sin embargo, el análisis de aminoácidos en muestras de alimentos se caracteriza por la presencia de un número considerable de aminoácidos en un amplio rango de concentraciones. Por ello, las técnicas cromatográficas de gases y líquidos acopladas a distintos detectores han sido las más ampliamente utilizadas.

Es importante señalar que desde el punto de vista analítico, la separación y detección de aminoácidos ha sido uno de los problemas más estudiados y mejor desarrollados por todas las técnicas cromatográficas^[160]. Su gran aplicabilidad reside en la variedad de condiciones que pueden utilizarse para separar dichos compuestos. Se han utilizado diferentes fases móviles (gases, líquidos o fluidos supercríticos) con una diversidad de fases estacionarias compatibles, que han permitido la separación cromatográfica de

estos compuestos con la especificidad, sensibilidad, linealidad y reproducibilidad necesarias para su cuantificación.

A continuación se resume el desarrollo de dichas técnicas en el tema que nos ocupa.

V. 3.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es una de las técnicas analíticas de separación que se ha estudiado y utilizado intensamente durante más de 40 años en la resolución de una gran variedad de problemas analíticos. Gracias a ello, se han encontrado condiciones válidas para la separación de casi todo tipo de compuestos^[161]. Esta técnica cromatográfica, como ya se dijo, ofrece un excelente poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles y su principal limitación se encuentra en la labilidad térmica de los solutos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización.

Es por ello que su aplicación al análisis de aminoácidos se vio limitada por la presencia de los diferentes grupos polares en las moléculas de estos compuestos. Los grupos carboxilo y amino no sólo le confieren a los aminoácidos una alta polaridad sino que también la tendencia a formar puentes de hidrógeno lo que se ve reflejado en su baja volatilidad. En consecuencia, el análisis de aminoácidos por CG requiere de su conversión cuantitativa en derivados menos polares y más volátiles para facilitar su separación y/o detección.

La derivatización se puede realizar tanto en el grupo funcional amino como en el carboxilo y para ello se han utilizado diferentes reactivos.

Zumwalt y col^[162]., realizaron la derivatización de los aminoácidos en un procedimiento de dos pasos. El primer paso consistió en la esterificación del

grupo carboxílico utilizando diferentes alcoholes alifáticos de cadena corta. El segundo en una reacción de acilación de la función *N*-(*O,S*) con varios ácidos anhídridos. Estos procedimientos de esterificación/acilación se han llevado a cabo utilizando distintas combinaciones de alcohol/anhídridos entre las que destacan isopropanol/pentafluoropropil anhídrido o isopropanol/trifluoacético anhídrido^[163].

Pätzold y col^[28]., aplicaron este tipo de derivatización para la determinación de L y D-aminoácidos libres en varias muestras de cacao convirtiéndolos en derivados volátiles pentafluoropropil aminoácidos. La esterificación del aminoácido se llevó a cabo utilizando 2-propanol en presencia de cloruro de acetilo a 100°C por una hora y la acilación con ácido pentafluoropropionico (anhídrido) en diclorometano a 100 °C por 20 min. Estos derivados se separaron en una columna capilar enantioselectiva Chirasil (25m x 0,25mm; 0,12µm) y detectaron por espectrometría de masas.

La derivatización de aminoácidos también se ha llevado a cabo utilizando alquilcloroformatos y alcohol, donde los grupos carboxílicos se convierten directamente a ésteres y los grupos aminos a carbamatos. Esta reacción es catalizada por piridina o picolina (2-metilpiridina) y puede realizarse en medios acuosos. La reacción entre los aminoácidos y los alquil cloroformatos son bastante rápidas, transcurren en cuestión de segundos^[164,165]

Hušek y col^[165] utilizaron cloroformatos de fluoroalquil con tres y cuatro átomos de carbono para la derivatización de aminoácidos contenidos en medio acuoso. La separación de los derivados (más de 30) con una buena resolución, se consiguió con una columna 5% fenilmetilpolisiloxano y detección por espectrometría de masas o ionización de llama. El intervalo lineal de concentraciones del método estuvo entre 0,1 – 100 nmol, con límites de cuantificación desde 0,03 pmol para la prolina hasta casi 20 pmol para el ácido

glutámico. Los autores concluyeron que el método propuesto es sencillo, rápido y robusto, permitiendo el análisis de aminoácidos en medios acuosos en menos de 15 minutos.

Sin embargo, las reacciones de sililación han sido las más utilizadas ya que se desarrollan en un solo paso, donde el agente derivatizante actúa simultáneamente sobre los hidrógenos activos de los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos. Este es uno de los motivos por los cuales se prefiere este tipo de derivatización sobre los métodos de derivatización de varios pasos, los cuales son complejos y tienden a consumir tiempo.

Existen varios reactivos de sililación y la selección de alguno de ellos va a depender de las condiciones bajo las cuales se realice la reacción de derivatización. En el caso de los aminoácidos, el más utilizado ha sido el BSTFA y por lo general, las condiciones de derivatización implican altas temperaturas (120 – 150°C) y largos tiempos de reacción (30 – 180 min) a fin de asegurar la completa derivatización de todos los aminoácidos presentes en la muestra^[109,166,167].

En algunas ocasiones, ciertos aminoácidos como la glutamina, asparagina, triptófano, lisina y glicina pueden generar varios derivados, lo que se traduce en varios picos para un mismo aminoácido. En estos casos, una modificación en las condiciones de reacción, como el cambio en el tiempo de reacción y tipo de solvente que se utilice pueden prevenir este comportamiento^[168].

En conclusión, la principal desventaja de la cromatografía de gases en el análisis rutinario de aminoácidos es precisamente la reacción de derivatización, que anexa una etapa más en el procedimiento analítico. Adicionalmente, hay que asegurar la exactitud y precisión en la formación de derivados volátiles estables de todos los aminoácidos. Sin embargo, tiene la ventaja de ser compatible con la detección por espectrometría de masas que

mejora la selectividad de la respuesta y, permite la determinación estructural de compuestos desconocidos.

V. 3.2. Cromatografía líquida de alta resolución

En los últimos años la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se ha convertido en la técnica más seleccionada en la determinación de aminoácidos ya que mantiene la especificidad de CG, sin embargo, la etapa de la preparación de la muestra, limitaciones de la matriz y tiempo de análisis se reducen considerablemente. Además, en CLAR algunos análisis se pueden llevar a cabo sin necesidad de derivatización.

La cromatografía de líquidos abarca todas las técnicas cromatográficas en las que la fase móvil es un líquido. Esta técnica analítica deriva de la evolución de la cromatografía preparativa en columna, cuyos términos de selectividad y de resolución fueron mejorados por la utilización de fases estacionarias muy elaboradas. Para aumentar la eficacia de la separación y así incrementar la resolución se desarrollaron fases estacionarias con tamaño de partícula del orden de micrómetros (3, 5, 10 μm) empacadas en columnas de 3 a 30 cm con diámetros desde 2 a 4,6 mm que permiten una mayor difusión de los solutos entre las fases móvil y estacionaria. Sin embargo, proporcionan gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea una gran caída de presión. Por ello, es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna, para posteriormente con un detector situado en la salida de la misma, se proporcione el registro continuo de la composición del líquido que sale^[101,102].

El instrumental utilizado en CLAR se puede describir con las siguientes partes, donde cada una de ellas se ve reflejada en la Figura 3:

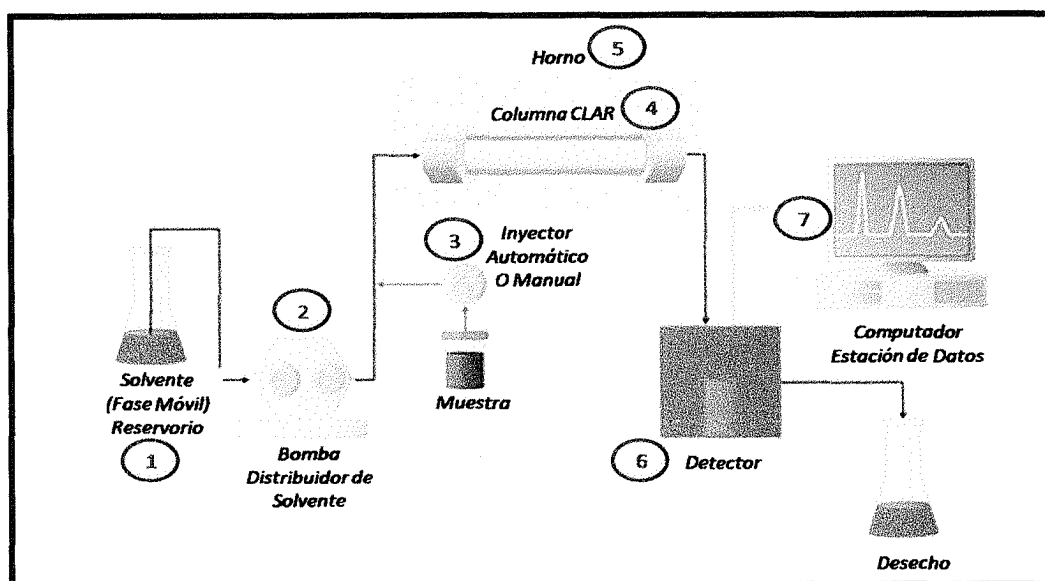


Figura 3. Componentes de un cromatógrafo de CLAR

1. Una fuente de fase móvil

2. Un sistema de regulación y medida de la presión de la fase móvil

3. Un sistema de inyección de la muestra: se trata de un dispositivo que permite introducir la muestra en la corriente de fase móvil

4. La columna es la parte fundamental, ya que en ella se produce la separación, donde la forma de distribución de la fase estacionaria y el valor de la relación de las fases, dan lugar a los diferentes tipos de columnas.

5. Un horno termostatzado para controlar la temperatura de la columna.

6. Un sistema de detección: dispositivo que mide en continuo y transforma en una señal eléctrica una propiedad del fluido que generalmente es física.

7. Un sistema de ampliación y tratamiento de la señal eléctrica generada por el detector.

El principio de su funcionamiento consiste en disolver la muestra en la fase móvil (FM) líquida que se inyecta, y, es la FM la que la transporta a la columna que contiene la fase estacionaria (FE). Los componentes de la muestra se distribuyen de modo diferente entre la FM y FE dependiendo de la afinidad por ambas fases, desplazándose a velocidad diferente. Debido a esta diferencia en la movilidad, los componentes se separan en bandas discriminadas que pasan por la celda del detector y se registran como una señal en el cromatograma.

El desarrollo de los detectores fue de la mano con el de las columnas de alta eficiencia, con volúmenes de inyección muy pequeños, que deben ser mínimos comparados con el volumen de la celda de detección y la dispersión que allí ocurre. Todo ello llevó a efectuar el rediseño del detector, teniendo en cuenta: menores volúmenes de las celdas de detección, diferente geometría y menores longitudes de las conexiones entre la columna y el detector. El detector ideal para CLAR debería cumplir con las siguientes propiedades^[101-103]:

- Ser universal.
- Ser igualmente sensible a todos los picos eluidos o registrar solamente aquéllos de interés.
- Permanecer inafectado por cambios en la temperatura, la velocidad de flujo o la composición de la fase móvil.
- Ser capaz de monitorear pequeñas cantidades del compuesto de interés.

- Evitar la dispersión del analito.
- Adecuada velocidad de detección, de manera que pueda detectar correctamente picos angostos, los cuales pasan rápidamente a través de la celda.
- Tener una respuesta lineal.
- Capaz de trabajar en un amplio intervalo dinámico.
- Ser fácil de manipular.
- Ser robusto.
- Ser preferiblemente no destructivo.

La CLAR tiene un campo de aplicación muy amplio y cubre una gran variedad de compuestos gracias a las interacciones que se presentan entre el analito, la fase móvil y la fase estacionaria, que permiten actuar de forma muy precisa sobre la selectividad. De esta premisa parte la clasificación de los diferentes tipos de cromatografía cuyo esquema se puede observar en la Figura 4.^[101]

Los métodos por CLAR, como hemos dicho, son los métodos cromatográficos más empleados en el análisis de aminoácidos para todo tipo de muestra y en un rango muy amplio de concentraciones. Las columnas más utilizadas para el análisis de aminoácidos son las de sílice unida a cadenas C8 o C18 (cromatografía en fase reversa). También se utilizan las de intercambio iónico^[169-173]. Es primordial en CLAR el papel que juega la fase móvil, ya que variando su composición, pH, entre otros parámetros se puede modificar considerablemente la selectividad del sistema cromatográfico en la separación de los aminoácidos^[102].

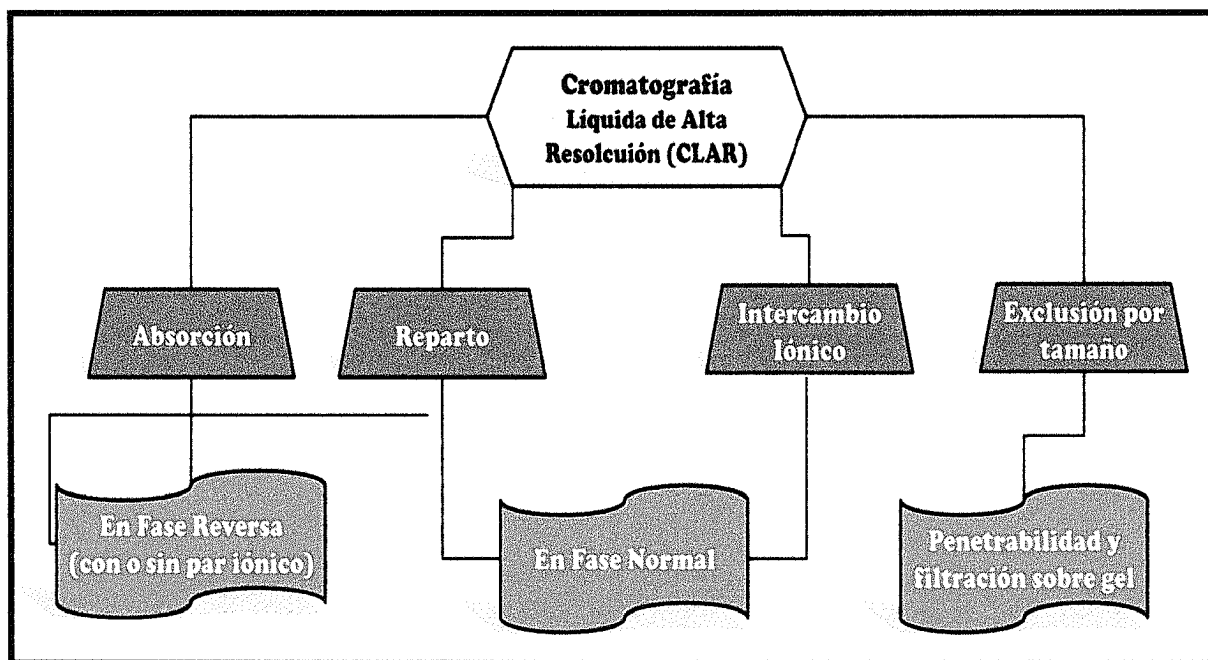


Figura 4. Clasificación de la cromatografía líquida de alta resolución

Por lo general, los aminoácidos pueden detectarse por UV en un rango de longitudes de onda entre los 190 y 210 nm. Sin embargo, trabajar a estas longitudes puede resultar conflictivo ya que la mayoría de los solventes también absorben a estas longitudes, así como también otros componentes de la muestra. En vista de esto, en el transcurso de los años se han venido desarrollando numerosos procedimientos que involucran la formación de derivados de aminoácidos sujetos a la detección fluorescente, visible o ultravioleta.

La transformación de los aminoácidos a derivados detectables a longitudes de onda más altas o fluorescentes puede llevarse a cabo antes de la separación cromatográfica o inmediatamente después de la elución de la columna, dependiendo de si se desea mejorar las características de retención y/o proporcionar una respuesta selectiva de los analitos en matrices complejas. Es importante destacar, que cada una de estas formas de derivatización posee sus ventajas e inconvenientes y es el operador quien

decide cuál método utilizar dependiendo de la muestra y del equipo que disponga.

Actualmente, los reactivos derivatizantes más utilizados para el análisis de estos compuestos se presentan en la Tabla 2^[169,170].

Tabla 2. Reactivos derivatizantes más utilizados para el análisis de aminoácidos

Reactivo Derivatizante	Grupo amino	Método de Separación	Pre- o postcolumna	Detección
o - ftalaldehído(OPA)	1°	EC o CFR	Pre- y post-	Vis (570nm) y Fluorescencia
Isotiosianato de fenilo (PITC)	1° y 2°	CFR	Pre-	UV (240–255 nm)
Cloruro de dansilo(DABS-Cl)	1° y 2°	CFR	Pre-	UV-Vis y Fluorescencia
7-cloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl)	1° y 2°	CFR	Pre- y post-	Fluorescencia
7-fluoro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F)	1° y 2°	CFR	Pre- y post-	Fluorescencia
Cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformato (Fmoc-Cl)	1° y 2°	CFR	Pre-	Fluorescencia

EC = Electroforesis Capilar; CFR = Cromatografía en Fase Reversa.

En este contexto Kirchhoff y col^[23,24]., evaluaron el contenido de aminoácidos libres en muestras de cacao por CLAR en fase reversa. Para ello transformaron los aminoácidos en OPA-derivados, los cuales presentaron una longitud de excitación y emisión a 334 y 425 nm, respectivamente.

Pripis-Nicolau y col^[174]., también emplearon el OPA como agente derivatizante de los aminoácidos para la determinación de su contenido en vinos. Sin embargo, utilizaron un segundo agente derivatizante a fin de también poder detectar por fluorescencia aminoácidos que contenían azufre en su estructura molecular.

Puziah y col^[29]., estudiaron los cambios en los precursores del aroma y sabor en cacaos forasteros y trinitarios a medida que transcurría su fermentación. Entre ellos, evaluaron el contenido de aminoácidos por el método propuesto por Cohen y col^[175]., el cual utiliza el PITC como agente derivatizante, donde el aducto que se forma, feniltiocarbamato, puede detectarse a 254 nm por UV.

Fabiani y col^[171] desarrollaron un método para la determinación de 16 aminoácidos en jugos de frutas comerciales. Estos compuestos eran convertidos en derivados estables utilizando cloruro de 9-fluoroenilmetil clorofornato y se detectaron por UV a una longitud de 263 nm.

Orly y col^[61]., también utilizaron el FMOC-Cl en la determinación de aminoácidos en muestras de cacao por cromatografía líquida de reparto en fase reversa con detección por fluorescencia. El análisis de los aminoácidos lo llevaron a cabo en un cromatógrafo líquido que contaba con una válvula de inyección automática adicional que permitió automatizar la reacción de derivatización precolumna. De esta forma se favoreció la frecuencia de análisis y los resultados mostraron una mayor exactitud y precisión debido a una disminución de los errores por parte del operador.

La detección amperométrica por pulsos también ha sido utilizada en el análisis de aminoácidos y es la que mayor auge ha tenido en los últimos años. Este tipo de detección se acopla perfectamente con la separación de los analitos por cromatografía de intercambio aniónico, convirtiéndola en una técnica selectiva y específica sin la necesidad de un tratamiento que implique la derivatización de estas especies. Sin embargo, su empleo se ha visto restringido en muchos laboratorios de rutina ya que el detector electroquímico, quizás por su costo, no es habitual en ellos^[169,172,173].

V. 3.2.1. Tratamiento de la muestra en CLAR para aminoácidos

Es importante destacar que la aplicación exitosa de estas técnicas cromatográficas no solo depende de la selección adecuada de la columna, el sistema de detección y/o reacciones de derivatización sino también de una etapa previa de tratamiento de la muestra (extracción de los analitos y limpieza de la muestra) antes de introducirlos en el sistema cromatográfico.

En la mayoría de los casos, estos analitos se encuentran contenidos en matrices de naturaleza muy compleja y heterogénea. En consecuencia contienen sustancias que interfieran durante su análisis, además de causar el deterioro y contaminación del sistema cromatográfico. En vista de esto, para la determinación de aminoácidos en cualquier matriz es necesario un tratamiento previo de la muestra que contribuye a mejorar la selectividad y sensibilidad del análisis^[176].

El tratamiento de muestras en química analítica es una de las etapas más importantes y complejas del proceso analítico y, que por lo general contribuye a la mayor fuente de error en los resultados. Comprende una serie de operaciones cuya función principal es la de adecuar y conservar la porción de la muestra tomada para su introducción en la unidad de inyección del cromatógrafo.

Los principales objetivos que se persiguen en la preparación de la muestra para un análisis por CLAR son^[71,174]:

- Disolver los analitos en un solvente adecuado y compatible con el sistema cromatográfico seleccionado.
- Aislar los analitos desde la muestra con el mínimo posible de compuestos que interfieran en el análisis.

- Preconcentrar a los analitos en el caso de análisis de trazas.
- En ciertos casos es necesario derivatizar los analitos, ya sea, para mejorar su discriminación (separación) en la columna cromatográfica o para mejorar la detección (sensibilidad).

Estas etapas pueden considerarse como una serie de operaciones unitarias:

- a. Estabilización y liberación del analito de la matriz.
- b. Eliminación de los compuestos endógenos o interferentes.
- c. Incremento de la sensibilidad y/o selectividad.

Estas operaciones involucran el uso de un gran número de técnicas analíticas de separación (Figura 5).

La selección de cualquiera de ellas va a depender del estado de agregación en el que se encuentre la muestra y de ciertos factores como:

- Propiedades físicas y químicas de los analitos
- Concentración del analito en la muestra
- Naturaleza de la matriz en la muestra
- Forma en la que se presenta el analito en la muestra
- Compatibilidad de los medios de solubilización y extracción con el sistema cromatográfico
- Tipo de detecto
- Compatibilidad con el detector

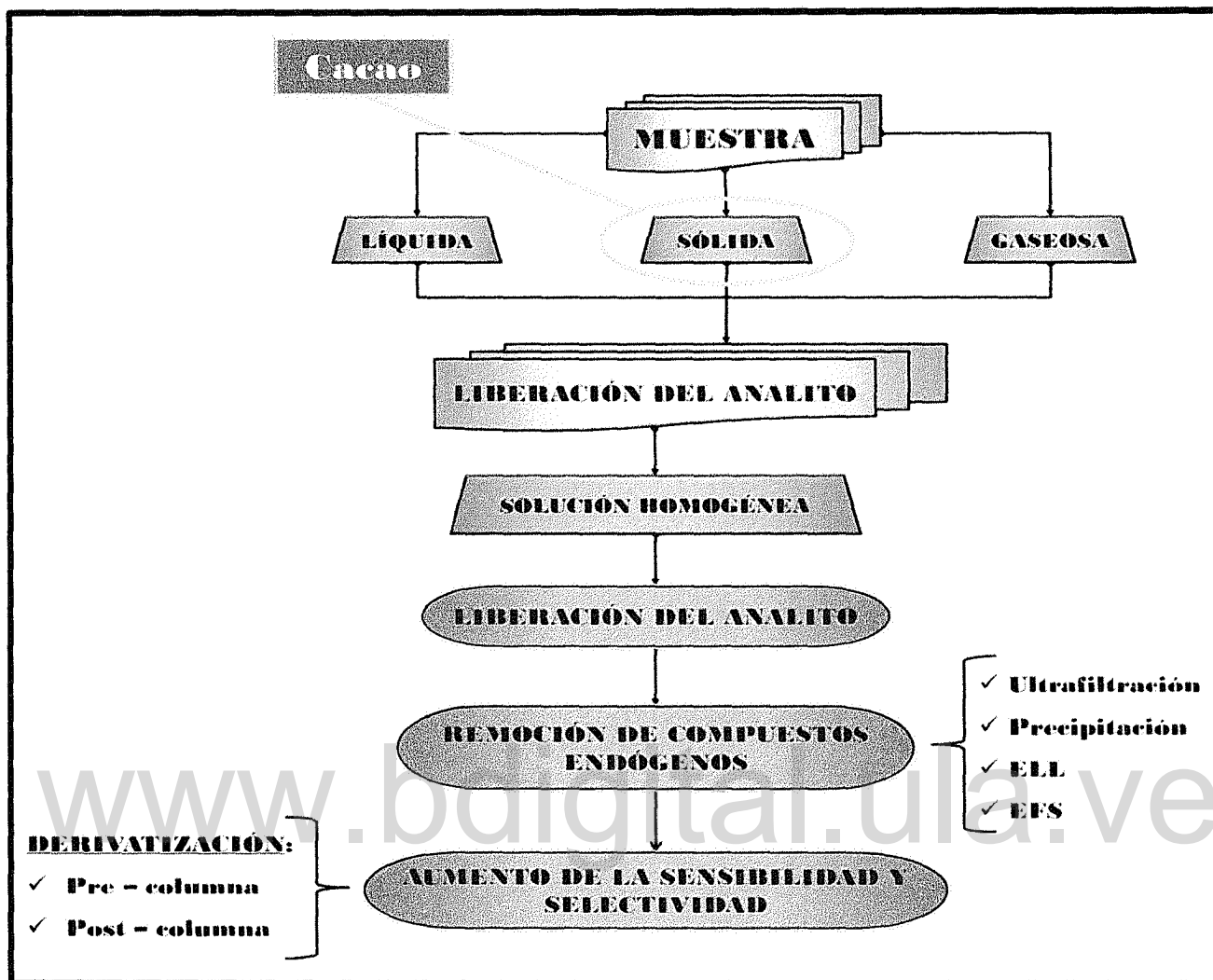


Figura 5. Diagrama esquemático del tratamiento de muestra de acuerdo con su naturaleza

En este sentido, de acuerdo con la bibliografía consultada^[23,24,29,71], cuando se utilizan matrices sólidas, la separación o liberación de los aminoácidos de la matriz, se realiza mediante procesos de extracción sólido-líquido. El solvente por elección es agua, debido a la alta polaridad que poseen los aminoácidos.

Carpén y col^[177], enfocaron su trabajo en el estudio de las mejores condiciones entre dos métodos de extracción (agitación y soxhlet) para la determinación aminoácidos libres en hojas de tomate. De acuerdo con trabajos

Wendy Josefina Orozco Contreras

previos, el solvente de extracción consistió en una mezcla de etanol:agua (80:20; v/v) y las condiciones estudiadas fueron: preservación de la muestra antes de la extracción, temperatura de extracción, relación cantidad de muestra: volumen de extracción y tiempo de extracción. Los mejores resultados se obtuvieron cuando las muestras fueron preservadas por liofilización y la extracción se llevó a cabo por Soxhlet durante 6 horas a 40 °C y una relación de 1g de planta/80 mL de etanol al 80%.

Por lo general, en el análisis de aminoácidos en muestras de cacao la mayoría de los autores siguen el protocolo de extracción propuesto por Kirchhoff y col.^[23,24]. Éste consiste en mezclar el polvo de cacao desgrasado en un determinado volumen de agua y agitación constante por una hora a 60 °C. Posteriormente, la solución es centrifugada, filtrada y lista para el análisis cromatográfico.

Rohan y Stewart^[51] también utilizaron agua como solvente de extracción de los aminoácidos en cacao. Posteriormente emplearon una columna de intercambio cationico (Amberlite IR120H) para remover los aminoácidos de la solución de extracción para su posterior análisis.

Bertazzo y col.^[178] examinaron la presencia de triptofano (libre y unido a proteínas) en granos de cacao de varios orígenes. La separación de este aminoácido de la muestra se llevó a cabo realizando dos extracciones sucesivas con agua por 1 hora a 37 °C y con agitación constante, cada una. Posteriormente, se centrifugó por 40 min a 12.000 rpm y la solución acuosa se ultrafiltró usando membranas Diaflo XM-50. Parte del filtrado se utilizó para determinación cromatográfica del analito.

El agua si bien es un buen solvente para la extracción de los aminoácidos desde las muestras de cacao, tiene el inconveniente de no ser selectiva, ya que también puede extraer otros compuestos polares en cantidades importantes que pueden causar interferencias durante el análisis

Wendy Josefina Orozco Contreras

cromatográfico. En ese sentido, el extracto contendrá otros compuestos además de los de interés, lo que hace necesario su limpieza previo a su inyección en el sistema cromatográfico.

La eliminación de estos compuestos endógenos se puede realizar mediante el empleo de técnicas como la precipitación con solventes orgánicos, la ultrafiltración y la extracción en fase sólida. De estos procedimientos, el más utilizado en los últimos años ha sido la extracción en fase sólida (EFS).

V. 3.2.1.1. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (EFS; SPE: solid phase extraction, siglas en inglés) es una de técnicas más utilizadas para la limpieza de la muestra en CLAR. El término “extracción en fase sólida” se debe a que el material soporte utilizado es un sólido, a través del cual pasa un líquido o un gas.

La forma de operar consiste en hacer pasar el extracto que contiene los analitos a estudiar sobre una fase sólida que los adsorbe de manera específica. Tras la adsorción, los analitos son extraídos con una pequeña cantidad de disolvente que tiene más afinidad por ellos que la fase sólida.

Generalmente, la extracción se realiza en una pequeña columna, denominada cartucho, de polipropileno donde la fase sólida o absorbente se empaca en forma de sándwich entre dos filtros (placas de polietileno con 20 μm de diámetro de poro) y la fase líquida se hace fluir a través del mismo ya sea por succión o por presión. La cantidad de fase sólida es variable ya que depende del volumen de muestra y de la concentración de los analitos presentes.

Las fases estacionarias empleadas en la EFS son similares a las utilizadas en cromatografía líquida. De acuerdo con el carácter químico del

grupo funcional unido a la sílice o al copolímero, las fases resultantes se pueden clasificar en: no polares, polares o de intercambio iónico (Tabla 3). La elección del disolvente va a depender de la naturaleza de la fase estacionaria. La selección del sorbente dependerá de las propiedades del analito, de su nivel de concentración y del disolvente en el que se encuentre.

Tabla 3. Materiales de relleno de los cartuchos de extracción en fase sólida^[179]

Tipo de Relleno		Características
Diamino	- $(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	Intercambiador aniónico débil
Amonio Cuaternario	- $(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$	Intercambiador aniónico fuerte
Ácido Carboxílico	- $(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Intercambiador catiónico débil
Ácido Sulfónico	- $\text{C}_6\text{H}_2\text{SO}_2\text{OH}$	Intercambiador catiónico fuerte
Alúmina		Sorbente polar
Florisil	Silicato de magnesio activado	Sorbente polar
Silicagel		Sorbente polar
Tierra de diatomea		Sorbente polar
Ciano	- $(\text{CH}_2)_3\text{CN}$	Sorbente de polaridad media
Amino	- $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	Sorbente de polaridad media
Fenilo	- C_6H_5	Sorbente no polar
Octilo	- C_8H_{17}	Sorbente no polar

La aplicación de esta técnica implica el cumplimiento de una serie de pasos que se detallan a continuación^[179]:

i. **Etapas de acondicionamiento:** Consiste en la activación del adsorbente y de los grupos funcionales pasando un solvente apropiado a través del cartucho. Para activar adsorbentes hidrofóbicos (por ejemplo C-18) se usa generalmente metanol o acetonitrilo, mientras que para los hidrofílicos (por ejemplo sílice) se usa hexano o cloruro de metileno.

ii. **Etapas de carga de la muestra:** Se aplica la muestra en la parte superior del cartucho. Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente. El

material endógeno de la matriz puede pasar por la columna sin ser retenidos mientras que los componentes de interés han de retenerse.

iii. Etapas de lavado: Permite la eliminación de cualquier resto de compuestos endógenos de la matriz que puedan interferir manteniendo los analitos en el adsorbente. Se pueden utilizar un solvente o una serie de solventes de fuerza creciente de elución que eliminen la mayoría de los contaminantes, mientras que los analitos de interés queden retenidos.

iv. Etapas de Secado: Las trazas de solvente se eliminan haciendo circular aire a través de la columna durante 2 a 10 minutos. Esta etapa mejora el rendimiento de la extracción.

v. Etapas de Elución: Se pasa un solvente adecuado por el cartucho para eliminar la interacción analito-sorbente y eluir el 100% de los compuestos de interés. El solvente adecuado debe tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, dejándolas en el lecho del adsorbente. El volumen de elución ha de ser lo menor posible para mantener alto el factor de concentración.

Spanik y col.^[180] usaron la extracción en fase sólida con diferentes intercambiadores iónicos para la separación y preconcentración de aminoácidos contenidos en muestras líquidas. Para ello, utilizaron tres tipos de resinas intercambiadoras: una de intercambio aniónica fuerte, una de intercambio aniónica débil y una de intercambio catiónico fuerte. Se observó que el cartucho de intercambio catiónico era el más adecuado para la separación y preconcentración de los aminoácidos en soluciones acuosas. La recuperación global del proceso de extracción se calculó como el valor promedio de tres mediciones encontrándose en un intervalo de 75 – 99% dependiendo del tipo de aminoácido.

La EFS, como se puede apreciar, implica una serie de etapas que hace que el procedimiento sea tedioso y consuma tiempo en su ejecución. Sin embargo, en los últimos años se ha logrado el acoplamiento de esta técnica con los sistemas CLAR, permitiendo así la automatización de algunas etapas del tratamiento de la muestra. En consecuencia, se pueden llevar a cabo las etapas de extracción y eliminación de los compuestos interferentes en línea, disminuyendo en gran parte el tiempo de análisis y logrando una mayor precisión y exactitud en el método.

La automatización de la EFS se logra mediante el empleo de los sistemas de columnas acopladas (Switching-Column: siglas en inglés) introducidos por Huber y col.^[181] y en los últimos tiempos, han sido muy utilizados en la limpieza de muestras y concentración de los analitos.

V. 3.2.1.2. Automatización de la extracción en fase sólida

Los sistemas de columnas acopladas comprenden todos los sistemas en los cuales la dirección de la fase móvil cambia por el uso de válvulas de alta presión automáticas o manuales. Así, el eluido de una columna se transfiere a otra en determinado intervalo de tiempo. Por lo general, se utilizan diferentes tipos de columnas. Consisten de una válvula manual o automática y de dos o más columnas, dependiendo del número de pasos que involucre el tratamiento de la muestra. Por lo general, en la primera columna se realiza una extracción en fase sólida de los analitos y limpieza de la muestra eliminando los compuestos endógenos de la muestra. Finalizado este proceso los analitos son transferidos a la columna analítica donde tiene lugar su separación y subsecuente detección a la salida de la columna. Es importante señalar que la transferencia de una columna a la otra puede también realizarse con eluyentes de diferente poder de elución.

Por lo general se utilizan cuatro modalidades, las cuales dependiendo de la fase móvil que realiza la transferencia y del origen de la misma se clasifican en: directa, indirecta, reversa y de circuito (Figura 6).

Jandik y col.^[182] desarrollaron un método automatizado que permitió la eliminación de los carbohidratos de las muestras previo a la determinación de los aminoácidos por cromatografía de intercambio aniónico con detección amperométrica de pulso integrado. En este caso, el primer paso consistió en la inyección de la muestra en el sistema y su transferencia a una columna de intercambio catiónico de hidrógeno, donde los carbohidratos pasan a través de ella mientras que los aminoácidos son retenidos. En este paso la fase móvil (fluido de limpieza) es agua, ya que es la única que permite que los aminoácidos queden completa e inmediatamente retenidos en esta columna. Posteriormente, la columna de intercambio catiónico se pone en serie con la columna analítica de cromatografía de intercambio aniónico y se transfieren los aminoácidos con la fase móvil (NaOH, pH 12,7), donde los aminoácidos se separan sin ninguna interferencia por parte de los carbohidratos. Para cada inyección de la muestra, el intercambiador catiónico se debe regenerar con protones por lo que existe una etapa de reacondicionamiento antes de cada inyección. Todo el procedimiento se automatizó y el método presentó una reproducibilidad para cada aminoácido con una desviación estándar promedio del 3,9% (n=5) y un porcentaje de recuperación para los analitos en un intervalo de 73 – 100%.

La automatización de la EFS utilizando los sistemas de columnas acopladas representa una excelente alternativa para la etapa de tratamiento de la muestra. El procedimiento de limpieza y concentración de la muestra es más selectivo, eficaz y rápido por lo que la frecuencia de análisis aumenta. En consecuencia el costo por análisis disminuye, aumenta la seguridad del operador y los procedimientos son menos contaminantes del medioambiente.

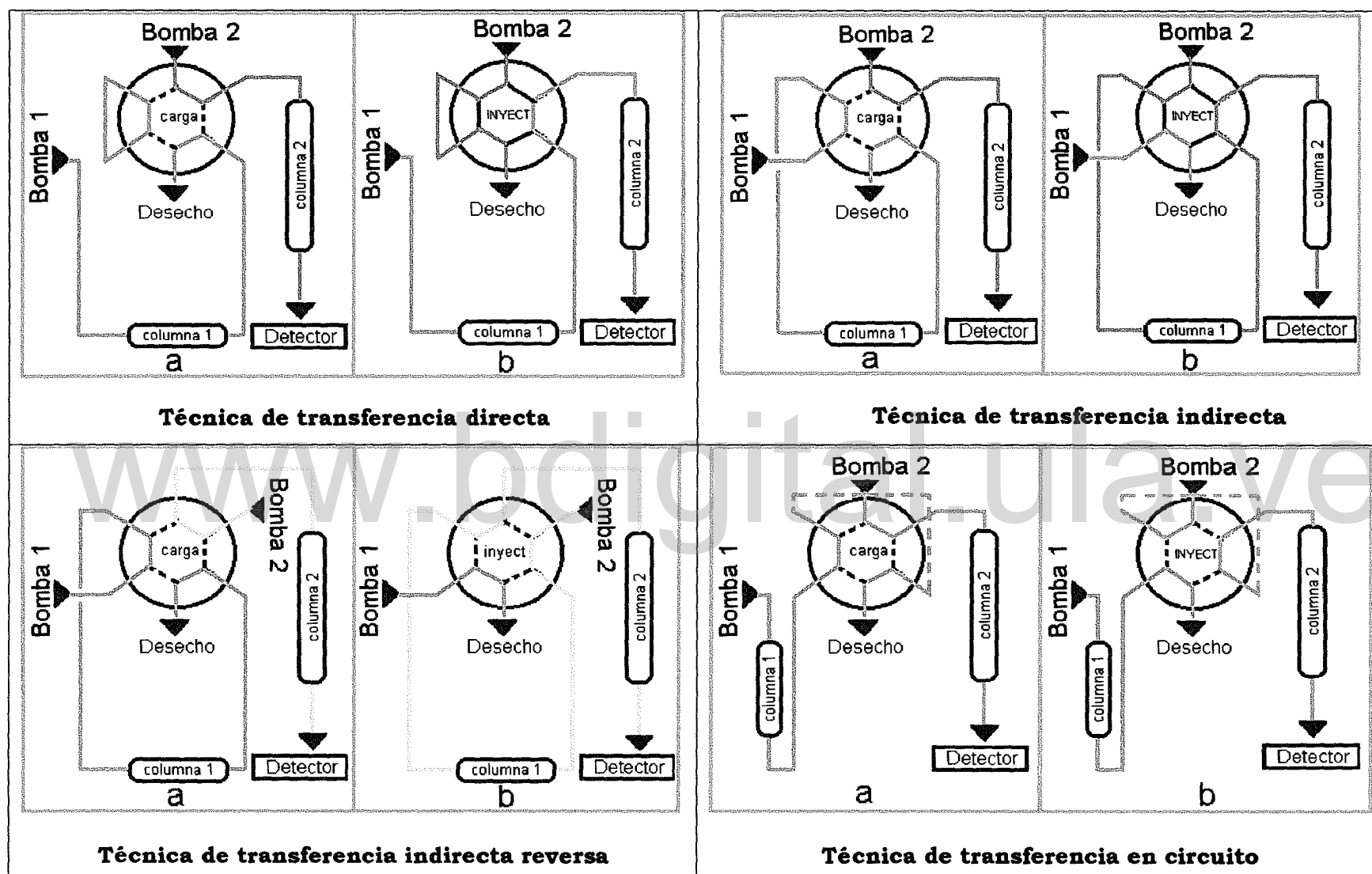


Figura 6. Modalidades de los sistemas de columnas acopladas

V. 4. Propuesta de trabajo y objetivos

Luego de una evaluación crítica de la bibliografía consultada se pudo constatar que dentro de los métodos más empleados en la determinación de aminoácidos, tienen un papel muy importante los métodos cromatográficos. Particularmente la cromatografía de líquidos de alta resolución ha tenido gran aplicación para el análisis de aminoácidos.

Los aminoácidos, como ya lo hemos dicho, son de naturaleza polar y su detección con los detectores convencionales de CLAR como UV y fluorescencia no es posible debido a la ausencia de grupos cromóforos o fluoróforos en la estructura molecular de muchos de ellos. Por ello, las reacciones de derivatización precolumna de estos compuestos no solamente permiten su detección por UV-arreglo de diodos sino que además mejoran su retención y discriminación en columnas con empaque apolares del tipo C₁₈. En la revisión bibliográfica se reportan una gran variedad de reactivos derivatizantes entre los que se destaca el isotiocianato de fenilo (PITC) que reacciona tanto con los aminoácidos primarios, como con los secundarios de acuerdo con el método propuesto por Bidlingmeyer y col.^[183], formando derivados (PTC-AA) estables que pueden detectarse por UV entre los 240 y 255 nm.

Por otra parte, si bien la cromatografía líquida ha sido la técnica más utilizada y reportada en la literatura en el análisis de aminoácidos, la cromatografía de gases también se puede utilizar para este fin. En algunos casos, como hemos dicho, ya sea por la disponibilidad de la instrumentación o costos operacionales puede ser la mejor elección.

La cromatografía de gases es una técnica más accesible a muchos laboratorios de rutina y, si se combina con la espectrometría de masas como

sistema de detección, el resultado es una metodología analítica de elevada selectividad y sensibilidad y amplio intervalo dinámico.

Sin embargo, la naturaleza polar de las moléculas de los aminoácidos requiere que sean derivatizados previo a su análisis por cromatografía de gases.

El objetivo de la derivatización es hacer un analito más volátil, menos reactivo, y por lo tanto mejorar su comportamiento cromatográfico. La sililación es el procedimiento de derivatización más ampliamente utilizado para el análisis de aminoácidos por GC. Los reactivos de sililación son populares porque son fáciles de usar y forman fácilmente derivados.

En base a todo lo expuesto y atendiendo a: la disponibilidad de los reactivos involucrados y a la infraestructura con que se cuenta en el Laboratorio de Espectroscopía Molecular, dentro del marco de este capítulo de la Tesis proponemos:

→ *Desarrollar y validar metodologías analíticas utilizando la cromatografía líquida de alta resolución y la cromatografía de gases para evaluar el perfil de aminoácidos libres en muestras de cacaos durante el beneficio postcosecha.*

Para cumplir con esta propuesta de trabajo nos propusimos los objetivos que se detallan a continuación.

V.4.1. Objetivos

V.4.1.1. Objetivos generales

⊕ Desarrollar y validar un método automático por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección UV-arreglo de diodos y con tratamiento de la muestra en línea para

160

Wendy Josefina Orozco Contreras

evaluar el perfil de aminoácidos libres en muestras de cacaos durante el proceso de fermentación y tostado.

⊕ Desarrollar y validar una metodología alterna por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas para la determinación de los aminoácidos libres en las muestras de cacao.

V.4.1.2. Objetivos específicos

V.4.1.2. 1. Para cromatografía líquida de alta resolución

⊕ Optimizar un procedimiento de extracción de los aminoácidos desde las muestras de cacao.

⊕ Optimizar la reacción de derivatización entre el isotiocianato de fenilo (PITC) y los aminoácidos

⊕ Optimizar la etapa de separación de los aminoácidos derivatizados (PTC-AA) por cromatografía de reparto en fase reversa utilizando una columna analítica del tipo C₁₈ y la del detector UV con el fin de obtener la mejor sensibilidad.

⊕ Montar un sistema de columnas acopladas que permita automatizar la etapa de extracción en fase sólida de los derivados de los aminoácidos desde los extractos.

⊕ Validar el procedimiento realizando estudios de precisión y exactitud.

⊕ Aplicar la metodología desarrollada en la determinación de aminoácidos muestras de cacao en diferentes etapas del proceso postcosecha (fermentación y tostado)

V.4.1.2.2. Para cromatografía de gases

- ⊕ Optimizar la reacción de derivatización entre N,O-Bis(trimetill-silil) trifluoroacetamida (BSTFA) y los aminoácidos.
- ⊕ Seleccionar la columna analítica y optimizar un método por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas que permita la detección y cuantificación de los derivados de los aminoácidos.
- ⊕ Aplicar la metodología desarrollada para la determinación de los derivados de los aminoácidos de las mismas muestras de cacao.

V. 5. Parte experimental

www.bdigital.ula.ve

V. 5.1. Sección cromatografía líquida de alta resolución

V. 5.1.1. Reactivos y solventes

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. El ácido acético (99.7%) de ANALAR, el acetato de sodio (99%, p/p) de MERCK, el feniltiocianato (reactivo derivatizante, grado de secuencia proteínica) de SIGMA y la trietilamina (99%, p/p) de Aldrich.

Los patrones de los aminoácidos (DL-Aminácidos 99%, p/p) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA).

Los solventes empleados, etanol y acetonitrilo, fueron de grado HPLC provenientes de las casas comerciales J.T Baker (Phillipsburg N.J USA) y Fisher, respectivamente. El agua utilizada se purificó en un sistema Milli-Q SP TOC (Water. Millipore, Milliford, MA, USA).

V. 5.1.2. Soluciones de trabajo

V. 5.1.2.1 Soluciones patrones de aminoácidos

Se prepararon soluciones acuosas de 17 aminoácidos presentes en el cacao a una concentración de 10.000 µg/mL. Para ello se pesaron 0,0500 g de cada aminoácido y se disolvieron en agua Milli-Q hasta un volumen final de 5 mL, con excepción del triptófano que disolvió en ácido clorhídrico diluido (0,1M). Estas soluciones se almacenaron bajo refrigeración a 4 °C y las soluciones de trabajo de menor concentración se prepararon semanalmente por dilución de éstas en agua Milli-Q.

V. 5.1.2.2. Fases móviles

Se dividen en dos tipos de fases móviles, las utilizadas para la limpieza de la muestra y las utilizadas para la separación de los aminoácidos en la columna cromatográfica.

Las fases móviles empleadas en la etapa de limpieza de la muestra y extracción de los analitos fueron:

1) La fase móvil de limpieza, de bajo poder de elución consistió en una solución 2% de acetonitrilo en buffer acetato 0,05M (pH 5,1). El buffer acetato se preparó a partir de una solución 0,05M de acetato de sodio (CH_3COONa) cuyo pH se ajustó a 5,1 con ácido acético concentrado (CH_3COOH).

2) La fase móvil de transferencia, con un poder de elución mayor, se preparó a partir de la fase limpieza y etanol en una relación porcentual de 10:90 (v/v), y se utilizó para transferir los analitos desde la precolumna a la columna analítica.



Para la separación de los aminoácidos en la columna analítica también se emplearon dos fases:

1) Fase móvil A: solución al 2 % de acetonitrilo en buffer acetato 0,05M (pH 5,1).

2) Fase móvil B: una solución de acetonitrilo:agua (60:40; v/v).

Todas las soluciones se filtraron a través de membranas de 0,45 μm de diámetro de poro (HV, Millex de Millipore) y se desgacificaron durante 20 min en un baño ultrasónico (Branson 2210) antes de su uso.

V. 5.1.3. Muestras de cacao

El método desarrollado se aplicó a la determinación de aminoácidos en las muestras de cacao que se detallaron en el Capítulo III, sección III.1, página 42,

V. 5.1.3.1. Extracción de los aminoácidos de las muestras de cacao

Un esquema del procedimiento de extracción de los aminoácidos se muestra en la Figura 7.

En un tubo de ensayo se pesaron 0,800 g de licor de cacao en polvo desgrasado y se sometieron a un proceso de extracción con 15 mL de agua desionizada (18 Ω). El tubo se colocó en un baño ultrasónico a 70 °C durante 15 min. El extracto obtenido se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000 r.p.m. El sobrenadante se transvasó a un matraz aforado de 25 mL, se enrasó con agua y se filtró al vacío utilizando filtros Millipore de 0,22 μm (Waters Corporation. Milford, Massachussets USA). Finalmente, se tomaron 200 μL del filtrado, se realizó la reacción de derivatización de los aminoácidos y se analizaron los derivados en el sistema cromatográfico propuesto^[61].

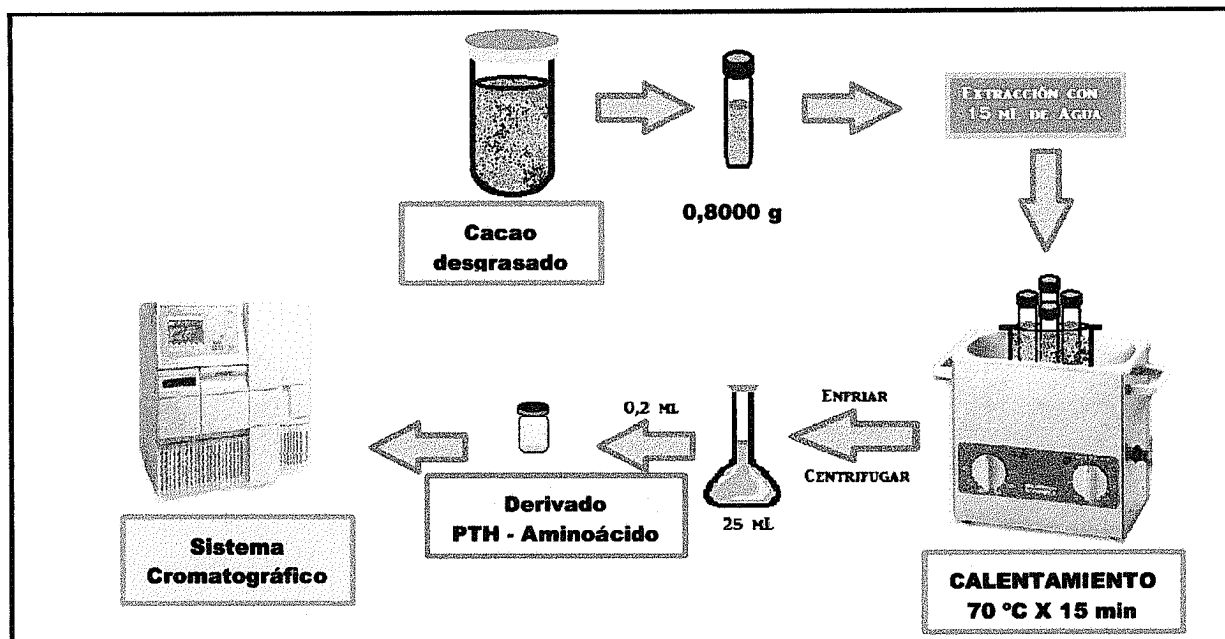


Figura 7. Esquema del procedimiento de extracción de los aminoácidos desde el licor de cacao desgrasado.

V. 5.1.3.2. Reacción de derivatización de los aminoácidos

Los derivados PTC-AA se prepararon de acuerdo con el método propuesto por Bidlingmeyer y Cohen^[183] con algunas modificaciones a fin de reducir el tiempo de reacción. El proceso de derivatización, consistió en mezclar 100 μL de la muestra y 200 μL de la solución derivatizante [Etanol:Trietilamina:Agua:PITC (7:1:1:1, v:v:v)]. La reacción de derivación fue asistida por radiación de microondas en un horno de microondas doméstico (LG Intelowave, MS-0745V) a una potencia de 340 W durante 40 seg.

V. 5.1.4 Instrumentación

La determinación de los aminoácidos en las muestras de cacao se realizó por cromatografía líquida de alta resolución con introducción de la muestra en línea, empleando el instrumental que se detalla a continuación:

Wendy Josefina Orozco Contreras

⇒ Un cromatógrafo líquido marca Perkin-Elmer Serie 200, provisto con una bomba cuaternaria de alta presión, un desgasificador en línea para las fases móviles, un automuestreador, un horno con módulo de control de temperatura para la columna, un detector UV-Visible de arreglo de diodos y un computador digital provisto con un Software TotalChrom (versión 6.3), que permite el control de todos los componentes del sistema, así como: el registro, almacenamiento y procesamiento de los datos.

⇒ Una válvula de inyección manual Rheodyne modelo 7125 con un bucle de 100 μL . Para el acoplamiento del sistema en línea se emplearon dos válvulas selectoras Rheodyne de seis puertos marca Supelco.

⇒ Una bomba Knauer modelo 64 para suministrar la fase móvil de lavado.

⇒ Una bomba Water modelo 515 para suministrar la fase de móvil para la transferencia de los analitos desde la precolumna 1 a la precolumna 2.

⇒ Una columna Oasis HBL de 20 mm de longitud, 3,9 mm de diámetro interno y 25 μm de diámetro de partícula (Precolumna 1).

⇒ Una columna Supelcosil™ LC-18 de 20 mm de longitud, 3 mm de diámetro interno y 5 μm de diámetro de partícula (Precolumna 2).

⇒ Una columna analítica Advantage Kromasil C18 100A de 150 mm de longitud, 3,0 mm de diámetro interno (DI) y 3 μm de diámetro de partícula (dp).

⇒ Un pHmetro marca Orion Research modelo 701A/digital ionalyzer para controlar el pH de las diferentes soluciones.

⇒ Un baño ultrasónico marca Branson modelo 2510.

V. 5.1.5. Procedimiento empleado

La determinación de los aminoácidos se llevó a cabo empleando un sistema de columnas acopladas en la modalidad de transferencia en circuito, utilizando dos válvulas automáticas. En este tipo de sistema, las columnas (precolumna 1 y columna analítica) no están conectadas en serie durante el periodo de transferencia (Figura 8). El eluido de la precolumna 1 es enviado a otra precolumna y al girar la válvula es transferido a la columna analítica. El ciclo de análisis para este sistema consta de las siguientes etapas:

A. Inyección y lavado de la muestra

B. Transferencia

C. Análisis y reacondicionamiento

A. Inyección y purificación de la muestra: Consiste en la introducción de la muestra en un bucle de 100 μ L a través de un inyector automático, la muestra es arrastrada hasta la Precolumna 1 (columna Oasis HLB) por la fase móvil de lavado (línea naranja), la cual es suministrada por la Bomba 1 a un flujo de 1,5 mL/min. Bajo estas condiciones los derivados de los aminoácidos son retenidos en la Precolumna 1 mientras los compuestos endógenos presentes en la muestra son eliminados y llevados al desecho durante un tiempo de lavado de 0,5 min. En este tiempo, la válvula VS1 se encuentra en la posición de carga. Simultáneamente, la fase móvil de análisis, suministrada por Bomba 3 circula por la Precolumna 2 (Supelcosil™ LC-18) y la columna analítica a un flujo de 1,7 mL/min (línea azul)(Figura 8).

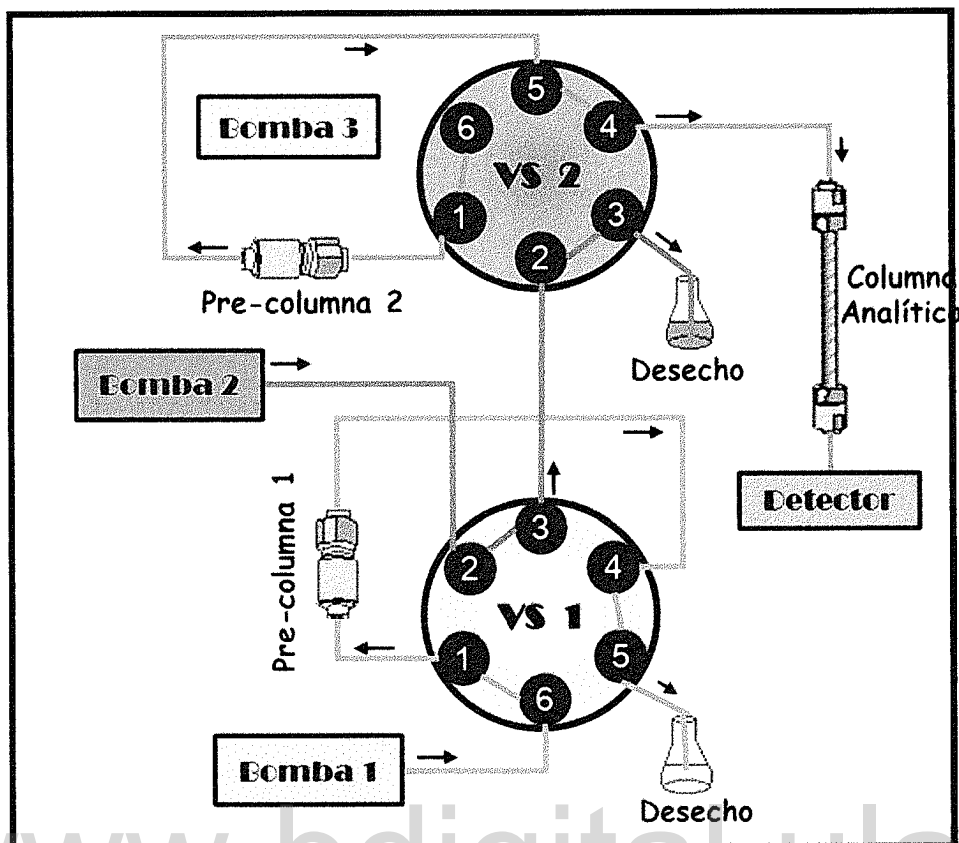


Figura 8. Sistema de columnas acopladas en su modalidad de transferencia en circuito. Válvulas VS1 y VS2 en su posición de carga.

B. Transferencia: En esta etapa, la válvula VS1 y la válvula VS2 cambian a la posición de inyección permitiendo así que la Precolumna 1 se acople en serie con la Precolumna 2 (línea punteada morada). Durante este proceso, la fase móvil de mayor poder de elución (Bomba 2: fase de transferencia) pasa por la Precolumna 1 en sentido inverso a la fase de lavado a un flujo de 1,8 mL/min y transfiere a la fracción de muestra que contiene a los analitos hasta las Precolumna 2, donde se retienen. El tiempo de transferencia es de 0,13 min (Figura 9). Culinado este tiempo la válvula VS2 cambia a su posición de carga, finalizando la transferencia.

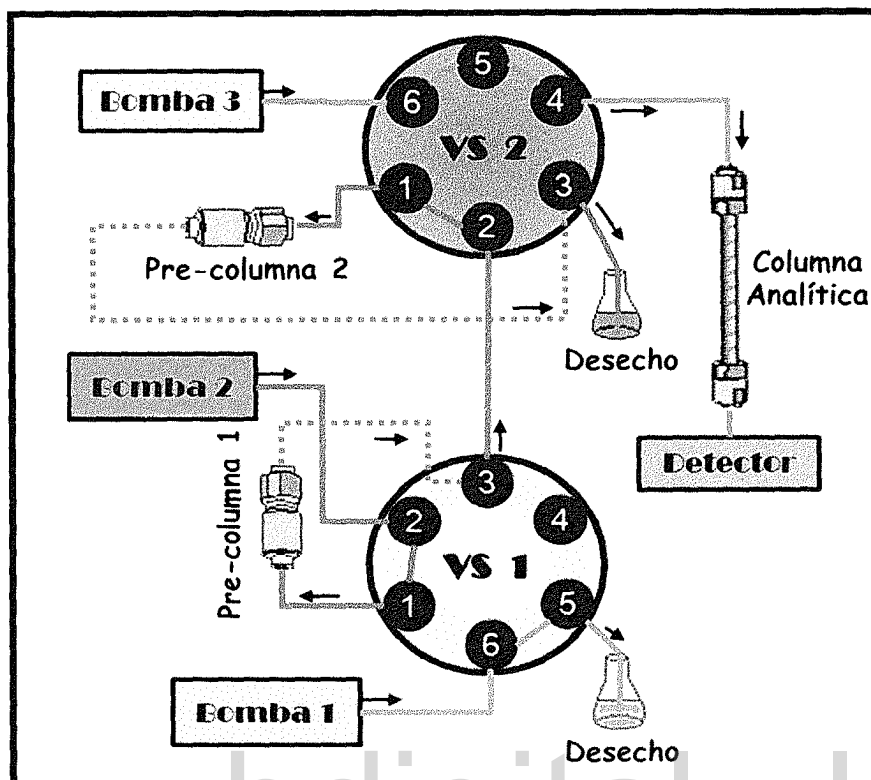


Figura 9. Sistema de columnas acopladas en su modalidad de transferencia en circuito. Válvulas VS1 y VS2 en su posición de inyección.

C. Análisis y Lavado: Durante esta etapa, la fase de elución proveniente de la Bomba 3 lleva a los analitos de la Precolumna 2 a la columna analítica dando inicio a su separación y detección por espectroscopía ultravioleta a una longitud de 254 nm. Posteriormente, luego de 7 minutos válvula VS1 retorna a su posición de carga, asegurando de esta manera la eliminación de cualquier resto de muestra en la Precolumna 1 y su reequilibrio con la fase móvil de lavado para una nueva inyección (Figura 10).

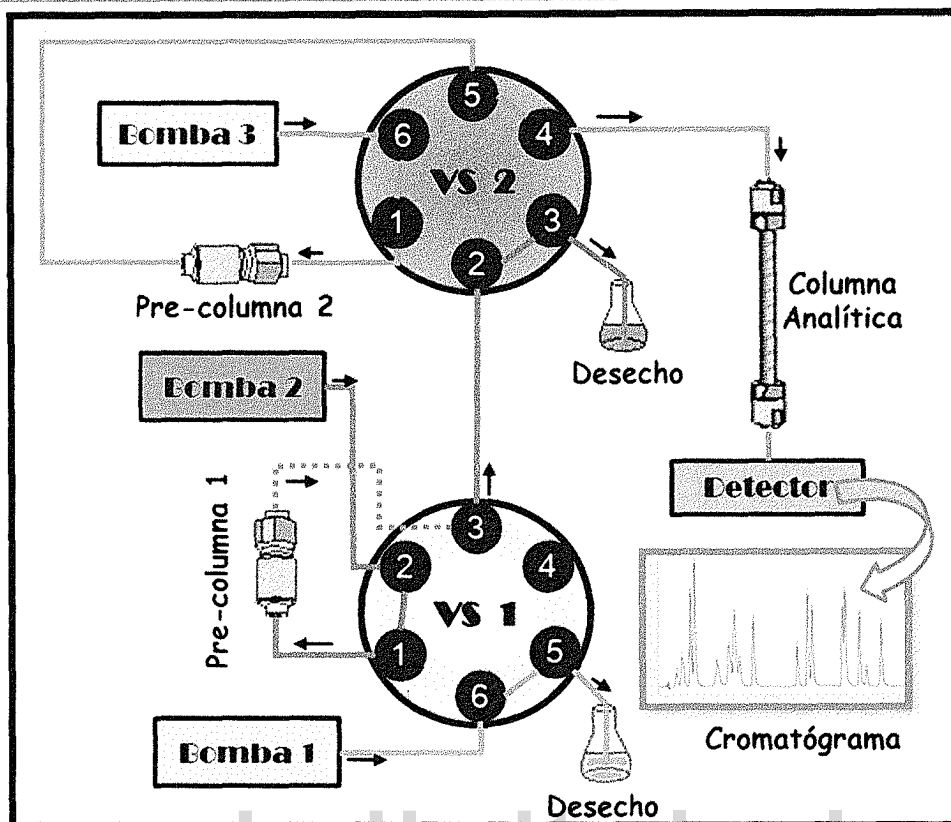


Figura 10. Sistema de columnas acopladas en su modalidad de transferencia en circuito. Válvulas VS1 y VS2 en su posición de carga.

V.5.1.6. Resultados y discusiones

V.5.1.6.1. Optimización de la reacción de derivatización

En el Laboratorio de Espectroscopia Molecular contábamos con el reactivo isotiocianato de fenilo (PITC) que reacciona tanto con los aminoácidos primarios como con los secundarios formando derivados (PTC-AA) estables que pueden ser detectados por espectroscopia ultravioleta. Por ello se seleccionó como reactivo derivatizante para el desarrollo de este trabajo.

La derivatización de los aminoácidos con PITC se llevó a cabo de acuerdo con el método propuesto por Bidlingmeyer y Cohen^[183] pero con

algunas modificaciones que realizamos con el fin de disminuir tiempo involucrado en la reacción.

V.5.1.6.1.1. Método de derivatización de Bidlingmeyer y Cohen^[183].

El mecanismo de la reacción de derivación se presenta en la Figura 11, donde el PITC reacciona con el grupo amino N-terminal del aminoácido en condiciones levemente alcalinas para formar un aducto, feniltiocarbamato (PTC-AA), que puede detectarse por UV entre los 240 y 255 nm.

En este ensayo, la etapa de derivatización se realizó en un tubo de ensayo pequeño.

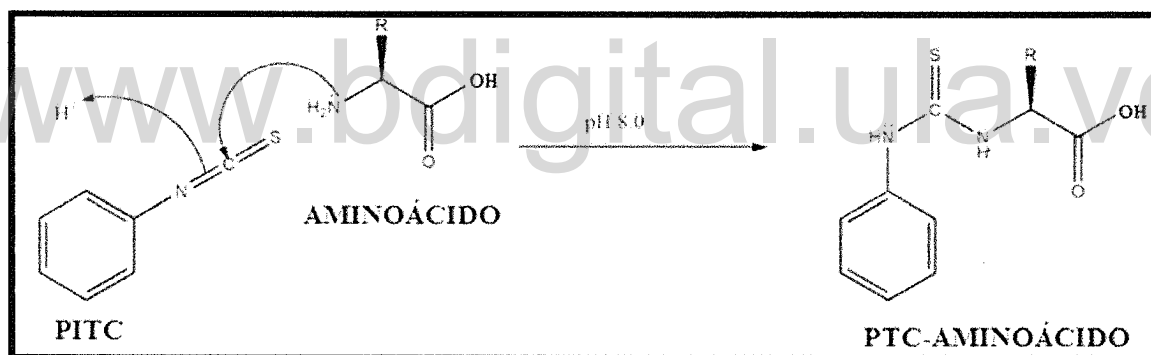


Figura 11. Mecanismo de reacción del PITC con los aminoácidos.

Se tomaron 20 μL de una mezcla de dos patrones de aminoácidos (ácido glutámico y treonina) y 20 μL de una solución de etanol:agua:triethylamina (2:2:1; v/v). Esta mezcla se secó al vacío con un flujo de nitrógeno por 5 min. El reactivo derivatizante consistía en una mezcla de etanol:triethylamina:agua:PITC (7:1:1:1; v/v). Para la formación de los derivados feniltiocarbamato se adicionaban 20 μL de este reactivo a la muestra seca, se tapaba el tubo de ensayo y se dejaba reaccionar por 20 min a temperatura

ambiente. Finalizado el tiempo de reacción se eliminaba el exceso de reactivo por evaporación al vacío con un flujo de nitrógeno. Posteriormente el derivado se reconstituía en 1 mL de agua y se inyectaban 20 μ L en el cromatógrafo. En la Figura 12 se muestra un esquema del procedimiento utilizado por los investigadores.

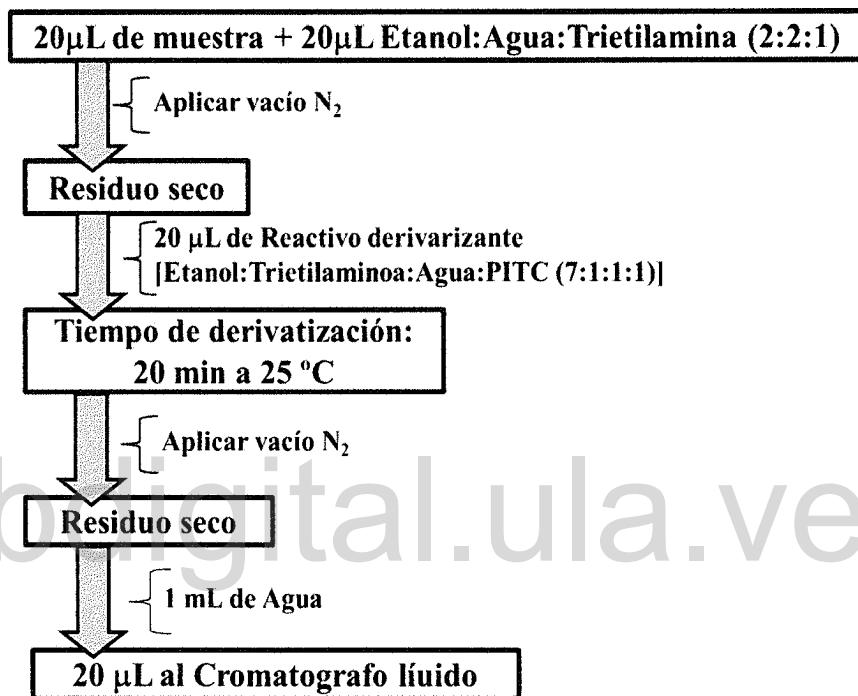


Figura 12. Esquema del procedimiento de derivatización de los aminoácidos de acuerdo a Bidlingmeyer y Cohen^[183]

En nuestro caso, en un principio reproducimos la metodología Bidlingmeyer y Cohen^[183] para la formación de los derivados y realizamos un estudio trabajando a temperatura ambiente y variando el tiempo de reacción con el fin de ver si lo podíamos reducir. Se evaluó el efecto del tiempo de derivatización sobre el rendimiento de la reacción. Para ello se realizó la reacción de derivatización a 2,5, 5, 10, 15 y 20 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13, donde se graficó las áreas obtenidas para los picos de los derivados de ácido glutámico y treonina en función del

tiempo de reacción. Se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de derivatización hay un incremento en el área de los picos, pero luego de los 15 minutos de reacción los cambios en las áreas de los picos eran poco significativos.

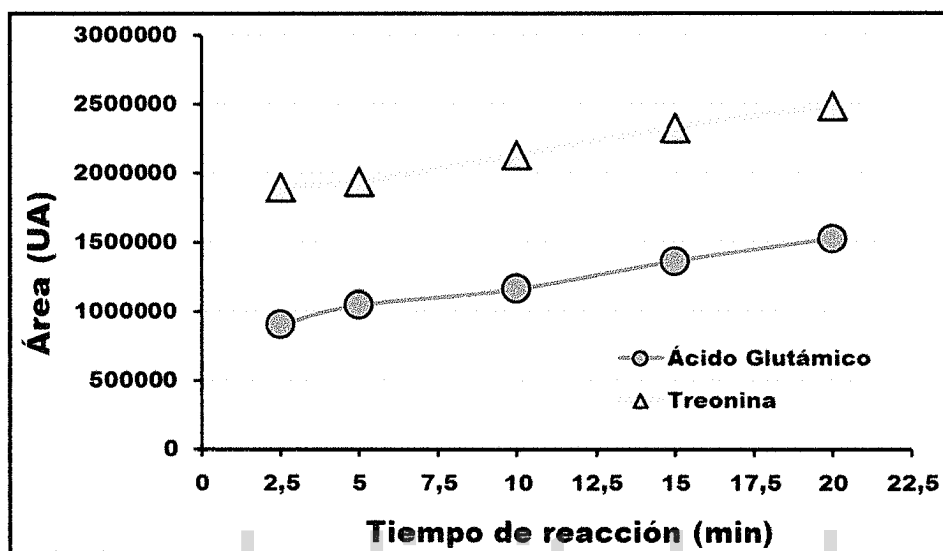


Figura 13. Efecto del tiempo de derivatización sobre el rendimiento de la reacción

En base a estos resultados pensamos que el tiempo de la reacción era muy largo y que lo podríamos disminuir estudiando el efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción de derivación. Adicionalmente, la experiencia que se tiene en el Laboratorio en el uso de las microondas, nos indujo a pensar que podríamos utilizar como forma de calentamiento la radiación con microondas en lugar del calentamiento convencional con baño María.

Como dijimos en el capítulo anterior, la aplicación de las microondas a los sistemas químicos representa un nuevo método para acelerar las reacciones químicas, con el consiguiente ahorro de tiempo. En general, al utilizar el método asistido por microondas es común que:

- Las condiciones de reacción sean más suaves

- Los tiempos de reacción sean más cortos
- Se obtengan rendimientos más altos

Concretamente, las microondas interaccionan con las moléculas de agua, desde la frecuencia de 2450 MHz, incrementando la velocidad de calentamiento. En presencia de las microondas, las reacciones químicas experimentan una fuerte aceleración, bien sea por la interacción directa de los reactivos o bien indirectamente por medio del disolvente.

V. 5.1.6.1.2. Reacción de derivatización asistida por microondas

En un vial se colocaron 20 μ L de una solución mezcla de los patrones de ácido glutámico y treonina y se le adicionaron 20 μ L de etanol y 20 μ L de la solución del reactivo derivatizante [etanol:triethylamina:agua:PITC (7:1:1:1; v/v)]. Esta mezcla se sometió a radiación por microondas en un horno de microondas doméstico (LG Intelowave, MS-0745V). Se optimizaron: el tiempo de irradiación, el nivel de potencia y la relación (v/v) entre la cantidad de aminoácido y reactivo derivatizante.

A. Tiempo y potencia de irradiación: Uno de los parámetros fundamentales es la potencia de irradiación ya que es la que establece la temperatura a la que se realizará la reacción y el otro es el tiempo de irradiación. Los primeros experimentos se realizaron a una potencia de radiación en 200W. Inicialmente se fijó un valor bajo de potencia teniendo en cuenta que la reacción reportada por Bidlingmeyer y Cohen^[183] se realizaba a temperatura ambiente. Para evaluar el efecto del tiempo de irradiación sobre la reacción se seleccionaron cuatro valores: 20, 30, 40 y 60 segundos a la potencia de radiación en 200W. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos.

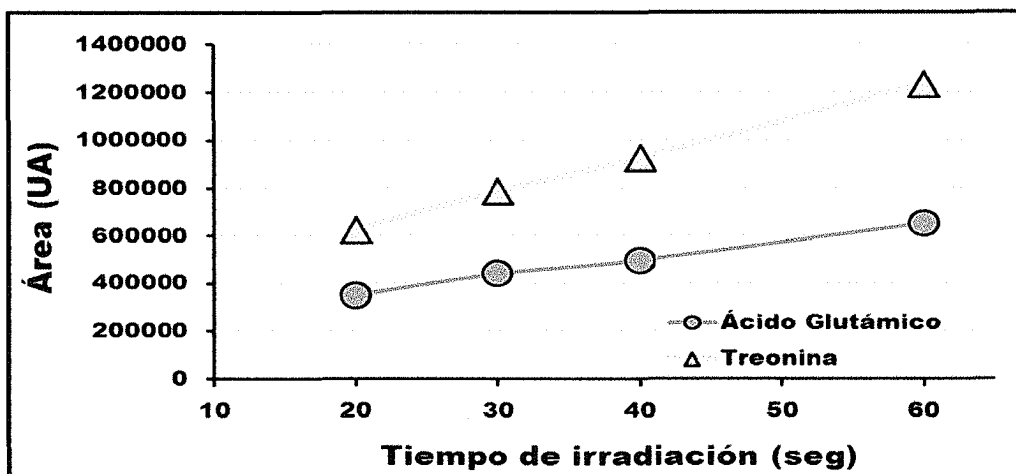


Figura 14. Efecto del tiempo de irradiación a una potencia de 200W

Se puede observar que a medida que se aumenta el tiempo de irradiación hay un incremento progresivo en el área de los derivados, lo que permitió pensar que todavía podía quedar parte de los analitos sin reaccionar con el reactivo derivatizante.

En vista de esto se decidió aumentar la temperatura aumentando la potencia de irradiación. Para ello se fijó la potencia de irradiación a 340 W y se estudiaron los mismos tiempos de reacción. Los resultados se muestran en la Figura 15, en este caso se puede apreciar que las áreas de los picos de los derivados aumentaron significativamente hasta un tiempo de 40 seg; para valores superiores las áreas permanecen casi constantes.

Estos resultados nos indicaron que se podía disminuir significativamente el tiempo de reacción de 20 min a 40 seg aumentando la temperatura de la reacción utilizando la radiación por microondas como forma de calentamiento. En este punto es importante señalar que no se evaluaron valores superiores de la potencia de irradiación a 340 W debido a que está reportado en la literatura la degradación del reactivo PITC a altas temperaturas [184]. Por lo tanto se estableció como tiempo óptimo de irradiación 40 seg a una potencia de 340W, como un buen compromiso entre un rendimiento muy

similar al que se obtiene cuando se aplica la metodología de Bidlingmeyer y Cohen^[183] pero con una disminución muy importante en el tiempo de reacción (Figura 16).

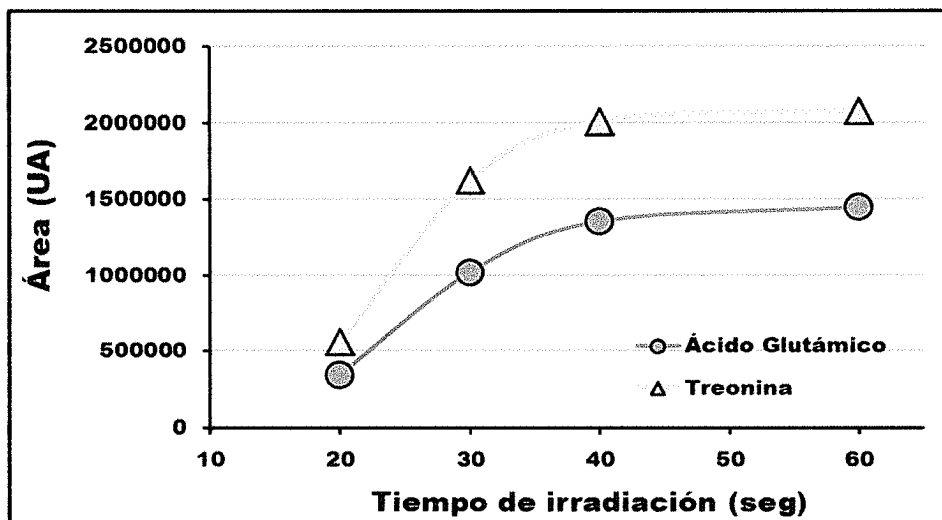


Figura 15. Efecto del tiempo de Irradiación a una potencia de 340W

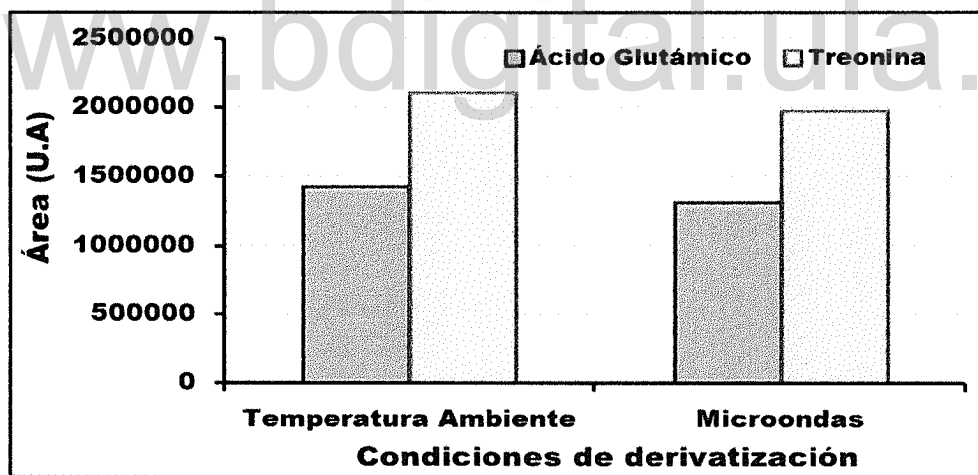


Figura 16. Comparación de las área obtenidas por el método de derivatización tradicional (15 min a temperatura ambiente) y utilizando microondas (40 seg a 340W).

B. Relación reactivo derivatizante:analito (v/v): De acuerdo con el mecanismo de reacción del PITC con los aminoácidos (Figura 11), la relación estequiométrica es de 1:1. Sin embargo, en la matriz a analizar se encuentran alrededor de 15 aminoácidos por lo que es necesario asegurarse

que la relación reactivo:aminoácido es la adecuada para derivatizar a todos los aminoácidos presentes en la muestra. Para ello, se realizó un estudio variando el volumen del reactivo derivatizante en 8, 12, 20, 40, 60 μL y el volumen de aminoácidos en 20, 50 y 100 μL para varios aminoácidos. Los resultados se muestran en la Figura 17. Se puede observar un máximo de rendimiento de la reacción para la relación aminoácido:reactivo derivatizante la 1:2 (v/v) por lo que se seleccionó para el resto de los análisis.

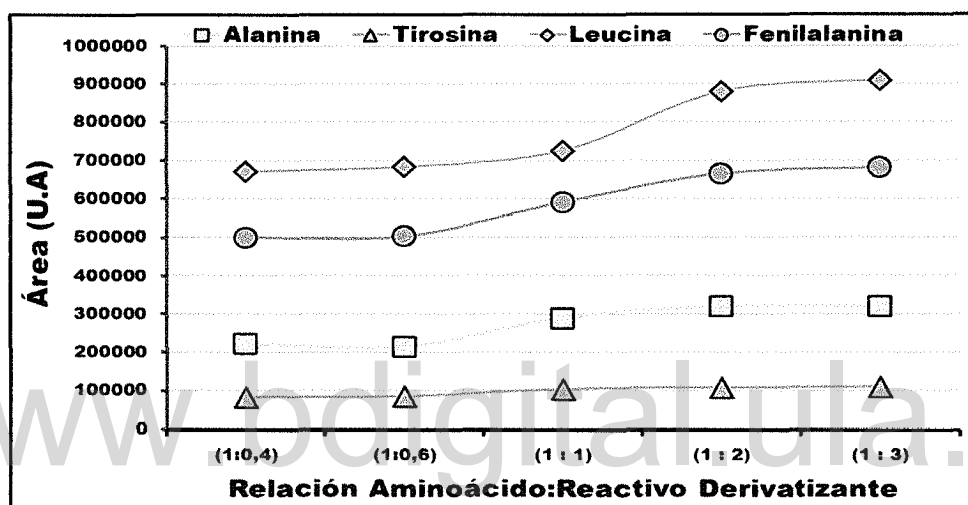


Figura 17. Relación entre los aminoácidos y el reactivo derivatizante

V.5.1.6.2. Sistema de columnas acopladas

La optimización de los parámetros instrumentales del sistema de columnas acopladas se llevó a cabo utilizando el método univariado, es decir, variando un parámetro a la vez, para lo cual se realizaron los siguientes estudios:

⇒ Selección de la precolumna de extracción en fase sólida de los derivados PTC-AA (precolumna 1) y optimización de las fases de lavado y de transferencia y sus flujos de circulación.

⇒ Optimización de la separación de los PTC-AA en la columna analítica (composición de la fase elución, pH, temperatura y

flujo) para lograr una buena resolución entre los analitos y un tiempo de análisis satisfactorio.

⇒ Montaje del sistema de columnas acopladas y determinación de los tiempos para los cambios de las válvulas selectoras de columnas de la posición de carga a la de inyección.

V.5.1.6.2.1. Optimización de la extracción en fase sólida de los PTC-AA

Se estudió:

1. La selección del material de empaque de la precolumna de extracción (fase estacionaria) a fin de obtener la máxima retención de analitos (PTC-AA) durante la etapa de limpieza.

2. La selección de la fase móvil de limpieza, la cual, debe permitir la retención de los PTC-AA en la fase estacionaria de la precolumna y la eliminación del mayor número de compuestos endógenos de la matriz para evitar su posible interferencia durante la separación.

La selección de estos parámetros dependen de las propiedades fisicoquímicas de los analitos a separar. Se sabe que los aminoácidos son especies anfóteras; su estructura y propiedades fisicoquímicas se encuentran influenciadas por el pH de la solución que los contiene. Además, debido a las diferentes características del grupo R que posee cada uno de ellos, existe una variación de su polaridad, lo que influye en su interacción con el empaque de la columna. Sin embargo luego de la reacción de derivatización no solo se mejora la detección de los aminoácidos, sino que también se aumenta su carácter hidrofóbico como consecuencia de la presencia del grupo fenilo en su estructura molecular.

Tomando en cuenta lo anterior, se estudió el comportamiento de una columna Oasis HBL (2,0 cm x 3,0 mm (DI) y con un diámetro de partícula de 25 μm) en la extracción en fase sólida de los PTC-AA durante la etapa de limpieza de la muestra. Este tipo de columnas se caracterizan por presentar un relleno con balance hidrofílico-lipofílico, es decir, su composición consiste de una proporción equilibrada de dos monómeros químicamente diferentes. Esto permite la retención de los compuestos polares a través de interacciones dipolo-dipolo con el monómero de N-vinilpirrolidona (carácter hidrofílico) y la retención de los compuestos no polares mediante fuerzas de Van de Waals con el monómero de divinilbenceno (carácter lipofílico)^[185,186]. En la Figura 18 se muestra la estructura del empaque de este tipo de columnas.

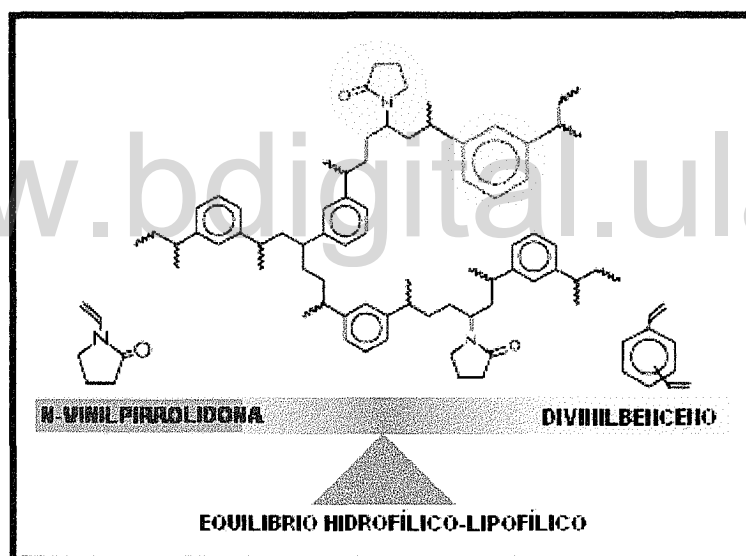


Figura 18. Composición del empaque Oasis HBL

Uno de los mayores beneficios del empleo de este tipo de columnas es que se puede aumentar la selectividad al variar el pH y la proporción entre solvente orgánico y agua en la fase móvil. De esta forma, modificando estas variables se puede aumentar la retención de los PTC-AA. Si los analitos son muy polares o ionizables, tendrán menor retención en la fase estacionaria de la columna y para eluirlos se pueden utilizar fases móviles débiles (acuosas con bajo contenido en solvente orgánico). Por otra parte, si al modificar el pH de la

fase móvil, los analitos se encuentran bajo su forma neutra, tendrán mayor afinidad por el empaque de la columna y serán retenidos por interacciones hidrofóbicas con la superficie de la fase estacionaria. Por ello, para eluirlos se necesitará de fases móviles más fuertes, con contenidos elevados del solvente orgánico. En la Figura 19 se muestra un diagrama donde se puede observar el comportamiento descrito para los empaques OASIS.

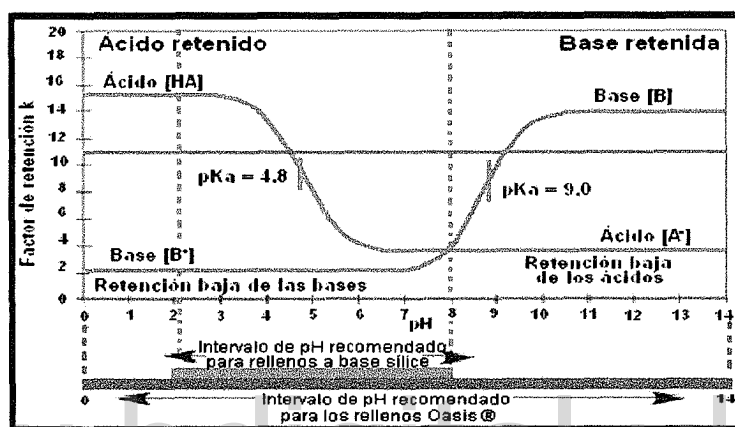


Figura 19. Comparación del factor de retención (k) y el pH para compuestos ácidos, básicos y neutros

Todas estas características convierten a los empaques Oasis en una excelente elección para llevar a cabo el proceso de EFS de los PTC-AA y fue seleccionada la columna OASIS HLB para la realización de este trabajo.

Para estudiar el comportamiento de los analitos en la precolumna OASIS HLB durante las etapas extracción y limpieza, se conectó la precolumna directamente al detector UV de arreglo de diodos y se optimizó la composición de la fase móvil de extracción y lavado y sus flujos de circulación. En nuestro caso para lograr la retención de los analitos se varió el pH y la proporción de solvente orgánico. Para ello, se inyectaron en la precolumna 100 μ L de un blanco y de los derivados de dos patrones de aminoácidos. Se seleccionaron el ácido aspártico y la lisina que de acuerdo a sus estructuras moleculares

podrían formar los derivados menos retenido y el más retenido en la precolumna. Para la detección de los PTC-AA se fijó la longitud de onda del detector UV-arreglo de diodos en 254 nm.

Los mejores resultados se obtuvieron con la móvil constituida por una solución al 2% acetonitrilo (MeCN) en buffer acetato 0,05M (pH 5,1) circulando a un flujo de 1,0 mL/min. A este pH los derivados PTC-AA se encontraban bajo su forma molecular favoreciendo su retención por interacción hidrofóbica con la superficie de la fase estacionaria de la columna Oasis. Adicionalmente un tiempo de 0,5 min (tiempo de lavado) permitía eliminar los compuestos endógenos de la matriz sin pérdida de los PTC-AA.

El tiempo de lavado se estableció entre el tiempo en que finalizaba de eluir de la precolumna todo el material endógeno de la matriz y el tiempo en que comenzaba a eluir de la misma el PTC-AA menos retenido (PTC-ácido aspártico) (ver Figura 20). La identificación de estos tiempos permitirá establecer el programa de tiempo en las válvulas selectoras al momento de acoplar todo el sistema.

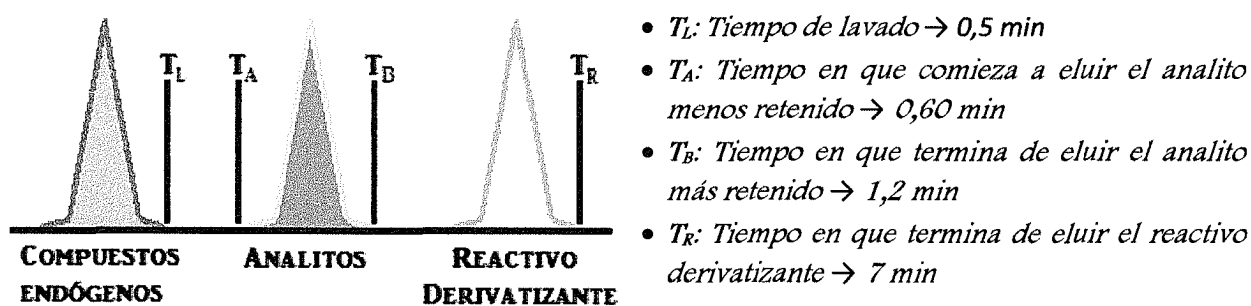


Figura 20. Condiciones óptimas para establecer los tiempos de limpieza de la muestra y extracción de los analitos en la columna.

Seguidamente se procedió a estudiar el proceso de transferencia de los analitos desde la precolumna a la columna analítica. Durante esta etapa se eluyen los PTC-AA de la precolumna en el sentido inverso al que fueron

introducidos con el fin de comprimir los picos de los analitos. De esta forma, se evita una pérdida de eficiencia y como consecuencia de resolución entre ellos durante su separación en la columna analítica.

En ese sentido, se evaluaron la naturaleza y composición de la fase móvil de transferencia y su flujo de circulación. Como solvente orgánico se utilizó etanol; su composición porcentual en la fase móvil se varió entre 50 y 90% y los flujos de circulación se estudiaron entre 1,2 y 2,2 mL/min. El mejor resultado se obtuvo empleando como fase móvil una solución de 90 % etanol en un buffer de acetato 0,05M (pH 5,1) (v/v) circulando a un flujo de 1,8 mL/min.

En este punto es importante señalar que la optimización de esta etapa fue la más crítica para la automatización de la EFS. Se necesitaba una fase móvil con gran poder de elución para comprimir todos los picos cromatográficos de los PTC-AA presentes en las muestras de cacao para que pudieran transferirse en el menor tiempo posible al loop de inyección en la columna analítica. En ese momento en el sistema en lugar de la Precolumna 2, había un loop de inyección. Sin embargo la utilización de la fase 90 % etanol en buffer de acetato 0,05M (pH 5,1) (v/v) para transferir los derivados desde la precolumna OASIS al loop como solvente de la muestra a inyectar creaba muchos problemas, como la pérdida de eficiencia en la separación de los PTC-AA en la columna analítica.

La eficiencia de una columna cromatográfica, que se evalúa por el número de platos teóricos (N), se describe por el ensanchamiento del pico que ocurre cuando un compuesto pasa a través de la columna. En condiciones ideales, el ancho del pico sólo depende de los procesos que tienen lugar dentro de la columna cromatográfica y por ello depende mucho de las características físicas del empaque y de las dimensiones de la columna. Sin embargo varios componentes del cromatógrafo son responsables de un ensanchamiento

adicional lo que lleva a una pérdida de la eficiencia. En la optimización de la eficiencia de una separación influye la inyección de la muestra tanto el volumen y masa de la muestra inyectada así como la naturaleza del solvente que la contiene^[101,161].

Para un análisis por CLAR la muestra a inyectar en el equipo debe reunir varias condiciones, entre ellas, la solución a inyectar debe ser compatible y miscible con la fase móvil. Es recomendable que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil o en su defecto, un solvente de menor poder de elución que la misma. Si la fuerza de elución del solvente es mayor es posible que los componentes migren rápidamente en la cabeza de la columna produciendo ensanchamiento y deformaciones de los picos^[102].

La separación de los PTC-AA en la columna analítica con una buena resolución en un tiempo corto es un desafío importante. Para lograrla se debe trabajar bajo condiciones de máxima eficiencia en la separación en todo momento. Nuestro problema influía directamente ya que el solvente de la muestra tenía mayor fuerza de elución que la fase móvil que se utilizaba para su separación de los PTC-AA en la columna analítica.

Por ello para poder evitar este problema se sustituyó el loop de inyección por una precolumna donde se transferían los PTC-AA desde la columna OASIS y quedaran retenidos para posteriormente transferirlos a la columna analítica pero con la fase móvil de elución que se utilizaba en la columna analítica.

En ese sentido se sustituyó el loop por una precolumna Supelcosil™ LC-18 (Precolumna 2) y se estudiaron el flujo al que debía circular la fase móvil de transferencia antes mencionada y el tiempo de transferencia. Un flujo de 1,8 mL/min durante un tiempo de 0,13 seg permitieron obtener, en el cromatograma, las mayores áreas para los picos de los PTC-AA y por ello se fijaron para el resto de los análisis.

V. 5.1.6.2.2. Separación de los derivados en la columna analítica

La separación cromatográfica de los PTC-AA se llevó a cabo por cromatografía en fase reversa y la optimización de la separación se realizó en términos de la resolución, a fin de poder obtener un valor comprendido entre 1,0 y 1,5, criterio aceptado cuando la muestra contiene más de 10 analitos^[187].

La resolución (R_s) se refiere al grado de separación de los componentes de una mezcla en un sistema cromatográfico y se puede calcular a partir de los datos del cromatograma utilizando la siguiente ecuación (Ecuación 1).

$$R_s: \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \frac{(k')}{(k'+1)}$$

k' : factor de capacidad

N : número de platos teóricos de la columna (factor eficiencia)

α : factor de separación

Ecuación 1. Determinación de la resolución

Esta ecuación es una relación fundamental en la optimización en cromatografía de líquidos puesto que resume las variables que se deben optimizar experimentalmente para obtener la R_s deseada en la separación. Ellas son: retención (k'), eficiencia de la columna (N) y selectividad (α).

Así, k' y α son parámetros de retención que están relacionados con la constante de distribución del equilibrio de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil. Por ello dependen de: la naturaleza de la fase estacionaria, la naturaleza y composición de la fase móvil y de la temperatura.

Por otra parte, N (número equivalente de platos teóricos) es un parámetro cinético que determina la eficiencia de la columna y que se manifiesta en la forma de los picos, finos y simétricos. Depende: de la velocidad

del flujo al cuál circula la fase móvil y de los parámetros físicos de la columna como longitud, diámetro, diámetro de la partícula del empaque, etc.

De esta forma, podemos cambiar las condiciones de una separación optimizando cada una de estas variables experimentales.

En base a lo antes expuesto, se seleccionó una columna Kromasil C₁₈ [150 x 30 (DI) mm, 3µm (dp)] que tiene un empaque apolar del tipo octadecilsilano y que permite la retención de los PTC-aminoácidos por interacciones hidrofóbicas.

Para lograr la separación de los PTC-AA con la mayor resolución posible se optimizó la naturaleza y composición de la fase móvil y el flujo de circulación de la misma.

La selectividad de la fase móvil depende del tipo de interacción de la misma con los componentes de la muestra. La magnitud de las interacciones para cada solvente fue tabulada y clasificada por Snyder en 8 grupos distintivos, de acuerdo a sus propiedades básicas, en un esquema triangular (triángulo de selectividad de Snyder)^[101]. Tomando en cuenta esta clasificación se pueden seleccionar las mezclas de solventes adecuadas para obtener una buena selectividad en la determinación de los analitos en estudio.

Por lo general, la separación de los PTC-aminoácidos se lleva a cabo utilizando un buffer en un intervalo de pH entre 5 y 7, a fin de asegurar que los derivados formados se encuentre en su forma molecular^[188]. El control del pH en la fase móvil es fundamental ya que afecta significativamente las posiciones de elución de algunos derivados. En vista de esto, se consideró como fase móvil inicial una solución de buffer acetato 0,05M (pH = 5,1), y se ensayaron diferentes modificadores orgánicos para disminuir los tiempos de retención y mejorar la selectividad entre los analitos durante la separación. Por tal motivo, se estudió el efecto del metanol, el acetonitrilo y mezclas de los mismos en

soluciones acuosas y soluciones de buffer acetato, variando su composición porcentual entre 40 y 60 %.

Además, debido al número de analitos (al menos 15 PTC-AA) presentes en la muestra, su separación en la columna no se puede realizar en la modalidad isocrática empleando una fase móvil constituida únicamente por el buffer acetato (fase móvil A)^[189]. Por ello utilizamos un gradiente de elución donde se establece un programa de gradiente que permite variar la composición de la fase móvil a lo largo de la separación. De esta forma, se va aumentando el poder de elución progresivamente para conseguir separar todos los componentes de la mezcla en un tiempo razonable.

Adicionalmente, se estudió el flujo de circulación, la cual se varió entre 1 a 1,7 mL/min. El flujo no es una variable que discrimine en la separación cromatográfica, sin embargo influye en la eficiencia permitiendo obtener picos finos y simétricos que mejora significativamente la resolución. De esta forma se optimizaron todas las variables mencionadas y los mejores resultados se obtuvieron para una fase móvil constituida por: solución A: una solución al 2% de acetonitrilo en de buffer acetato 0,05M (pH 5,1) (solución de menor poder de elución) y, solución B: una solución 60% de acetonitrilo en agua (60:40; v/v) (solución de mayor poder de elución), operando con el gradiente de elución que se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Programa del gradiente de elución

Pasos	Tiempo	Fase móvil A ^a (%)	Fase móvil B ^b (%)	Flujo mL/ min	Temperatura
0		100	0	1,7	45 °C
1	5 min	100	0		
2	31 min	52	48		
3	2 min	0	100		
4	5 min	0	100		
5	2 min	100	0		

^a A: 2% MeCN en buffer acetato 0,05M (pH 5,1), ^b B: 60% MeCN en agua

La temperatura de la columna es otro parámetro que puede influir en la optimización de una separación cromatográfica.

En nuestro caso en particular, la temperatura no influyó en la selectividad, sin embargo si en la eficiencia ya que permitió disminuir la viscosidad de la fase móvil. Por ello, se fijó una temperatura de la columna de 45 °C que nos permitió trabajar a flujos altos, generando presiones moderadas en la cabeza de la columna.

En las Figuras 21 y 22 se muestran los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones cromatográficas optimizadas al inyectar 20 μ L de un blanco y de una mezcla patrón de los 15 aminoácidos derivatizados. En estas figuras, los últimos 5 picos, en ambos cromatogramas, corresponden al reactivo derivatizante y se puede apreciar como la presencia de éstos afecta la visibilidad de los picos de los derivados como consecuencia de gran absorptividad que posee.

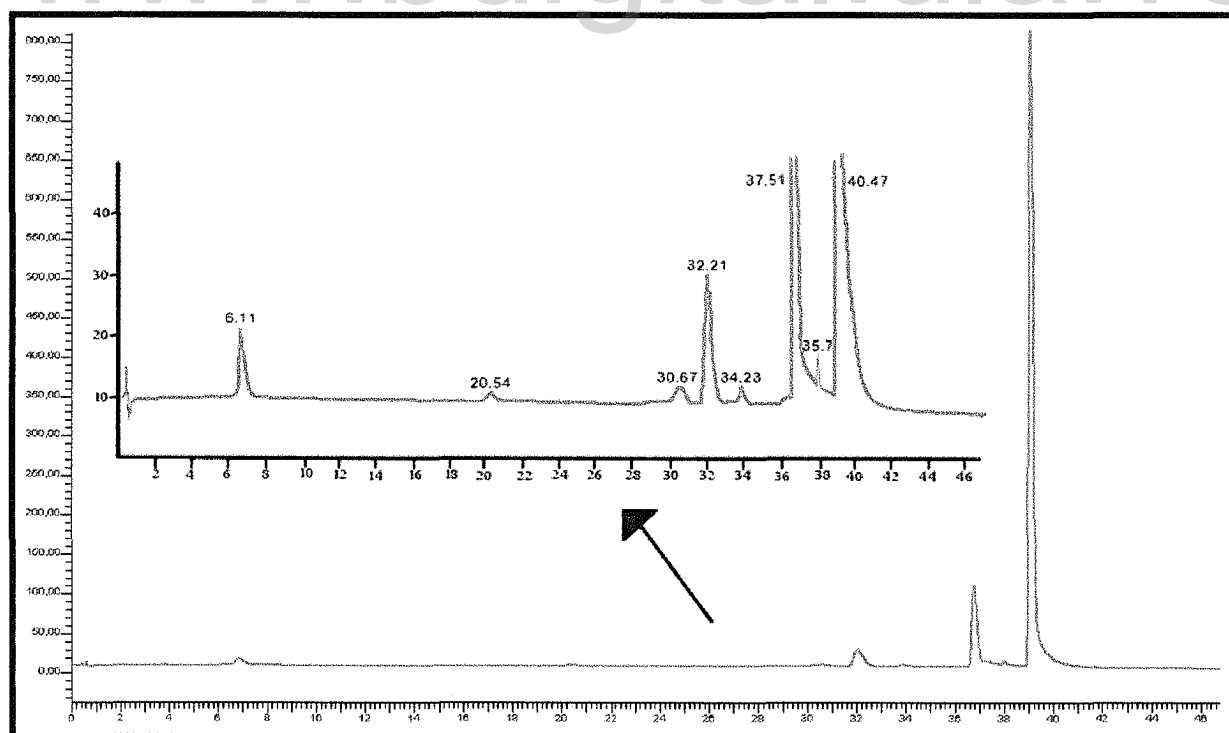


Figura 21. Cromatograma obtenido para un blanco.

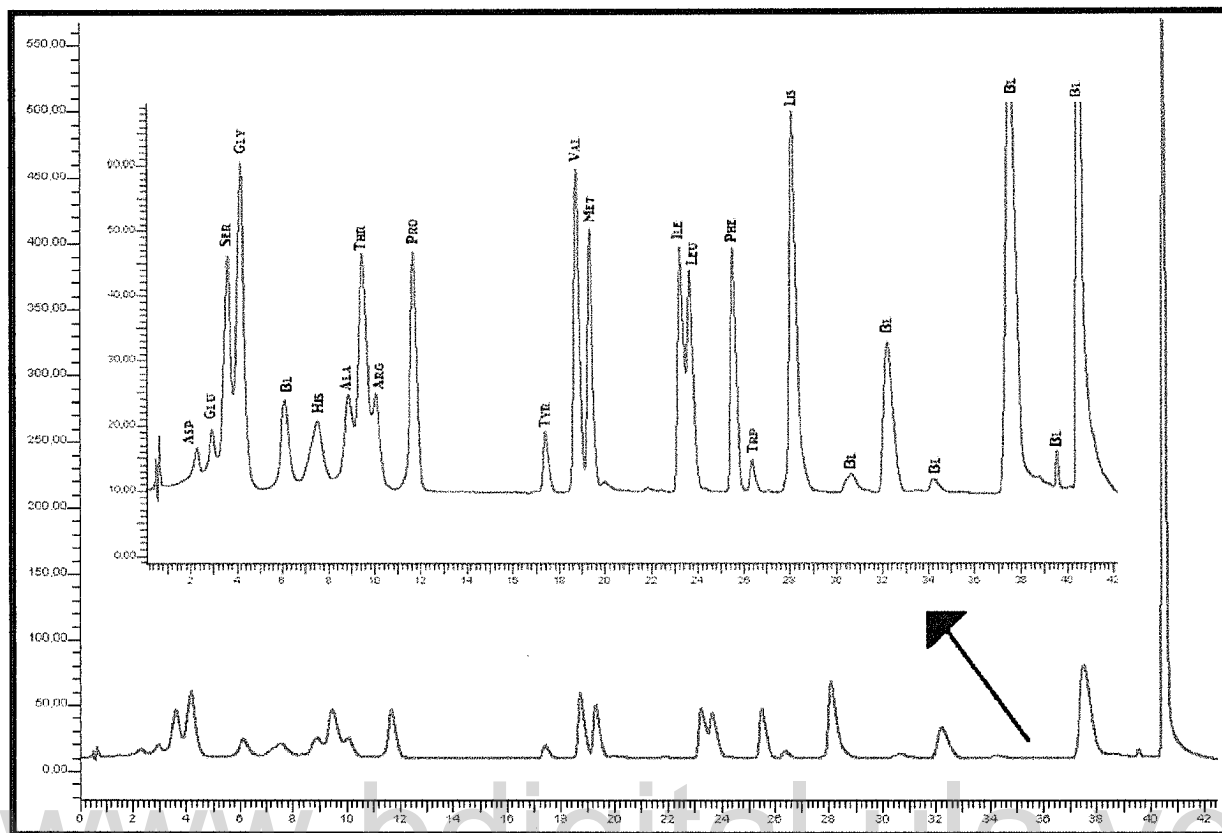


Figura 22. Cromatograma obtenido para una mezcla de patrones de 15 $\mu\text{g/mL}$ de los 15 aminoácidos

La identificación, tanto de los tiempos de retención como el orden de elución de los PTC-AA se realizó inyectando de forma individual cada uno de ellos y finalmente se inyectó una mezcla de todos los patrones para comprobar la resolución de los picos cromatográficos. En la Tabla 5 se presentan los tiempos de retención de los PTC-AA.

En el cromatograma (Figura 21) también se puede observar que a pesar de que todos los aminoácidos se encontraban a la misma concentración (30 $\mu\text{g/mL}$), las áreas de los picos eran diferentes. Este comportamiento podría atribuirse a las diferencias en la estructura de cada derivado. Si bien el grupo cromóforo, que se introdujo en las estructuras moleculares de los aminoácidos durante la derivatización, es el mismo para todos, cada uno de éstos

presentaban ya una variación en el grupo R. Esto, se reflejaría en las diferentes absorptividades molares que presentan los derivados y en consecuencia una variación en el área de cada pico.

Tabla 5. Tiempos de retención de los PTH-AA

Aminoácido	Abreviatura	Tiempo de retención (min)	Aminoácido	Abreviatura	Tiempo de retención (min)
Ácido Aspártico	Asp	2,29	Valina	Val	18,72
Ácido Glutámico	Glu	2,96	Metionina	Met	19,31
Serina	Ser	3,62	Isoleucina	Ile	23,23
Glicina	Gly	4,18	Leucina	Leu	23,65
Alanina	Ala	8,88	Triptofano	Trp	26,36
Treonina	Thr	9,47	Lisina	Lis	28,08
Prolina	Pro	11,68	Fenilalanina	Phe	25,51
Tirosina	Tyr	17,41	Reactivo Derivatizante	Bl	6,15; 32,21; 37,34; 40,59

V.5.1.6.2.3. Montaje del sistema de columnas acopladas

Una vez determinadas las condiciones para llevar a cabo la limpieza y extracción de los analitos en la precolumna, así como las mejores condiciones para su separación en la columna analítica, se procedió a ensamblar el sistema completo de columnas acopladas en su modalidad de transferencia en circuito, utilizando dos válvulas automáticas (VS1 y VS2) (Figura 8). Esta etapa consiste en establecer el programa, en el software del equipo, indicando los tiempos en que deben girar las válvulas automáticas para cumplir con las etapas de limpieza de la muestra, transferencia de los PTC-AA a la precolumna de inyección y su posterior transferencia a la columna analítica para su separación y detección. También se deben programar los tiempos de regeneración de las precolumnas para estar en condiciones para una nueva

inyección. En la Tabla 6 se presenta el programa de tiempos de las válvulas selectoras utilizado.

Tabla 6. Programa de tiempos de las válvulas selectoras de columnas

Válvula VS	Posición	Tiempo	Evento
1 2	Carga Carga	0 min	La muestra se inyecta en la precolumna 1 y tiene lugar el lavado de la muestra
1 2	Inyección Inyección	0,50 min	Finaliza el lavado y comienza a pasar la fase móvil de transferencia por la precolumna 1. Por la precolumna 2 circula la fase móvil de separación de la columna analítica
1 2	Inyección Carga	0,55 min	Inicia la transferencia de los analitos de la precolumna 1 a la precolumna 2
2 2	Carga Inyección	0,68 min 0,69 min	Termina la transferencia de los analitos desde la precolumna 1 a la precolumna 2 Se inicia la separación de los PTC-AA en la columna analítica
1	Carga	7 min	Todo el reactivo derivatizante se ha eliminado de la precolumna 1 y se inicia su reacondicionamiento para la siguiente inyección.

Posteriormente se procedió a evaluar el programa de tiempos de las válvulas automáticas sobre la separación de los PTC-AA en la columna analítica.

En este punto fue necesario realizar algunas modificaciones al gradiente de elución establecido inicialmente (Tabla 4). Los cambios realizados se presentan en la Tabla 7.

En las Figuras 23 y 24 se muestran los cromatogramas obtenidos bajo estas condiciones para una solución patrón mezcla de todos los PTC-AA y para una muestra de cacao tratada de acuerdo al procedimiento descrito. Se observa que los picos asociados al reactivo derivatizante desaparecieron mejorando así la visualización de los picos de los PTC-AA. Esto nos muestra que el procedimiento de limpieza de la muestra en el sistema de columnas

acopladas fue efectivo. Adicionalmente el tiempo de corrida disminuyó, en la Tabla 8 se presentan los nuevos tiempos de retención de los PTC-AA.

Tabla 7. Programa de gradiente de elución para la separación de los PTC-AA en el sistema de columnas acopladas

Pasos	Tiempo (min)	Fase móvil A ^a (%)	Fase móvil B ^b (%)	Flujo (mL/ min)	Temperatura °C
1	0,5	100	0	1,7	45
2	6,5	100	0		
3	24	65	35		
4	2	0	100		
5	3	0	100		
6	2	100	0		

^aA: 2% MeCN en buffer acetato 0,05M (pH 5,1), ^bB: 60% MeCN en agua

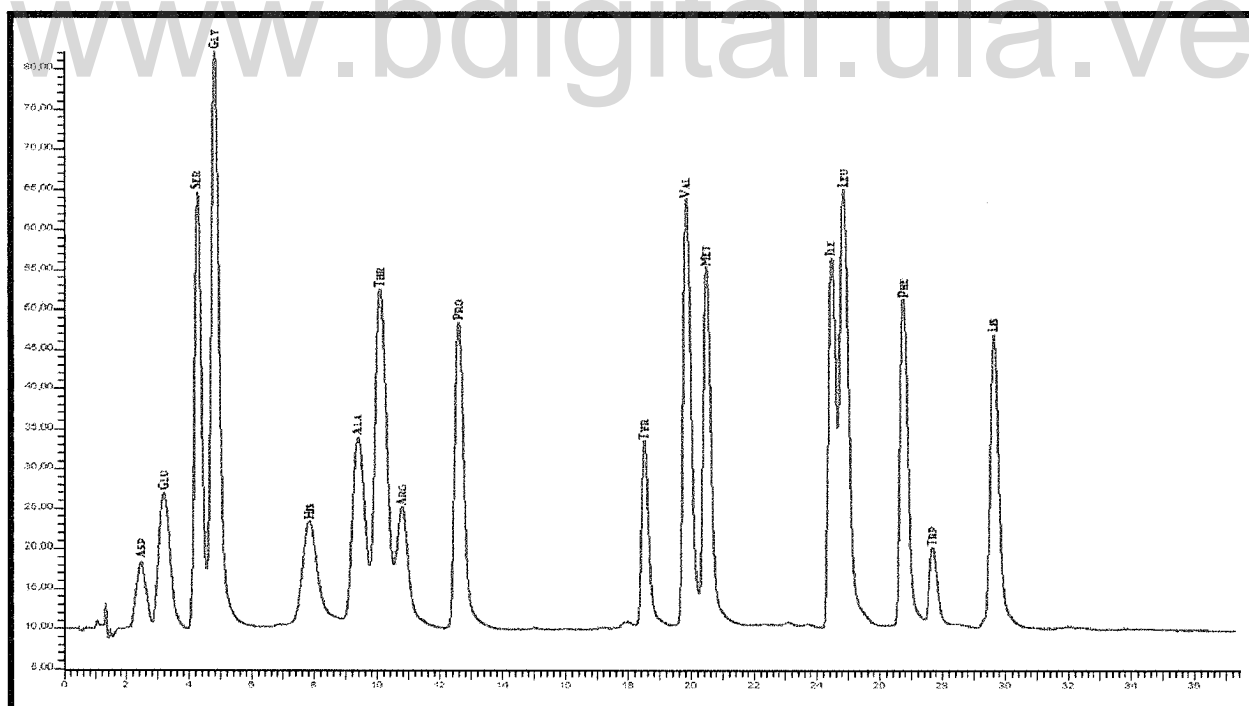


Figura 23. Cromatograma de la separación de los PTC-AA obtenido en el sistema de columnas acopladas a partir de una mezcla de patrones de aminoácidos de concentración de 30 µg/mL

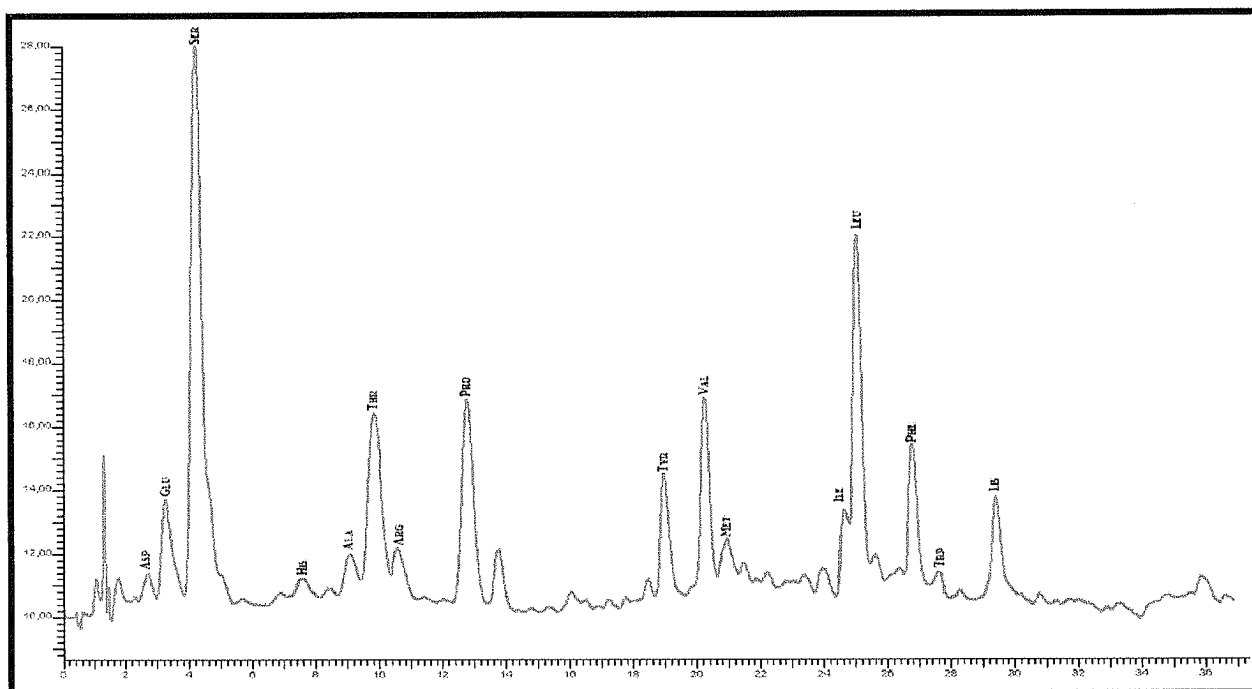


Figura 24. Cromatograma de una muestra de cacao en el sistema de columnas acopladas.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 8. Tiempos de retención de los PTH-aminoácidos en el sistema de columnas acopladas.

Aminoácido	Abreviatura	Tiempo de Retención (min)	Aminoácido	Abreviatura	Tiempo de Retención (min)
Ácido Aspártico	Asp	2,63	Tirosina	Tyr	18,51
Ácido Glutámico	Glu	3,27	Valina	Val	19,84
Serina	Ser	4,26	Metionina	Met	20,47
Glicina	Gly	4,81	Isoleucina	Ile	24,47
Alanina	Ala	9,39	Leucina	Leu	24,84
Treonina	Thr	10,09	Fenilalanina	Phe	26,74
Prolina	Pro	12,60	Triptofano	Trp	27,68
			Lisina	Lis	29,63

Por otra parte, se observa una buena resolución entre los 15 aminoácidos en un tiempo de corrida bastante aceptable de 30 minutos. El gradiente de elución utilizado fue muy adecuado ya que si comparamos el tiempo de corrida con los reportados en la literatura, este valor se encuentra en un punto intermedio entre 12 min y 45 min.

En la Tabla 9 se resumen las condiciones optimizadas para todo el procedimiento que permitieron obtener la separación de todos los PTC-AA presentes en las muestras de cacao con una buena resolución y sin interferencias de matriz.

Tabla 9. Resumen de las condiciones optimizadas de todo el sistema utilizado en la determinación de aminoácidos en muestras de cacao empleando un sistema de columnas acopladas en su modalidad de transferencia en circuito

Etapas	Componente del sistema	Condición
Inyección de la muestra (Tiempo = 0 min)	Válvula automática Rheodyne 7125: Posición de Inyección. Válvula automática de 6 puertos (# 1): Posición de carga Válvula automática de 6 puertos (# 2): Posición de carga	Volumen de inyección: 100 µL del derivado
Limpieza de la muestra (Tiempo = 0,50 min)	Columna de extracción: Oasis HBL (2,0 cm x 3,0mm; 25µm)	Fase móvil: 2% MeCN en buffer acetato 0,05M (pH 5,1) Flujo: 1,0 mL/min
Transferencia de los analitos: (Tiempo = 0,13 min)	Precolumna C18 Válvula automática de 6 puertos (# 1): Posición de inyección Válvula automática de 6 puertos (# 2): Posición de inyección	Fase móvil: 90% de etanol en buffer acetato 0,05M (pH 5,1) Flujo: 1,8 mL/min
Lavado de precolumna 1 (Tiempo = 7 min)	Válvula automática de 6 puertos (# 1): Posición de inyección	Fase móvil: 90% de etanol en buffer acetato 0,05M (pH 5,1)
Separación en la columna analítica (Tiempo = 37,5 min)	Válvula automática de 6 puertos (# 2): Posición de carga. Columna analítica: Advantage Kromasil C18 100A (150mm x 3,0 mm; 3µm)	Fase móvil: Gradiente de elución de la Tabla 7 Detección: UV a 254nm

V.5.1.7. Validación del método analítico

La validación del método propuesto se realizó evaluando la linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y los límites de cuantificación para PTC-AA así como también el efecto de matriz.

V.5.1.7.1. Exactitud y Precisión

La exactitud del método se estimó a través de estudios de recuperación. Se analizaron soluciones derivatizadas de muestras de cacao enriquecidas con los aminoácidos a diferentes niveles de concentración. En la Tabla 10 se resumen los resultados obtenidos, se observa que los porcentajes de recuperación se encuentran entre el 81 y el 109 % para todos los casos, con un coeficiente de variación menor al 3,85 % ($n=3$). Estos valores nos indicaron que existía un buen rendimiento en todos los procesos de extracción del procedimiento ya que las recuperaciones para los analitos fueron cuantitativas.

La precisión del procedimiento se estimó a través de la medición de las áreas de los picos de 5 réplicas de soluciones aminoácidos derivatizadas por el procedimiento descrito, tanto de patrones acuosos como de muestras de cacao enriquecidas con los analitos a los niveles de concentración estudiados. En las Tablas de 11 a 16 se presentan los resultados obtenidos para el análisis, durante un mismo día y en diferentes días para los diferentes PTC-AA. La precisión se expresó en función del coeficiente de variación (C.V.) y se encontró que, en el caso de los análisis realizados en un mismo día el C.V. fue inferior al 2,5 % lo que corresponde a una muy buena precisión del procedimiento. En el caso de los análisis realizados entre días, el coeficiente de variación fue menor a 3,5 %, lo que aseguró una buena estabilidad del sistema cromatográfico.



Tabla 10. Estudios de recuperación para el método propuesto en muestras de cacao

Analito	Concentración añadida (µg/mL)	% de Recuperación	CV (%)
Ácido Aspártico	7,5	101,76	2,02
	15	101,24	1,74
	30	105,18	0,78
Ácido Glutámico	7,5	100,46	1,30
	15	104,68	0,75
	30	109,51	0,12
Serina	7,5	88,95	1,82
	15	107,43	2,53
	30	107,98	0,92
Glicina	7,5	99,96	2,28
	15	106,14	1,82
	30	105,11	1,11
Alanina	7,5	95,61	0,86
	15	108,86	0,16
	30	101,99	0,811
Tirosina	7,5	99,18	1,92
	15	109,41	0,64
	30	106,79	0,35
Valina	7,5	97,08	0,48
	15	103,57	3,02
	30	102,56	0,91
Metionina	7,5	96,40	1,38
	30	107,23	3,82
Isoleucina	7,5	98,24	0,97
	15	105,80	0,63
	30	101,23	1,27
Leucina	7,5	95,68	0,30
	15	10,79	1,02
	30	107,98	1,43
Fenilalanina	7,5	98,66	0,82
	15	109,23	0,73
	30	109,21	0,27
Triptofano	7,5	85,33	2,38
	15	109,59	1,62
	30	105,93	0,70
Lisina	7,5	99,4	1,33
	15	106,99	1,85
	30	103,52	0,35

Tesis Doctoral | Aminoácidos

Tabla 11. Características analíticas del método propuesto para patrones acuosos de aminoácidos ácidos

Analito	Intervalo lineal (µg/mL)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Reproducibilidad en un día, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)	Reproducibilidad entre días, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)
Ácido Aspártico	7,5 – 45 µg/mL	Y = 8378,2 X	0,9983	1,40	1,45
				0,60	1,92
				0,61	3,45
Ácido Glutámico	7,5 – 45 µg/mL	Y = 19797 X	0,9983	1,59	1,09
				0,40	0,78
				0,49	1,21

Tabla 12. Características analíticas del método propuesto para patrones acuosos de otros aminoácidos

Analito	Intervalo lineal (µg/mL)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Reproducibilidad en un día, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)	Reproducibilidad entre días, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)
Lisina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 14027 X	0,9802	0,82	2,08
				0,58	1,67
				0,31	0,78
Serina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 41949 X	0,9974	1,53	2,86
				0,20	0,46
				1,14	3,38
Glicina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 71155 X	0,9997	0,65	1,45
				1,96	3,03
				0,84	1,07
Treonina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 30215 X	0,9944	0,98	1,95
				0,25	0,92
				0,12	0,94

Tesis Doctoral Aminoácidos

Tabla 13. Características analíticas del método propuesto para patrones acuosos de aminoácidos hidrofóbicos

Analito	Intervalo lineal (µg/mL)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Reproducibilidad en un día, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)	Reproducibilidad entre días, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)
Leucina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 49987X	0,9964	0,61	1,28
				0,43	1,51
				0,93	2,09
Alanina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 30996X	0,9971	0,59	1,45
				0,52	0,77
				0,12	0,65
Fenilalanina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 23351X	0,9934	0,73	2,48
				0,89	1,57
				0,09	0,59
Valina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 54109X	0,9926	0,43	0,94
				0,11	0,50
				0,50	1,46
Tirosina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 12036X	0,9983	0,88	1,91
				0,59	1,07
				0,21	0,67
Isoleucina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 31590X	0,9934	0,44	1,53
				0,58	1,12
				0,27	0,61
Prolina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 48021X	0,9971	0,79	1,06
				0,18	0,50
				1,5	2,10
Metionina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 35375X	0,9905	0,87	1,49
				0,53	0,90
				0,09	0,32
Triptofano	7,5 – 45 µg/mL	Y = 5380,3X	0,9906	2,47	2,87
				0,82	1,40
				0,30	1,82

Tesis Doctoral Aminoácidos

Tabla 14. Características analíticas del método propuesto para los aminoácidos ácidos en muestras de cacao

Analito	Intervalo lineal (µg/mL)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Reproducibilidad en un día, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)	Reproducibilidad entre días, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)
Ácido Aspártico	7,5 – 45 µg/mL	Y = 8605,6X + 11645	0,9994	1,60	2,48
				1,17	2,17
				0,32	0,67
Ácido Glutámico	7,5 – 45 µg/mL	Y = 20209X + 31299	0,9983	0,66	0,62
				0,26	0,44
				0,29	0,20

Tabla 15. Características analíticas del método propuesto para otros aminoácidos en muestras de cacao

Analito	Intervalo lineal (µg/mL)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Reproducibilidad en un día, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)	Reproducibilidad entre días, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)
Lisina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 14753X + 57148	0,9988	0,55	0,86
				0,58	0,21
				0,17	0,58
Serina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 45630X + 34046	0,9977	0,16	0,36
				0,65	1,25
				0,64	0,97
Glicina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 72233X + 222622	0,9981	0,70	1,72
				0,88	1,15
				0,66	0,73

Tesis Doctoral | Aminoácidos

Tabla 16. Características analíticas del método propuesto para los aminoácidos hidrofóbicos en muestras de cacao

Analito	Intervalo lineal (µg/mL)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Reproducibilidad en un día, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)	Reproducibilidad entre días, % CV (n = 5) (7,5; 15; 30 µg/mL)
Leucina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 52320X + 316165	0,9977	0,18	0,11
				0,58	2,00
				0,80	0,84
Alanina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 31212X + 61868	0,9986	0,51	0,55
				0,21	0,50
				0,99	2,08
Fenilalanina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 25439X + 116529	0,9996	0,57	0,60
				0,55	0,88
				0,27	0,37
Valina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 54312X + 230151	0,9991	0,18	0,33
				1,08	1,07
				0,62	0,98
Tirosina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 12558X + 110620	0,9987	0,61	0,75
				0,47	1,04
				0,28	0,49
Isoleucina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 33406X + 94184	0,9997	0,53	0,38
				0,27	0,45
				1,19	1,64
Prolina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 46538X + 988123	0,9964	0,65	0,42
				1,35	1,55
				1,21	1,63
Metionina	7,5 – 45 µg/mL	Y = 36979X + 66793	0,9912	1,14	1,03
				0,26	0,40
				1,27	1,16
Triptofano	7,5 – 45 µg/mL	Y = 5472X + 6867	0,9923	0,55	0,86
				0,58	0,21
				0,17	0,58

V.5.1.7.2. Linealidad del método y efecto de la matriz

Para determinar la linealidad del método y estudiar el efecto de la matriz en el análisis, se realizaron curvas de calibrado de soluciones patrones de los aminoácidos en un intervalo de concentración entre 7,5 y 45 $\mu\text{g/mL}$ y de muestras de cacao enriquecidas con los aminoácidos a los mismos niveles de concentración utilizando el método de adición de estándar (Figuras 25 y 26). Cada curva de calibrado incluyó al menos una serie de seis puntos y un blanco y se midieron un mínimo de tres veces cada uno. Todas las muestras se procesaron por el método propuesto y se evaluaron en el sistema cromatográfico optimizado. Se pudo observar que existía linealidad en las curvas de calibrado de todos los aminoácidos en los intervalos de concentración estudiados con valores para los coeficientes de correlación $r^2 > 0,9900$ ($n=7$) para todos los casos.

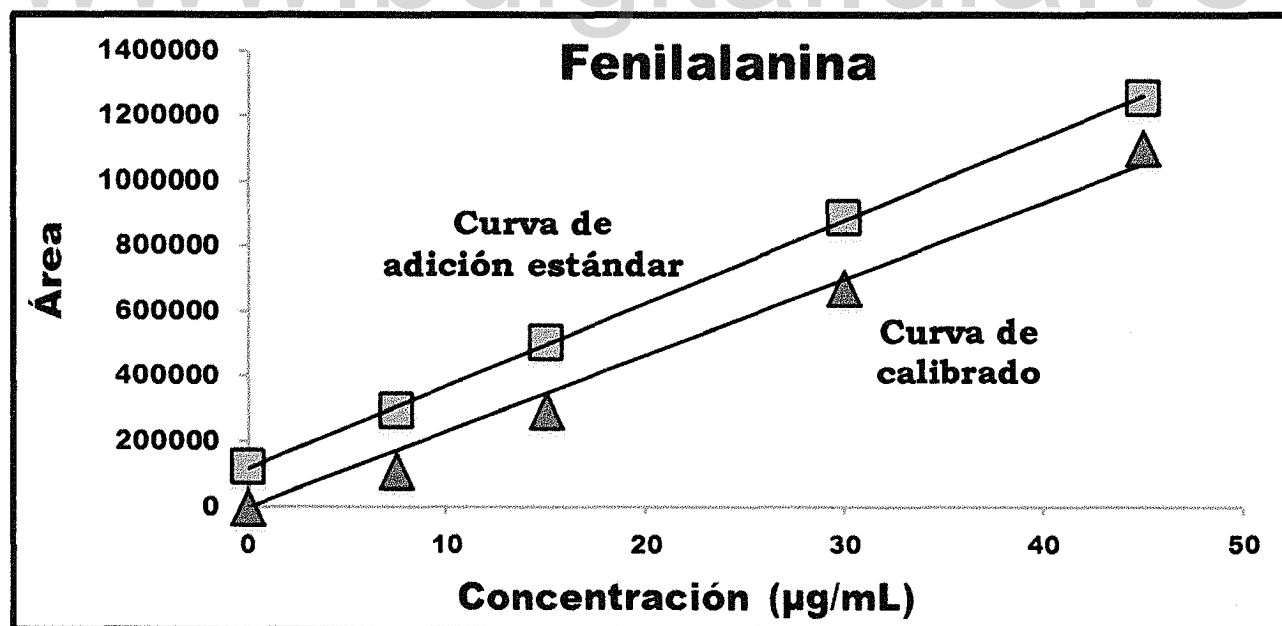


Figura 25. Curva de calibrado para la fenilalanina en el intervalo de concentración estudiado en la solución patrón y en el licor de cacao enriquecido con los analitos

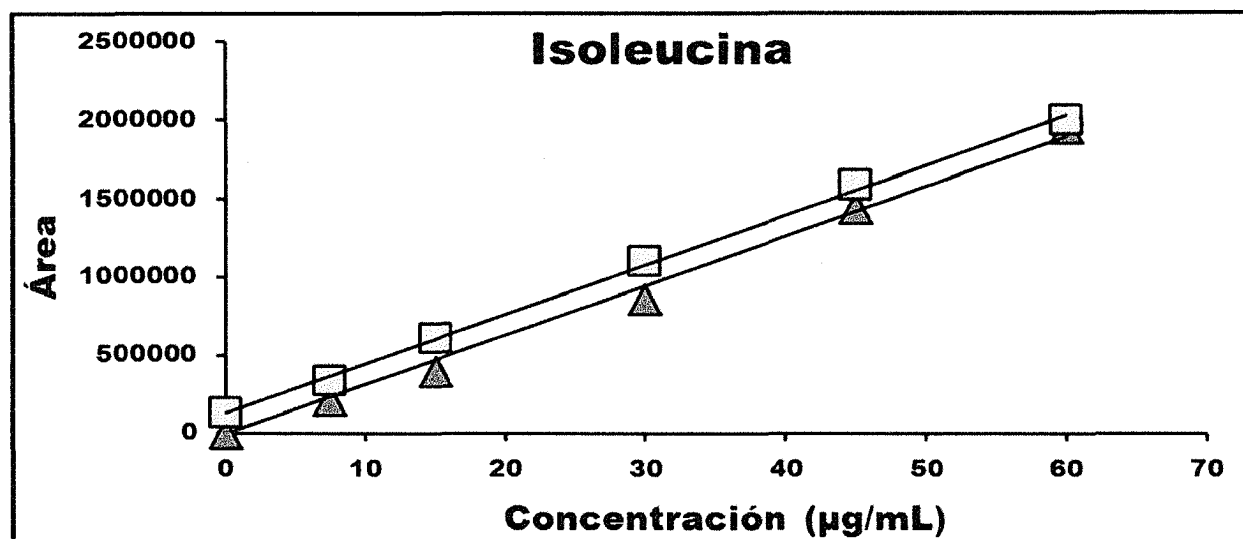


Figura 26. Curva de calibrado para la Isoleucina en el intervalo de concentración estudiado en la solución patrón y en el licor de cacao enriquecido con los analitos

Adicionalmente, se evaluó estadísticamente la linealidad de las curvas. El estadístico de prueba que se utiliza se presenta en la Ecuación 2^[143].

$$t_r = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Ecuación 2. Estadístico de prueba

Se asume como hipótesis nula “la no correlación entre X e Y ”, donde X se refiere a la concentración e Y al área de pico del analito. La zona de aceptación (ZA) de esta hipótesis con un 95% de confianza está dada por:

$$ZA = \{ T / -t_{(1-\alpha/2; n-2)} < T < +t_{(1-\alpha/2; n-2)} \}$$

$$ZA = \{ T / -t_{(0,975; 3)} < T < +t_{(0,975; 3)} \}$$

$$ZA = \{ T / -3,182 < T < 3,182 \}$$

Wendy Josefina Orozco Contreras

Si el valor observado de T (t_r calculado) es mayor que el t tabulado ($t = \pm 3,182$) se rechaza la hipótesis, siendo la correlación lineal significativa con una probabilidad del 95%.

En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos para el cálculo del estadístico t_r , donde se observa que el t_r calculado se encuentra fuera de la zona de aceptación de la hipótesis nula, se puede entonces concluir que existe una correlación lineal entre la concentración y el área de pico de los analitos

Tabla 17. Valores del estadístico t_r calculado para el coeficiente de regresión lineal del método propuesto.

Analito	t_r (min)	Analito	t_r (min)
Ácido Aspártico	41,97	Tirosina	41,97
Acido Glutámico	41,97	Valina	20,06
Serina	33,92	Metionina	17,68
Glicina	99,98	Isoleucina	21,24
Histidina	37,76	Leucina	28,82
Alanina	32,12	Fenilalanina	21,25
Treonina	23,08	Triptofano	12,19
Prolina	32,12		

Se evaluó el efecto de la matriz comparando las pendientes de las rectas de regresión de las curvas de calibrado de patrones acuosos con las de adición de estándar (Figura 25) aplicando el estadístico *t de Student*.

El estadístico *t de Student* (t), permite estimar con un 95 % de confianza si existe diferencia significativa entre la pendiente de la curva de adición estándar y la de calibrado. El cálculo de t se realizó mediante la ecuación 3^[143,146].

$$t = \frac{\beta_1 - \beta_2}{\sqrt{\frac{Sp^2}{SC_{x1}} + \frac{Sp^2}{SC_{x2}}}}$$

Ecuación 3 Determinación del estadístico t

Los subíndices 1 y 2 hacen referencia a la curva de adición estándar y de calibrado, respectivamente. En la Tabla 18 se define cada parámetro de esta ecuación y la manera como se determina^[143].

Tabla 18. Parámetros asociados a la determinación del t.

Parámetro	Significado y cálculo
Sp²	Varianza ponderada del grupo de datos para la curva de calibrado y de adición estándar $Sp^2 = \frac{SC_{y1} - \left(\frac{(SP_{xy1})^2}{SC_{x1}} \right) + SC_{y2} - \left(\frac{(SP_{xy2})^2}{SC_{x2}} \right)}{n_1 - 2 + n_2 - 2}$
SC_{x1} - SC_{x2}	Cuadrado de la concentración de cada grupo $SC_x = \sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} ; \quad SC_y = \sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}$
Sp_{xy1} - Sp_{xy2}	Suma de productos de las concentraciones de cada grupo $SP_{xy} = \sum X_i \cdot Y_i - \frac{\sum X_i \cdot \sum Y_i}{n}$
n₁ - n₂	Número de medidas

La hipótesis a prueba es que “no existen diferencias significativas entre las dos pendientes de las curvas estudiadas”, es decir $\beta_1 = \beta_2$ y cuya zona de aceptación se encuentra en el siguiente intervalo:

$$ZA = \{ T / -t(1-\alpha/2;n-2) < T < +t(1-\alpha/2;n-2) \}$$

203

$$ZA = \{ T / -t(0.975;3) < T < +t(0.975;3) \}$$

$$Z_A = \{ T / - 2.776 < T < 2.776 \}$$

En la Tabla 19 se muestran los valores obtenidos de t para cada analito y se observa que todos ellos entran dentro del intervalo de aceptación de la hipótesis nula, por lo que se puede decir que no existen diferencias significativas entre las pendientes de ambas curvas para un nivel de confianza del 95 %. En consecuencia no hay interferencia de la matriz en el procedimiento propuesto. Por ello, es posible utilizar el método propuesto para la evaluación de aminoácidos en muestras de cacao mediante el empleo de curvas de calibrado.

Tabla 19. Valores de t calculado para la determinación del efecto matriz sobre el procedimiento de propuesto

Analito	t calculado	Analito	t calculado
Ácido Aspártico	0,91	Tirosina	1,36
Acido Glutámico	0,63	Valina	0,09
Serina	2,46	Metionina	0,96
Glicina	0,64	Isoleucina	1,25
Lisina	0,58	Leucina	1,26
Alanina	0,21	Fenilalanina	1,96
Treonina	0,45	Triptofano	0,2
Prolina	-0,73		

V. 5.1.7.3. Límite de detección, límite de cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación definidos como la concentración de los analitos que cumplen con una relación señal:ruido de 3:1 y 10:1 respectivamente se presentan en la Tabla 20. Los resultados permiten

concluir que el método propuesto permite evaluar los aminoácidos en las distintas muestras de cacao

Tabla 20. Límites de detección y cuantificación de cada aminoácido

Aminoácidos	Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido Glutámico	0,05	0,10
Ácido Aspártico	0,04	0,09
Serina	0,06	0,10
Glicina	0,05	0,09
Lisina	0,06	0,10
Alanina	0,05	0,09
Treonina	0,08	0,10
Prolina	0,04	0,10
Tirosina	0,05	0,08
Valina	0,04	0,09
Metionina	0,09	0,10
Isoleucina	0,05	0,09
Leucina	0,05	0,09
Fenilalanina	0,04	0,08
Triptofano	0,04	0,10

V. 5.1.8. Análisis de muestras de cacao

Se analizaron muestras de cacaos venezolanos a diferentes días de fermentación, 0 días, 1 día, 2 días, 3 días hasta 7 días de fermentación, dependiendo de la variedad de cacao (criollo, trinitario y forastero). En la Figura 27 se presentan los resultados obtenidos, correspondientes al contenido

205

de los aminoácidos libres presentes en los granos de cacao en función del tiempo de fermentación. Se observa un incremento progresivo de la cantidad de aminoácidos a medida que transcurre la fermentación, con un máximo al tercer día para los cacaos criollos y en el séptimo día para los forasteros (IMC - 67) y trinitarios (ICS - 1). De igual forma, es importante destacar que todas la muestras estudiadas presentaron un contenido apreciable de aminoácidos libres en ausencia de fermentación ($t_f=0$).

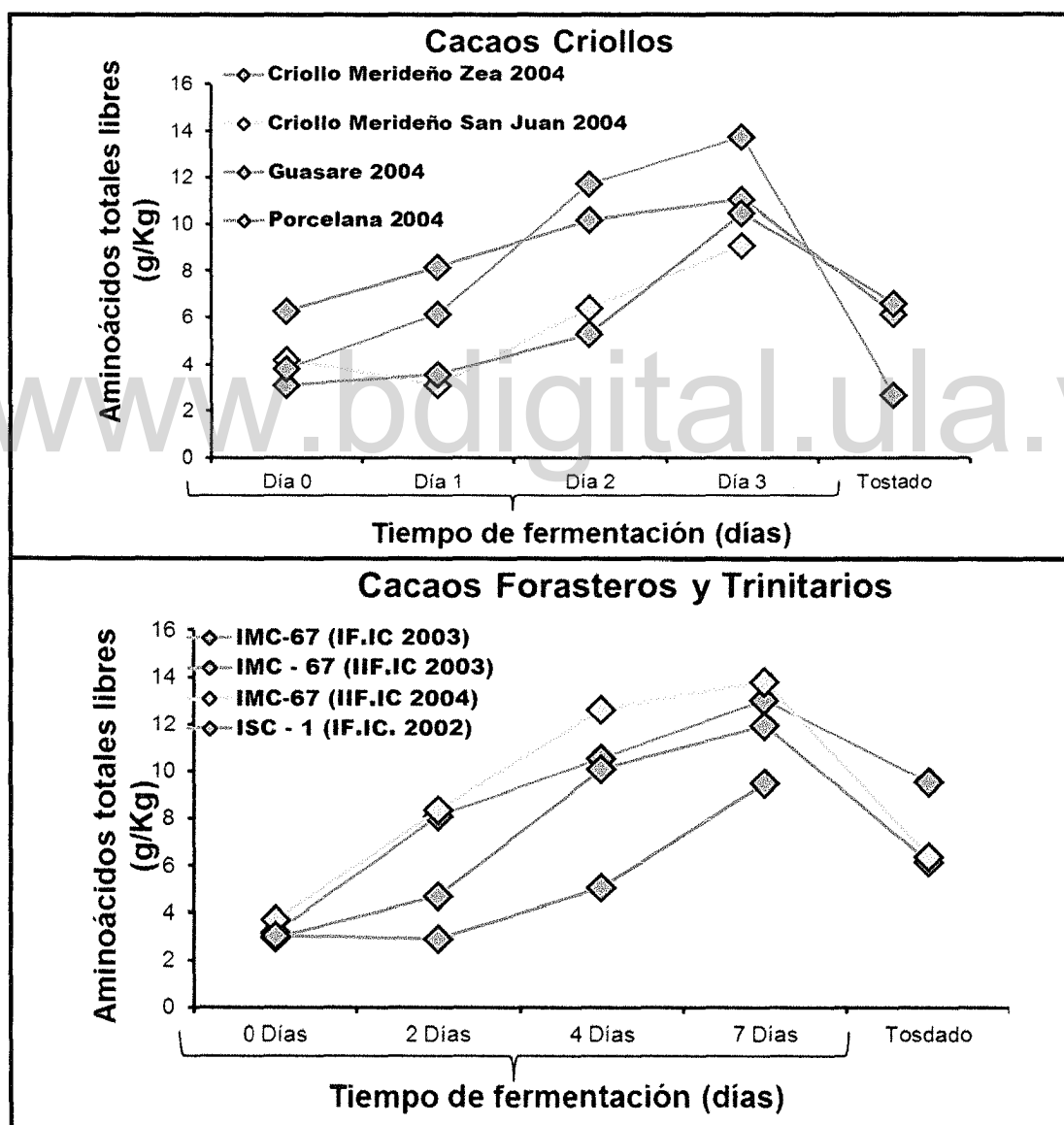


Figura 27. Tendencia de los aminoácidos durante el proceso de fermentación en muestras de cacao

Estos resultados concuerdan con los reportados por Cros y col^[30,31] en relación a los cacaos Sánchez de República Dominicana. En este caso, los granos sin fermentar presentaban un contenido de aminoácidos libres cercano al 0,2% en peso, que aumentaba a lo largo del proceso de fermentación. Hashim, P y col.^[29], también observaron la misma tendencia al estudiar cacaos híbridos provenientes de Malasia, a medida que transcurría la fermentación había un incremento casi lineal de la concentración de los aminoácidos libres hasta el 4° día, luego del cual los valores permanecían relativamente constantes hasta el final de la fermentación. Kirchhoff y col^[23]., justifican este comportamiento sobre la base de un efecto conjunto de los aminoácidos presentes en los granos sin fermentar y de la actividad proteolítica que se genera dentro de los granos durante la etapa de fermentación.

Para profundizar este estudio y poder entender más a fondo los procesos que se desarrollan durante la fermentación, en las Tablas 21 – 30 (en Anexos, páginas 288–297) se detalla el contenido individual de aminoácidos para cada una de las muestras estudiadas. En función de estos resultados se graficó el contenido de aminoácidos ácidos, aminoácidos hidrofóbicos y otros para los distintos días de fermentación (Figuras 28-30). En todos los casos estudiados, se observa el aumento progresivo del contenido de aminoácidos libres y los hidrofóbicos son los que muestran un mayor incremento durante la fermentación, comportamiento que algunos investigadores como Voigt y col^[190] han asociado a la actividad proteolítica de ciertas enzimas sobre las proteínas de reserva que tienen los granos de cacao, específicamente sobre las vicilinas o globulinas 7S. Las enzimas involucradas en este proceso son la endoproteinasa aspártica (pH óptimo 3,5) y la carboxipeptidasa (pH óptimo 5,8). La primera actúa sobre las proteínas de reserva degradándolas a oligopéptidos con residuos de aminoácidos hidrofóbicos con extremos carboxilo-terminal^[190,191,192]. La segunda actúa en los extremos carboxilo-terminal de los oligopéptidos, liberando por esta vía aminoácidos hidrofóbicos ^[24,193].

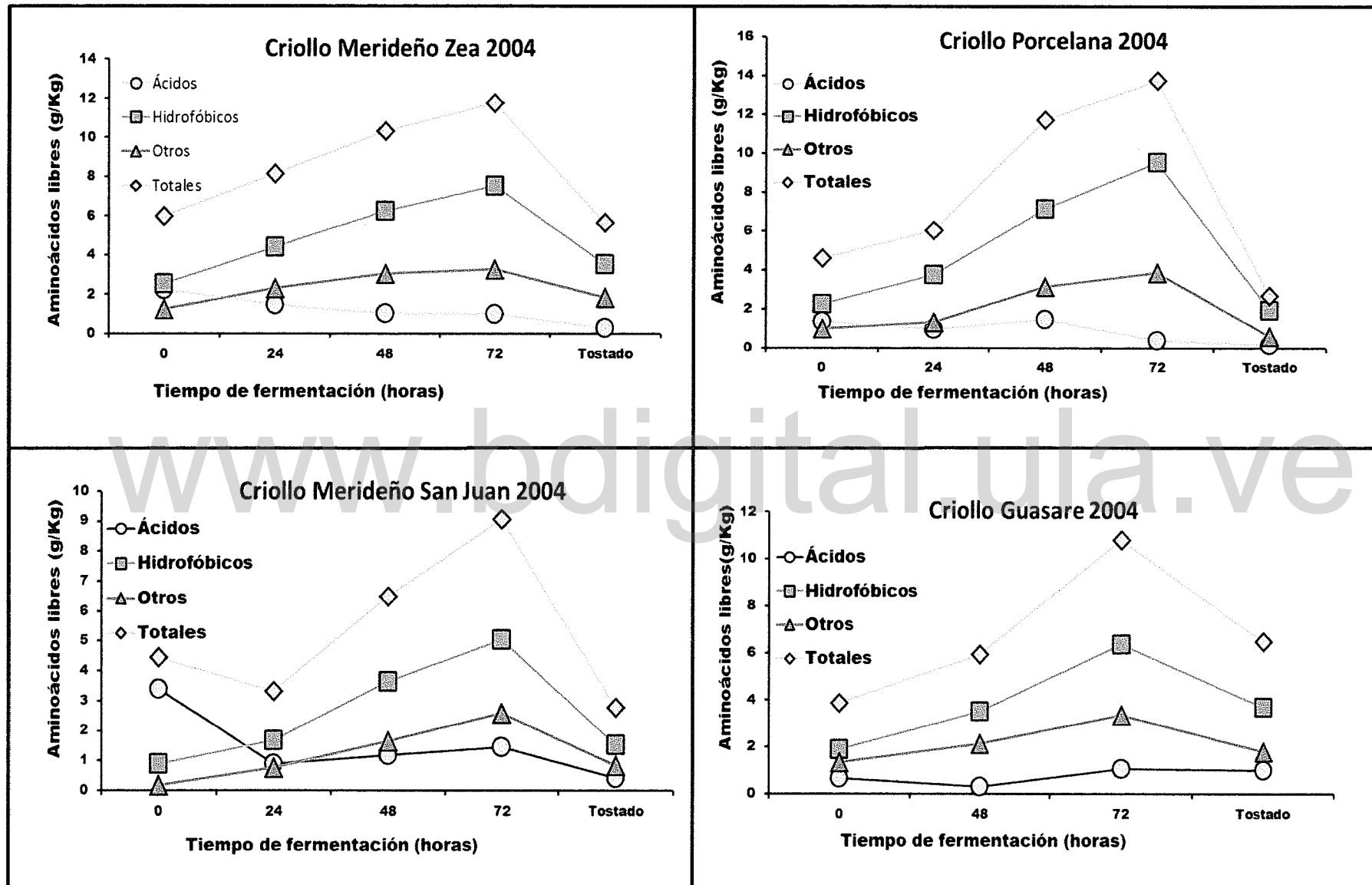


Figura 28. Tendencia de los aminoácidos durante el proceso de fermentación de cacaos criollos

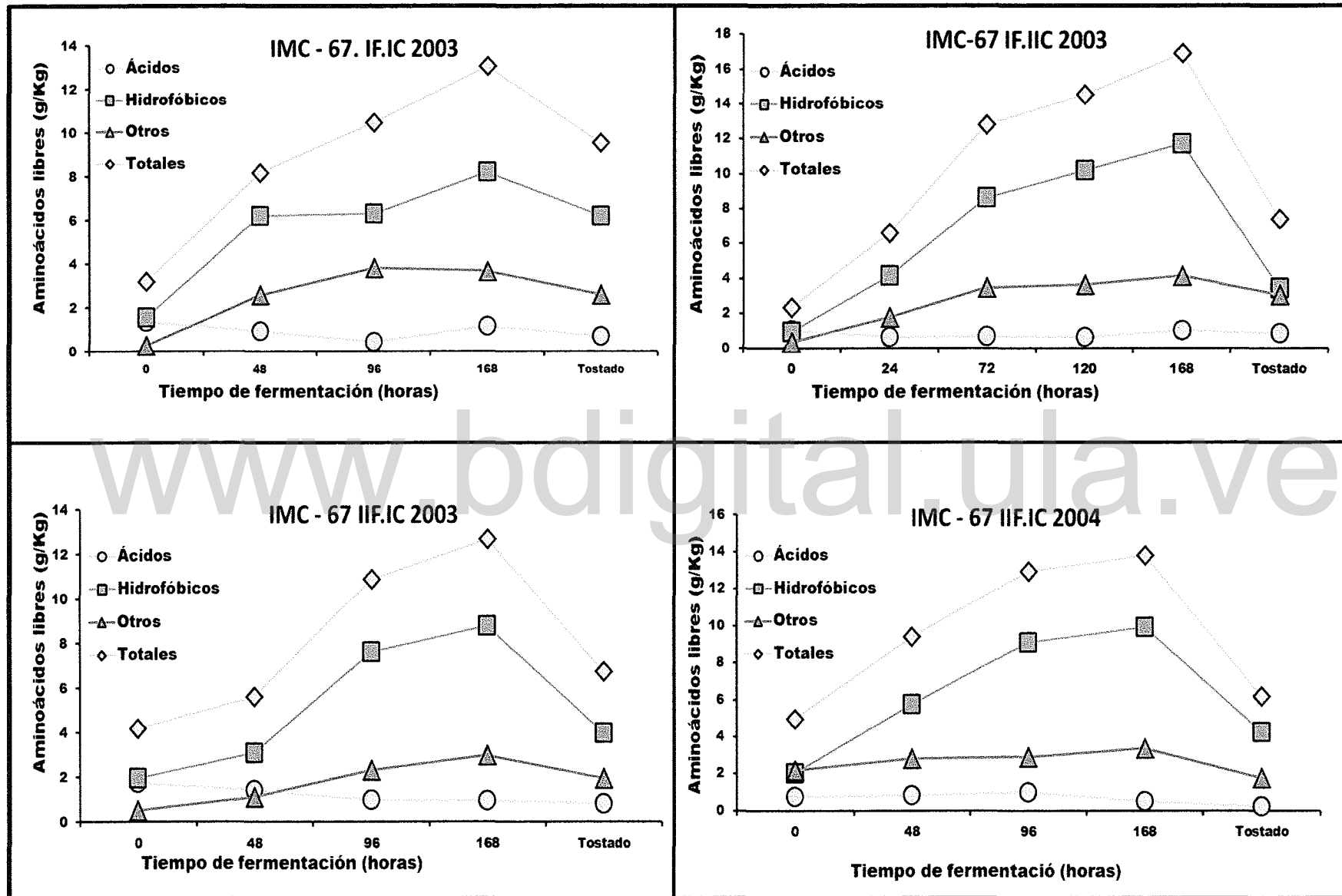


Figura 29. Tendencia de los aminoácidos durante el proceso de fermentación en cacaos forasteros

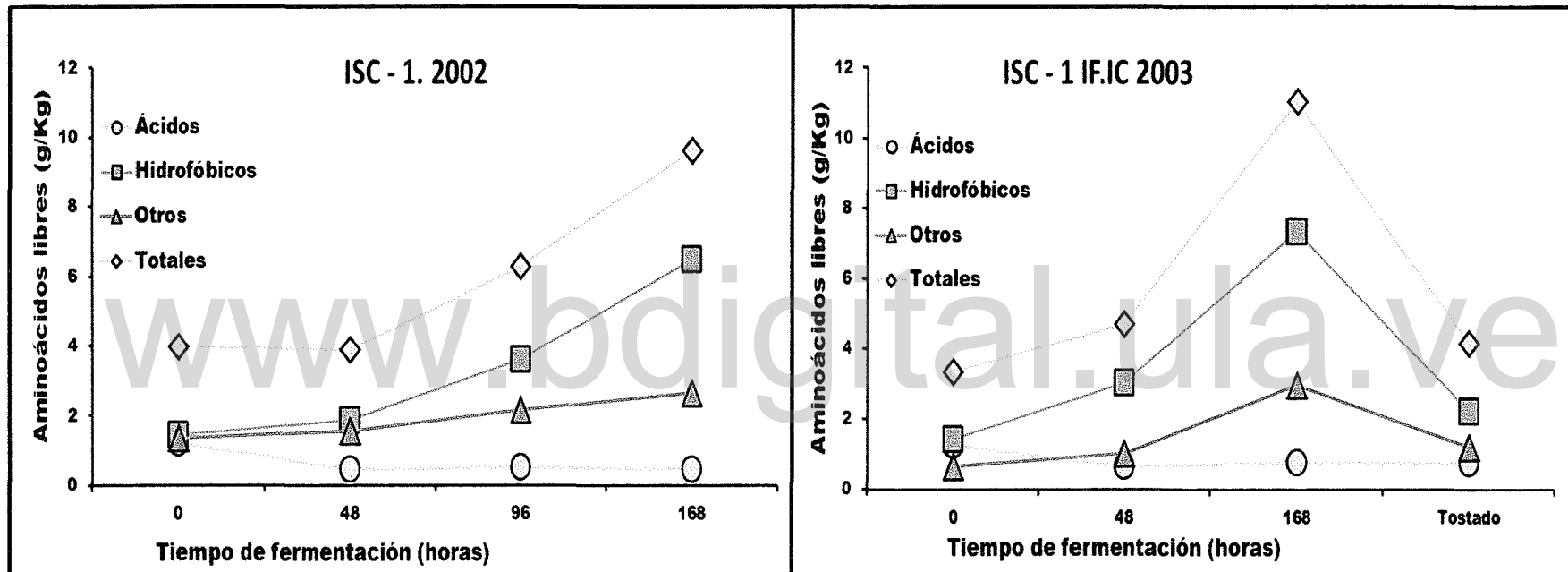


Figura 30. Tendencia de los aminoácidos durante el proceso de fermentación en cacaos trinitarios

La tendencia observada en estas figuras ya ha sido descrita con anterioridad por varios investigadores, en base a estudios realizados con diferentes variedades de cacaos^[23,24,29]

Sin embargo, las cantidades individuales obtenidas en este trabajo difieren de las reportadas por los otros autores, tanto para los granos sin fermentar como los fermentados^[196].

Estas diferencias pueden estar asociadas a la actividad enzimática, que está muy influenciada por algunos parámetros propios de la etapa de fermentación como son: la cantidad de granos que se fermenten y el número de remociones que se realice, los cuales a su vez tienen una influencia directa sobre la temperatura y el pH del proceso.

La masa de cacao que se fermenta se relaciona directamente con la cantidad de calor que producen los microorganismos. Por su parte, la remoción de los granos permite la aireación de los mismos, lo que conlleva a una regulación tanto de la acidez del producto como de la velocidad del proceso fermentativo^[196]. Un exceso de aireación da lugar a bajas temperaturas y, en consecuencia a una disminución de las velocidades metabólicas así como también una alta concentración de ácido acético.

La carboxipeptidasa que es la responsable de la liberación de los aminoácidos hidrofóbicos, disminuye su acción a bajas temperaturas y pH elevados, ya que sus condiciones óptimas de acción se dan a un pH cercano a 5 y a temperaturas sobre los 45 °C^[29]. En este sentido, la cantidad de aminoácidos y oligopéptidos liberados durante la proteólisis varía considerablemente de un cacao a otro.

Las Figuras 28-30 muestran un segundo comportamiento: la disminución en el contenido de aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico) durante los primeros días de fermentación. Seiki^[195], observó un

comportamiento similar para el ácido glutámico al realizar la fermentación en cestas y rumas, mientras que Hashim y col^[29]., sólo observaron una pequeña disminución del ácido aspártico durante los dos primeros días de esta etapa. De acuerdo con Kirchhoff^[23,24] no se puede asegurar que ningún otro aminoácido, además de los ácidos, disminuya su concentración en la almendra, ya que cualquier degradación puede ser compensada por su formación proteolítica, especialmente para el caso de los aminoácidos hidrofóbicos.

Los resultados obtenidos que muestran las Tablas 21-30 y la Figura 31 permiten diferenciar los cacaos fermentados de los no fermentados en función del tipo de aminoácido que predomine en la almendra.

Los granos de cacao sin fermentar presentan cantidades pequeñas de aminoácidos libres (2,33 – 5,96 g/Kg) pero con alto contenido de aminoácidos ácidos (entre el 15 y el 63 % dependiendo del tipo y la variedad de cacao.

Por el contrario, los granos de cacao bien fermentados, presentan un mayor contenido de aminoácidos libres entre 9,07 – 16,90 g/Kg con un predominio de aminoácidos hidrofóbicos (entre el 56 y 72%) y una disminución bastante drástica, de más del 25%, de los aminoácidos ácidos hacia el final de la fermentación.

Este comportamiento concuerda con los resultados reportados por Hashim^[29] y Kirchhoff^[23,24], para cacaos provenientes de Malasia y Ghana, donde los granos sin fermentar, secos y libres de grasa presentan cantidades pequeñas de aminoácidos libres (2,25 – 6,24 g/Kg) y los granos bien fermentados, secos y libres de grasa provenientes de África poseen entre 8 – 14 g/Kg de aminoácidos libres^[26]. Ellos reportan que la relación aminoácidos hidrofóbicos:ácidos:otros varía de 30:18:52 en granos sin fermentar a 46:6:48 en granos fermentados para los cacaos de Malasia y de 33:30:37 a 58:16:26 para los granos provenientes de Ghana

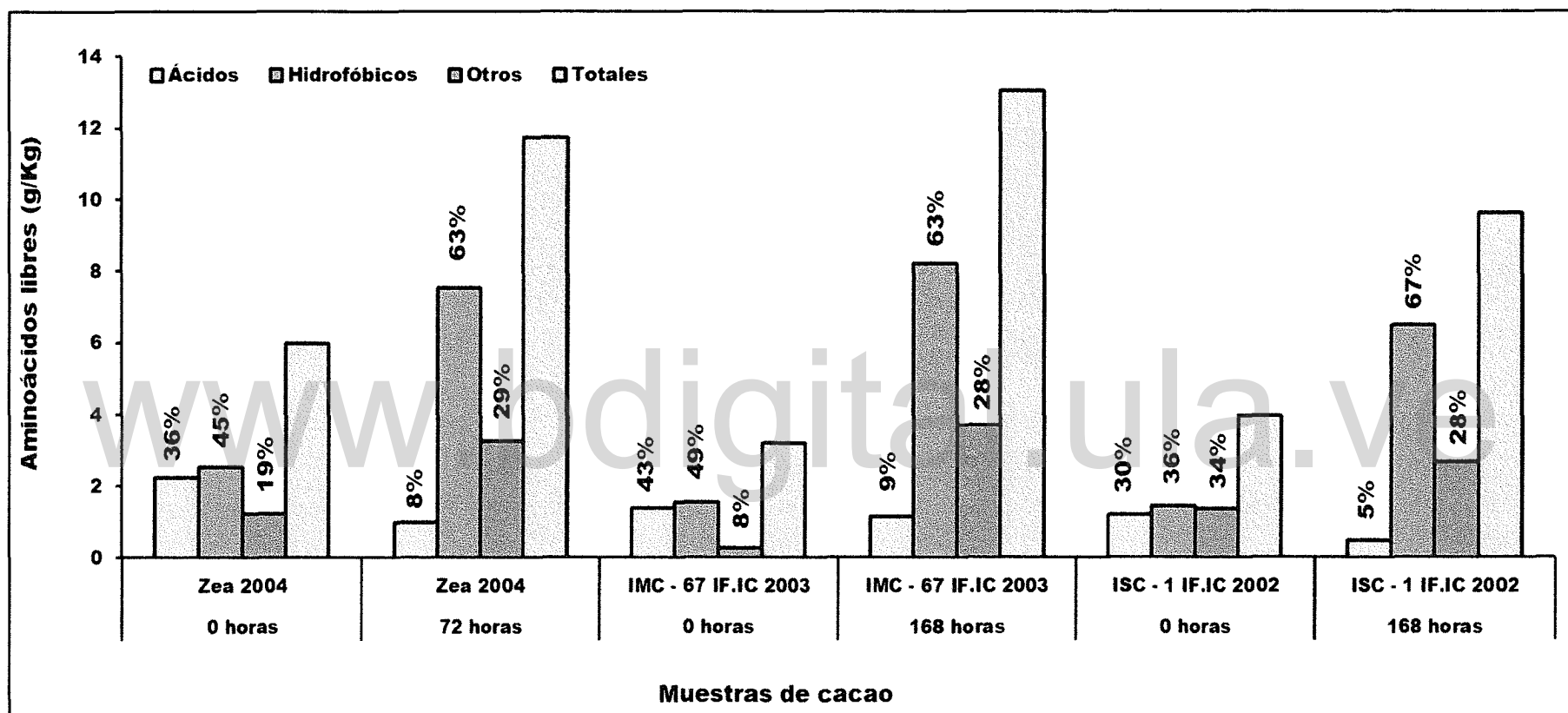


Figura 31. Cambios de los aminoácidos libres entre el primer y último día de fermentación para distinto tipos de cacao

Esta relación permite apreciar como el contenido de aminoácidos ácidos es mayor en los cacaos sin fermentar que en los cacaos fermentados, así como también que estos últimos presentan un mayor contenido de aminoácidos hidrofóbicos.

En nuestro caso los resultados obtenidos siguen la misma tendencia que lo reportado por Hashim^[29] y Kirchhoff^[23,24]. A manera de ejemplo para el forastero IMC-67, que sería equivalente a los anteriormente mencionados, la relación hidrófobos:ácidos:otros para uno de los ciclos estudiados fue 41:15:44 en los granos sin fermentar y de 72:4:25 en los granos fermentados.

Como ya se mencionó con antelación, al final de la fermentación los aminoácidos predominantes son los hidrofóbicos, en este trabajo se encontró que las concentraciones de leucina, fenilalanina, valina, alanina e isoleucina aumentaron significativamente durante esta etapa. Rohan y col^[44]., observaron el incremento de aminoácidos durante la fermentación, aunque este aumento solo se observó para la leucina, fenilalanina y valina. Por su parte, Seike^[195], Hashim^[29] y Kirchhoff^[23,24] también encontraron considerables cantidades de aminoácidos hidrofóbicos como la leucina, fenilalanina, alanina y tirosina, los cuales se asocian con la formación del aroma del cacao, debido a su elevada reactividad con los azúcares reductores.

Los resultados obtenidos permiten inferir entonces que los aminoácidos son liberados en cantidades limitadas y poco constantes, pero este proceso está muy influenciado por el pH y la temperatura que se desarrollan durante la fermentación. Además, los cacaos fermentados pueden diferenciarse de los no fermentados por la cantidad de aminoácidos libres y la relación aminoácidos hidrofóbicos/aminoácidos ácidos presentes en la almendra.

También se realizó un estudio comparativo del contenido de aminoácidos libres presentes en las distintas variedades de cacao criollos provenientes de un mismo ciclo de cosecha y fermentación. Estos resultados se presentan en la Figura 32.

Se pueden apreciar diferencias significativas entre las distintas variedades de un mismo tipo de cacao. En un principio se podría atribuir este comportamiento a diferencias genéticas entre las variedades estudiadas. Sin embargo, los cacaos criollos merideño San Juan y merideño Zea son cacaos genéticamente equivalentes pero cultivados en zonas diferentes. Por este motivo, las diferencias de composición observadas no se pueden atribuir exclusivamente al genotipo, son el producto de la influencia combinada de diversos factores: variedad, condiciones de cultivo y cosecha y tratamiento postcosecha^[12,28,29,48,192].

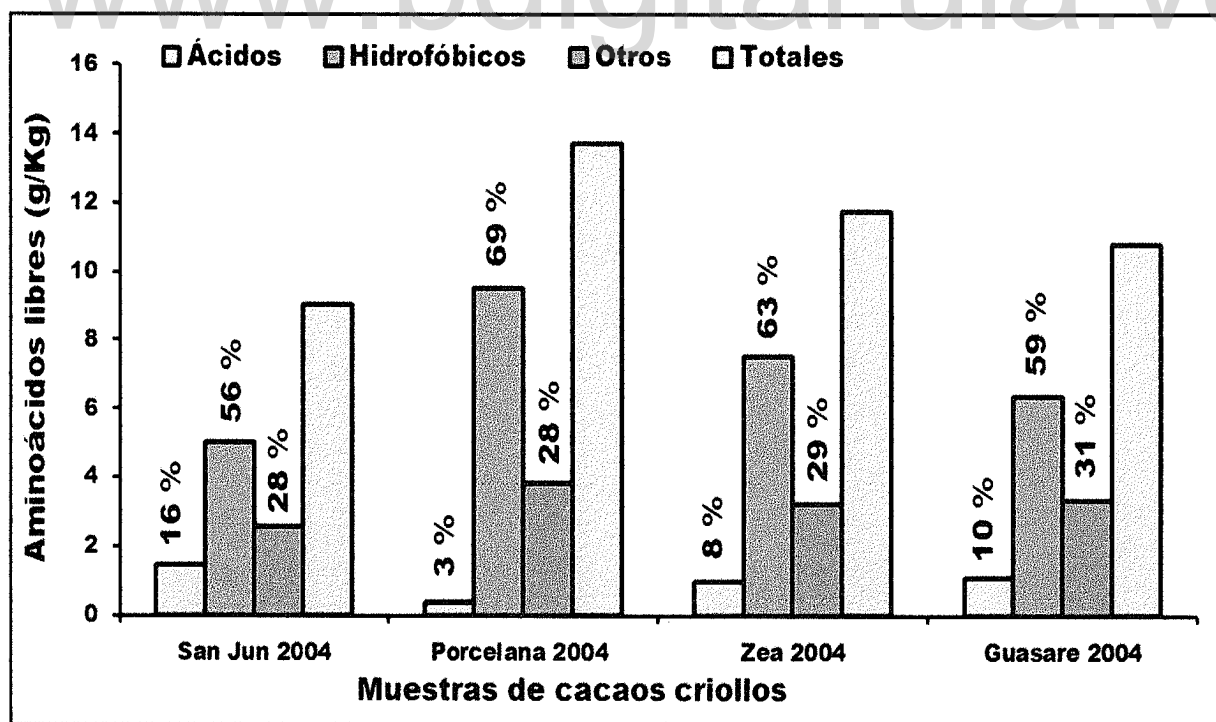


Figura 32. Estudio comparativo de aminoácidos libres en distintas variedades de cacaos criollos

En vista de lo anterior, varios investigadores han estudiado los cambios en los niveles de aminoácidos libres en el transcurso de la fermentación y han podido constatar que muchos parámetros tienen efecto sobre la composición final, tales como: condiciones climáticas durante la formación del fruto, el grado de madurez de las bayas, el estado nutricional de la planta madre, el material genético, además de las condiciones de fermentación y secado^[26].

El análisis de las muestras IMC - 67 (Figura 33), refleja claramente esta situación. Estas muestras provienen de un mismo tipo y variedad de cacao, pero fueron recolectadas en distintos periodos del año (ciclos) y además, en cada ciclo se realizaron dos fermentaciones dependiendo de la maduración que presentaba la mazorca.

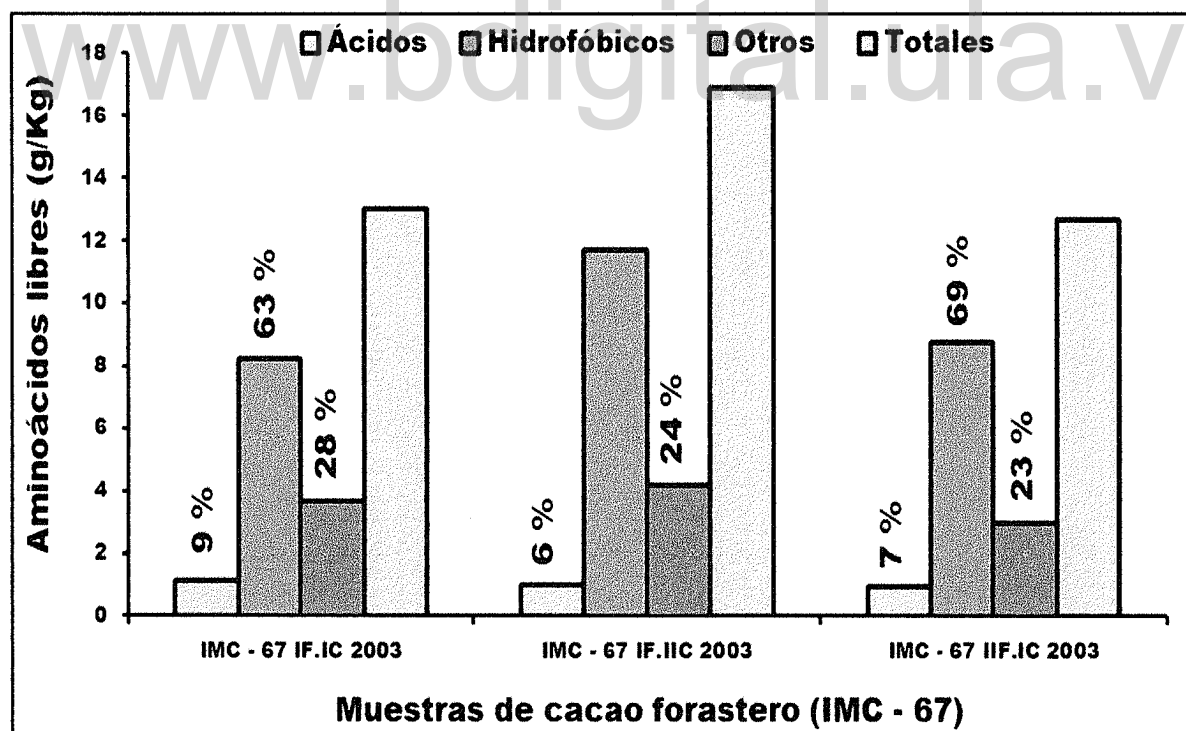


Figura 33. Estudio comparativo del contenido de aminoácidos libres en una variedad de cacao forastero (IMC - 67) para distintos ciclos de cosecha y periodos de fermentación en un mismo año.

En la gráfica de la Figura 33 se observa también como hay un ligero aumento en el contenido de aminoácidos hidrofóbicos en la segunda fermentación en relación a la primera para las muestras IMC-67 IF.IC 2003 y IMC-67 IIF.IC 2003 respectivamente. De acuerdo con Portillo y col.^[57], la demora en el desgrane y apertura de las mazorcas origina un incremento brusco de la temperatura durante la fermentación, lo cual puede favorecer los procesos de proteólisis y en consecuencia la liberación de aminoácidos hidrofóbicos.

En el caso de las muestras recolectadas en distintos ciclos y años (Figura 34), se observa que tanto para cacaos forasteros como trinitarios la variación en el contenido de aminoácidos es mucho más pronunciada. En este caso, no sólo influyen los parámetros mencionados anteriormente sino que también los tratamientos postcosecha (tipo de fermentación, tiempo de fermentación, frecuencia de volteo, condiciones del secado) y de las condiciones climáticas de la zona en donde se cultive la planta y donde se lleven a cabo los procesos de fermentación y secado (temperatura, radiación solar, precipitaciones).

Al final de la fermentación, el contenido de humedad en las almendras es ligeramente superior al 60% y, de acuerdo con las normas COVENIN, debe reducirse hasta valores de un 6 a 7% antes de almacenar, vender, transportar y/o exportar los granos. Un contenido de humedad por debajo de estos valores, hace que la cáscara del grano se torne quebradiza mientras que valores superiores, hacen que el grano sea susceptible al ataque de hongos y adquiera olores desagradables^[44]. De acuerdo con Zambrano y col.^[17], el secado es un proceso físico, químico y mecánico el cual se puede llevar a cabo de forma natural (por exposición de los granos al sol) o de forma artificial (mediante equipos con corrientes de aire caliente). La elección de cualquiera de estos métodos va a depender de las características de cada tipo de cacao, de la cantidad de mazorcas

recolectadas y de las condiciones climáticas que prevalecen después recoger las mazorcas^[196].

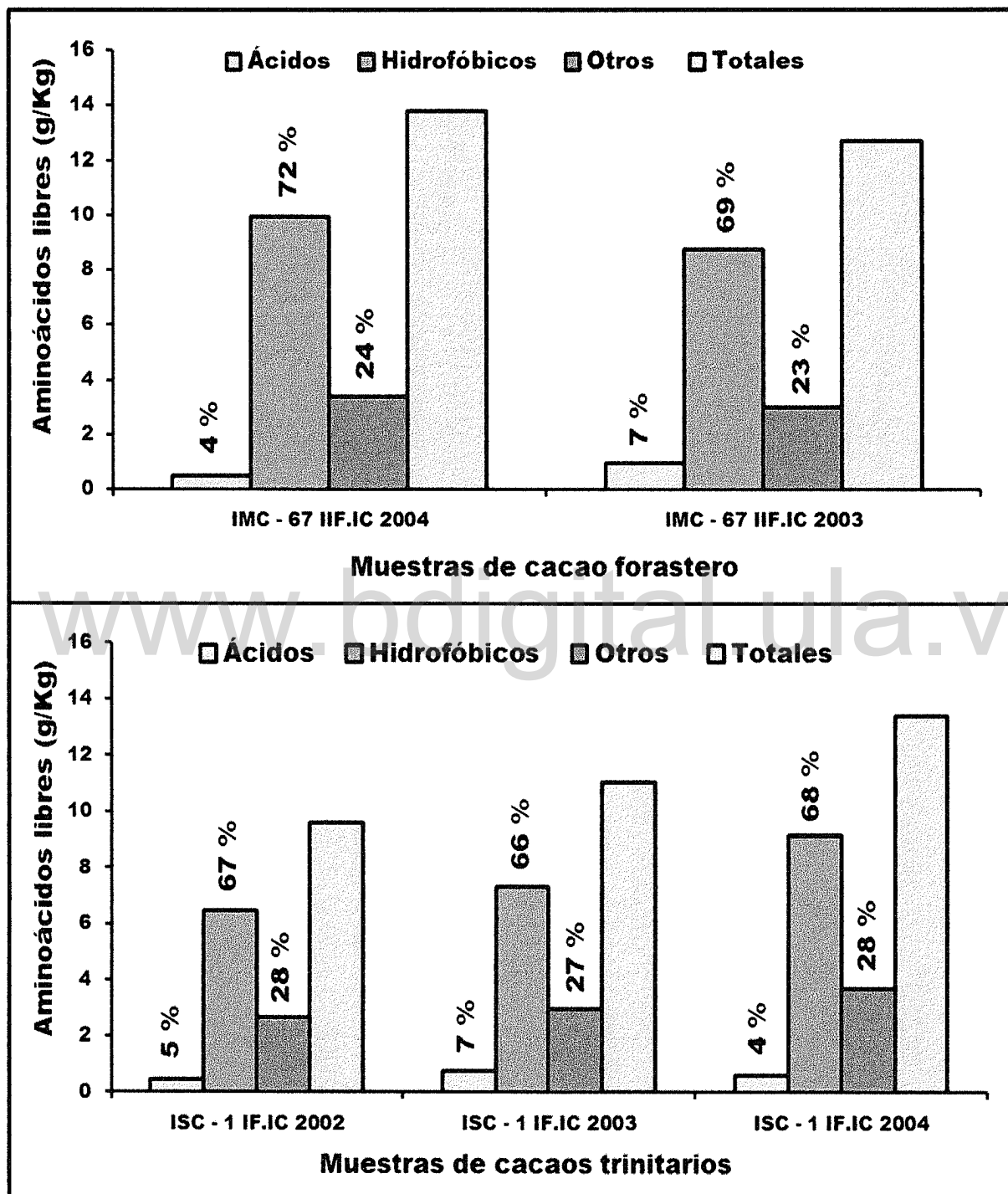


Figura 34. Estudios comparativos del contenido de aminoácidos libres en muestras de cacao forasteros (IMC - 67) y trinitarios (ICS - 1) en distintos años de fermentación.

La etapa de secado es importante. En ella continúa la fase oxidativa de la fermentación que influye en la disminución de la astringencia, amargor y acidez del grano. Como las enzimas toman parte en los cambios químicos que ocurren al inicio del secado, este proceso no debe ser muy rápido pues la temperatura elevada y el bajo contenido de humedad pueden causar la inactividad de las enzimas, antes de que se hayan completado los cambios químicos esenciales^[196,198]. En nuestro caso, no nos suministraron muestras tomadas a diferentes tiempos durante la etapa de secado. Por lo tanto, no se pudo determinar la función respectiva del secado en la formación de los compuestos, implicados en el sabor final.

De acuerdo con Cros^[48], como ya se mencionó, el aroma del cacao proviene de distintas fuentes: una fracción inicial (presente en la almendra fresca), una fracción desarrollada durante la fermentación y secado y por último por una fracción que se genera durante el tostado. En la etapa de fermentación se forman los precursores necesarios para poder obtener el aroma específico del cacao en el tostado^[199]. Varios autores han reportado que el aroma y sabor a chocolate en los granos de cacao es exclusivo de los granos fermentados posteriormente secados y tostados. En los granos que son tostados, sin una etapa previa de fermentación, no se obtiene ese sabor típico en el cacao^[191,195,200,201].

El desarrollo térmico del aroma de cacao es un fenómeno realmente complejo, que depende de las condiciones de tiempo y temperatura en las que se realice el tostado, así como de la composición química del grano^[202]. Para la selección de las condiciones de tostado, como lo hemos mencionado con anterioridad, se deben considerar diferentes factores, entre los que se destacan: tipo de cacao, origen, tratamiento postcosecha y el grado de tostado que se desee^[203]. Por lo general, se trabaja a temperaturas de 110 °C, 130 °C y 145 °C para cacaos

criollos, trinitarios y forasteros, respectivamente con tiempos entre los 25 y 30 minutos.

En nuestro caso, los resultados obtenidos para las muestras durante esta etapa, indican que el tostado ocasiona una disminución drástica de la concentración de aminoácidos libres en las tres variedades de cacao estudiadas (Figuras 28-30 y Tablas 21-30).

Nuestros resultados están en concordancia con los reportados por Rohan y col^[204], quienes concluyen además que esta degradación muestra una correlación lineal con el tiempo de calentamiento; la disminución de cada aminoácido va a depender de las condiciones bajo las cuales se realice el tostado.

De acuerdo con Jinap. S y col^[202]., la intensidad del sabor del cacao puede estar asociada con la presencia de metilpirazinas y, los aminoácidos hidrofóbicos podrían ser sus precursores potenciales. Por tales razones, la disminución en la concentración de aminoácidos a medida que transcurre la torrefacción (Figuras 28-30) se debe a su participación en la degradación de Strecker durante la reacción de Maillard, que se ve favorecida por las altas temperaturas. Esta condición facilita la interacción del grupo amino de los aminoácidos con los grupos carbonilos de los azúcares reductores.

En la literatura se pueden encontrar varios trabajos cuyos resultados avalan esta premisa, ya que tras el tostado de los granos se observa un aumento significativo en la concentración de metilpirazinas a la par de una disminución de los aminoácidos libres^[63,205]. Yusep y col., Jinap y col^[45]., sostienen que los aminoácidos libres son los precursores específicos del aroma del cacao, los cuales actúan como sustrato para la formación de las metilpirazinas.

En ese sentido, varios autores afirman que las metilpirazinas pueden ser utilizadas como índices del proceso de tostado debido a su pronunciada formación durante la torrefacción y a su influencia en el aroma final del cacao^[205,206].

Sobre la base de estas premisas, en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular se decidió realizar un estudio comparativo del contenido de alquilpirazinas entre cacaos criollos, forasteros y trinitarios, a fin de determinar si existía alguna discriminación entre ellos.

Para llevar a cabo este trabajo se desarrolló y validó un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM) e introducción de la muestra en línea empleando la técnica de espacio de cabeza (EC)^[205].

La técnica de espacio de cabeza permitió llevar a cabo el tratamiento e introducción de la muestra en el cromatógrafo de gases, a través de una extracción (sólido-gas) simple y cuantitativa de las alquilpirazinas presentes en el licor de cacao, con un mínimo de interferencias. Esta propuesta disminuyó significativamente el tiempo de tratamiento de la muestra previo al análisis y, permitió el acoplamiento directo con el cromatógrafo de gases y el detector espectrómetro de masas.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la etilpirazina no estaba presente en los cacaos criollos, mientras que en los forasteros y trinitarios se encontraba en distintas concentraciones. También se observó que la relación trimetilpirazina/tetrametilpirazina agrupaba a los cacaos criollos y los separaba claramente del resto de los tipos de cacaos.

En nuestro caso, muchas de las muestras que analizamos coincidían con las del trabajo de Delgado y col^[205].

Por ello, pudimos hacer una comparación de nuestros resultados, con respecto al perfil de aminoácidos libres durante el último día de fermentación y a lo largo de la etapa de tostado, con el contenido de pirazinas obtenido por Delgado y col. Los resultados se muestran en las Figuras 35 a 37 y son consistentes con las premisas expuestas con anterioridad.

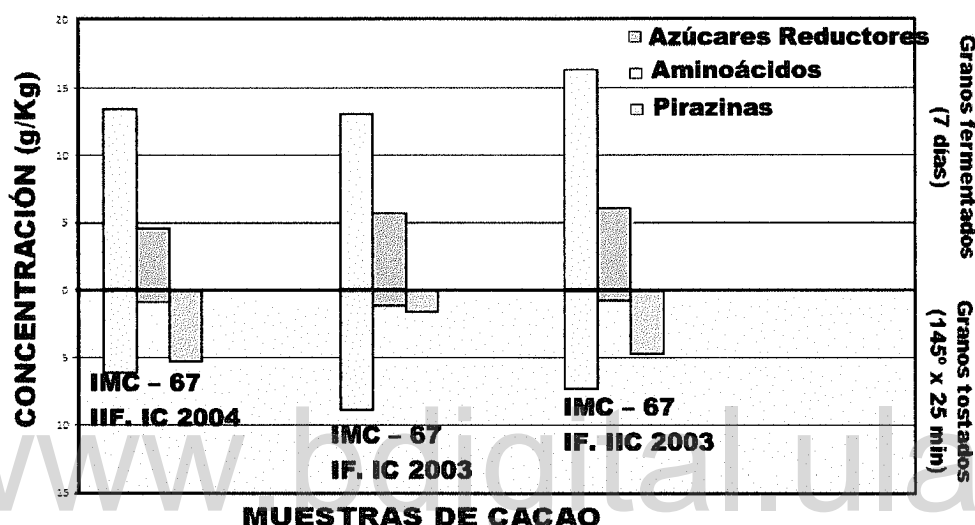


Figura 35. Efecto del tostado en el contenido de aminoácidos, azúcares reductores y pirazinas en muestras de cacaos forasteros.

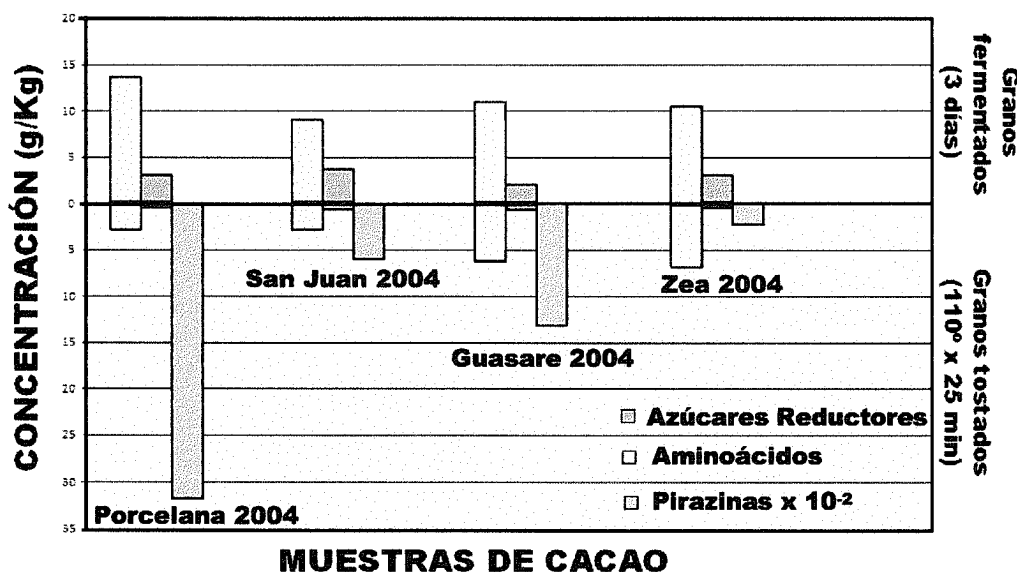


Figura 36. Efecto del tostado en el contenido de aminoácidos, azúcares reductores y pirazinas en muestras de cacaos criollos.

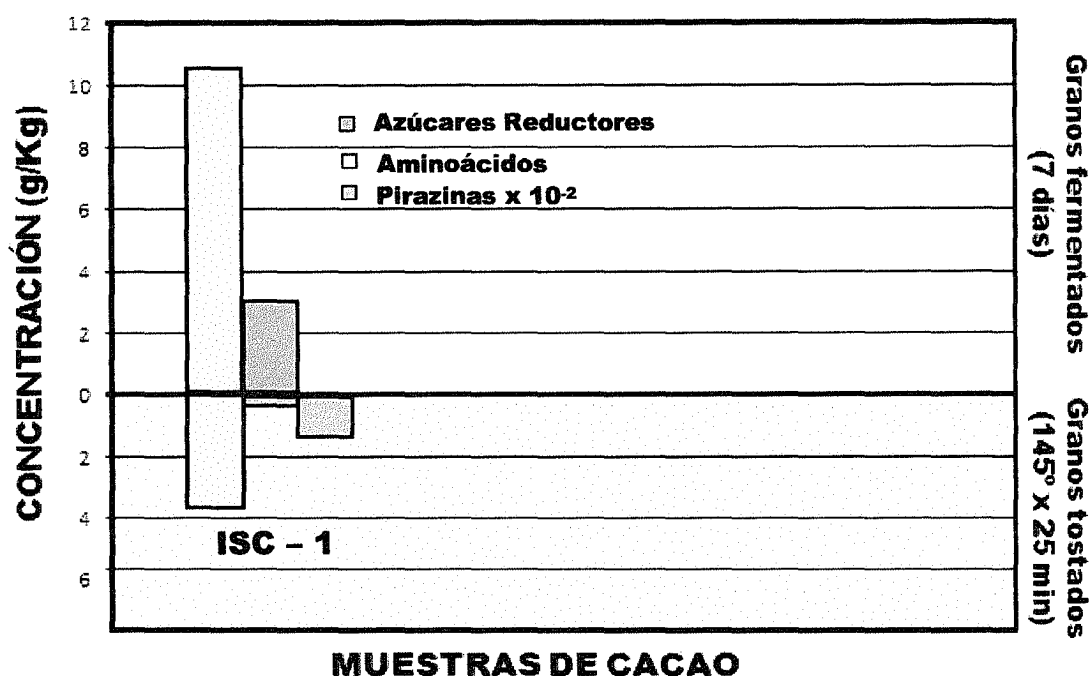


Figura 37. Efecto del tostado en el contenido de aminoácidos, azúcares reductores y pirazinas en muestras de cacao trinitario.

En primer lugar, se observa una disminución importante en la concentración de aminoácidos libres en la transición de la etapa de fermentación a la de tostado.

En segundo término, se destaca el aumento del contenido de pirazinas durante el proceso de tostado.

En esta última etapa, también podemos observar la desaparición de los azúcares reductores, resultados que avalan la tesis que plantean Rohan^[49] y Mermet^[207]: los azúcares reductores representan el factor limitante en el desarrollo de un buen aroma. Éstos son los primeros que se consumen durante el desarrollo de la reacción de Maillard, por lo que actúan como el reactivo limitante de esta reacción. En consecuencia, también limitan la formación de los compuestos aromáticos característicos del cacao: las pirazinas.

IV. 5.1.9. Conclusiones

☞ En este trabajo se desarrolló una nueva propuesta metodológica para la determinación de aminoácidos libres en muestras de cacao donde se tuvo especial atención en mejorar los parámetros analíticos característicos como: automatización, tiempo de análisis, precisión, exactitud, volumen de muestra reducido, bajo coste y bajo impacto ambiental.

☞ El tiempo de la reacción de derivación de los aminoácidos se disminuyó significativamente desde varios minutos (10 a 60 min.) a unos segundos (40 seg.), utilizando un horno de microondas doméstico para acelerar la reacción con radiación de microondas.

☞ En la etapa del tratamiento de la muestra luego de la reacción de derivatización, se automatizó la extracción en fase sólida de los derivados en un sistema de columnas acopladas utilizando una precolumna Oasis HLB, minimizando los errores experimentales asociados a un tratamiento manual. Adicionalmente, este sistema garantizó bajo consumo de solventes orgánicos y baja generación de residuos tóxicos por lo que la propuesta metodológica se enmarca dentro de la filosofía general de la Química Analítica Verde.

☞ La validación de la metodología indicó una buena exactitud y precisión demostrando la alta eficiencia de los todos los procedimientos de extracción propuestos.

☞ Utilizando la metodología propuesta se analizaron muestras de cacaos criollos, forasteros y trinitarios, cultivados en distintas regiones de *Venezuela*, antes, durante y después de los procesos de fermentación y tostado. Los resultados obtenidos para los cacaos forasteros y trinitarios

mostraron las mismas tendencias de cambios que las reportadas en la literatura. Para los cacaos criollos venezolanos, estos resultados son originales, ya que en la literatura especializada no se reportan trabajos que aborden este tema para esta variedad de cacao.

Por todo lo expuesto, esta propuesta representa una nueva alternativa metodológica atractiva y válida para la determinación de aminoácidos en muestras de cacao, que podrá contribuir significativamente al conocimiento sobre la calidad final de los cacaos venezolanos.

V. 5.2. Sección cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

En el marco de este capítulo de la Tesis también nos propusimos desarrollar y validar un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas para la determinación de aminoácidos y que se describe a continuación.

Utilizando este método se evaluó el perfil de aminoácidos libres en las mismas muestras de cacao lo que permitió confirmar la veracidad de los resultados obtenidos por el método por cromatografía líquida de alta resolución.

V.5.2.1. Reactivos y solventes

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y los solventes de grado HPLC. El acetonitrilo fue suministrado por J. T Baker (Phillisbrug, NJ, USA) y el agua utilizada se purificó en un sistema Milli-Q SP TOC (Water. Millipore, Milliford, MA, USA). Los gases utilizados: aire



(99,999%), nitrógeno (99,999%) y helio (99,999%) fueron suministrados por AGA de Venezuela.

Para el desarrollo de este método se empleó como reactivo derivatizante el N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), proporcionado por Sigma (St. Louis, MO, USA) y los patrones de aminoácidos fueron los mismos que se utilizaron en CLAR.

V.5.2.2. Patrones de aminoácidos y muestras de cacao

Se prepararon soluciones de los aminoácidos en acetonitrilo por dilución de las soluciones patrones de 10.000 µg/mL utilizadas en CLAR.

Las muestras de cacao analizadas en este estudio fueron las mismas que se utilizaron en CLAR.

V.5.2.3. Sistema cromatográfico

⇒ Se utilizó un cromatógrafo de gases VARIAN modelo 3800 acoplado a un espectrómetro de masas VARIAN Saturno 2000 (con un analizador de trampa de iones) y a un automuestreador automático modelo VARIAN 8200 con un carrusel para 48 viales de volúmenes de 2,0 y 0,1 mL, respectivamente.

⇒ La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna capilar 5% fenil-metil-polisiloxano, HP5 ms (Agilent) de 30 m x 0,25mm con un espesor de película de 0,25 µm.

⇒ La detección de los distintos derivados se realizó mediante el monitoreo de ion específico (SIM, selected ion monitoring; siglas en inglés) y la identificación de los analitos se realizó utilizando las

librerías WILEY y NIST integradas en el software del equipo. Ello permitió seleccionar los siguientes iones: m/Z 102 para la glicina, 116 para la alanina, 142 para la prolina, 144 para la valina, 158 para la leucina e isoleucina, 156 para la lisina, 176 para la metionina, 202 para el triptófano, 204 para la serina, 218 para la treonina, tirosina y fenilalanina, 232 para el ácido aspártico y 246 para el ácido glutámico.

V.5.2.4. Resultados y discusiones

La optimización de las condiciones de trabajo se realizó empleando el método univariado, es decir, se modificó un parámetro a la vez.

Para el sistema propuesto se optimizaron todas aquellas variables involucradas tanto en la etapa de derivatización de los aminoácidos, como en la separación y detección de los derivados.

Los distintos estudios que se realizaron fueron:

a. *Reacción de derivatización de los aminoácidos asistida por microondas:*

- Tiempo de irradiación
- Potencia de irradiación

b. *Separación cromatográfica de los derivados:*

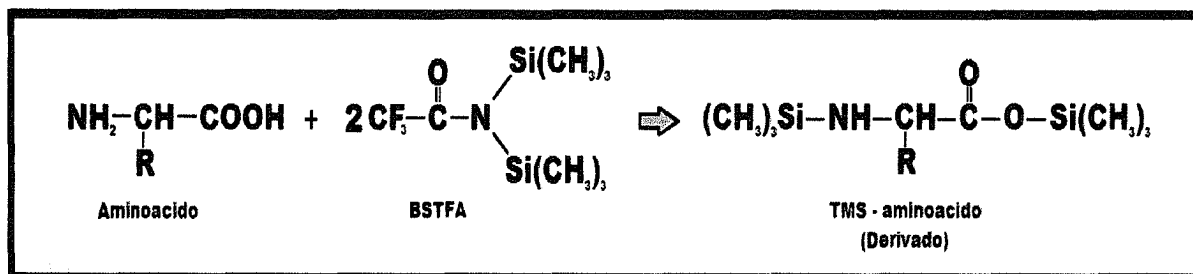
- Selección de la columna cromatográfica
- Condiciones cromatográficas para obtener una buena resolución entre los analitos en un tiempo de análisis satisfactorio (programa de temperatura del horno, programa de temperatura del inyector y flujo del gas portador).

c. Condiciones de detección de los derivados:

- Condiciones del detector de masas para lograr la mejor sensibilidad para la detección de los distintos aminoácidos en las muestras de cacao (modalidad de impacto electrónico, temperatura de la línea de transferencia, de la trampa de iones y del manifold).

IV. 5.2.4.1. Reacción de derivatización de los aminoácidos

Los aminoácidos, como ya lo hemos dicho, son compuestos polares con una volatilidad muy baja, por lo que no pueden ser analizados por cromatografía de gases sin su conversión previa en derivados volátiles y estables. Dentro de las reacciones orgánicas más utilizadas en la conversión de aminoácidos en derivados volátiles, la sililación es el método de derivatización más versátil, por ser una reacción que puede llevarse a cabo en un solo paso. En este procedimiento se sustituyen los hidrógenos activos (-COOH y NH₂) de la molécula por grupos trimetilsilil [(CH₃)₃Si-; TMS] (Figura 38), reduciendo así la polaridad del analito y la formación de puentes de hidrógeno, lo que trae como resultado un incremento en su volatilidad.



228

Figura 38. Reacción de sililación de los aminoácidos con BSTFA.

En este trabajo se empleó como agente silanizante BSTFA (Figura 38). En general, este tipo de reacciones suele realizarse en presencia de un calentamiento convencional a temperaturas entre los 75 y 100 °C y requiere de largos tiempos de reacción (más de 30 minutos)^[109,208,209]. Para disminuir el tiempo de reacción se propuso emplear la radiación de microondas como forma de calentamiento ^[166].

Para obtener el mayor rendimiento en la reacción y en el menor tiempo posible se optimizaron: el tiempo de irradiación (30, 60 y 180 seg), la potencia de irradiación por MW (310 y 630 W) y la relación reactivo derivatizante:analito.

En las Figuras 39 y 40 se presentan las gráficas correspondientes a los estudios del tiempo y la potencia de irradiación por microondas sobre la reacción de derivatización de tres aminoácidos seleccionados para este fin.

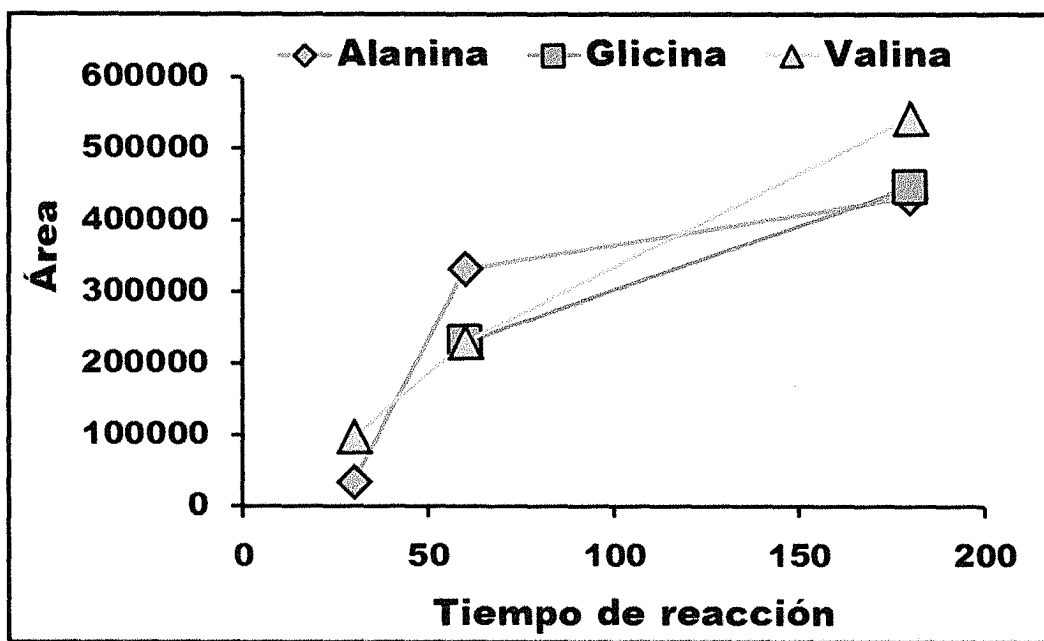


Figura 39. Efecto del tiempo de irradiación (30, 60 y 180 seg) a una potencia de irradiación de 310W

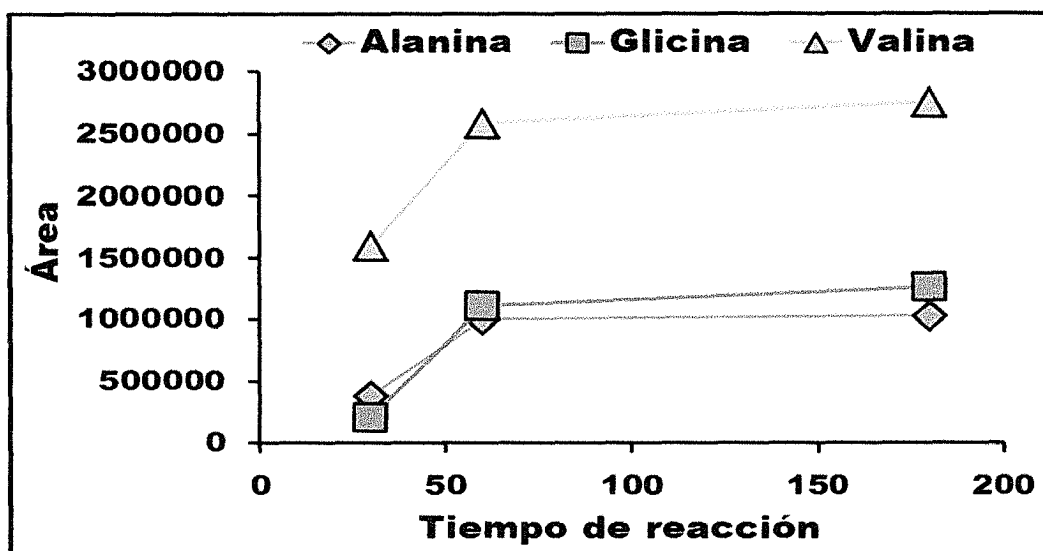


Figura 40. Efecto del tiempo de irradiación (30, 60 y 180 seg) a una potencia de irradiación de 630W

En ambas gráficas se puede apreciar como aumenta el área de pico de los derivados con el aumento del tiempo de irradiación, siendo este comportamiento menos pronunciado cuando se trabajó a una potencia de 310 W (Figura 39a). Cuando se trabajó a la potencia de 630 W (Figura 39b) se puede observar que, a tiempos de reacción superiores a los 60 segundos no se observan cambios significativos en las áreas de pico de los analitos en estudio. En vista de este comportamiento, se seleccionaron una potencia de irradiación por MW de 630 W y un tiempo de irradiación de 60 segundos como las mejores condiciones para realizar la reacción y se fijaron para el resto de los análisis.

V.5.2.4.2. Separación cromatográfica

La separación cromatográfica se realizó en una columna capilar 5% fenil-metil-polisiloxano, HP5 ms (Agilent) de 30 m x 0,25mm con un espesor de película de 0,25 μ m utilizando el programa de temperatura: 80

230

Wendy Josefina Orozco Contreras

°C (2 min) hasta 155 °C con una velocidad de calentamiento de 8 °C/min, luego hasta 300 °C (3 min) a 11 °C/min. Como gas portador se utilizó Helio a un flujo de 1mL/min.

La inyección de la muestra se realizó con la modalidad de inyección splitless con un tiempo de cierre para la válvula solenoide de 0,45 min y a una temperatura del inyector de 250 °C.

El detector de masas se utilizó en la modalidad por impacto electrónico a un voltaje de 70 eV. La temperatura de la línea de transferencia, del maniold y de la trampa de iones fueron: 230 °C, 40 °C y 280 °C respectivamente.

En la Figura 41 se presenta el cromatograma obtenido al inyectar una mezcla patrón de los aminoácidos derivatizados de acuerdo al procedimiento descrito (Figura 40a). La identificación, de los tiempos de retención se realizó inyectando de forma individual cada uno de los derivados de los aminoácidos y monitoreando su ion específico. Los tiempos de retención y los iones específicos para cada uno de los analitos se presentan en la Tabla 31.

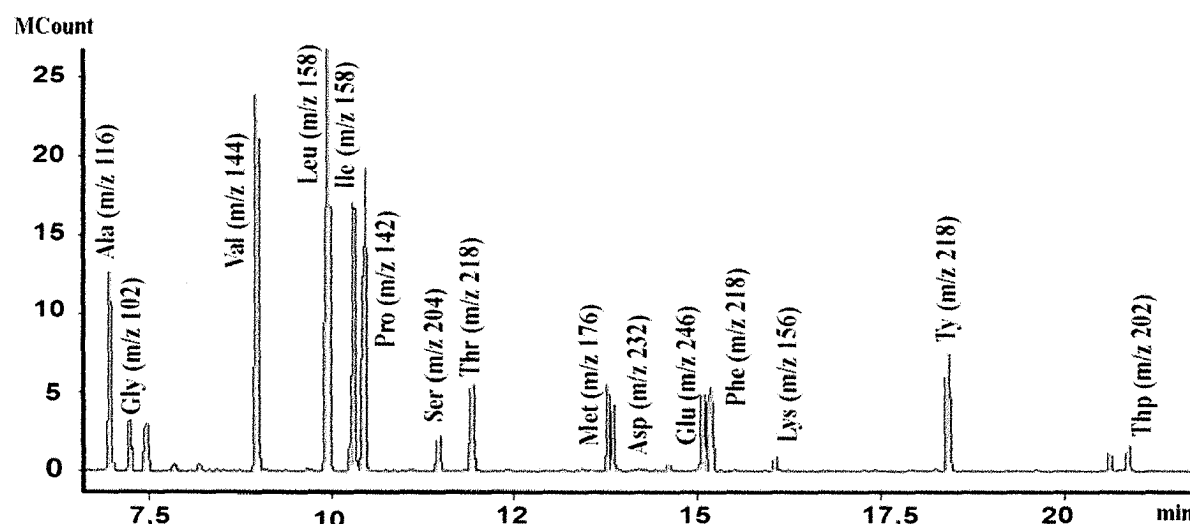


Figura 41. Cromatograma de una solución patrón de aminoácidos derivatizados con BSTFA.

Wendy Josefina Orozco Contreras

Tabla 31. Tiempos de retención de los trimetilsilil derivados de los aminoácidos

Aminoácido	Abrebiatura	Tiempo de retención (min)	SIM
Alanina	Ala	6,967	116 + 190
Glicina	Gly	7,240	102 + 147 + 176
Valina	Val	8,975	73 + 144 + 218
Leucina	Leu	9,941	73 + 158 + 232
Isoleucina	Ile	10,112	73 + 158 + 218
Prolina	Pro	10,317	73 + 142 + 216
Serina	Ser	11,475	73 + 204 + 218
Treonina	Thr	11,924	73 + 218 + 292
Metionina	Met	13,799	73 + 128 + 176
Ácido Aspártico	Asp	13,851	73 + 156 + 232
Ácido Glutámico	Glu	15,053	73 + 128 + 246
Fenilalanina	Phe	15,376	73 + 192 + 218
Lisina	Lis	16,074	84 + 156 + 230 + 362
Tirosina	Tyr	18,442	73 + 218 + 280
Triptofano	Trp	20,833	73 + 202 + 280

Una vez optimizadas todas las condiciones de trabajo se procedió a la inyección de una muestra de cacao, el cromatograma obtenido se presenta en la Figura 42.

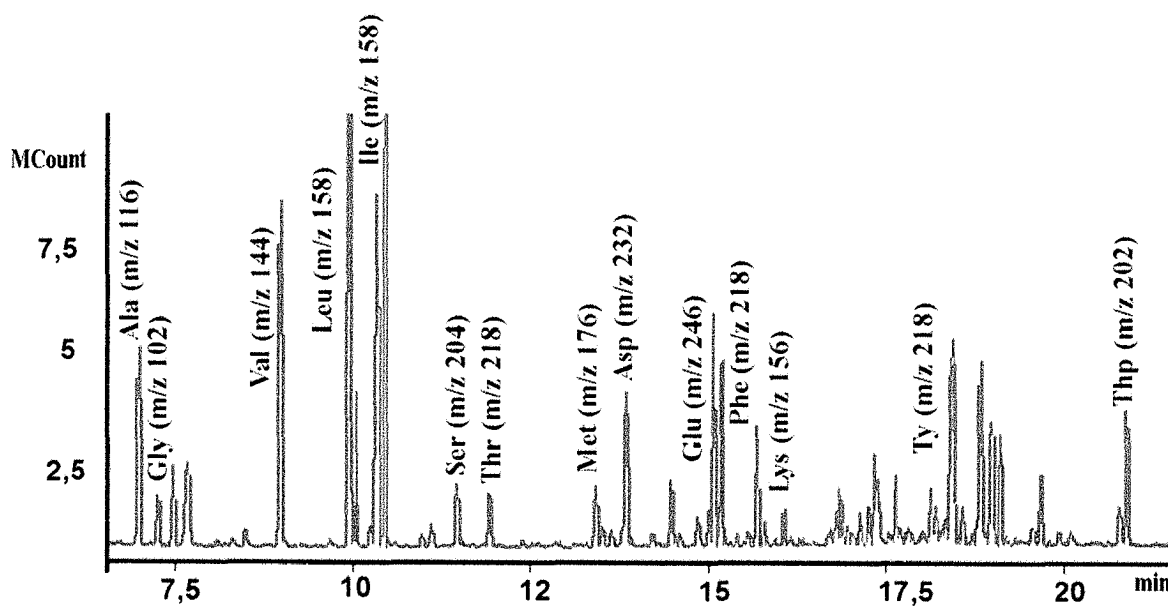


Figura 42. Cromatograma de una muestra de cacao tratada de acuerdo al procedimiento propuesto.

Wendy Josefina Orozco Contreras

V. 5.2.5. Validación del método analítico

La validación del método propuesto se llevó a cabo mediante estudios de exactitud, precisión, linealidad y efecto matriz.

V.5.2.5.1. Precisión y exactitud del método

La precisión del procedimiento se estimó utilizando tanto soluciones patrones de los aminoácidos como muestras de cacao enriquecidas con los analitos a distintos niveles de concentración. El estudio se llevó a cabo durante un día y entre días. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 32 y 33, donde la precisión se expresa en función del coeficiente de variación (CV). Se puede observar que en el caso de los análisis realizados en un mismo día el $CV < 4,67\%$ para todos los casos. Del mismo modo, en el caso de los análisis realizados entre días, el coeficiente de variación fue menor al 4,0 %. Estos resultados indicaban una buena precisión del método y una buena estabilidad del sistema CG-EM utilizado.

La exactitud del método se estimó a través de estudios de recuperación. Se analizaron por el método propuesto, muestras de cacao enriquecidas con los analitos a diferentes niveles de concentración. Los resultados obtenidos (Tabla 34) muestran que para todos los casos los valores de los porcentajes de recuperación se encuentran entre el 95 y el 108 % con un coeficiente de variación menor al 4,2 % ($n=5$). Estos resultados nos confirmaron el alto rendimiento de los procedimientos de extracción (sólido-líquido) y de derivatización de los aminoácidos estudiados.

Tabla 32. Precisión del método utilizando patrones de aminoácidos

Aminoácido	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Reproducibilidad en un día	Reproducibilidad entre días
		% CV (n = 5)	% CV (n = 5)
Ácido Aspártico	0,8	1,57	0,69
	4,0	4,41	2,78
Ácido Glutámico	2,0	3,45	1,52
	10,0	4,47	3,67
Glicina	0,6	3,39	3,92
	3,3	3,67	3,90
Serina	1,0	0,63	2,02
	5,0	1,15	2,48
Treonina	1,5	0,18	2,83
	7,5	1,74	1,99
Lisina	5,0	1,76	0,94
	25	3,94	1,89
Alanina	2,0	4,09	3,15
	10,0	1,78	2,82
Valina	2,0	3,55	2,45
	10,0	1,21	2,11
Leucina	6,5	3,86	2,45
	45,0	1,60	0,98
Isoleucina	1,5	0,83	1,32
	7,5	2,35	2,89
Prolina	4,0	3,21	2,97
	20,0	3,14	4,01
Metionina	0,6	3,23	4,08
	10,6	0,34	1,82
Fenilalanina	4,0	2,26	2,00
	50,0	0,40	1,99
Tirosina	2,0	2,01	1,98
	20,0	1,18	2,96
Triptofano	0,3	0,96	1,35
	6,6	0,79	1,06

Tabla 33. Estudios de precisión del método para muestras de cacao

Aminoácido	Concentración (µg/mL)	Reproducibilidad en un día	Reproducibilidad entre días
		% CV (n=5)	% CV (n=5)
Ácido Aspártico	0,8	2,78	0,69
	4,0	3,56	4,00
Ácido Glutámico	2,0	3,82	1,78
	10,0	4,02	2,71
Glicina	0,6	2,89	1,56
	3,3	2,87	3,33
Serina	10,0	1,98	1,23
	5,0	2,34	2,12
Treonina	1,5	1,45	2,21
	7,5	1,98	2,78
Lisina	5,0	2,01	1,99
	25,0	2,79	2,67
Alanina	2,0	3,97	2,68
	10,0	2,25	3,32
Valina	2,0	4,01	3,02
	10,0	3,06	2,98
Leucina	6,5	4,21	2,89
	65,0	2,25	1,95
Isoleucina	1,5	2,45	2,05
	7,5	1,78	2,03
Prolina	4,0	2,98	1,90
	20,0	2,89	2,13
Metionina	0,6	2,32	1,98
	10,6	3,67	2,99
Fenilalanina	4,0	3,35	1,89
	80,0	2,95	2,86
Tirosina	2,0	2,98	2,21
	20,0	2,54	2,61
Triptofano	0,3	1,12	2,43
	6,6	2,08	3,09

Tabla 34. Estudios de recuperación de los aminoácidos de las muestras de cacao

Analito	Concentración añadida (µg/mL)	% de Recuperación	CV (%)
Ácido Aspártico	0,8	109,36	2,50
	1,6	109,47	3,21
	4,0	96,91	1,93
Ácido Glutámico	2,0	108,97	2,15
	4,0	103,78	2,24
	10,0	106,14	1,89
Serina	1,0	110,30	2,78
	2,0	99,86	4,10
	5,0	98,95	1,78
Glicina	0,66	98,15	3,40
	1,33	106,41	2,10
	3,33	100,42	1,99
Alanina	2,0	106,37	1,92
	4,0	91,01	2,99
	10,0	105,98	3,20
Tirosina	2,0	110,20	3,11
	10,0	101,73	1,45
	20,0	106,53	2,15
Valina	2,0	101,15	2,33
	4,0	106,06	2,09
	10,0	105,12	3,56
Metionina	0,66	98,29	2,97
	10,65	110,97	3,11
Isoleucina	1,5	92,40	2,89
	3,0	110,27	3,71
	7,5	107,79	3,21
Leucina	6,5	91,40	3,98
	32,5	102,13	2,45
	65	98,83	3,45
Fenilalanina	4,0	107,52	1,56
	20,0	108,65	2,65
	80,0	105,57	1,45
Triptofano	0,33	99,97	1,89
	3,33	102,34	2,24
	6,66	101,10	2,01
Lisina	5,0	101,86	2,34
	10,0	110,45	2,03
	25,0	109,89	2,79

V.5.2.5.2. Linealidad y efecto matriz del método

Para evaluar la linealidad del método, se construyeron curvas de calibrado con soluciones patrones de los aminoácidos y con muestras de cacao enriquecidas con los analitos a los mismos niveles de concentración de acuerdo al método de adición estándar. Los intervalos de concentración se establecieron de acuerdo a lo reportado para cada analito en la bibliografía^[29]. Cada gráfico de calibración incluyó una serie de seis puntos y un blanco medidos un mínimo de cinco veces cada uno. En la Tabla 35 se muestran los resultados correspondientes a las ecuaciones de regresión lineal del área del pico de los analitos en función de la concentración. Se puede observar que los coeficientes de regresión lineal son $> 0,9990$ para todos los casos por lo que existe una buena linealidad en el intervalo de concentración estudiado.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de la matriz en el análisis aplicando el estadístico *t Student* (para un nivel de confianza de 95%) con el fin de comparar las pendientes de las rectas de calibrado de las soluciones patrones de los aminoácidos y aquellas correspondientes a las de adición de estándar. Los resultados mostraron que no existía diferencia significativa entre las curvas de regresión de patrones y de muestras de cacao enriquecida con los aminoácidos estudiados ($P < 0,05$) (ver ejemplo Figura 43). Este comportamiento nos permitió concluir que no existía interferencia de la matriz en el análisis y que se podían evaluar los niveles de concentración de los diferentes aminoácidos en las muestras de cacao utilizando la curva de calibrado de patrones sin la necesidad de aplicar el método de adición de estándar para cada muestra.

Tabla 35. Características analíticas de las rectas de calibrado

Aminoácido	Intervalo dinámico (µg/ mL)	Calibración externa con patrones de los aminoácidos		Adición de estándar en muestras de cacao	
		Ecuación de regresión lineal $A = mC + n$	Coefficiente de correlación (r)	Ecuación de regresión lineal $A = mC + n$	Coefficiente de correlación (r)
Ácido Aspártico	0 - 16	$A = 364437C$	0,9975	$A = 369019C + 3E^{+05}$	0,9926
Ácido Glutámico	0 - 32	$A = 287666C$	0,9991	$A = 289467C + 3E^{+06}$	0,9972
Glicina	0 - 13,3	$A = 631276C$	0,9978	$A = 625085XC + 683592$	0,9965
Serina	0 - 20	$A = 508146C$	0,9980	$A = 512548 C + 3E^{+05}$	0,9892
Treonina	0 - 18	$A = 371447C$	0,9973	$A = 369727C + 1E^{+05}$	0,9960
Lisina	0 - 100	$A = 65508C$	0,9931	$A = 65717 C + 2E^{+05}$	0,9865
Alanina	0 - 40	$A = 751886C$	0,996	$A = 758817C + 9E^{+05}$	0,9940
Valina	0 - 40	$A = 980721C$	0,9981	$A = 983587C + 7E^{+05}$	0,9973
Leucina	0 - 65	$A = 688696C$	0,9981	$A = 684879 C + 9E^{+05}$	0,9951
Isoleucina	0 - 30	$Y = 629637X$	0,9991	$A = 629740 C + 2E^{+05}$	0,9970
Prolina	0 - 80	$A = 418113C$	0,9988	$A = 412842C + 7E^{+05}$	0,9933
Metionina	0 - 13,3	$A = 437526C$	0,9963	$A = 440846 C + 468795$	0,9939
Fenilalanina	0 - 80	$A = 332385C$	0,9899	$A = 332083C + 5E^{+05}$	0,9920
Tirosina	0 - 40	$A = 381649C$	0,9931	$A = 383161 C + 6E^{+05}$	0,9931
Triptofano	0 - 6,6	$A = 599956C$	0,9963	$A = 603464C + 980601$	0,9949

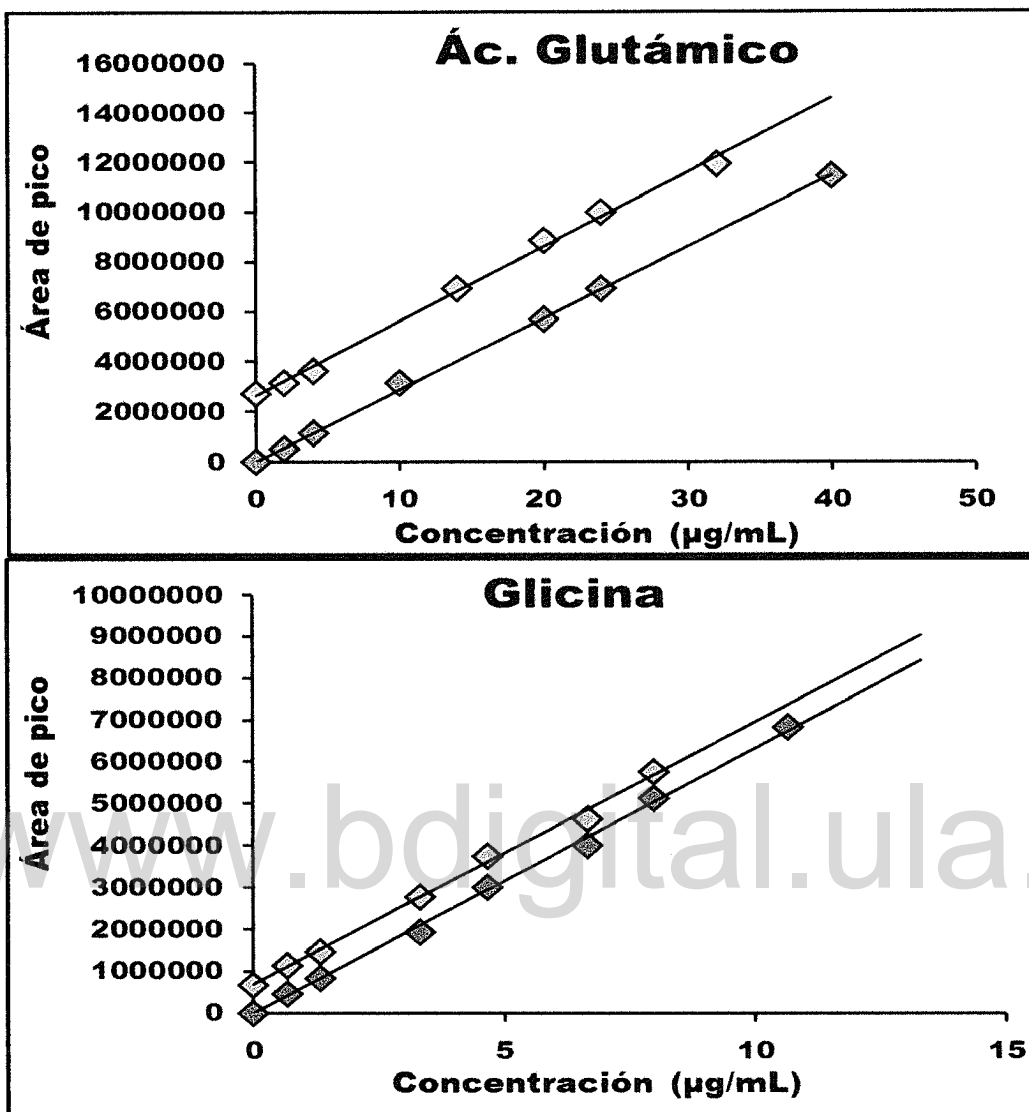


Figura 43. Curvas de calibrado de soluciones patrones y de las muestras de cacao (adición de estándar) para: **(a)** el ácido glutámico y **(b)** la glicina.

V. 5.2.6. Análisis de las muestras de cacao por CG-EM

Utilizando el método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas se evaluó el perfil de aminoácidos en las mismas muestras que se analizaron por el método de cromatografía líquida anteriormente descrito. Los resultados obtenidos por el método propuesto se correlacionaron con los obtenidos por CLAR y se detalla a continuación.

V.5.2.6.1. Análisis de correlación de los resultados

En el ámbito de las investigaciones es muy frecuente la necesidad de establecer si dos o más variables están relacionadas o asociadas, es decir, nos interesa determinar si distintos instrumentos, métodos u operadores obtienen valores similares cuando se mide una variable en las mismas unidades experimentales. La mayoría de las veces esta correspondencia no es un hecho evidente y se hace necesario examinar el comportamiento conjunto de los valores de las variables involucradas para establecer si existe algún tipo de asociación entre ellas.

Una manera rápida de determinar la eventual asociación entre dos variables es a través de una representación gráfica de las dos variables estudiadas. Esto produce una dispersión de los pares de valores en el plano y la tendencia que siga todo el grupo de puntos puede indicar si existe asociación entre las variables y la naturaleza de esta asociación. Es importante mencionar que si cada muestra conduce a un resultado idéntico con ambos estudios, la recta de regresión tendrá una ordenada en el origen, una pendiente y un valor del coeficiente de correlación (r) de 1.

En este sentido, se utilizaron rectas de regresión lineal para comparar los dos métodos analíticos desarrollados. En la Tabla 36 se presentan los valores del coeficiente de correlación (r) de la rectas de regresión obtenidos para todos los aminoácidos estudiados. Se puede apreciar que existe una correlación lineal positiva entre ambos métodos, el valor de $r > 0,9000$ para todos los casos.

En la Figura 44 se muestra, a manera de ejemplo, el estudio de correlación de los resultados para el caso del ácido glutámico en todas las muestras de cacao analizadas por ambos métodos. Se puede observar una consistencia lineal entre los resultados obtenidos tanto por CLAR como CG para el ácido glutámico en las distintas muestras estudiadas.

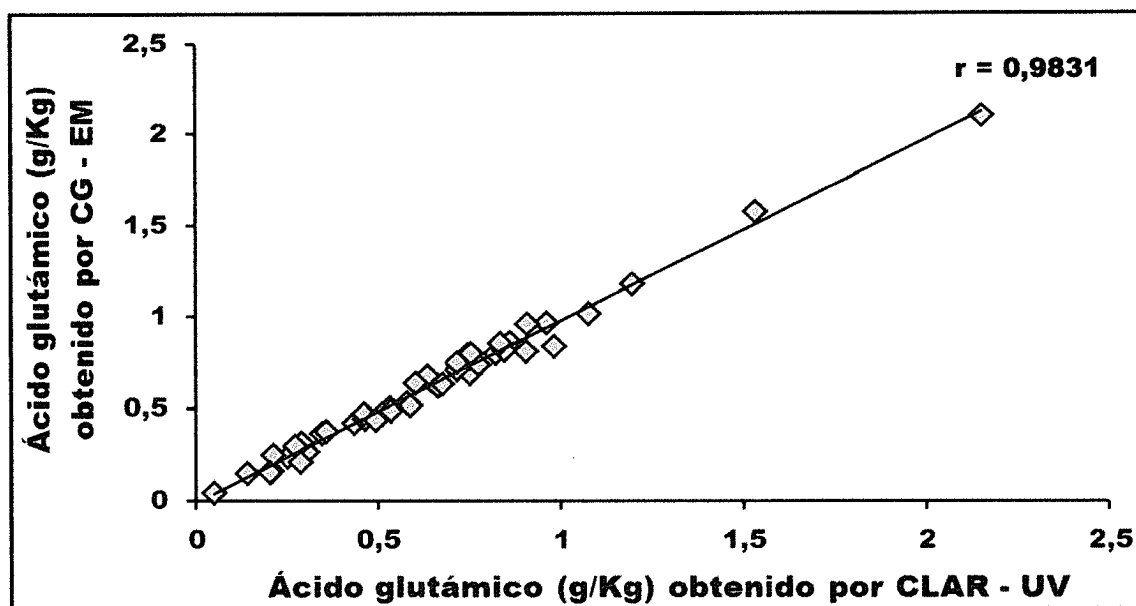


Figura 44. Representación gráfica de la concentración de ácido glutámico en las muestras de cacaos analizadas por las dos metodologías propuestas.

Por otra parte, a fin de verificar si r es realmente significativo, considerando el número de pares de valores usados, es necesario utilizar algún criterio estadístico que permita asegurar que el valor del coeficiente de correlación muestral se desvía significativamente de cero. Para ello se planteó una prueba de hipótesis:

H_0 = No existe correlación entre los dos métodos estudiados: $r = 0$

H_1 = Existe correlación entre los dos métodos estudiados: $r \neq 0$

El estadístico de prueba a utilizar se presenta a continuación:

$$t = \frac{r \sqrt{n - 2}}{\sqrt{1 - r^2}}$$

Los resultados obtenidos para cada aminoácido se muestran en la Tabla 36 donde podemos observar que todos los valores del estadístico de prueba t se encuentran fuera del rango de aceptación de H_0 . Se puede concluir que los datos proporcionan suficiente evidencia para rechazar H_0 con un 95 % de confianza y que los dos métodos desarrollados están linealmente correlacionados.

Otra prueba de significación, que también nos proporciona información importante sobre las metodologías desarrolladas, es la comparación de las desviaciones estándar, es decir, los errores aleatorios de los dos conjuntos de datos. Esta comparación nos permitirá comprobar que los dos métodos son igual de precisos. Para este caso, consideramos como prueba de hipótesis:

H_0 = las varianzas no presentan diferencias significativas entre sí:

$$\sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

H_1 = las varianzas presentan diferencias significativas entre sí:

$$\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Puesto que se trata de la comparación de dos varianzas el estadístico de prueba es la F de Fisher

$$F = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

Los resultados obtenidos para este test se presentan en la Tabla 36 y se comprueba que $F < F_{\text{crítico}}$, entonces, se puede afirmar con un 95% de confianza que ambos métodos son igual de precisos.

Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio comparativo entre las dos series de datos obtenidos para cada método, a fin de establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados aportados por cada uno. Con este test se determinó que no existen diferencias significativas en las concentraciones aportadas por ambos métodos, es decir, la media para las diferentes muestras pareadas era estadísticamente igual a cero. En este sentido, se considera como prueba de hipótesis:

H_0 = la diferencia entre las medias es igual a cero:

$$\mu_1 - \mu_2 = 0 \text{ ó } \mu_1 = \mu_2$$

H_1 = la diferencia entre las medias es distinto de cero:

$$\mu_1 - \mu_2 \neq 0 \text{ ó } \mu_1 \neq \mu_2$$

Por lo tanto se debe utilizar como estadístico de prueba:

$$t = \frac{\bar{X}_2 - \bar{X}_1}{\sqrt{n/s_d}}$$

Los resultados se muestran en la Tabla 36. Los valores experimentales son menores al valor crítico para todos los casos y por lo tanto se puede decir con un 95% de probabilidad que los dos métodos no proporcionan resultados significativamente diferentes.

En conclusión, los resultados obtenidos confirman la exactitud, precisión y veracidad de los valores obtenidos, indicando que ambas metodologías pueden ser utilizados para la determinación de aminoácidos en muestras de cacao.



Tabla 36. Correlación de entre los dos métodos desarrollados para el análisis de aminoácidos en cacaos venezolanos. Análisis estadístico

Aminoácidos	Coeficiente de correlación (r)	Prueba t: correlación (r)		Prueba F: comparación de desviaciones estándar		Prueba t: muestras emparejadas	
		<i>t</i> _{calculado}	<i>t</i> _{crítico}	<i>F</i> _{calculado}	<i>F</i> _{crítico}	<i>t</i> _{calculado}	<i>t</i> _{crítico}
Ácidos	0,9523	22,0661	1,67	1,0793	1,6607	0,8190	2,0166
Aspártico							
Ácido	0,9831	32,3975	1,67	1,0225	1,6607	0,8061	2,0166
Glutámico							
Serina	0,9535	22,3703	1,67	1,1241	1,6607	1,3437	2,0166
Glicina	0,9426	19,9601	1,67	0,9360	1,6607	1,9444	2,0166
Prolina	0,9499	21,4900	1,67	1,2212	1,6607	1,1629	2,0166
Tirosina	0,9463	20,6976	1,67	1,1645	1,6607	0,6841	2,0166
Valina	0,9524	22,0910	1,67	1,3043	1,6607	0,6810	2,0166
Metionina	0,8997	14,5743	1,67	1,5870	1,6607	1,9930	2,0166
Isoleucina	0,9804	35,1871	1,67	1,1153	1,6607	0,7795	2,0166
Leucina	0,9783	33,3872	1,67	1,1161	1,6607	1,6305	2,0166
Fenilalanina	0,9874	44,1214	1,67	1,0214	1,6607	1,4900	2,0166
Triptofano	0,9789	33,8742	1,67	1,0336	1,6607	1,6632	2,0166
Treonina	0,9287	17,7085	1,67	1,2096	1,6607	1,8660	2,0166
Alanina	0,9559	23,0146	1,67	0,8467	1,6607	2,0076	2,0166
Lisina	0,9789	33,8742	1,67	1,0463	1,6607	1,9524	2,0166

V. 5.2.7. Conclusiones

Se desarrolló y validó un método por cromatografía de gases con detección por EM enfocado a la evaluación del perfil de aminoácidos libres en muestras de cacao.

El empleo de radiación por microondas para asistir la reacción de derivatización de los aminoácidos permitió disminuir el tiempo de reacción de 60 minutos a 1 minuto.

La columna seleccionada y el programa de temperatura optimizado permitieron la separación de los derivados de los aminoácidos con una buena selectividad y eficiencia en un tiempo de análisis de 21 min. El tiempo de corrida se redujo casi en 10 minutos a los valores reportados en la literatura que oscilan entre 30 y 40 minutos.

La validación del método se realizó por estudios de precisión y exactitud. La exactitud se estimó a través de estudios de recuperación sobre muestras de cacao. En todos los casos se obtuvieron resultados de los porcentajes de recuperación comprendidos en un intervalo entre 95 – 108% con un $CV < 4,2 \%$.

Los estudios de precisión mostraron una buena estabilidad tanto del sistema cromatográfico como de los derivados formados ya que los CV estuvieron por debajo 4,0 % para todos los casos.

Se pudo determinar que no existe efecto de matriz por lo que se pueden utilizar las curvas de calibrado de los patrones para la evaluación de los aminoácidos presentes en las muestras de cacao.

Utilizando el método propuesto se analizaron los aminoácidos libres en las mismas muestras que se utilizaron en el método por

cromatografía líquida. La aplicación de distintos tests estadísticos sobre los resultados obtenidos por ambos métodos, permitió comprobar que ambos métodos son igual de precisos y los resultados aportados por cada uno no presentan diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$). En este sentido, los dos métodos desarrollados pueden emplearse para la determinación de aminoácidos en muestras de cacao.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO VI:

www.bdigitalula.ve

VI. CONCLUSIONES FINALES

Los resultados más relevantes del trabajo que se presenta en esta memoria se pueden resumir en las siguientes conclusiones, referidas a cada una de las partes principales del trabajo.

☞ Con respecto al procedimiento de extracción de aminoácidos y azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) desde las muestras de cacao, se puede destacar que la extracción con agua (70 °C) durante 15 min asistida por ultrasonido resultó ser eficaz. Las recuperaciones obtenidas para todos los analitos fueron superiores al 90% con una desviación estándar relativa de < 3,5 %. Todo ello demostró que el procedimiento de extracción utilizado fue adecuado para la extracción de aminoácidos y azúcares en muestras tan complejas como es el caso del cacao.

☞ El desarrollo y optimización de las distintas metodologías analíticas presentadas en este trabajo se caracterizaron por su aplicación a la determinación de analitos altamente polares, no volátiles y con ausencia de grupos cromóforos y/o fluorescentes, lo que hizo indispensable el uso de una reacción de derivatización que permitió mejorar no solo su discriminación cromatográfica al momento de la separación sino que también su selectividad y sensibilidad durante la detección tanto para CLAR como para CG.

☞ Las reacciones de derivatización para todos los casos fueron asistidas por radiaciones de microondas (MW) que redujeron significativamente los tiempos de reacción a valores $\leq$ a un minuto con relación a los reportados en la literatura de varios minutos (de 15 a 80 min) utilizando calentamientos convencionales. La técnica de MW, por tanto, se presenta como una alternativa

a las técnicas clásicas, reemplazando así a los métodos convencionales de calentamiento.

☞ Todas las metodologías propuestas permitieron evaluar selectivamente a cada uno de los analitos estudiados. Ello prueba que:

✓ Las columnas seleccionadas, tanto para CLAR como para GC, conjuntamente con los gradientes de elución y los programas de temperatura optimizados, permitieron la separación de los analitos con una buena selectividad y eficiencia en un tiempo de análisis satisfactorio.

✓ La optimización de las condiciones de trabajo de los detectores UV con arreglo de diodos y espectrometría de masas fueron las adecuadas ya que permitieron la detección sensible y selectiva de los derivados correspondientes de una manera inequívoca.

☞ Para la determinación de los aminoácidos por CLAR, la precolumna Oasis HLB demostró una alta eficiencia en el procedimiento de la extracción en fase sólida de los derivados (PTC-AA). Adicionalmente la automatización de la extracción en fase sólida en un sistema de columnas acopladas en su modalidad circuito, minimizó los errores experimentales asociados a un tratamiento manual, obteniéndose una mejor precisión y exactitud en el análisis.

☞ Los distintos parámetros de validación aplicados a las metodologías propuestas indicaron una buena precisión de los métodos y estabilidad de los sistemas cromatográficos empleados. También, mostraron una buena exactitud y ausencia de interferencias de la matriz en los análisis, lo que confirman que los procedimientos de extracción utilizados fueron eficaces.

Utilizando las metodologías propuestas se analizaron 90 muestras de cacaos cultivados en las distintas zonas del territorio nacional y tomadas durante las diferentes etapas del beneficio postcosecha. La interpretación de los resultados obtenidos permitió establecer tendencias del comportamiento de los azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) y aminoácidos libres antes, durante y después de los procesos de fermentación y tostado. En líneas generales se pudo constatar que:

↳ Durante el transcurso de la fermentación de los granos tiene lugar la hidrólisis de la sacarosa, lo que genera un aumento en el contenido de fructosa y glucosa mientras que la sacarosa prácticamente desaparece hacia el final de la fermentación.

↳ El contenido de fructosa fue de tres a cuatros veces superior al de glucosa al final de la fermentación, indicativo de un buen proceso de fermentación.

↳ La acumulación de los azúcares reductores (fructosa y glucosa), principalmente fructosa, durante la fermentación tiene un efecto muy significativo en la formación del aroma del cacao durante el proceso de torrefacción mediante la reacción de Maillard.

↳ Durante el tostado de los granos, etapa fundamental en el desarrollo del aroma y sabor del chocolate, tiene lugar la casi completa desaparición de los azúcares reductores en los grano.

↳ A medida que transcurre el proceso de fermentación de los granos, tiene lugar un aumento en el contenido de aminoácidos libres con un predominio de los aminoácidos hidrofóbicos, principalmente leucina, fenilalanina, valina, alanina e isoleucina.

↪ La formación de los aminoácidos durante la fermentación tiene lugar en cantidades limitadas y poco constantes, pero directamente influenciadas por el pH y la temperatura a la que se desarrolle esta etapa del beneficio postcosecha.

↪ La relación aminoácidos hidrofóbicos/aminoácidos ácidos es un parámetro que puede emplearse también para determinar el grado de fermentación de los granos.

↪ Solo una fracción de aminoácidos es parcialmente degradada durante la etapa de tostado y depende, en parte, de las condiciones bajo las cuales se realice esta etapa y sobre todo del contenido de azúcares reductores presentes en los granos, quienes actúan como reactivos limitantes en la reacción de Maillard para la formación de los compuestos asociados con el aroma y sabor del cacao.

Finalmente, es importante destacar que, en general, los métodos que se presentan resultan adecuados para análisis de rutina orientados a la determinación de azúcares y aminoácidos libres en muestras de cacao. En el proceso de desarrollo de cada uno de ellos se han estudiado los parámetros más relevantes en este tipo de análisis, y se ha pretendido, en el conjunto de ellos, la utilización de cantidades mínimas de disolventes y reactivos tóxicos o nocivos para el medio ambiente.

En este contexto, sin lugar a dudas, lo más resaltante fue establecer un protocolo de trabajo que permite abordar este tipo de problemas. Los resultados, las respuestas y sugerencias que surgen de estos trabajos deben servir de apoyo a los esfuerzos que se hacen para mejorar la posición competitiva de los productores de cacao fino o aromático, que tiene su origen en la calidad del producto que manejan.

En la actualidad, se observa una clara tendencia al desarrollo de métodos analíticos automáticos, que reducen significativamente el tiempo de análisis y la intervención del operador y que cumplan con los conceptos básicos que define la química verde es decir métodos que reducen el consumo de reactivos y disolventes tóxicos minimizando por esta vía los desechos.

En este punto es importante destacar que los métodos de análisis expuestos, fueron desarrollados, todos, con la infraestructura (equipos, accesorios, *softwares*, etc.) que en estos momentos están a disposición en el Laboratorio de Espectroscopía Molecular (LEM).

En los últimos 10 años el LEM ha adquirido un importante *background* en el tema genérico “*cacao*”. Adicionalmente, se ha intentado mantener al día los métodos de análisis que se usan para abordar el tema, haciendo algunas contribuciones relevantes al mismo. De igual forma, se ha seguido con atención las nuevas tendencias que marcan los diseños metodológicos a los que se hizo referencia y está en capacidad, desde el punto de vista conceptual, de abordarlos.

Por ello, para dar continuidad a esta línea de investigación de tanta relevancia para el país, se necesitan protocolos de trabajo que involucren metodologías enmarcadas en esa nueva óptica. Sin embargo para ello es necesario, en parte, de una actualización del instrumental, de los accesorios de los *softwares* y para ello se debe contar evidentemente con un fuerte respaldo económico.

CAPÍTULO VII:

www.bdigitalula.ve

BIBLIOGRÁFICAS

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- [1]. González, J. E. **El cacao en Venezuela**. 1999. Fundacite Aragua. http://www.fundacite-aragua.gob.ve/index.php/fondo_documental/papeles/37. Julio 2009.
- [2]. Clavijo, S. **Determinación de ácidos grasos y triglicéridos en manteca de cacao por cromatografía de gases**. Trabajo Especial de Grado. Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela, 2006. 1 – 102.
- [3]. Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. **Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A Critical review**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2008. 48: 840 – 857.
- [4]. González Muñoz, Y., Pérez Sira, E., Palomino Camargo, C. **Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate**. Actualización en Nutrición. 2012. 13(4): 314-331.
- [5]. Lima, L., Almeida, H., Nout, M., Zwietering, M. **Theobroma cacao L., “The food of the Gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011. 51:731 – 761.
- [6]. Camu, N., De Winter, T., Addo, S., Takrama, J., Bernaert, H., De Vuyst, L. **Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentration of the flavor of chocolate**. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2008. 88: 2288 – 2297.
- [7]. Clapperton, J., Lockwood, R., Romanczyk, L., Hammerstone, J. F. **Contribution of genotype to cocoa (Theobroma cacao L.) flavour**. Tropical Agriculture (Trinidad).1994. 71:303–308.

[8]. Schawn, R., Rose, A. ***Microbial fermentation of cacao beans with emphasis on enzymatic degradation of the pulp***. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 1995. 79: 96 – 107.

[9]. Oliviero, T., Capuano, E., Cämmerer, B. ***Influence of roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model system***. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009. 57: 147 – 152.

[10]. de Brito, E.S., Pezoa García, N.H., Amancio, A.C., Valente, A.L.P., Pini, G. F., Augusto, F. ***Effect of autoclaving cocoa nibs before roasting on the precursors of the Maillard reaction and pyrazines***. International Journal of Food Science and Technology. 2001, 36: 625-630.

[11]. Ramli, N., Hassan, O., Said, M. ***Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa bean***. Journal of Food Processing and Preservation. 2006. 30: 280 – 298.

[12]. Pini, G., de Brico, E., García, N., Valente, A., Augusto, F. ***A Headspace Solid Phase Microextraction (HP-SPME) method for the chromatographic determination of alkylpyrazines in cocoa samples***. Journal of Brazilian Chemical Society 2004 15:2.

[13]. Baudi, S. D. ***Química de los alimentos***. Pearson. Mexico. 1993

[14]. Noor-Soffalina, S., Jinap, S., Nazamid, S. ***Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavor precursors in lipidic model***. International Journal of Food Science and Technology. 2009. 44:168 – 180.

[15]. Contreras, S. ***Efectos isotópicos B en la RMN-13C de carbohidratos***. Mérida, Venezuela. Tesis de Maestría. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 1992.

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- [1]. González, J. E. **El cacao en Venezuela**. 1999. Fundacite Aragua. http://www.fundacite-aragua.gob.ve/index.php/fondo_documental/papeles/37. Julio 2009.
- [2]. Clavijo, S. **Determinación de ácidos grasos y triglicéridos en manteca de cacao por cromatografía de gases**. Trabajo Especial de Grado. Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela, 2006. 1 – 102.
- [3]. Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. **Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A Critical review**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2008. 48: 840 – 857.
- [4]. González Muñoz, Y., Pérez Sira, E., Palomino Camargo, C. **Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate**. Actualización en Nutrición. 2012. 13(4): 314-331.
- [5]. Lima, L., Almeida, H., Nout, M., Zwietering, M. **Theobroma cacao L., “The food of the Gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011. 51:731 – 761.
- [6]. Camu, N., De Winter, T., Addo, S., Takrama, J., Bernaert, H., De Vuyst, L. **Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentration of the flavor of chocolate**. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2008. 88: 2288 – 2297.
- [7]. Clapperton, J., Lockwood, R., Romanczyk, L., Hammerstone, J. F. **Contribution of genotype to cocoa (Theobroma cacao L.) flavour**. Tropical Agriculture (Trinidad).1994. 71:303–308.

- [8]. Schawn, R., Rose, A. **Microbial fermentation of cacao beans with emphasis on enzymatic degradation of the pulp.** Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 1995. 79: 96 – 107.
- [9]. Oliviero, T., Capuano, E., Cämmerer, B. **Influence of roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model system.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009. 57: 147 – 152.
- [10]. de Brito, E.S., Pezoa García, N.H., Amancio, A.C., Valente, A.L.P., Pini, G. F., Augusto, F. **Effect of autoclaving cocoa nibs before roasting on the precursors of the Maillard reaction and pyrazines.** International Journal of Food Science and Technology. 2001, 36: 625-630.
- [11]. Ramli, N., Hassan, O., Said, M. **Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa bean.** Journal of Food Processing and Preservation. 2006. 30: 280 – 298.
- [12]. Pini, G., de Brico, E., García, N., Valente, A., Augusto, F. **A Headspace Solid Phase Microextraction (HP-SPME) method for the chromatographic determination of alkylpyrazines in cocoa samples.** Journal of Brazilian Chemical Society 2004 15:2.
- [13]. Baudi, S. D. **Química de los alimentos.** Pearson. Mexico. 1993
- [14]. Noor-Soffalina, S., Jinap, S., Nazamid, S. **Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavor precursors in lipidic model.** International Journal of Food Science and Technology. 2009. 44:168 – 180.
- [15]. Contreras, S. **Efectos isotópicos B en la RMN-13C de carbohidratos.** Mérida, Venezuela. Tesis de Maestría. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 1992.

- [16]. Kim, J., Lee, Y. ***Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation of melanoidins as result of the Maillard reaction.*** Food Chemistry 2008. 108: 582 – 592.
- [17]. Zambrano, A., Romero, C., Gómez, A., , Ramos, G., Lacruz, C., Brunetto, M.R., Gallignani M., Gutiérrez, L., Delgado, Y. ***Evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao criollo merideño durante la fermentación en dos condiciones edafoclimáticas.*** Agronomía Tropical. 2010. 60(2): 211-219.
- [18]. Portillo, E., Labarca, M., Grazziani, L., Cros, E., Assemat, S., Davrieux, F., Boulanger, R., Marcano, M. ***Formación del aroma del cacao Criollo (Theobroma cacao L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela.*** Revista UDO Agrícola. 2009. 9 (2): 458-468.
- [19]. Clímaco, A., Pérez, E., Lares, M.C. ***Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de CUYAGUA, Estado ARAGUA.*** Agronomía Tropical. 2007. 57(4): 249-256.
- [20]. Portillo, E., Graziani, L., Betancourt, E. ***Efecto de los tratamientos post-cosecha sobre la temperatura y el índice de fermentación en la calidad del cacao criollo Porcelana (Theobroma cacao L.) en el Sur del Lago de Maracaibo.*** Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 2005, 22: 388-399.
- [21]. Portillo, E., Graziani, L., Betancourt, E. ***Análisis químico del cacao criollo Porcelana (Theobroma cacao L.) en el Sur del Lago de Maracaibo.*** Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 2007. 24: 522-546.

- [22]. Jayalekshmy, A., Mathew, A.G. ***Changes in the carbohydrates and proteins of coconut during roasting.*** Food Chemistry. 1990. 37:123-134.
- [23]. Kirchhoff, P.M., Biehl, B., Ziegeler-Berghausen, H., Hammor, M., Lieberei, R. ***Kinetics of the formation of free amino acids in cocoa seeds during fermentation.*** Food Chemistry. 1989. 34: 161-179.
- [24]. Kirchhoff, P.M., Biehl, B., Crone, G. ***Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation.*** Food Chemistry. 1989. 31: 295-311.
- [25]. Ikrawan, Y., Chaiseri, S., Vungdeethum, O. ***Effect of fermentation time on pyrazine concentration of Thai Forastero beans.*** Kasetsart Journal (Nat, Sci.). 1997. 31: 479-487.
- [26]. Rohsius, Ch., Matissek, R., Lieberei, R. ***Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins.*** European Food Research Technology. 2006. 222: 432-438.
- [27]. Redgwell, R.J., Trovato, V., Curti, D. ***Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions.*** Food Chemistry. 2003. 80: 511-516.
- [28]. Pätzold, R., Brückner, H. ***Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occurring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell.*** Amino Acids. 2006. 31: 63-72.



- [29]. Puziah, H., Jinap S., Sharifah, S.M., Asbi A. ***Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation***. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1998. 78:535-542.
- [30]. Cross, E. ***Factores condicionantes de la calidad del cacao***. In Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. 2004. CIRADCP, Maison de la Technologies, Montpellier Cedex 1. 2004
- [31]. Cros, E. ***Factores condicionantes de la calidad del cacao***. Memorias del 1er Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. Noviembre 1997. Maracay, Estado Aragua. Venezuela. Pp 16-32.
- [32]. Braudeau, J. 1970. El Cacao, Traducido por A. Hernández C., Barcelona, España, Editorial Blumé, 185 234 p.
- [33]. Arguello, O., Mejia, L. ***Origen y descripción botánica. Tecnología para el mejoramiento de sistemas de producción de cacao***. Bucaramanga, Colombia. 2000, 10 – 12p.
- [34]. Beckett ST (2000). ***The Science of Chocolate***. edn: Cambrige, UK.
- [35]. Ramos, G., Ramos, P., Azócar, A. ***Manual del Productor de Cacao***. 4ª edición. Producciones Karol C.A. Mérida – Venezuela. 2000, 1 – 8, 54 – 67p
- [36]. Moreira, D. M. 1994. ***La Calidad del Cacao***. Revista INIAP. 1994. No 4: 24 -26.
- [37]. Portillo, E., Martínez, E., Araujo, F., Parra, R., Esparza, D. ***Diagnóstico técnico agronómico para el cultivo cacao (Theobroma cacao L.) en el Sur del Lago de Maracaibo***. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 1995. 12:151 -166.

- [38]. Roelofsen P.A. ***Fermentation, drying and storage of cocoa beans.*** Advances in Food Research. 1958. 8:225- 296.
- [39]. Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L., Álvarez, N., Trujillo, A. ***Fermentación del cacao en dos diseños de cajas de madera.*** Agronomía Tropical. 2003. 53(2): 175-187.
- [40]. Álvarez, C., Tovar, L., García, H., Morillo, F., Sánchez, P., Girón, C., De Fariás, A. ***Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (Theobroma cacao L.) usando dos tipos de fermentadores.*** Revista Científica UDO Agrícola. 2010. 10 (1): 76-87.
- [41]. Puziah, H., Jinap, S., Sharifah, K.S., Asbi, A. ***Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation.*** Journal of the Science of Food and Agriculture. 1998. 78:543-550.
- [42]. Lagunes. G, S., Loiseau, G., Paredes, J., Barel, M. ***Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic.*** International Journal of Food Microbiology. 2007. 114: 124 – 130.
- [43]. Biehl, G., Brunner, E. ***Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans.*** Journal of the Science of Food and Agriculture. 1985. (36) 583 – 598p
- [44]. Rohan T.A. ***Precursors of chocolate aroma: a comparative study of fermented and unfermented cocoa beans.*** Journal of Food Science. 1964. 29: 456-459.
- [45]. Jinap, S., Lioe, H., Yusep, I., Nazamid, S. ***Role of carboxypeptidases to the free amino acids composition, methylpyrazine formation and sensory characterisc of***

underfermented cocoa beans. International Food Research Journal. 2010. 17: 763- 774.

[46]. Hashim P., Selamat J., Muhammad K., Ali A. **Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during fermentation.** Journal of the Science Food and Agriculture. (1998). 78: 535 – 542.

[47]. Ortiz , L., Camacho, G., Graziani, L. **Efecto del secado al sol sobre la calidad del grano fermentado de cacao.** Agronomía Tropical. 2004. 54:31-43.

[48]. Cros, E., Jeanjean, N. Formation de l'arôme cacao. Cacao et chocolat. Production, utilisation, caractéristiques. J. Pontillon. Paris. Ed. Tec & Doc. 1998. 188-206.

[49]. Rohan, T., Stewart, T. **The precursors of chocolate aroma: changes in the sugar during the roasting of cocoa beans.** Journal of Food Science 1966. 31: 206-209.

[50]. Serra, J., Ventura, F. **Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalinized cocoa powder.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. 50: 3743-3750.

[51]. Rohan, T., Stewart, T. **The precursors of chocolate aroma: changes in the free amino acids during the roasting of cocoa bean.** Journal of Food Science. 1966. 31: 202-205.

[52]. Rohan, T., Stewart, T. **The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans.** Journal of Food Science 1967. 32:399-402.

[53]. **Cocoa.** Encyclopedia of food science. 1994. 1073-1083.

Wendy Josefina Orozco Contreras

- [54]. Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T. **Food microbiology. Fundamentals and frontiers**. 2º Ed. ASM Press. Washington, D.C. 2001.
- [55]. Reineccius, G., Andersen, D., Kavanagh, T. **Identification and quantification of the free sugar in cocoa beans**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1972. 20(2): 199 – 202.
- [56]. Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L., Lemus, M., Parra, P. **Efecto del mezclado de granos de dos tipos de cacao sobre algunas características químicas durante la fermentación**. Agronomía Tropical 2002. 52(3): 325 – 342.
- [57]. Portillo, E. **Influencia de la fermentación en la calidad del cacao porcelana (*Theobroma cacao* L) en el Sur del Lago de Maracaibo**. Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay, Caracas – Venezuela. 2000. 147p
- [58]. Torres, O. **Efecto del tiempo transcurrido entre la cosecha y el desgrane sobre algunas características físicas y químicas del cacao (*Theobroma cacao* L.) durante la fermentación**. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela. 130p
- [59]. Nogales, J., Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L. **Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera**. Agronomía Tropical 2006. 56(1): 5 – 20.
- [60] Zambrano, A., Romero, C., Gómez, A., Ramos, G., Dugarte, S., Rivas, E., Lacruz, C., Brunetto, M.R., Galignani, M., Gutiérrez, L., Delgado, Y. **Determinación de azúcares en cacos durante la fermentación y**

torrefacción. Memorias del IV Congreso Venezolano de Química. Mérida - Venezuela. 6-10 Noviembre, 2005.

[61]. Rivas, O. **Desarrollo de un método para la determinación de aminoácidos en muestras de cacao.** Trabajo Especial de Grado. Universidad de Los Andes. Mérida – Venezuela. 2006. 1 – 84.

[62]. Brito, E., Pezoa, E., Gallão, M., Cortelazzo, A. **Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting.** Journal of Science and Food Agriculture. 2000. 81: 281-288.

[63]. Puziah, H., Jinap, S., Sharifah, K.S., Asbi, A. **Effect of drying time, bean depth and temperature on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration of Malaysian cocoa beans.** Journal of Science and Food Agriculture. 1999. 79: 987-994.

[64]. Mills, F., Baker, G., Hodge, J. **Amadori compounds as nonvolatile flavor precursors in processed foods.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1969. 17(4): 723-727.

[65]. Gill M.; A. J. Mac Leod and M. Moreau. **Aroma components of cocoa beans proceedings of the 4th Weurman flavor reseach symposium. Dourdan (France).** In: Developpment in Food Science (1985), Ed. J. Adda. Elsevier,Amsterdam.10:261-266.

[66]. McMurry, J. **Química Orgánica.** Grupo Editorial Iberoamericana. Mexico. 1993.

[67]. Fessenden, R. J., Fessenden, J. S. **Química Orgánica.** Grupo Editorial Iberoamericana. Mexico. 1983

[68]. Blanco, A. **Química Biológica.** Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 2002.

Wendy Josefina Orozco Contreras

- [69]. Lehninger, A. L. **Principios de Bioquímica**. 2º Ed. Omega, Barcelona. 2009. 1013p
- [70]. Belitz, H. D., Grosch, W. **Química de los Alimentos**. ACRIBIA, S.A. España. 1988.
- [71]. Nielsen, S. **Food Analysis**. Aspen Publishers, Inc. Estados Unidos de América. 1998.
- [72]. Mendel, B., Kemp, A. **A colorimetric Micro-method for the Determination of Glucose**. Biochemical Journal. 1954. 56(4): 639 – 646p.
- [73]. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, P. A. **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances**. Analytical Chemistry 1956. 28: 350 – 356p
- [74]. Mangas, J., Moreno, J., Rodriguez, R. **Analysis of Polysaccharides in cider: Their effect on sensory Foaming Properties**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999. 47: 152 – 156p.
- [75]. Thavaningkul, P., Suppapitnarm, P. **Batch Injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection**. Biosensors & Bioelectronic. 1999. 14: 19 – 25p.
- [76]. Filipiak, M., Fludra, K., Gasciminiska, E. **Enzymatic method for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode**. Biosensors & Bioelectronic. 1996. 11: 355 – 364p.
- [77]. Randhir P, D., Wang, J. **Electrochemical detection of carbohydrates at carbon-nanotube modified glassy-carbon electrodes**. Electrochemistry Communication. 2004. 6: 284 – 287p

- [78]. Buratti. S., Brunetti. B., Mannino. S. ***Amperometric detection of carbohydrates and thiols by using a glassy carbon electrode with Co oxide/multi-wall carbon nanotubes catalytic system***. Talanta. 2008. 76: 454–457p.
- [79]. Deo. R., Wang. J. ***Electrochemical detection of carbohydrates at carbon-nanotubes modified glassy carbon electrodes***. Electrochemical Communication. 2004. 6: 284–287p
- [80]. Jamin, E., Gonzalez, J., Reamund.,G. ***Improved detection of sugar addition to Apple juice and concentrates using internal standard ¹³CIRMS***. Analytical Chimica Acta. 1997. 347: 359 – 368p.
- [81]. Cooper, H., Marshall, E., ***Electrospray ionization fourier transform mass spectrometric analysis of wine***. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. 49: 5710 – 5718.
- [82]. LeThanh. H., Lendl. B. ***Sequential injection Fourier transform infrared spectroscopy for the simultaneous determination of organic acids and sugars in soft drink employing automated solid phase extration***. Analytica Chimica Acta. 2000. 422: 63 – 69p
- [83]. Sartini, R., Oliveira, C. C. ***Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry***. Analitical Chimica Acta. 1998. 366: 119 – 125p.
- [84]. Kronka, E., Paim, A., Boaventura, F., Costa, J., Lapa, R. ***Determination of glucose in soft drink and sugar-cane juice employing a multicommutation approach in flow system and enzymatic reaction***. Fresenius Journal of Analytical Chemistry. 1999. 364: 358 – 361p.

- [85]. Chen. Z., Hibbert. D. ***Simultaneous amperometric and potentiometric detection of sugars, polyols and carboxylic acids in flow systems using copper wire electrodes.*** Journal of Chromatography A. 1997. 766: 27-33p.
- [86]. Honda, S. ***Postcolumn derivatization for chromatographic analysis of carbohydrates.*** J. Chromatogr. A 1996, 720, 183-199.
- [87]. Xibao Gao, Jinghe Yang , Fang Huang , Xia Wu, Lei Li , Changxia Sun. ***Progresses of Derivatization Techniques for Analyses of Carbohydrates.*** Analytical Letters
- [88]. Honda, S.; Susuki, S.; Nose, A.; Yamamoto, K.; Kakehi, K. ***Capillary zone electrophoresis of reducing mono and oligosaccharides as borate complexes of their 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin 5-one derivatives.*** Carbohydr. Res. 1991, 215, 193-198.
- [89]. Guttman, A. ***Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis.*** J. Chromatogr. A 1997, 763: 271-277.
- [90]. Koimur, M.; Lu, B.; Westerlund, D. ***High performance liquid chromatography of disaccharides on a porous graphitic carbon column applying post-column derivatization with benzamidine.*** Chromatographia 1996, 43, 254-260.
- [91]. Zhang, R. E.; Cao, Y. L.; Hearn, M. W. ***Synthesis and application of Fmoc-hydrazine for the quantitative determination of saccharides by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the low and subpicomole range.*** Anal. Biochem. 1991, 195, 160-167.
- [92]. Joung Ho Ko, Huazi Huang, Gyoung Won Kang, and Won Jo Cheong. ***Simultaneous quantitative determination of monosaccharides including fructose in hydrolysates of yogurt and orange juice***

products by derivatization of monosaccharides with p-aminobenzoic acid ethyl ester followed by HPLC. Bull. Korean Chem. Soc. 2005, 26(10): 1533-1538.

[93]. Lourdes Casas Cardoso, Vladimir Cabrera Díaz, Raúl Fajardo García. **Determinación de azúcares reductores en miel final por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.** Centro Azúcar. 2001, 2:17-22

[94]. Tommaso, R., Campa, C., **Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still Growing.** Fresenius. J. Anal. Chem (2000) 368: 739 – 758p

[95]. Technical Note 20. **Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC - PAD).** Dionex.

[96]. Cataldi, T., Campa, C., **Isocratic Separations of Closely-related mono- and disaccharides by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection using dilute alkaline spike with barium acetate.** Journal of Chromatography. A. 1999. 855:539- 550p

[97]. Johnson, D., LaCourse, W., **Liquid Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection at Gold and Platinum Electrode.** Analytical Chemistry. 1990. 62(10):589A – 596A

[98]. Montero, M., Rodríguez, M., Sánchez, G. **Analysis of Low Molecular Weight Carbohydrates in Food and Beverages: A Review.** Chromatographia. 2004. 59: 15 – 30p.

266

Wendy Josefina Orozco Contreras

- [99]. Ruiz-Matute. A., Hernández-Hernández. O., Rodríguez-Sánchez. S., Sanz. M., Martínez-Castro. I. **Derivatization of carbohydrates for GC and CG-MS analyses**. Journal of Chromatography B. 2011. 879: 1226 – 1240p.
- [100]. Ettre, L. S. **Nomenclature for Chromatography**. Pure and Applied Chemistry. 1993. 65(4): 819 – 872p
- [101]. Quattrocchi. O., Abelaira de Andrizzi. S., Laba. R. **Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica**. Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires, Argentina 1992. 3 - 8p.
- [102]. Valcárcel, M., Gómez, A. **Técnicas Analíticas de Separación**. Editorial Reverté S.A. Barcelona – España 1988.
- [103]. Harvey, D. **Química Analítica Moderna**. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A. Madrid – España. 2002.
- [104]. Clement, R. **Gas Chromatography Biochemical, Biomedical and Clinical. Application**. Vol. 111 of Chemical Analysis Series. Editorial Wiley – Interscience. Ontario – Canada. 1990.
- [105]. Smith, R. M., **Understanding mass spectra**. A basic approach. 2º Ed. Wiley – Interscience. 2005
- [106]. Peltier, J. M., **A mass spectrometric examination of some carbohydrates**. Thesis for the Degree Doctor fo Phylosophy. MacMaster University 1992.
- [107]. Walford, S. N., **GC – MS as a tool for carbohydrate analysis in a research environment**. Proc. Int. Soc. Cane Technol. 2010. 27: 1 – 16.
- [108]. Ahuja, S., **Derivatización in Gas Chromatography**. Journal of Pharmaceutical Sciences 1976. 65(2) : 164 – 184

Wendy Josefina Orozco Contreras

[109]. Blau, K. **Handbook of Derivatives for Chromatography**. 2^o edition. Editorial Wiley. 1993

[110]. Orata, F., **Capítulo 5: Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. Advanced gas Chromatography**. Masinde Muliro University of Science and Technology, Kenya 2012.

[111]. **Developments in Microwave Chemistry**. Evaluesserve R.S.C, 2005.

Disponible en: http://www.rsc.org/images/evaluateserve_tcm1816758.pdf

[112]. Aradilla. D., Oliver, R., Estrany F., **La química de las microondas**. Técnica Industrial 2009. 284: 55-58.

[113]. Crecente C. J., **Síntesis orgánica asistida por microondas**. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad de Compostela. Galicia, España, 2012

[114]. Kappe. C., **Controlled Microwave heating in Modern Organic Synthesis**. Angewandte Chemie International Edition 43(46)(2004) 6250-6284

[115]. Tierney, J., Lidström, P. **Microwave assisted organic chemistry**. 1^o Edicion. Editorial Blackwell. Oxford-Reino Unido, 2005.

[116]. Luque-Garcia, J., Luque de Castro, M. **Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going?**. Trends in Analytical Chemistry 2003. 22(2): 90-98.

[117]. Corsaro, A., Chiacchio, U., Pistarà, V., Romeo, G. **Microwave-assisted chemistry of carbohydrates**. Current Organic Chemistry 2004. 8: 511 - 538p.

[118]. Momenbeik, F., Khorasani, J. H. **Separation and determination of sugar by reversed-phase high-performace liquid chromatography**

Wendy Josefina Orozco Contreras

after pre-column microwave-assited derivatization. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2006. 384: 844 – 850p.

[119]. Lewczuk, P., Beck, G., Esselmann, H., Bruckmoser, R., Zimmermann, R., Fiszer, M., Maler, J. M., Kornhuber, J., Wiltfang, J. **Microwave-assited derivatization of glucose and galactose for gas chromatographic determination in human plasma.** Clinical Chemistry 2006. 52(2): 334 – 335p.

[120]. Cowie. G., Hedges. J. **Determination of neutral sugars in Plankton, sediments, and Wood by capillary gas chromatography of equilibrated isomeric mixtures.** Analytical Chemistry. 1984. 56(3): 497–503p.

[121]. Ratsimba. V., Garcia. J., Defaye. J., Nigay. H., Voilley. A. **Qualitative and quantitative evaluation of mono- and disaccharides in D-fructose, D-glucoses and sucrose caramels by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Di-D-fructose dianhydrides as tracers of caramel authenticity.** Journal of Chromatography A. 1999. 844: 283–293p.

[122]. Katona. Zs., Sass. P., Molnár-Perl. I. **Simultaneous determination of sugar, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of chromatography A. 1999. 847: 91–102p.

[123]. Medeiros. P., Simoneit. B. **Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A. 2007. 1141: 271–278p.

[124]. Rojas-Escudero. E., Alarcon-Jiménez. A., Elizalde-Galván. P., Rojo-Callejas. F. **Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography.** Journal of Chromatography A. 2004. 1027: 117–120p.

Wendy Josefina Orozco Contreras

[125]. ai. Zs., Boldizsár. I., Molnár-Perl. I. **Characteristic fragmentation patterns of trimethylsilyl and trimethylsilyl-oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry.** Journal of Chromatography A. 2008. 1177: 183-189p.

[126]. Bassi, D., Bartolozzu, F., Muzzi, E. **Patterns and heritability of carboxylic acids and soluble sugars in fruits of apricot (*Prunus armeniaca* L.).** Plant Breeding 1996. 115(1): 67-70p

[127]. Bartolozzi, F., Bertazza, G., Bassi, D., Cristoferi, G. **Simultaneous determination of soluble and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gas - liquid chromatography.** Journal of Chromatography A 1997. 758(1): 99 - 107p

[128]. Low, N. H. **Determination of Fruit Juice Authenticity by Capillary Gas Chromatography with Flame Ionization Detection.** Journal of AOAC International. 1996. 79(3): 724 - 737p.

[129]. Tisza, S., Molnár-Perl, I., Friedman, M., Sass, P. **Simultaneous capillary GC of acids and sugars as their silyl(oxime) derivatives: Quantitation of chlorogenic acid, raffinose, and pectin substances.** Journal of High Resolution Chromatography 1996. 19(1): 54-58p

[130]. Molnár-Perl, I., Horváth, K. **Simultaneous quantitation of mono-, di- and trisaccharides as their TMS ether oxime derivatives by GC-MS: I. In model solutions.** Chromatographia 1997 45(1): 321 - 327p.

[131]. Molnár-Perl, I., Horváth, K. **Simultaneous quantitation of mono-, di- and trisaccharides as their TMS ether oxime derivatives by GC-MS: II. In honey.** Chromatographia 1997 45(1): 328 - 335p.

- [132]. Sanz. M., Castro-Martínez, I., **REVIEW. Recent developments in simple preparation for chromatographic analysis of carbohydrates.** Journal of Chromatography A. 2007. 1153: 74-89p.
- [133]. Steinbach, A., Wille, A. **Ion Chromatographic Analysis of Carbohydrates in Essential and Non-Essential Foodstuffs.** Food Marketing & Technology. 2010. 32 - 35p
- [134]. M. D. Luque de Castro, L. E. García-Ayuso. **Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future.** Anal. Chim. Acta 369 (1998) 1-10.
- [135]. J. L. Luque-García, M. D. Luque de Castro. **Ultrasound: a powerful tool for leaching.** Trends Anal. Chem. 22 (2003) 41-47.
- [136]. F. Priego-Capote, M. D. Luque de Castro. **Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation.** Trends Anal. Chem. 23 (2004) 644-653.
- [137]. H. M. Santos, J. L. Capelo. **Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment.** Review. Talanta 73 (2007) 795-802.
- [138]. N. Fidalgo-Used, E. Blanco-González, A. Sanz-Medel. **Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples.** Review. Anal. Chim. Acta 590 (2007) 1-16.
- [139]. Schummer, C., Delhomme, O., Appenzeller, B. M. R., **Comparasion of MTBSTFA and BSFTA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis.** Talanta 2009. 77: 1473 - 1482
- [140]. Mogosanu, G. D., Gtumezescu, A. M., Mihaiescu, D. E., Istrati, D., Mogosanu, D. E., Buteica, A., **Identification of sugars from silene albae herba using GC-MS technique.** U.P.B Sci. Bull. 2011. 73(2): 101 - 107.

[141]. Somoneit, B. R. T., Elias, V. O., Kobayashi, M., Kawamura, K., Rushdi, A. I., Medeiros, P. M., Rogge, W. F., Didyk, B. M., ***Sugars dominant water/soluble organic compounds in soils and characterization as tracers in atmospheric particulate matter.*** Environmental Science and Technology 2004. 38: 5939

[142]. Kochetkov, N.K., Chizhov, O.S., ***Mass spectrometry of carbohydrate derivatives.*** Advances in Carbohydrate Chemistry. Ed Wolfrom, ML. Academic Press, New York. 1966. 39-93.

[143]. Miller, J.C., Miller, J. N., ***Estadística para Química Analítica.*** 2^{da} edición. Addison Wesley Iberoamericana SA., Washington, USA, (1993).

[144]. International Conference of Harmonization Q2A: ***Text on Validation of Analytical Procedures.*** US FDA Federal Register, vol. 60, March 1995, pp. 11260-11266

[145]. International Conference of Harmonization Q2B: ***Validation of Analytical Procedures—Methodology.*** US FDA Federal Register, vol. 62, May 1997. pp. 27463-27467.

[146]. Lancas, F., ***Validación de métodos cromatográficos de análisis.*** Editorial RiMA. Sao Carlos, Brazil. 2004

[147]. Berbert, P. R. F., Contribuicao para o conhecimento dos acucars components da amendoa e do mel de cacao. Review of Theobroma (Brazil). 1979. 9:55 - 61

[148]. Schnermann, P., Schieberie, P. ***Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution análisis.*** Journal of Agriculture and Food Chemistry. 1997. 45: 767 - 872.

[149]. Counet C. ; D. Callemien, C. Ouwerx and S. Collin. ***Use of gaschromatography-olfactometry to identify key odorant compounds***

Wendy Josefina Orozco Contreras

in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. Journal of Agricultura and Food Chemistry 2002. 50(8): 2385 - 2391

[150]. Sukha, D.A., Butler, D. R., **Pyrazine and volatile compounds and their linkages to organoleptic attributes.** The Cocoa Research Unit (CRU), University of the West Indies, Trinidad and Tobago), 2006.

[151]. Lerceteau, E., Rogers, J., Pétiard, V., Crouzillat, D., **Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis.** Journal of the Science of Food and Agriculture 1999. 79: 619 - 625

[152]. Wade, L.G. **Química Orgánica.** Prentice - Hall Hispanoamericana. Mexico. 1993.

[153]. Carey, F. **Química Orgánica.** McGrawHill Iberoamericana. Mexico. 2006

[154]. Kosir, I. J., Kidric, J., **Identification of amino acids in wines by one- and two- dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001. 49(1) 50 - 56.

[155]. Milio, F., Loffredo, W., **Qualitative Testing for Amino Acids and Proteins.** Modular laboratory program in chemistry reac 448. (<http://labops1ton.wikispaces.com/file/view/Qualitative+Testing+for+Amino+Acids+%26+Proteins.pdf>)

[156]. Domínguez, R., Serra, B., Reviejo, A.J., Pingarrón, J. M., **Chiral Analysis of Amino Acids Using Electrochemical Composite Bienzyme Biosensors.** Analytical Biochemistry 2001. 298(2): 275 - 282

[157]. Kosir, I. J., Kidric, J., **Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds.** Analytica Chimica Acta 2002. 458(1): 77 - 84.

Wendy Josefina Orozco Contreras

- [158]. Tummuru, M. K., Ekambareswara, R., Sastry, C. S. P., ***Spectrophotometric Determination of Amino Acids Using Metol and Sodium Hypochlorite or Chloramine-T***. Mikrochimica Acta[Wien] 1984. III: 199 – 208
- [159]. Dukes, B. C., Butzke, C. E., ***Rapid determination of primary amino acid in grape juice using an o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay***. American Jouranl of Enology and Viticulture 1998. 49(2): 125-134
- [160]. Molnár-Perl, I., ***Role of chromatography in the analysis of sugar, carboxylic acids and amino acids in food***. Journal of Chromatography A 2000. 891: 1-32.
- [161]. Dean, R. ***A Practical Guide to the Care, Maintenance and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatographic Systems***. 2^o edición. Heildelberg : Hüting. 1995.
- [162]. Zumwalt, R., Roach, D., Gehke, C., ***Gas-liquid chromatography of amino acids in biological substances***. Journal of Chromatography A 1970. 53(2): 171 – 194p.
- [163]. Hussek, P. ***Choloformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents***. Journal of Chromatography B. 1998. 717 :57–91p.
- [164]. Zampolli, M., Basaglia, G., Dondi, F. ***Gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as methyl chloroformate derivatives: Aplication tos pace analysis***. Journal of Chromatograohy A. 2007. 1150: 162 – 172p.

- [165]. Hušek, P., Šimek, P., Hartvich, P. **Fluoroalkyl chloroformates in treating amino acids for gas chromatographic analysis.** Journal Chromatography A. 2008. 1186: 391-400p
- [166]. Deng. C., Yin. X., Zhang. L., Zhang. X. **Development of microwave-assisted derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry for fast determination of amino acid in neonatal samples.** Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2005. 19:2227-2334p
- [167]. Shen. X., Deng. C., Wang. B., Dong. L. **Quantification of trimethylsilyl derivatives of amino acid disease biomarkers in neonatal blood samples by gas chromatography-mass spectrometry.** Analytical Bioanalytical Chemistry. 2006. 384:931-938p
- [168]. Gehrke. C., Nakamoto. H., Zumwalt. R. **Gas-liquid chromatography of protein amino acid trimethylsilyl derivatives.** Journal of Chromatography. 1969. 45: 24-51p
- [169]. Peace. R., Gilani. S. **Chromatographic determination of amino acids in foods.** J. AOAC International. 2005. 88(3): 877-887p.
- [170]. Callejo, R. **Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales.** Tesis de Doctorado. Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina legal. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. Sevilla – España, 2008.
- [171]. Fabiani, A., Versari, A., Parpinello, G., Castellari, M., Galassi, S., **High-performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethyl-chloroformate.** Journal of Chromatographic Science 2002. 40(1): 14-18.

[172]. Martens. D., Frankenberger. W. ***Pulsed amperometric detection of amino acids separated by anion exchange chromatography.*** Journal of Liquid Chromatography. 1992. 15(3): 423–439p.

[173]. Clarke. A., Jandik. P., Rocklin. R., Liu. Y., Avdalovic. N. ***An integrated amperometric waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following Anion-Exchange Chromatography.*** Analytical Chemistry. 1999. 71: 2774–2781p.

[174]. Pripis-Nicolau, L., Revel, G., Bertrand, A., Maujean, A., ***Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions.*** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000. 48(9): 3761-3766.

[175]. Cohen, S., Meys, M., Tarvin, T., ***The pico-tag method. A manual of advanced techniques for amino acids analysis.*** Water, Division of Millepore, USA. 1989

[176]. Nollet, L. ***Food analysis by HPLC.*** 2º ed. Marcel Dekker, Inc. New York, Estados Unidos. 2000

[177]. Carpena-Ruiz, R., Sopena, A., Ramon, A. M., ***Extraction of free amino acids from tomato leaves.*** Plant and Soil 1989. 119:251 – 254

[178]. Bertazzo, A., Comai, S., Brunato, I., Zancato, M., Costa, V. L., The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in Theobroma cacao beans. Food Chemistry 2011. 124(1):93-96

[179]. Berrueta, L., Gallo, B., Vicente, F. ***A review of solid phase extraction: basic principles and new developments.*** Chromatographia. 1995. 40 (7/8): 474–483p.

[180]. Spanik, I., Horvathova, G., Janacova, A. ***On the use of solid phase ion exchanger for isolation of amino acids from liquid samples and***

Wendy Josefina Orozco Contreras

their enantioselective gas chromatographic analysis. Journal of Chromatography A. 2007. 1150:145 – 154.

[181]. Huber, J., Van Der Linden, R., Ecker, E., Oreans, M. ***Column switching in high-pressure liquid chromatography.*** Journal of Chromatography. 1973. 83: 267-277p.

[182]. Jandik, P., Cheng, J., Jensen, D. ***Simplified in-line sample preparation of amino acid analysis in carbohydrate containing samples.*** Journal of Chromatography B. 2001. 758: 189–196p.

[183]. Bidlingmeyer, B.A; Cohem, S.A; Tarvin, T.L. ***Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization.*** Journal of Chromatography 336(1984): 93-104

[184]. **PHENYL ISOTHIOCYANATE.** (fecha de consulta: Junio 2009)

http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5733806.htm; <http://www.chemicalbook.com/RiskAndSafety.htm#Risk>

[185]. Oasis Applications Notebook. Waters Corporation, 2003.

[186]. Productos Oasis para extracción de muestra. Waters Corporation, 2008.

[187]. Aragao. N,M; Veloso, C.C. ***Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography.*** Talanta 67 (2005): 1007 – 1013.

[188]. Cohen, S. A; Strydom. D. J. ***Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives.*** Analytical Biochemistry 174(1988) 1 – 16.

[189]. Cáceres. I; Barahona. F; ***El análisis íntegro de los vinos. Cromatografía de líquidos de alta eficacia.*** Alimentaciónn, Equipos y Tecnología. Mayo (1986): 141 – 152.

[190]. Voigt, J., Voigt, G., Heinrichs, H., Wrann, D., Biehl, B., ***In vitro studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: The significance of endoprotease specificity.*** Food Chemistry 51(1994) 7 – 14

[191]. Voigt, J., Heinrichs, H., Biehl, B., ***In vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and carboxypeptidase.*** Food Chemistry 49(1994) 173 – 180

[192]. Bytof, G., Biehl, B., Heinrichs, H., Voigt, J., ***Specificity and stability of the carboxypeptidase activity in ripe, ungerminated seeds of Theobroma cacao L.*** Food Chemistry 54(1994) 15 – 21

[193]. Alvarado. S, F., ***Purificación y caracterización bioquímica de la carboxipeptidasa (tcCP) dela semilla de cacao (Theobroma cacao L).*** Tesis de Maestria. Colegio de Postgrado. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Tabasco – Mexico 2011

[194]. Ortis, L., Graziani, L., Gervaise, R., ***Evaluación de varios factores sobre características químicas del grano de cacao fermentado y secado al sol.*** Agronomía Tropical, 2009. 59(2): 119 – 127

[195]. Seiki. K., ***Chemical changes during cocoa fermentation using the tray method in Nigeria.*** Rev. Int. Choc., 28(1973) 38 – 42.

[196]. Simplice. G, T., Bi Zahouli, I., Ban-Koffi, L-. Adrien. F, M., Gnopo. N, J., ***Performance of different drying methods and their effects on***

the chemical quality attributes of raw cocoa material. International Journal of Food Science and Technology. 45 (2010) 1564 – 1571.

[197]. Pizan, J. Ardilla, J. ***Guía Técnica para el cultivo de cacao. 2ª edición. FEDECACAO.*** Gobernación del Valle de Cauca. 2007

[198]. Saltini, R., Akkerman, R., Frosch, S., ***Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality.*** Food Control 29 (2013) 167 – 187.

[199]. Kratzer, U., Frank, R., Kalbacher, H., Biehl, B., Wostemeyer, J., Voight, J., ***Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of coco and chocolate-specific aroma precursors.*** Food Chemistry 113(2009)903-913.

[200]. Camu, N., González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., Takrama, J., Addo, S., De Vuyst, L., ***Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana.*** Applied and Environmental Microbiology. 74(1)(2008) 86 – 98.

[201]. Leal, G., Gomez, L., Efraim, P., de Almeida, T., Figueira, A., ***Fermentation of cacao (Theobroma cacao L) seeds with a hybrid Kluyveromyces marxianus strain improved product quality attributes.*** FEMS Yeast Research 8(2008) 788 – 798

[202]. Jinap, S., Wan, R. W. I., Russly, R., Nordin, L., ***Effect of roasting time and temperature on volatile component profile during nib roasting of cocoa beans (Theobroma cacao).*** Journal of the Science of Food and Agriculture 77(1998) 441 – 448.

[203]. Rodriguez. C, J., ***Estudio de los compuestos volátiles de Theobroma cacao L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado. Tesis de doctorado.*** Sección de Estudios de Postgrados e Investigación. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. D.F – México 2011.

[204]. Rohan, T., Stewart, T., ***The precursors of chocolate aroma: Changes in the free amino acids during the roasting of cocoa beans.*** Journal of Food Science 31(1966) 202 – 205.

[205]. Brunetto, M., Delgado, Y., Gutierrez, L., Clavijo, S., Contreras, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, A., Ramos, G., ***Headspace gas chromatography-mass spectrometry determination of alkylpyrazines in cocoa liquor samples.*** Food Chemistry 112(2009) 253 – 257

[206]. Moulay, L., Manzanares, P., Valles, S., Ramón, D., Gil, J., ***Effect of enzyme treatments and drying temperatures on methylpyrazine content in cocoa (Theobroma cacao L) powder extract.*** Journal of Food Science 71(9)(2006)622 – 626

[207]. Lerceleau, E., Roger, J., Péttard, V., Crouzillat, D., ***Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two dimensional electrophoresis.*** Journal of the Science of Food and Agriculture. 79(1999) 619 – 625.

[208]. Ferreira, A. A., Ferraz, V., Oliveira, P. M., Godinho, A., Silveira, D., Rasian, S. ***Microwave-assisted derivatization and GC-MS analyses of amino acids from Ipomoea cairica aqueous extract.*** Chemistry of Natural Compounds. 2008. 44(5): 679 – 681.

[209]. Shen, X., Deng, C., Wang, B., Dong, L. ***Quantification of trimethylsilyl derivatives of amino acid disease biomarkers in***

neonatal blood samples by gas chromatography-mass spectrometry.

Analytical Bioanalytical Chemistry. 2006. 384: 931 – 938.

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

www.bdigital.ula.ve

IV. CARBOHIDRATOS

Tabla 12. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacaos forasteros IMC-67 IIF. IC 2003

Azúcar	Días de fermentación											
	Día 0	%	F/G	Día 2	%	F/G	Día 4	%	F/G	Día 7	%	F/G
Fructosa	0,21	1,55	2,1	0,88	7	2,6	2,51	26,49	3,2	3,87	66,93	3,8
Glucosa	0,09	0,73		0,34	2,69		0,78	8,24		1,01	17,40	
Sacarosa	13,28	97,71		11,43	90,30		6,19	65,25		0,90	15,66	
Azúcares Reductores	0,20	1,52		1,22	9,69		6,19	65,25		4,88	84,33	
Azúcares Totales	13,59	100		12,66	100		9,49	100		5,79	100	

Tabla 13. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacaos forasteros IMC-67 IF. IC 2003.

Azúcar	Días de fermentación														
	Día 0	%	F/G	Día 2	%	F/G	Día 4	%	F/G	Día 7	%	F/G	Tostado	%	F/G
Fructosa	0,31	2,49	1,1	1,20	14,58	1,8	3,54	46,32	3,0	3,19	72,79	3,2	0,25	29,93	0,7
Glucosa	0,28	2,22		0,68	8,27		1,18	15,47		1,00	22,90		0,38	45,38	
Sacarosa	12,06	95,29		6,37	77,14		1,62	21,22		0,09	2,26		0,01	0,89	
Azúcares Reductores	0,59	4,71		1,89	22,86		4,72	61,79		4,19	95,69		0,63	75,31	
Azúcares Totales	12,66	100,00		8,26	100,00		6,35	83,01		4,29	97,95		0,64	76,20	

Tesis Doctoral Anexos

Tabla 14. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacaos forasteros IMC-67 IIF. IC 2004.

Azúcar	Días de fermentación												Tostado		F/G
	Día 0	%	F/G	Día 2	%	F/G	Día 4	%	F/G	Día 7	%	F/G			
Fructosa	0,24	2,01	1,1	0,99	11,49	1,8	3,16	52,39	2,9	2,45	72,34	2,9	0,13	28,26	0,5
Glucosa	0,21	1,84		0,55	6,39		1,10	18,36		0,83	24,68		0,24	52,01	
Sacarosa	11,51	96,16		7,13	82,12		1,76	29,25		0,10	2,98		0,09	19,73	
Azúcares Reductores	0,46	3,84		1,55	17,88		4,27	70,75		3,29	97,02		0,37	80,27	
Azúcares Totales	11,97	100,00		8,68	100,00		6,03	100,00		3,39	100,00		0,46	100	

Tabla 15. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacaos forasteros IMC-67 IF. IIC 2003.

Azúcar	Días de fermentación															Tostado	%	F/G
	Día 0	%	F/G	Día 1	%	F/G	Día 3	%	F/G	Día 5	%	F/G	Día 7	%	F/G			
Fructosa	0,09	0,85	1,1	0,37	3,67	2,3	1,99	28,86	2,9	3,95	62,75	3,1	2,48	69,14	2,5	0,15	15,53	0,5
Glucosa	0,08	0,79		0,16	1,63		0,68	9,91		1,28	20,33		1,001	27,84		0,74	75,59	
Sacarosa	11,21	98,36		9,60	94,70		4,23	61,22		1,06	16,92		0,10	3,02		0,08	8,89	
Azúcares Reductores	0,18	1,64		0,53	5,30		2,68	38,78		5,23	83,08		3,48	96,98		0,89	91,11	
Azúcares Totales	11,40	100,0		10,146	100,00		6,92	100,00		6,30	100,00		3,59	100,00		0,97	100,00	

Tabla 16. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacaos criollos Mérida San Juan 2004.

Azúcar	Días de fermentación												Tostado	%	F/G
	Día 0	%	F/G	Día 1	%	F/G	Día 2	%	F/G	Día 3	%	F/G			
Fructosa	0,12	1,12	1,1	0,48	5,72	2,3	2,19	40,09	3,9	2,53	71,60	2,7	0,14	35,39	0,7
Glucosa	0,11	1,03		0,20	2,48		0,56	10,27		0,93	26,29		0,20	48,89	
Sacarosa	10,66	97,85		7,76	91,80		2,72	49,64		0,07	2,11		0,06	15,72	
Azúcares Reductores	0,23	2,15		0,69	8,20		2,76	50,36		3,46	97,89		0,34	84,28	
Azúcares Totales	10,89	100		8,46	100		5,48	100		3,54	100		0,41	100	

Tabla 17. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao criollos Mérida Zea 2004.

Azúcar	Días de fermentación												Tostado	%	F/G
	Día 0	%	F/G	Día 1	%	F/G	Día 2	%	F/G	Día 3	%	F/G			
Fructosa	0,35	3,73	1,2	0,65	12,11	1,5	2,33	55,32	2,6	2,11	62,97	3,0	0,18	47,77	1,5
Glucosa	0,30	3,23		0,43	8,18		0,88	21,01		0,70	20,97		0,12	31,40	
Sacarosa	8,85	93,04		4,28	79,71		1,59	37,91		0,10	3,23		0,08	20,84	
Azúcares Reductores	0,66	6,96		1,09	20,29		3,21	76,33		2,81	83,94		0,31	79,16	
Azúcares Totales	9,51	100		5,37	100		4,81	114,24		2,92	87,17		0,39	100,00	

Tabla 18. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacaos criollos Porcelana 2004.

Azúcar	Días de fermentación												Tostado		
	Día 0	%	F/G	Día 1	%	F/G	Día 2	%	F/G	Día 3	%	F/G			
Fructosa	0,37	3,94	1,0	0,72	10,39	1,4	2,02	47,60	2,7	2,69	71,46	3,8	0,28	45,53	1,8
Glucosa	0,35	3,75		0,50	7,25		0,75	17,69		0,70	18,71		0,15	24,85	
Sacarosa	8,77	92,30		5,73	82,36		1,47	34,71		0,25	6,65		0,18	29,62	
Azúcares Reductores	0,73	7,70		1,22	17,64		2,77	65,29		3,39	90,17		0,44	70,38	
Azúcares Totales	9,511	100		6,95	100		4,24	100		3,64	100		0,62	100,00	

Tabla 19. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacaos criollos Guasare 2004.

Azúcar	Días de fermentación												Tostado		
	Día 0	%	F/G	Día 1	%	F/G	Día 2	%	F/G	Día 3	%	F/G			
Fructosa	0,15	1,70	1,1	0,46	6,08	1,7	2,58	53,16	2,7	2,20	71,07	2,8	0,14	46,69	1,9
Glucosa	0,14	1,51		0,27	3,67		0,94	19,39		0,78	25,18		0,07	24,78	
Sacarosa	9,07	96,80		6,85	90,25		1,33	27,45		0,11	3,76		0,08	28,53	
Azúcares Reductores	0,30	3,20		0,74	9,75		3,52	72,55		2,98	96,24		0,22	71,47	
Azúcares Totales	9,37	100		7,59	100		4,85	100		3,09	100		0,311	100	

Tabla 20. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao trinitario ISC-1 2003.

Azúcar	Días de fermentación												Tostado	%	F/G
	Día 0	%	F/G	Día 2	%	F/G	Día 4	%	F/G	Día 7	%	F/G			
Fructosa	0,10	1,03	1,3	0,30	4,36	1,1	2,05	35,59	3,6	3,55	76,13	3,4	1,00	49,97	1,0
Glucosa	0,08	0,82		0,28	4,14		0,56	9,83		1,05	22,60		0,96	47,77	
Sacarosa	10,17	98,15		6,32	91,50		3,15	54,58		0,05	1,28		0,04	2,26	
Azúcares Reductores	0,19	1,85		0,58	8,50		2,62	45,42		4,60	98,72		1,97	97,74	
Azúcares Totales	10,36	100		6,91	100		5,78	100		4,66	100		2,01	100	

Tabla 21. Concentración de azúcares durante la fermentación para cacao trinitario ISC-1 2002.

Azúcar	Días de fermentación												Tostado	%	F/G
	Día 0	%	F/G	Día 2	%	F/G	Día 4	%	F/G	Día 7	%	F/G			
Fructosa	0,19	1,41	1,8	1,99	23,17	7,1	2,98	75,03	3,9	3,21	83,94	5,3			
Glucosa	0,10	0,76		0,28	3,28		0,75	19,05		0,61	15,95				
Sacarosa	13,36	97,83		6,33	73,55		0,23	5,92		0,004	0,11				
Azúcares Reductores	0,29	2,17		2,27	26,45		3,74	94,08		3,83	99,89				
Azúcares Totales	13,65	100		8,60	100,00		3,98	100,00		3,834	100,00				

V. AMINOÁCIDOS**Tabla 21.** Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao criollo Merideño Zea 2004

Aminoácidos (g/Kg)	Días de Fermentación								Tostado	%
	0 días	%	1 días	%	2 días	%	3 días	%		
Ácidos	2,23	35,75	1,44	17,64	1,02	8,89	0,98	8,00	0,29	3,63
Ácido Aspártico	0,56	9,02	0,53	6,47	0,31	3,01	0,15	1,34	0,08	1,27
Ácido Glutámico	1,67	26,73	0,91	11,18	0,72	5,88	0,74	6,66	0,21	2,36
Hidrofóbicos	2,51	44,68	4,39	53,91	6,23	61,06	7,53	62,72	3,53	66,59
Leucina	0,45	7,12	1,05	12,96	1,69	16,69	1,55	14,03	1,36	22,22
Alanina	0,51	8,20	0,56	6,84	0,84	7,93	1,67	9,65	0,19	3,14
Fenilalanina	0,43	6,92	0,81	9,93	0,98	9,70	1,00	9,07	0,84	13,75
Tirosina	0,12	6,61	0,22	2,66	0,41	4,04	0,42	3,79	0,24	3,87
Valina	0,23	3,74	0,35	4,34	0,47	4,65	0,47	4,28	0,09	1,50
Isoleucina	0,31	4,91	0,52	6,36	0,68	6,72	0,80	7,27	0,12	1,87
Prolina	0,29	4,45	0,57	7,03	0,57	5,63	1,08	9,74	0,26	13,58
Metionina	0,014	0,23	0,05	0,66	0,21	2,056	0,14	1,28	0,11	1,74
Triptofano	0,16	2,52	0,26	3,14	0,37	3,64	0,40	3,62	0,32	4,95
Otros	1,22	19,57	2,32	28,45	3,05	30,04	3,23	29,28	1,83	29,78
Lisina	0,91	14,55	1,72	21,13	1,84	18,10	1,58	14,34	0,59	9,66
Serina	0,18	2,79	0,26	3,25	0,61	6,02	0,82	7,41	0,64	9,39
Glicina	0,04	0,59	0,11	1,30	0,18	1,78	0,28	2,513	0,29	4,70
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,104	1,64	0,23	2,78	0,42	4,14	0,55	5,02	0,37	6,04
Total	5,97	100	8,14	100	10,30	100	11,74	100	5,64	100

Tabla 22. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao criollo Porcelana 2004

Aminoácidos (Kg/g)	Días de Fermentación								Tostado	%
	0 días	%	1 días	%	2 días	%	3 días	%		
Ácidos	1,35	29,27	0,95	15,73	1,45	12,42	0,37	2,72	0,16	5,84
Ácido Aspártico	0,56	12,08	0,52	8,70	0,68	5,84	0,26	1,87	0,05	1,78
Ácido Glutámico	0,79	17,19	0,42	7,03	0,77	6,58	0,12	0,84	0,11	4,06
Hidrofóbicos	2,26	49,06	3,75	62,40	7,12	60,88	9,51	69,28	1,93	71,84
Leucina	0,29	6,26	0,77	12,73	0,86	7,38	1,85	13,51	0,47	17,57
Alanina	0,33	7,18	0,57	9,52	1,59	13,58	1,76	12,79	0,34	12,80
Fenilalanina	0,41	8,90	0,59	9,74	0,86	7,37	1,15	8,38	0,34	12,79
Tirosina	0,24	5,20	0,29	4,77	0,32	2,71	0,32	2,36	0,25	9,33
Valina	0,14	3,01	0,300	4,99	0,96	8,18	1,30	9,49	0,16	5,84
Isoleucina	0,16	3,36	0,18	3,01	0,92	7,83	1,09	7,96	0,13	4,91
Prolina	0,52	11,32	0,78	12,88	1,04	8,86	1,34	9,78	0,11	3,97
Metionina	0,01	0,20	0,01	0,17	0,09	0,76	0,18	1,31	0,11	3,90
Triptofano	0,17	3,64	0,28	4,59	0,49	4,22	0,51	3,70	0,02	0,74
Otros	1,00	21,67	1,32	21,87	3,12	26,70	3,84	28,00	0,60	22,32
Lisina	0,79	17,09	0,82	13,66	1,41	12,04	1,58	11,48	0,37	13,95
Serina	0,10	2,19	0,25	4,20	0,59	5,07	0,98	7,17	0,10	3,65
Glicina	0,04	0,97	0,06	0,93	0,367	3,14	0,51	3,69	0,03	1,09
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,07	1,43	0,19	3,08	0,76	6,46	0,78	5,66	0,10	3,62
Total	4,61	100	6,02	100	11,70	100	13,73	100	2,68	100

Tabla 23. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao criollo Merideño San Juan 2004

Aminoácidos (Kg/g)	Días de Fermentación								Tostado	%
	0 días	%	1 días	%	2 días	%	3 días	%		
Ácidos	3,38	63,40	0,87	20,29	1,18	18,24	1,46	16,10	0,4049	14,60
Ácido Aspártico	1,23	23,10	0,23	5,24	0,41	6,30	0,46	5,09	0,13	4,76
Ácido Glutámico	2,15	40,30	0,65	15,05	0,78	11,94	1,00	11,01	0,27	9,84
Hidrofóbicos	1,78	33,28	2,66	61,95	3,66	56,34	5,02	55,51	1,53	55,11
Leucina	0,11	1,89	0,24	5,49	0,69	10,67	1,04	11,49	0,50	17,88
Alanina	0,11	2,14	0,27	6,18	0,50	7,74	0,89	9,83	0,11	3,87
Fenilalanina	0,06	1,09	0,30	6,92	0,71	10,90	0,83	9,14	0,12	4,23
Tirosina	0,17	3,26	0,27	6,25	0,52	7,93	0,58	6,45	0,21	7,66
Valina	0,10	1,87	0,11	2,59	0,23	3,47	0,34	3,74	0,06	2,07
Isoleucina	0,06	1,06	0,17	3,84	0,26	3,93	0,29	3,19	0,19	6,70
Prolina	1,14	21,32	1,19	27,63	0,54	8,25	0,79	8,67	0,21	7,66
Metionina	0,002	0,04	0,011	0,26	0,039	0,59	0,13	1,48	0,06	1,99
Triptofano	0,033	0,61	0,12	2,79	0,19	2,85	0,14	1,52	0,09	3,06
Otros	0,18	3,32	0,76	17,76	1,65	25,43	2,57	28,40	0,84	30,29
Lisina	0,10	1,84	0,54	12,66	1,26	19,41	1,78	19,71	0,30	10,94
Serina	0,05	0,89	0,11	2,45	0,14	2,141	0,28	3,11	0,14	4,94
Glicina	0,012	0,23	0,036	0,83	0,09	1,37	0,15	1,67	0,14	5,07
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,02	0,36	0,078	1,82	0,16	2,50	0,36	3,92	0,26	9,33
Total	5,34	100	4,30	100	6,49	100	9,05	100	2,77	100

Tabla 24. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao criollo Guasare 2004

Aminoácidos (Kg/g)	Días de Fermentación						Tostado	%
	0 días	%	2 días	%	3 días	%		
Ácidos	0,66	17,02	0,31	5,16	1,08	9,99	1,01	15,67
Ácido Aspártico	0,30	7,79	0,10	1,73	0,59	5,42	0,56	8,60
Ácido Glutámico	0,36	9,23	0,20	3,43	0,49	4,57	0,46	7,07
Hidrofóbicos	1,87	48,35	3,50	59,03	6,36	58,95	3,67	56,66
Leucina	0,20	5,25	0,65	11,03	1,50	13,85	0,87	13,35
Alanina	0,17	4,48	0,30	5,03	0,47	4,31	0,33	5,13
Fenilalanina	0,28	7,15	0,71	11,93	1,10	10,15	0,77	11,84
Tirosina	0,48	12,34	0,66	11,06	0,82	7,64	0,61	9,33
Valina	0,10	2,46	0,22	3,70	0,46	4,24	0,26	3,99
Isoleucina	0,14	3,52	0,20	3,40	0,46	4,30	0,24	3,68
Prolina	0,37	9,59	0,51	8,60	1,19	11,06	0,45	6,88
Metionina	0,012	0,32	0,052	0,88	0,12	1,12	0,03	0,50
Triptofano	0,13	3,23	0,20	3,4072	0,25	2,28	0,13	1,96
Otros	1,34	34,63	2,12	35,82	3,35	31,06	1,7933	27,67
Lisina	0,44	11,42	1,12	18,90	1,94	17,97	1,40	21,62
Serina	0,82	21,10	0,79	13,31	0,80	7,40	0,17	2,64
Glicina	0,031	0,81	0,06	0,97	0,17	1,55	0,05	0,80
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,05	1,30	0,16	2,64	0,45	4,14	0,17	2,61
Total	3,87	100,00	5,93	100,00	10,79	100,00	6,48	100,00

Tabla 25. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao forastero IMC-67 IF.IC 2003

Aminoácidos (Kg/g)	Días de Fermentación								Tostado	%
	0 días	%	2 días	%	4 días	%	7 días	%		
Ácidos	1,37	43,00	0,92	11,21	0,43	4,11	1,15	8,79	0,71	7,46
Ácido Aspártico	0,58	18,10	0,34	4,13	0,10	0,93	0,17	1,31	0,023	0,24
Ácido Glutámico	0,79	24,90	0,58	7,08	0,33	3,18	0,97	7,47	0,69	7,22
Hidrofóbicos	1,54	48,52	4,71	57,58	6,22	59,38	8,22	63,01	6,21	65,17
Leucina	0,13	4,10	1,08	13,18	1,87	17,88	2,26	17,33	1,82	19,09
Alanina	0,19	5,97	0,44	5,39	0,57	5,43	0,65	4,96	0,51	5,39
Fenilalanina	0,16	5,00	0,84	10,24	0,76	7,27	0,81	6,24	0,57	5,98
Tirosina	0,32	9,90	0,57	7,00	0,34	3,27	0,49	3,75	0,44	4,60
Valina	0,08	2,59	0,31	3,77	0,71	6,75	0,59	4,51	0,40	4,14
Isoleucina	0,10	3,00	0,43	5,21	0,51	4,83	1,27	9,72	1,01	10,58
Prolina	0,50	15,78	0,70	8,51	0,80	7,65	1,21	9,29	0,76	7,94
Metionina	0,011	0,36	0,09	1,15	0,16	1,51	0,31	2,41	0,29	3,02
Triptofano	0,06	1,84	0,26	3,14	0,50	4,7841	0,63	4,81	0,42	4,43
Otros	0,27	8,48	2,56	31,21	3,83	36,51	3,68	28,21	2,61	27,38
Lisina	0,11	3,51	1,70	20,72	1,77	16,92	1,19	9,13	0,70	7,28
Serina	0,12	3,90	0,38	4,60	1,08	10,35	1,00	7,68	0,93	9,71
Glicina	0,02	0,47	0,21	2,56	0,30	2,82	0,49	3,76	0,31	3,29
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,019	0,60	0,27	3,33	0,67	6,43	1,00	7,64	0,68	7,10
Total	3,18	100,00	8,19	100,00	10,48	100,00	13,04	100,00	9,54	100,00

Tabla 26. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao forastero IMC-67 IF.IIC 2003

Aminoácidos (Kg/g)	Días de Fermentación										Tostado	%
	0 días	%	1 días	%	3 días	%	5 días	%	7 días	%		
Ácidos	1,03	44,23	0,64	9,71	0,71	5,52	0,68	4,65	1,02	6,05	0,87	11,81
Ácido Aspártico	0,27	11,69	0,18	2,70	0,121	0,94	0,12	0,84	0,27	1,60	0,19	2,59
Ácido Glutámico	0,76	32,54	0,46	7,01	0,59	4,58	0,55	3,81	0,75	4,45	0,68	9,21
Hidrofóbicos	0,94	40,37	4,18	63,18	8,64	67,39	10,19	70,12	11,71	69,25	3,44	46,56
Leucina	0,10	4,20	0,80	12,04	1,69	13,15	2,21	15,18	2,66	15,71	0,45	6,14
Alanina	0,13	5,48	0,63	9,48	0,88	6,83	1,05	7,20	1,12	6,61	0,66	8,95
Fenilalanina	0,12	5,07	0,48	7,23	1,31	10,19	1,51	10,37	1,51	8,92	1,07	14,53
Tirosina	0,17	7,35	0,08	1,25	0,50	3,88	0,54	3,73	0,99	5,86	0,11	1,53
Valina	0,06	2,41	0,40	6,00	1,25	9,73	1,27	8,75	1,36	8,05	0,13	1,73
Isoleucina	0,06	2,72	0,55	8,27	1,12	8,69	1,24	8,51	1,44	8,54	0,13	1,73
Prolina	0,25	10,72	0,98	14,75	1,12	8,75	1,39	9,56	1,67	9,90	0,13	1,80
Metionina	0,011	0,462	0,03	0,41	0,14	1,12	0,33	2,29	0,36	2,13	0,31	4,18
Triptofano	0,046	1,962	0,25	3,74	0,65	5,04	0,66	4,53	0,60	3,54	0,44	5,98
Otros	0,36	15,40	1,80	27,11	3,48	27,10	3,67	25,23	4,18	24,70	3,08	41,63
Lisina	0,10	4,15	0,99	14,96	1,42	11,06	1,19	8,17	1,19	7,06	0,82	11,15
Serina	0,10	4,22	0,40	5,97	1,08	8,39	1,25	8,60	1,47	8,71	1,14	15,37
Glicina	0,14	6,17	0,21	3,11	0,33	2,58	0,39	2,71	0,62	3,64	0,36	4,91
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,02	0,86	0,20	3,07	0,65	5,06	0,84	5,76	0,89	5,29	0,75	10,20
Total	2,33	100	6,61	100	12,83	100	14,53	100	16,90	100	7,39	100

Tabla 27. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao forastero IMC-67 IIF.IC 2003

Aminoácidos (Kg/g)	Días de Fermentación								Tostado	%
	0 días	%	2 días	%	4 días	%	7 días	%		
Ácidos	1,79	41,41	1,43	25,41	0,96	8,86	0,94	7,44	0,82	12,17
Ácido Aspártico	0,50	12,02	0,44	7,95	0,14	1,31	0,18	1,42	0,16	2,37
Ácido Glutámico	1,23	29,40	0,98	17,45	0,82	7,55	0,76	6,02	0,66	9,79
Hidrofóbicos	1,93	46,33	3,07	54,59	7,60	69,72	8,77	69,14	3,98	59,03
Leucina	0,19	4,61	0,31	5,68	1,75	16,13	1,83	14,45	0,70	10,45
Alanina	0,29	6,97	0,42	7,64	0,85	7,88	1,22	9,64	0,86	12,79
Fenilalanina	0,27	6,64	0,38	6,85	1,17	10,73	1,18	9,34	0,70	10,47
Tirosina	0,28	6,82	0,37	6,60	0,76	7,01	0,77	6,11	0,10	1,48
Valina	0,12	3,07	0,23	4,18	0,42	3,86	0,53	4,17	0,28	4,28
Isoleucina	0,13	3,12	0,21	3,87	0,55	5,12	0,60	4,76	0,12	1,87
Prolina	0,50	12,11	0,82	14,60	1,30	11,97	1,45	11,47	0,46	6,87
Metionina	0,01	0,18	0,04	0,80	0,26	2,47	0,35	2,82	0,15	2,34
Triptofano	0,11	2,77	0,24	4,34	0,5	4,58	0,80	6,32	0,56	8,43
Otros	0,51	12,18	1,12	19,99	2,32	21,33	2,97	23,41	1,94	28,79
Lisina	0,27	6,55	0,74	13,23	0,64	5,88	0,87	6,87	0,63	9,35
Serina	0,13	3,22	0,20	3,66	0,77	7,10	0,89	7,03	0,67	10,02
Glicina	0,03	0,72	0,06	1,22	0,28	2,62	0,44	3,53	0,40	5,93
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,07	1,68	0,10	1,87	0,62	5,71	0,75	5,96	0,23	3,48
Total	4,18	100	5,62	100	10,89	100	12,69	100	6,75	100

Tabla 28. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao forastero IMC-67 IIF.IC 2004.

Aminoácidos (Kg/g)	Días de Fermentación								Tostado	%
	0 días	%	2 días	%	4 días	%	7 días	%		
Ácidos	0,75	15,29	0,84	8,95	1,00	7,74	0,47	3,58	0,21	3,57
Ácido Aspártico	0,22	4,57	0,33	3,52	0,25	1,97	0,12	0,93	0,04	0,38
Ácido Glutámico	0,53	10,721	0,50	5,42	0,74	5,76	0,36	2,65	0,57	3,17
Hidrofóbicos	2,02	40,76	5,74	61,17	9,06	70,06	9,92	71,96	4,21	68,52
Leucina	0,22	4,57	1,75	18,70	1,91	14,82	2,21	16,05	1,04	16,93
Alanina	0,32	6,53	0,45	4,85	1,54	11,96	1,77	12,82	0,57	9,31
Fenilalanina	0,10	2,17	1,01	10,86	1,30	10,10	1,40	10,19	0,12	2,08
Tirosina	0,49	9,94	0,54	5,81	0,59	4,63	0,63	4,56	0,28	4,69
Valina	0,12	2,57	0,34	3,63	0,98	7,58	1,01	7,37	0,77	12,53
Isoleucina	0,15	3,12	0,4	4,25	0,58	4,48	0,80	5,85	0,57	9,35
Prolina	0,46	9,27	0,89	9,53	1,36	10,54	1,28	9,28	0,21	3,46
Metionina	0,01	0,30	0,12	1,30	0,29	2,29	0,23	1,70	0,15	2,54
Triptofano	0,11	2,26	0,20	2,15	0,46	3,62	0,55	4,05	0,46	7,52
Otros	2,17	43,93	2,80	29,90	2,87	22,11	3,37	24,45	1,72	27,91
Lisina	0,29	5,85	0,95	10,12	0,70	5,41	0,91	6,65	0,49	8,11
Serina	1,35	27,22	1,40	14,98	1,16	8,99	1,23	8,97	0,55	9,01
Glicina	0,45	9,21	0,10	1,12	0,30	2,33	0,55	4,00	0,32	5,20
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,08	1,64	0,34	3,67	0,70	5,45	0,66	4,83	0,34	5,58
Total	4,95	100	9,39	100	12,93	100	13,77	100	6,15	100

Tabla 29. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao trinitario ISC-1 IF.IC 2002.

Aminoácidos (Kg/g)	Días de Fermentación							
	0 días	%	2 días	%	4 días	%	7 días	%
Ácidos	1,2032	30,33	0,46	12,04	0,50	8,10	0,46	4,84
Ácido Aspártico	0,42	10,79	0,21	5,53	0,20	3,22	0,17	1,83
Ácido Glutámico	0,75	19,53	0,25	6,51	0,30	4,88	0,28	3,05
Hidrofóbicos	1,42	35,87	1,87	48,23	3,60	57,53	6,48	67,49
Leucina	0,08	2,15	0,14	3,60	0,52	8,38	1,66	17,29
Alanina	0,11	2,83	0,24	6,30	0,44	7,03	0,89	9,30
Fenilalanina	0,10	2,56	0,16	4,36	0,52	8,37	1,08	11,28
Tirosina	0,42	10,64	0,43	11,27	0,72	11,59	0,77	8,01
Valina	0,06	1,66	0,08	2,06	0,21	3,30	0,36	3,75
Isoleucina	0,09	2,32	0,10	2,68	0,20	3,19	0,32	3,40
Prolina	0,46	11,70	0,58	15,15	0,81	13,02	1,13	11,78
Metionina	0,06	0,06	0,01	0,18	0,05	0,87	0,027	0,28
Triptofano	0,07	1,91	0,10	2,61	0,10	1,74	0,22	2,36
Otros	1,3401	33,78	1,54	39,71	2,15	34,36	2,65	27,65
Lisina	0,16	4,27	0,24	6,18	0,58	9,30	1,85	19,31
Serina	1,02	25,84	1,12	28,88	1,33	21,29	0,38	4,02
Glicina	0,01	0,29	0,01	0,38	0,027	0,44	0,081	0,83
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,13	3,37	0,16	4,25	0,20	3,320	0,33	3,44
Total	3,96	100	3,87	100	6,27	100	9,61	100

Tabla 30. Concentración de aminoácidos durante la fermentación para cacao trinitario ISC-1 IF.IC 2003

Aminoácidos (Kg/g)	Días de Fermentación						Tostado	%
	0 días	%	2 días	%	7 días	%		
Ácidos	1,26	37,97	0,64	13,71	0,79	7,00	0,73	17,73
Ácido Aspártico	0,51	15,36	0,30	6,40	0,24	2,17	0,22	5,36
Ácido Glutámico	0,75	22,60	0,34	7,37	0,53	4,82	0,51	12,37
Hidrofóbicos	1,42	42,70	3,01	64,12	7,32	66,25	2,21	53,34
Leucina	0,17	5,16	0,42	8,97	1,30	11,82	0,26	6,25
Alanina	0,26	8,03	0,39	8,30	0,79	7,20	0,25	6,07
Fenilalanina	0,18	5,61	0,44	9,36	1,47	13,33	0,19	4,77
Tirosina	0,07	2,11	0,09	1,93	1,05	9,50	0,53	12,89
Valina	0,08	2,40	0,19	4,12	0,45	4,14	0,15	3,76
Isoleucina	0,08	2,49	0,22	4,69	0,56	5,10	0,12	3,07
Prolina	0,51	15,39	1,07	22,94	1,17	10,67	0,30	7,27
Metionina	0,0044	0,13	0,01	0,40	0,03	0,31	0	0,00
Triptofano	0,04	1,34	0,15	3,37	0,45	4,14	0,38	9,20
Otros	0,64	19,31	1,03	22,09	2,95	26,74	1,20	28,92
Lisina	0,31	9,49	0,51	10,99	0,90	8,21	0,38	9,32
Serina	0,20	6,13	0,30	6,59	1,04	9,44	0,14	3,41
Glicina	0,04	1,29	0,065	1,38	0,31	2,82	0,27	6,65
Histidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arginina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Treonina	0,081	2,39	0,15	3,20	0,69	6,25	0,39	9,52