



MANUAL PARA EL ANÁLISIS DE PARÁMETROS QUÍMICOS ASOCIADOS A LA CALIDAD DEL CACAO

MANUAL PARA EL ANÁLISIS DE PARÁMETROS QUÍMICOS ASOCIADOS A LA CALIDAD DEL CACAO

Rafael Correa Delgado, Ph. D.
PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR

Javier Ponce Cevallos, Sclogo.
MINISTRO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, ACUACULTURA Y PESCA

Juan Manuel Domínguez, Ph. D.
DIRECTOR EJECUTIVO DEL INIAP

Citación correcta de esta publicación:

Espín, S & Samaniego, I. 2016. "Manual para el análisis de parámetros químicos, asociados a la calidad del cacao" Manual Nro 105, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina. Quito.

2016, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)
Av. Eloy Alfaro N30-350 y Amazonas. Quito-Ecuador
Teléfono 593 2 2567645
Correo electrónico: iniap@iniap.gob.ec
www.iniap.gob.ec
Isaia.iniap@iniap.gob.ec
Noviembre 2016

EQUIPO TÉCNICO PARTICIPANTE

Susana Espín Mayorga. Química, Master.
Iván Samaniego Maigua. Doctor en Química, M.Sc.

COMITÉ REVISOR

Sandra Garcés Carrera, Ph. D.
Xavier Cuesta Subía, Ph. D.
Álvaro Monteros Altamirano, Ph. D.

ISBN 978-8942-22-082-0



IMPRESO EN ECUADOR

Impreta San Mateo.
Dirección Impreta: Diego Osorio S8-453 Y Colta. Quito - Ecuador

Todos los derechos reservados.
Prohibida la reproducción total o parcial sin autorización

1. PRESENTACIÓN

EL CACAO ES UNO DE LOS PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE MAYOR IMPORTANCIA EN LA EXPORTACIÓN DE ECUADOR, SE ESTIMA QUE DE LA PRODUCCIÓN MUNDIAL DE CACAO, EL 5% CONSTITUYE CACAO FINO Y DE AROMA; DE DICHO PORCENTAJE, ECUADOR PARTICIPA CON EL 50%, RAZÓN POR LA QUE ES CONSIDERADO EL MAYOR PRODUCTOR DE CACAO FINO Y DE AROMA EN EL MUNDO.

SE CUENTA CON 470000 HECTÁREAS DE CULTIVO, DISTRIBUIDAS EN EL LITORAL Y EN LA REGIÓN AMAZÓNICA, SEGÚN LA ASOCIACIÓN NACIONAL DE EXPORTADORES DE CACAO (ANECACAO), DURANTE EL AÑO 2015 SE EXPORTARON 260000 TONELADAS MÉTRICAS DE CACAO EN GRANO Y PRODUCTOS DERIVADOS, GENERANDO ALREDEDOR DE USD \$812 MILLONES.

DURANTE LAS DOS ÚLTIMAS DÉCADAS, EL CACAO ECUATORIANO HA PERDIDO, LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD Y AROMA; UNA DE LAS PRINCIPALES CAUSAS, ES EL MAL MANEJO POSCOSECHA Y LA FALTA DE NORMAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD.

EN LA ACTUALIDAD, LA CALIDAD DEL CACAO SE DETERMINA OBSERVANDO LA CONDICIÓN INTERNA DEL COTILEDÓN, EL COLOR Y LOS DAÑOS EVIDENTES COMO RESULTADO DE INFESTACIONES DE HONGOS O INSECTOS, ASÍ TAMBIÉN SE REALIZAN ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS. ESTAS EVALUACIONES REQUIEREN LA PARTICIPACIÓN DE EXPERTOS Y SON DE CARÁCTER SUBJETIVO, POR LO QUE SE BUSCA CENTRARLAS EN ASPECTOS CUALITATIVOS Y APLICAR UN SISTEMA MÁS OBJETIVO Y CREÍBLE DE CLASIFICACIÓN DE LA CALIDAD DEL CACAO, CON LO CUAL, SE ESPERA MEJORAR Y RECUPERAR LOS PRECIOS EN EL MERCADO INTERNACIONAL Y LA TRANSPARENCIA EN LAS TRANSACCIONES COMERCIALES ACTUALES.

EN ESTE CONTEXTO, A PARTIR DEL AÑO 2009, EL INIAP A TRAVÉS DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA, JUNTO AL PROGRAMA NACIONAL DE CAFÉ Y CACAO DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TROPICAL PICHILINGUE, INICIAN TRABAJOS COMPLEMENTARIOS A LAS ACTIVIDADES DEL PROYECTO ECU-B7-3010/93/176 DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, ACUACULTURA Y PESCA (MAGAP), CON EL PROPÓSITO DE DETERMINAR PARÁMETROS FÍSICOS, QUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS QUE DEFINAN LA CALIDAD DEL CACAO, APOYEN LA INVESTIGACIÓN Y LA TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA PARA BENEFICIO DE LOS AGRICULTORES DEL SECTOR CACAOTERO DEL PAÍS.

POSTERIORMENTE, A TRAVÉS DE LA APLICACIÓN Y EJECUCIÓN DE VARIOS PROYECTOS COMPETITIVOS DE INVESTIGACIÓN FINANCIADOS POR ORGANISMOS NACIONALES E INTERNACIONALES, COMO EL COMMON FUND FOR COMMODITIES (CFC), LA INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION (ICCO), LA SECRETARIA NACIONAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR, CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN (SENESCYT) Y EL APOORTE DEL PROGRAMA DE FORTALECIMIENTO INSTITUCIONAL, SE CONSOLIDA ESTA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN, Y SE AMPLIÓ LA PRESTACIÓN DE SERVICIOS AL SECTOR CACAOTERO MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES QUÍMICOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES ASOCIADOS A LA CALIDAD DEL CACAO PRODUCIDO EN EL ECUADOR.

EL PRESENTE DOCUMENTO, ES PARTE DE LOS RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES REALIZADAS, QUE RECOPILA LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE SERVICIO DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA) DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD DEL INIAP, PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES QUÍMICOS RELACIONADOS CON LA CALIDAD DEL CACAO; DEL MISMO QUE SE ESPERA SE CONSTITUYA EN UNA GUÍA ÚTIL PARA INVESTIGADORES, DOCENTES, ESTUDIANTES Y DEMÁS ACTORES DE LA CADENA PRODUCTIVA DEL CACAO VINCULADOS A LA INVESTIGACIÓN, LA INNOVACIÓN Y EL DESARROLLO INDUSTRIAL DE ESTE RUBRO.

EL LABORATORIO LSAIA DEL INIAP, TRABAJA BAJO UN SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD, CUMPLIENDO LA NORMA INTERNACIONAL ISO/IEC 17025 Y ES RECONOCIDO POR EL SERVICIO ECUATORIANO DE ACREDITACIÓN (SAE).

2. RESUMEN

EL PRESENTE DOCUMENTO RECOPILA LOS PROTOCOLOS QUE SE APLICAN EN EL LABORATORIO DE SERVICIO DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS (LSAIA), DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA DEL INIAP, PARA EL ANÁLISIS DE LA CALIDAD QUÍMICA DEL CACAO. SE BASA EN LAS EXPERIENCIAS GENERADAS DESDE EL AÑO 2009, COMO RESULTADO DE LA PARTICIPACIÓN Y EJECUCIÓN DE VARIOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN, DENTRO DE LOS CUALES SE ADAPTARON, VALIDARON Y ACREDITARON TÉCNICAS ANALÍTICAS E INSTRUMENTALES QUE SE FUNDAMENTAN EN EL USO DE CROMATOGRAFÍA EN FASE GASEOSA, ACOPLADO A DETECTORES DE IONIZACIÓN DE FLAMA (FID), Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS, CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) ACOPLADO A DETECTORES DE ARREGLO DE DIODOS (DAD), FLUORESCENCIA (FLD) Y ESPECTROFOTOMETRÍA (UV/VIS) ENTRE OTRAS, PARA DETERMINAR COMPONENTES QUÍMICOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES ASOCIADOS A LA CALIDAD DEL CACAO.

3. AGRADECIMIENTOS

NUESTRO AGRADECIMIENTO A TODAS LAS INSTITUCIONES Y PERSONAS QUE APOYARON LA IMPLEMENTACIÓN DE ESTA NUEVA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN Y SERVICIO DE ANÁLISIS EN EL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA, QUE HA PERMITIDO UN ADECUADO USO DE LAS CAPACIDADES TÉCNICAS E INFRAESTRUCTURA DEL INSTITUTO, PARA EL DESARROLLO DE UN TRABAJO INTEGRAL CON EL RUBRO CACAO.

UN ESPECIAL AGRADECIMIENTO, AL DR. GUSTAVO ENRÍQUEZ, EN SU CALIDAD DE EX DIRECTOR GENERAL Y EX DIRECTOR DE INVESTIGACIONES DEL INIAP, POR LA CONSTANTE MOTIVACIÓN, APOYO Y ENTREGA DE SUS CONOCIMIENTOS Y DOCUMENTACION ESPECIALIZADA SOBRE EL TEMA.

AL DR. MARC TREBOUX, DIRECTOR DEL LABORATORIO CANTONAL DE NEUCHATEL-SUIZA, POR HABER FACILITADO LOS PROTOCOLOS DE ANÁLISIS, VIGENTES EN SU LABORATORIO, IMPORTANTE INSUMO PARA LA ADAPTACIÓN Y VALIDACION DE VARIOS MÉTODOS PRESENTADOS EN ESTE MANUAL.

AL DR. MICHEL JACQUET Y EL DR. EMILE CROS DEL CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPMENT (CIRAD), POR EL APOYO EN LA IMPLEMENTACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS EN EL LABORATORIO, ASI COMO AL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS GENERADOS.

A LOS INGENIEROS FREDDY AMORES, JUAN CARLOS JIMÉNEZ Y JAMES QUIROZ, ASI COMO A LOS DEMÁS COMPAÑEROS DEL PROGRAMA NACIONAL DE CACAO DEL INIAP, POR EL TRABAJO CONJUNTO REALIZADO, COMPARTIENDO CONOCIMIENTO, EXPERIENCIAS Y LA MÍSTICA DEMOSTRADA POR PARTE DE LOS INVESTIGADORES DEL INIAP.

A LOS COMPAÑEROS DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD, DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA DEL INIAP, ASÍ COMO A TODOS LOS/LAS JÓVENES TESISISTAS DE VARIAS UNIVERSIDADES DEL PAÍS, QUE APORTARON EN LOS PROCESOS DE SELECCIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS AQUÍ PRESENTADOS.

SUSANA ESPÍN

IVÁN SAMANIEGO

4. CONTENIDO

	Página
1. Presentación.....	3
2. Resumen.....	5
3. Agradecimientos.....	7
4. Contenido	9
5. Sección 1 Preparación de muestras.....	11
6. Sección 2 Procedimientos específicos.....	17
6.1 Índice de fermentación.....	19
6.2 Porcentaje de humedad.....	21
6.3 pH y acidez titulable.....	22
6.4 Acidez volátil.....	25
6.5 Ácidos orgánicos.....	27
6.6 Contenido de grasa.....	32
6.7 Polifenoles totales.....	34
6.8 Pigmentos antocianicos.....	39
6.9 Catequina, Epicatequina, Procianidinas.....	41
6.10 Alcaloides.....	44
6.11 Azúcares	48
6.12 Componentes volátiles (Aromas).....	51
6.13 Acidos grasos.....	55
6.14 Micotoxinas (Ocratoxina A).....	58
7 Sección 3 Anexos	65
7.1 Abreviaturas.....	67
7.2 Galería de fotos.....	69



SECCIÓN 1

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. INTRODUCCIÓN

En el laboratorio, la preparación de la muestra es trascendental para obtener resultados analíticos confiables, por lo tanto, se deben seguir procedimientos adecuados para su procesamiento y almacenamiento, los mismos que dependerán de la naturaleza de las muestras, así como de los parámetros que se analicen.

Para la preparación del cacao en grano, los pasos básicos a seguir son los siguientes:

- 1) Separación de la cascarilla, manual o utilizando un equipo descascarillador.
- 2) Molienda de las almendras.
- 3) Separación de partículas de 0.38 y 0.149mm (42 y 100 mesh respectivamente) utilizando un tamiz.
- 4) Desengrasado de muestras, utilizando solventes.
- 5) Almacenamiento de muestras molidas y desengrasadas.

Para el licor de cacao, bloques de chocolate y cacao en barras, se aplica directamente la molienda, tamizaje y desengrasado; mientras que para muestras de polvo de cacao se procede directamente con el tamizaje y desengrasado de la muestra.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Mediante procesos de descascarillado, molienda, tamizaje y desengrasado se obtiene la matriz adecuada, reducida a un tamaño de partícula que asegure homogenización para el análisis en el laboratorio.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento se aplica a muestras de almendras, licor y polvo de cacao, para el análisis de parámetros químicos.

4. DESCASCARILLADO Y MOLIENDA

4.1. REACTIVOS

- Nitrógeno líquido

4.2 EQUIPOS Y MATERIALES

- Molino de café, Mr. Coffee, IDS-S
- Molino Retch Z200
- Tamiz de malla proporcional a 42 y 100 mesh equivalentes a 0.38 y 0.149mm
- Bisturí
- Brochas
- Espátula plástica
- Recipientes plásticos para almacenamiento de muestras
- Marcador permanente
- Cinta adhesiva para rotulado
- Congelador
- Equipo automático, Sieve Shaker model S-2

4.3. PROCEDIMIENTO

- a) Remover manualmente la cascarilla que protege las almendras de cacao, utilizando un bisturí. Se puede también emplear un equipo descascarillador que facilita este proceso.
- b) Tomar un frasco de plástico limpio y rotular con el código de laboratorio correspondiente a la muestra.
- c) Pasar las almendras peladas a un recipiente plástico, tapar y con cuidado insertar el mismo en el termo de nitrógeno líquido por aproximadamente 5 minutos.
- d) Sacar el recipiente del termo de nitrógeno líquido, abrir con cuidado la tapa del mismo y pasar las almendras congeladas al molino; moler por 2 minutos aproximadamente.
- e) Pasar el polvo de cacao obtenido de la molienda al equipo de agitación automático para tamizar y separar partículas de 0.38 y 0.149mm.
- f) Recolectar en un frasco de plástico el polvo de cacao tamizado con el tamaño de partícula requerido. El residuo que no pasa por el tamiz, vuelva a moler siguiendo los pasos c, d y e, hasta finalizar toda la muestra.
- g) Cerrar herméticamente el frasco que contiene la muestra molida y tamizada, colocar en el congelador a -18°C, en caso de no procesar inmediatamente las muestras.

Observaciones:

- Utilizar guantes y mascarilla para manipular el recipiente con las almendras durante el proceso de congelación, utilizando nitrógeno líquido.

5. DESENGRASADO DE LA MUESTRA POR EL MÉTODO SOXHLET

5.1 REACTIVOS

- Agua destilada
- Éter de Petróleo p.a. (rango de ebullición de 40 a 60°C)

5.2 EQUIPOS Y MATERIALES

- Equipo Extractor Soxhlet de capacidad 250mL, con uniones esmeriladas
- Algodón libre de grasa
- Papel filtro de 16cm de diámetro
- Dedal de extracción de celulosa de 33mm x 88mm libre de grasa
- Núcleos de ebullición de vidrio
- Desecador de vidrio con platina de cerámica y desecante
- Estufa a 105°C
- Balones de 250mL con uniones esmeriladas
- Balanza de precisión
- Equipo de calentamiento

5.3 PROCEDIMIENTO

Se parte de la muestra molida y tamizada, aplicando el siguiente procedimiento:

- a) Doblar el papel filtro de 16cm formando un sobre e introducir en el dedal de extracción.
- b) Pesar 10 gramos de polvo de cacao y transferir al dedal de extracción.
- c) Cerrar el sobre de papel filtro, cubrir el dedal de extracción con algodón y colocar dentro del extractor Soxhlet de capacidad 250mL.
- d) Medir en una probeta graduada 180mL de Éter de Petróleo y transferir al balón de destilación.
- e) Unir el Soxhlet con el balón de destilación y conectar al refrigerante.
- f) Colocar el equipo completo sobre el dispositivo de calentamiento, abrir el paso de agua para el refrigerante y extraer por ocho horas.
- g) Retirar el polvo desengrasado del dedal de extracción y colocar en una caja petri de 125mm de diámetro en un desecador por lo menos durante 24 horas.

- h) Transferir el polvo desengrasado en viales de vidrio provistos de tapa rosca hermética y almacenar a -18°C , si en caso los análisis no se realizan de manera inmediata.

Observaciones:

- Para la operación de pesado de la muestra se debe tomar en consideración tres cifras decimales.



SECCIÓN 2

PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS

6.1 ÍNDICE DE FERMENTACIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La determinación del Índice de Fermentación provee un criterio objetivo para definir el grado de fermentación del cacao beneficiado; se lo conoce también como color rojo de las almendras RCV (Red Color Value); el mismo que señala que las almendras de cacao llegan a una fermentación adecuada cuando la relación entre la absorbancia a 460nm (productos pardos y de condensación de flavonoides) y 525nm (antocianinas) es igual a 1, lo que indica que las reacciones de oxidación y condensación que se producen durante la fermentación de las almendras habrían concluido. (IOCCC, 2009)

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Después de retirar la cáscara, los granos son molidos y tamizados. La muestra es desengrasada con Éter de Petróleo realizando una posterior extracción de los componentes con una solución de Ácido Clorhídrico en Metanol, en este extracto se determina la Absorbancia a 460 y 525nm respectivamente, con un espectrofotómetro Uv-Vis y se establece como índice de fermentación la relación: DO_{460}/DO_{525} .

3. CAMPO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a almendras secas, fermentadas y no fermentadas.

4. REACTIVOS

- Metanol p.a. 99.5% de pureza
- Ácido Clorhídrico fumante, concentración 36.5-38%, densidad 1.19

4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución Ácido Clorhídrico 0.0012M en Metanol:** Transferir cuantitativamente 1 mL de Ácido Clorhídrico concentrado en un balón volumétrico de 1000mL y completar a volumen con Metanol.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Papel filtro Whatman N° 4
- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Balones volumétricos de 25mL
- Embudos de vidrio para filtración 12cm de diámetro
- Espectrofotómetro UV- VIS
- Erlenmeyer con tapa rosca de 125mL
- Pipeta volumétrica de 4mL
- Cubetas de vidrio para Espectrofotómetro Uv-Vis

6. PROCEDIMIENTO

6.1 DESENGRASADO DE LA MUESTRA

Proceder de acuerdo a lo descrito en el método de preparación de muestras.

6.2 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

- En un erlenmeyer de 125mL pesar 2g de muestra desengrasada.
- Adicionar 50mL de solución Ácido Clorhídrico en Metanol.
- Colocar la muestra en el equipo de extracción y agitar por 45 minutos en un baño de hielo a 0°C.
- Filtrar el extracto a través de papel filtro Whatman N° 4.
- Tomar cuantitativamente 4mL del filtrado en un balón de 25mL y llevar a volumen con la solución de Ácido Clorhídrico en Metanol.
- Pasar una alícuota de la solución a una cubeta de vidrio y leer en el Espectrofotómetro Uv-Vis en la opción fotometría bajo las siguientes condiciones:
 - Longitud de Onda: 460 y 525nm
 - Temperatura: ambiente
 - Slit: 0.2nm

7. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para el cálculo del IF, se utiliza la siguiente fórmula:

$$IF = DO_{460}/DO_{525}$$

IF = Índice de Fermentación

DO₄₆₀ = Absorbancia de la solución a 460nm

DO₅₂₅ = Absorbancia de la solución a 525nm

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Cros, E., Rouly, M., Villeneuve, F., Vincent, J.C. 1982. Recherche d'un indice de fermentation du cacao II. Estimation de la matière colorante rouge des fèves de cacao. Café Cacao Thé. 26(2):115-122
2. IOCCC (International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery). 1990. Methods of Analysis. Analytical Method 40. Determination of the Red Colour Value of cocoa beans by spectroscopy. Bruselas, Bélgica. 5p

6.2. PORCENTAJE DE HUMEDAD

1. INTRODUCCIÓN

La calidad del cacao está directamente relacionada con los procesos poscosecha: Fermentación y Secado. El proceso de secado natural al sol se produce a temperaturas inferiores a 60°C para consolidar la formación del sabor y aroma característico, de igual manera este proceso sirve para evitar la sobre-fermentación de las almendras, generadora de malos sabores y olores asegurando un buen almacenamiento del grano para la comercialización (Pontillon, 1997).

En el laboratorio se ha establecido una metodología para determinar la humedad como parámetro de control de calidad, utilizando técnicas de análisis gravimétrico, tomando como referencia el método AOAC 931.04.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La humedad contenida en las almendras y nibs de cacao, se determina por diferencia de pesos de las muestras luego de ser sometidas a un proceso de secado en una estufa de aire forzado a 105°C por 12 horas.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este método es aplicable para polvo de almendras de cacao secas, fermentadas, no fermentadas y licor de cacao.

4. EQUIPOS Y MATERIALES

- Espátula plástica
- Recipientes de aluminio para secar muestras
- Estufa de aire forzado
- Balanza analítica digital precisión 0.1mg
- Desecador de vidrio

5. PROCEDIMIENTO

- a) Colocar el recipiente de aluminio en la estufa de aire forzado a 105°C por dos horas.
- b) Sacar el recipiente de aluminio a un desecador, dejar enfriar y pesar.
- c) Pesar 2 gramos de polvo de cacao en el recipiente y dejar en la estufa a 105°C por 12 horas.
- d) Sacar el recipiente con la muestra a un desecador, dejar enfriar y pesar.

Observaciones:

- Pesar las muestras con precisión de tres decimales.

6. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El cálculo de resultados se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad} = \frac{P1 - P2}{P} * 100$$

P1 = Peso del recipiente de aluminio con la muestra seca (g)

P2 = Peso del recipiente de aluminio tarada (g)

P = Peso de la muestra (g)

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemist, USA). 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International: Cacao beans & its product.16 ed. Gaithersburg, USA. 2: 1-17

6.3. pH Y ACIDEZ TITULABLE

1. INTRODUCCIÓN

La calidad del cacao depende en gran medida del grado y del tiempo de acidificación de los cotiledones durante el proceso de fermentación. Varios autores han determinado que el pH tiene un rol fundamental respecto al mayor o menor potencial de formación de precursores de aroma (Biehl, 1996).

Compuestos ácidos en almendras de cacao son producidos por el metabolismo microbial de la pulpa, la cual es absorbida en el cotiledón. La presencia de ácidos durante la fermentación es necesaria para producir la muerte del embrión de la almendra, prevenir la germinación, solubilizar los polifenoles y ayudan a evitar la acción nociva de ciertas bacterias que causan sabores indeseables (Armijos, 2002).

El cotiledón de la semilla no es ácido naturalmente, pero durante el proceso de fermentación y secado absorbe ácidos y otras sustancias producidas por los microorganismos que fermentan la pulpa circundante. Anteriormente, se ha indicado que la absorción de ácido que se produce en la fermentación es esencial en el curado del cacao y en el desarrollo de precursores de sabor y aroma, después de la fermentación la acidez de los cotiledones se incrementa con la consecuente disminución del pH.

La medida de la acidez titulable, se realiza mediante una reacción de neutralización, que en este caso requiere del uso de una base química (NaOH 0.1N) hasta alcanzar el punto de equilibrio. Este parámetro tiene una relación inversa con el pH, de tal manera que mientras más ácida sea la solución o el extracto, se va a requerir una mayor cantidad de base para su neutralización.

La determinación de la acidez titulable en muestras de almendras, polvo y licor de cacao se realiza a partir del extracto obtenido para medir el pH, valorando el punto final de equilibrio al adicionar NaOH 0.1N hasta obtener un pH final de 8.3 mediante valoración potenciométrica. Los resultados se expresan como meq NaOH 0.1N requeridos por cada gramo de muestra analizada.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La determinación del pH es la medida de la tendencia de la acidez o alcalinidad de las muestras; expresa la concentración de los iones H^+ provenientes de todos los ácidos volátiles y no volátiles presentes en las almendras del cacao disueltas en agua. Mientras que el principio básico de la medida electrométrica del pH se fundamenta en el registro potenciométrico de la actividad de los iones Hidrógeno.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este método se aplica a almendras de cacao secas, fermentadas y no fermentadas, polvo de cacao, licor de cacao.

4. REACTIVOS

- Agua destilada
- Hidróxido de Sodio, p.a.
- Fenolftaleína, p.a.
- Ftalato Ácido de Potasio, p.a.
- Etanol al 95%

4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución de Fenolftaleína al 1%:** Transferir cuantitativamente 1 gramo de Fenolftaleína en un balón volumétrico de 100mL y completar a volumen con Etanol al 95%.
- **Solución de Hidróxido de Sodio 0.1N:** Transferir cuantitativamente 4 gramos de

Hidróxido de Sodio en un balón volumétrico de 100mL y completar a volumen con agua destilada.

- **Solución de Ftalato ácido de Potasio (Solución para la estandarización del Hidróxido de Sodio):** Transferir cuantitativamente 0.204 gramos de Ftalato ácido de Potasio en un balón volumétrico de 50mL disolver y completar a volumen con agua destilada. Titular el Ftalato ácido de Potasio con la solución de Hidróxido de Sodio utilizando como indicador la Fenolftaleína al 1%, la concentración real de la solución de Hidróxido de Sodio se obtiene con la siguiente ecuación:

$$NORMALIDAD = \frac{0.02043}{p * V}$$

V = Volumen de solución de NaOH 0.1N utilizado en la titulación.

P = Peso de Ftalato ácido de Potasio en gramos

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Papel filtro Whatman N° 1
- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Pipetas volumétricas de 10mL
- Balones volumétricos de 50mL
- Embudos de vidrio para filtración de 12cm de diámetro
- Vasos de precipitación de 50, 100 y 250mL
- Placa agitadora
- Medidor de pH
- Bureta de precisión de 2mL
- Erlenmeyer con tapa rosca de 125mL

6. PROCEDIMIENTO

- a) Pesar 5g de polvo de cacao en un erlenmeyer, añadir 50mL de agua destilada y poner en agitación continua por una hora.
- b) Filtrar el extracto utilizando papel filtro Whatman N° 1.
- c) Tomar 10mL del extracto y medir el pH, utilizando un pH-metro calibrado.
- d) Titular el extracto con la solución de Hidróxido de Sodio 0.1N, hasta alcanzar un pH final de 8.3.

7. CÁLCULOS Y RESULTADOS

Los resultados de la medición de acidez titulable se reportan como mL de Hidróxido de Sodio 0.1N utilizados por gramo de cacao.

El pH se reporta como unidades de pH.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemist, USA). 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International: Cacao beans & its product. 16 ed. Gaithersburg, USA. 2: 1-17
2. Pontillon, J. 1997. Cacao et chocolat : production, utilization, caractéristiques. Sciences et techniques alimentaires, Lavoisier, Paris., p 481-489

6.4. ACIDEZ VOLÁTIL

1. INTRODUCCIÓN

Existen diferencias de opinión sobre la naturaleza de la acidez del cacao. Varios estudios, señalan a los ácidos volátiles y no volátiles como posibles causantes de la acidez. Se ha establecido que los ácidos no volátiles son más importantes en la acidez del cacao porque estos no se pierden durante el proceso de manufactura. Las cantidades de ácido acético que se pierden, en su mayoría dependerán del proceso de elaboración del chocolate y en cualquiera de ellos resulta en pérdidas excesivas de ácido acético y de otros compuestos del sabor. (Cubero, 1990)

La extracción de los ácidos, se realiza por arrastre de vapor a partir de un gramo de muestra, utilizando un equipo de destilación, tipo Lickens Nickelson. Este parámetro químico evalúa la cantidad total de ácidos orgánicos volátiles contenidos en el cacao, representados principalmente por el ácido acético, aunque existen también en cantidades bajas, Ácido Isovalérico, Ácido Isobutírico y Ácido Propiónico. (Armijos, 2002)

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los ácidos volátiles son removidos de las muestras de cacao con la ayuda de un ácido fuerte (Ácido Sulfúrico fumante) y destilación por arrastre de vapor por aproximadamente 20 minutos, los ácidos son recuperados en agua destilada y titulados con solución de Hidróxido de Sodio 0.1N, utilizando Fenolftaleína como indicador. Los resultados se expresan como ml de NaOH 0.1N usados por cada gramo de muestra.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este método se aplica a polvo de almendras de cacao secas, fermentadas y no fermentadas

4. REACTIVOS

- Metanol grado p.a. 99.5 %

- Ácido Sulfúrico fumante. p.a.
- Hidróxido de Sodio. p.a.
- Fenolftaleína p.a.
- Ftalato ácido de Potasio p.a.
- Etanol al 95%

4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución de Fenolftaleína al 1%:** Transferir cuantitativamente 1 gramo de Fenolftaleína en un balón volumétrico de 100mL y completar a volumen con Etanol al 95%.
- **Solución de Hidróxido de Sodio 0.1N:** Transferir cuantitativamente 4 gramos de Hidróxido de Sodio en un balón volumétrico de 100mL y completar a volumen con agua destilada.
- **Solución de Ftalato ácido de Potasio (Solución para la estandarización del Hidróxido de Sodio):** Transferir cuantitativamente 0.204 gramos de Ftalato ácido de Potasio en un balón volumétrico de 50mL disolver y completar a volumen con agua destilada. Titular el Ftalato ácido de Potasio con la solución de Hidróxido de Sodio, utilizando como indicador Fenolftaleína al 1%. La concentración real de la solución de Hidróxido de Sodio se obtiene con la siguiente ecuación:

$$NORMALIDAD = \frac{0,02043}{p \cdot V}$$

V = Volumen de solución de NaOH 0.1N utilizado en la titulación

P = Peso de Ftalato ácido de Potasio en gramos

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Pipetas volumétricas de 1 y 10mL
- Balones volumétricos de 50 y 100mL
- Vasos de precipitación de 50,100 y 250mL
- Bureta de precisión de 2mL
- Equipo de destilación por arrastre de vapor, tipo Lickens Nickelson
- Erlenmeyer de 500mL
- Manta de calentamiento para balones de destilación de 1000mL

6. PROCEDIMIENTO

- a) Pesar 1g de cacao y transferir cuantitativamente al equipo de destilación.
- b) Añadir 3 gotas de Ácido Sulfúrico y lavar las paredes del equipo con agua destilada.
- c) Colocar un erlenmeyer de 500mL con 50mL de agua destilada para recibir el destilado y proceder con la destilación aproximadamente 45 minutos hasta obtener 30mL.
- d) Una vez recolectado el volumen indicado, se añade 2 gotas de Fenolftaleína y se titula el extracto que contiene los ácidos orgánicos volátiles con la solución de Hidróxido de Sodio al 0.1N.

Observaciones:

- Es importante remover completamente la cáscara del grano de cacao, ya que existe un alto contenido de ácidos volátiles en la misma, lo que puede afectar el resultado final.
- La prueba debe hacerse en lo posible inmediatamente después del pelado y molido de las almendras.

7. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados para la acidez volátil se expresan como mililitros de Hidróxido de Sodio 0.1N utilizados por cada gramo de cacao.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armijos, A. I. 2002. Características de acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación. Tesis Licenciada en Ciencias Químicas, Especialización Química Analítica. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 107 p
2. Cubero, E.1990. Indicadores Químicos de la calidad del grano seco de cacao y su aplicación. Tesis de Licenciatura. San José-Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 180p
3. Pontillon, J. 1997. Cacao et chocolat: production, utilization, caractéristiques. Sciences et techniques alimentaires, Lavoisier, Paris., p 481-489

6.5. ÁCIDOS ORGÁNICOS

1. INTRODUCCIÓN

En el cacao los ácidos orgánicos juegan un papel muy importante dentro de la formación de los componentes responsables del aroma, ya que éstos son el resultado de una serie de procesos enzimáticos. Además de producir la muerte del embrión y evitar la germinación, los ácidos, permiten la vacuolización y pérdida celular, lo que ayuda a la distribución de enzimas por el tejido y su mezcla con el sustrato con el sustrato, produciendo así reacciones de formación de los precursores del aroma de chocolate.

Los ácidos orgánicos son sintetizados por diferentes tipos de reacciones, especialmente por la oxidación de los azúcares. Dentro del cacao, la principal fuente de formación de ácidos son las reacciones microbianas en la pulpa que rodea al fruto. La posterior difusión de los ácidos hacia el cotiledón, provee un ambiente propicio para que se lleven a cabo reacciones para el desarrollo de precursores de los aromas característicos del chocolate; por lo tanto los ácidos orgánicos representan un parámetro importante dentro de la calidad, participan en el metabolismo de ciertas sustancias durante la poscosecha, que imparten al producto características aromáticas tanto de olor como de sabor en el cacao (Jinap, 1994).

Los ácidos orgánicos son sobre todo los ácidos Acético, Cítrico y Oxálico, formados en la fermentación. Los niveles se incrementan en forma gradual durante los primeros días, produciéndose posteriormente un decrecimiento en los valores hacia el final del proceso (Belitz, 1997).

Usualmente, se realiza la determinación de los ácidos volátiles y no volátiles mediante técnicas analíticas diferentes, Cromatografía en Fase Gaseosa (GC) para los volátiles y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para los no volátiles. Con la finalidad de facilitar el procedimiento, se adaptó la metodología tomando como referencias el método MO EC 050 del Laboratorio Cantonal de Neuchatel- Suiza descrito por Caperos y Girad (2000) y el método propuesto por Jinap, S (1994), logrando que los ácidos orgánicos volátiles y no volátiles sean separados y cuantificados por HPLC utilizando un detector de espectrofotometría UV/VIS y una columna cromatográfica Bio-Rad HPX-87H.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los ácidos orgánicos volátiles y no volátiles del polvo de cacao, se extraen en fase acuosa, posteriormente se elimina los azúcares y alcoholes pasando el extracto a través de una resina Bio-Rad 5, a continuación se pasa el extracto por un cartucho SEP – PAK C18 y se eluye los ácidos orgánicos con Ácido Sulfúrico 0.01N.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este método se aplica a las almendras de cacao secas, fermentadas y no fermentadas, polvo y licor de cacao

4. REACTIVOS

- Agua ultrapura
- Metanol grado HPLC
- Carbonato de Sodio anhidro p.a.
- Amonio NH₃ al 25%
- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido Acético glacial 99.9%
- Ácido Láctico 98%

- Ácido Cítrico 99%
- Ácido Málico 99%
- Ácido Oxálico 99.5%
- Ácido Succínico 99%
- Ácido Sulfúrico 98%

4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución Ácido Sulfúrico 0.01N:** Transferir cuantitativamente con una micropipeta 500 μ L de Ácido Sulfúrico al 98% en un balón volumétrico de 1000mL completar a volumen con agua ultrapura.
- **Solución Carbonato de Sodio 0.5 M:** Transferir cuantitativamente 5g de Carbonato de Sodio anhidro en un balón volumétrico de 100mL, completar a volumen con agua ultrapura.
- **Solución fase móvil para HPLC:** Solución Ácido Sulfúrico 0.01N.
- **Solución estándar madre de ácidos orgánicos:** Pesar las cantidades indicadas en la tabla 1 de cada ácido orgánico y aforar a 100mL con agua ultrapura para obtener las concentraciones deseadas.

ÁCIDO ORGÁNICO	MASA (g)	CONCENTRACIÓN (g/L)
Ácido Cítrico	0.10	1.0
Ácido Málico	0.25	2.5
Ácido Láctico	0.15	1.5
Ácido Oxálico	0.20	2.0
Ácido Acético	0.15	1.5

Tabla 1. Concentraciones de ácidos orgánicos en la solución madre

- **Solución estándar de ácidos orgánicos:** Pasar cuantitativamente 10mL de la solución madre de ácido orgánicos a un balón de 100mL y completar a volumen con agua ultrapura.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Probetas de vidrio borosilicato de 100mL
- Vasos de precipitación de borosilicato de 10, 50mL
- Sistema de extracción al vacío compuesto de kitasato de 1000mL, reservorios de 500mL con membrana de filtro poroso y pinza metálica.
- Micropipeta automática de 100 a 1000 μ L

- Puntas para micropipeta automática
- Baño Ultrasonido
- Centrifuga
- Jeringuillas plásticas con filtro de lana de vidrio
- Membrana millipore de filtración de 0.22 μ m
- Balones aforados de 10, 25, 50, 100, 1000mL.
- Equipo medidor de pH
- Pipetas volumétricas de 1 y 10 mL
- Resina Bio-Rad Cl-5
- Cartuchos Sep-Pak C18
- Equipo Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC),
- Tubos Falcon de 50mL
- Papel Watman No.4

6. PROCEDIMIENTO

1.1 PRE - ACONDICIONAMIENTO DE LA RESINA BIO-REX 5

Pesar 0.5 gramos de resina en una vaso de 50mL, adicionar 3mL de solución de Carbonato de Sodio 0.5M mezclar y filtrar, descartar la solución, adicionar nuevamente 3mL de Carbonato de Sodio 0.5M, filtrar y descartar la solución, lavar la resina con 3mL de agua destilada.

1.2 PRE - ACONDICIONAMIENTO DEL CARTUCHO SEP – PAK C18

Pasar por el cartucho 0.5mL de Metanol y lavar con 3mL de agua destilada por dos veces.

1.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN

- a) En un tubo graduado de 50mL, pesar 2 gramos de polvo de cacao, añadir 20mL de agua ultrapura o bidestilada y agitar en un homogenizador de tubos durante 1 minuto.
- b) Centrifugar a 9000rpm hasta obtener un sobrenadante claro sin partículas suspendidas, filtrar en papel Whatman Nº 4.
- c) Tomar 10mL del filtrado y ajustar a pH 8-9 con solución de NH₄OH 5N.
- d) Añadir 0.5 gramos de resina Bio-Rad CL5, a 2mL del filtrado a pH 8-9.
- e) Trasvasar el contenido del vaso a una columna con filtro de fibra de vidrio y lavar 3 veces con 3mL de agua destilada.

- f) Añadir 3mL de Ácido Sulfúrico 0.01N por tres veces y recoger el eluido sobre un balón de aforo de 10mL, llevar a volumen con agua bidestilada.
- g) Eliminar las interferencias de polifenoles, pasando el extracto por un cartucho SEP-PAK C18 previamente acondicionado y filtrar a través de una membrana Millipore de 0.22 µm.

6.4 CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Injectar 10µL del extracto purificado en el HPLC bajo las siguientes condiciones:

- Columna: Bio-Rad HPX-87H (300 X 7.8mm)
- Temperatura de Columna: 40°C
- Detector UV-VIS: Longitud de Onda 210nm
- Fase móvil: Ácido sulfúrico 0.01N
- Flujo: 0.7 mL/minuto

7. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación se realiza sobre la base de áreas mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{mg}{g} = c * \frac{AM}{AS} * \frac{50}{2}$$

c = Concentración del ácido orgánico en el estándar en 10µl

AM = Área de la muestra

AS = Área del estándar

50 = Factor de dilución

2 = Gramos de muestra pesada.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armijos, A. I. 2002. Características de acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación. Tesis Licenciada en Ciencias Químicas, Especialización Química Analítica. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 107 p
2. Caperos, J.; Girard J.P. 2000. Dosage d'acides organiques, sucres et d'alcool par HPLC. Manual de Calidad. Capítulo 10A. MO EC 009. Laboratorio Cantonal de Neuchatel, Suiza. p 1

3. Jinap, S.; Dimick, P. 1990. Acidic characteristics of fermented and dried cocoa beans from different countries of origin. *Journal of Food Science*. 55.(2): 547-550

6.6. CONTENIDO DE GRASA (MANTECA)

1. INTRODUCCIÓN

La grasa del cacao, es el componente cuantitativo y cualitativamente más importante de las semillas del cacao, es rica en ácidos palmíticos y esteáricos, tiene un intervalo de fusión relativamente estrecho entre 30 y 40°C. El comportamiento a la fusión que se percibe en la boca como muy agradable se debe a la existencia de unos pocos tipos de triacilglicérols, que contienen esencialmente Ácidos Palmítico, Esteárico y Oleico. También se explica su estabilidad a la auto oxidación y a la alteración microbiana por la composición en ácidos grasos (Belitz, 1997).

Se ha confirmado una variación natural en la grasa de cacao, tanto en sus propiedades físicas como químicas y en algunos casos estas variaciones son estacionales, lo que significa que las condiciones climáticas pueden ser un factor determinante. Algunas mantecas son blandas y otras son duras; las mantecas duras son preferidas y tienen una ventaja obvia en climas y estaciones cálidas.

Estas grasas se emplean principalmente para la obtención de chocolates y derivados. Se encuentra localizada en los cotiledones (50-58%) y se considera un producto secundario de la fabricación del cacao.

A nivel de laboratorio, la determinación de la grasa proveniente de almendras fermentadas, no fermentadas y secas, se realizó tomando como referencia el Método Oficial (920.157) de la AOAC (1997), el método analítico # 37 de la IOCCC (1996) adaptado a las condiciones del laboratorio por Villavicencio y Espín, 2001, utilizando un Sistema de Extracción Soxhlet.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La materia grasa del polvo de cacao, es extraída con Éter de Petróleo mediante extracción continua en Soxhlet por 12 horas, se recupera el solvente del extracto etéreo se seca la grasa en una estufa y se pesa

3. CAMPO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a las almendras de cacao secas, fermentadas, no fermentadas, polvo y licor de cacao.

4. REACTIVOS

- Agua destilada
- Éter de Petróleo (rango de ebullición de 40 a 60°C)

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Algodón libre de grasa
- Papel filtro de 16cm
- Dedal de extracción de 33mm x 88mm libre de grasa
- Núcleos de ebullición
- Desecador con desecante
- Estufa a 105°C
- Balones de 250mL con uniones esmeriladas
- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Equipo Extractor Soxhlet de capacidad 250 mL, con uniones esmeriladas
- Balones de destilación de 250mL

6. PROCEDIMIENTO

- a) Colocar en la estufa a 105°C un balón de destilación de 250mL con dos núcleos de ebullición durante dos horas.
- b) Sacar el balón de destilación en un desecador, dejar enfriar y pesar.
- c) Doblar el papel filtro de 16cm formando un sobre e introducir en el dedal de extracción.
- d) Pesar 5 gramos de cacao en polvo en el dedal de extracción.
- e) Cerrar el sobre de papel filtro, cubrir el dedal de extracción con algodón libre de grasa y colocar dentro del Extractor Soxhlet.
- f) Medir en una probeta 180mL de Éter de Petróleo y pasar al balón de destilación.
- g) Unir el Soxhlet con el balón de destilación y conectar al refrigerante.
- h) Colocar el equipo completo sobre el dispositivo de calentamiento, abrir el paso de agua para el refrigerante, extraer por ocho horas.
- i) Sacar el cartucho del Soxhlet, recuperar el solvente y sacar el balón con grasa a una estufa a 105°C por dos horas.
- j) Sacar los balones de la estufa a un desecador, dejar que se enfríe y pesar.

Observaciones:

- Para la operación de pesado de la muestra se debe tomar en consideración tres cifras decimales.
- El polvo de cacao se obtiene siguiendo el método de preparación de muestras.

7. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Grasa = \frac{P1 - P2}{P} * 100$$

P1 = Peso del balón con grasa (g)

P2 = Peso del balón vacío tarado (g)

P = Peso de la muestra (g)

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemist, USA). 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International: Cacao beans & its product.16 ed. Gaithersburg, USA. 2: 1-17
2. Belitz,H.D., Grosch, W. 1997. Química de los Alimentos: Café, té y cacao; Acribia, Zaragoza, España. 2d: 1011-1046
3. IOCCC (International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery). 1990. Methods of Analysis.Analytical Method 37. Determination of the fat content of cocoa power by Soxhlet extration. Bruselas, Bélgica.5p
4. Villavicencio, A. 2001. Caracterización química del nivel de fermentación y estudio de los parámetros de calidad del cacao (*Theobroma cacao* L.) producido en el Ecuador. Tesis de Licenciada en Ciencias Químicas, Especialización Química Analítica. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.128p

6.7. POLIFENOLES TOTALES, TANINOS Y NO TANINOS

1. INTRODUCCIÓN

Los polifenoles constituyen uno de los grupos de sustancias más numerosas y ampliamente distribuidas en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras fenólicas identificadas siendo los flavonoides el grupo más importante (Bravo, 1998). El chocolate está entre los alimentos ricos en polifenoles, particularmente en flavonoides de tipo catequinas, epicatequinas y sus polímeros conocidos como procianidinas, importantes por sus efectos funcionales en beneficio de la salud. Un grupo creciente de evidencias sugieren que el consumo regular de los productos del cacao o el uso de sus principios activos como agentes terapéuticos podrían influir favorablemente en la lucha contra las enfermedades cardiovasculares e incluso en otras patologías como el cáncer (Lange, 1970, Gutierrez,2002).

En el cacao los polifenoles son almacenados en las células pigmentarias de los cotiledones y en función del contenido de antocianinas en estas células, las almendras presentan un color que varía de blanco a violeta intenso. Este tipo de biomoléculas en el cacao han sido muy estudiadas desde hace mucho tiempo por que influyen en

las características organolépticas del grano como el color, el sabor astringente y amargo (Lange ; Shahidi , 1996; Gutiérrez, 2002).

Durante la fermentación del cacao, los polifenoles son sometidos a modificaciones bioquímicas internas en los cotiledones, por lo cual se ha observado una disminución de la concentración del conjunto de estos compuestos debido a reacciones de condensación oxidativa por vía enzimática y no enzimática, formando polímeros de alto peso molecular de tipo taninos insolubles, estos pigmentos poliméricos formados al final de estas reacciones le dan el color café-marrón típico del chocolate. Durante la fase aeróbica de la fermentación, la función más importante es la reducción de astringencia y el amargor por la oxidación de los polifenoles, que forman complejos con las proteínas y los péptidos (Shahidi, 1996; Calderón, 2002; Samaniego, 2012).

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Mediante el fraccionamiento de un extracto de cacao obtenido en una solución acuosa de Metanol al 70% y precipitaciones selectivas con gelatina, se separan compuestos fenólicos, taninos y no taninos. La concentración de estas fracciones, se determina luego de la purificación sobre Polivinilpirrolidina insoluble (PVP) usando el método colorimétrico del reactivo de Folin Ciocalteu y un Espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 760 nm.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Método aplicable a almendras de cacao secas, fermentadas, no fermentadas, polvo y licor de cacao libres de grasa.

4. REACTIVOS

- Metanol grado reactivo al 99.5 %
- Estándar Ácido Gálico Monohidratado 97.5 – 102.5%
- Reactivo de Folin & Ciocalteu, grado p.a.
- Carbonato de Sodio 99.5%
- Agua ultrapura o bidestilada
- Polivinilpirrolidina, Sigma P 6755
- Gelatina sin sabor, Gel 'hada
- Cloruro de Sodio puris, 99.5%, Fluka 71380
- Ácido Clorhídrico 36.5 - 38% HCl

4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Carbonato de Sodio al 20%:** Transferir cuantitativamente 20 g de Carbonato de Sodio en un balón volumétrico de 100mL disolver y completar a volumen con agua ultrapura.

- **Solución acuosa de Metanol:** Transferir cuantitativamente 700mL de Metanol en un balón volumétrico de 1000mL completar a volumen con agua ultrapura, (densidad de la solución 0.872g/mL).
- **Solución de gelatina al 1%:** Pesar 1.00g de gelatina y transferir a un balón volumétrico de 100mL. Disolver con una cantidad suficiente de agua destilada caliente y aforar a 100mL con agua ultrapura.
- **Cloruro de Sodio al 10%:** Pesar 10.0g de Cloruro de Sodio y transferir a un balón volumétrico. Disolver y aforar con agua destilada.
- **Ácido Clorhídrico 0,1N:** Transferir 8.60mL de HCl 36.5-38% a un balón volumétrico, disolver y aforar con agua destilada. La solución se estandarizó con Carbonato de Sodio anhidro (estándar primario).
- **Solución de gelatina / NaCl (1:1).** Mezclar un volumen de la solución de gelatina al 1% con un volumen igual de NaCl al 10% y homogenizar.
- **Preparación de estándar primario de 200ppm de Ácido Gálico:** Transferir 0.020g de Ácido Gálico en un balón volumétrico de 100mL, disolver y aforar con agua destilada.
- **Soluciones estándar para curva de calibración:** A partir de la solución estándar primario de 200ppm, transferir con precisión los volúmenes indicados en la tabla 2 a un balón volumétrico de 10mL y aforar con agua ultrapura:

Volumen de Estándar (mL)	Volumen de Agua (mL)	Concentración (ppm)
0.25	9.975	5
0.50	9.950	10
2.00	8.00	40
4.00	6.00	80
5.00	5.00	100
7.00	3.00	140

Tabla 2. Curva de calibración para análisis de polifenoles totales

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Papel filtro Whatman N° 4 y 5
- Balones volumétricos de 100mL
- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Agitador magnético
- Baño María
- Pipetas volumétricas de 5 y 1mL
- Embudos de vidrio para filtración 12cm de diámetro

- Espectrofotómetro UV- VIS
- Agitadores tipo Vortex
- Tubos de ensayo capacidad de 15mL
- Papel filtro cualitativo de 16cm
- Micropipeta automática de 100 a 1000mL
- Puntas para micropipeta automática
- Erlenmeyer tapa rosca de 125mL
- Vasos de precipitación de 10, 100 y 500mL

6. PROCEDIMIENTO

6.1. DESENGRASADO DE LA MUESTRA:

Proceda de acuerdo a lo descrito en la Sección 1. Método de preparación de muestras.

6.2. EXTRACCIÓN

- a) Pesar en un erlenmeyer 1g de polvo de cacao desengrasado con aproximación de 0,5mg y añadir 75mL de solución acuosa de Metanol al 70%.
- b) Mezclar en un agitador magnético a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- c) Filtrar el extracto a través de papel Whatman No.4 y aforar a 100mL en un balón volumétrico, con solución acuosa de Metanol al 70% (**Extracto crudo**).

6.3. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

- d) Transferir 5mL de extracto crudo a un balón volumétrico de 50mL y aforar con agua ultrapura (Extracto A). Se emplea para la determinación de polifenoles totales.

6.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS NO FENÓLICOS

- e) Tomar 10mL de extracto crudo y llevar a pH 3,5 con HCl 0.1N.
- f) Añadir 10mL de agua destilada y mezclar con 2g de Polivinilpolipirrolidina durante 10 minutos usando un equipo de agitación magnética.
- g) Filtrar a través de papel Whatman No.5 colectando el residuo en un balón volumétrico de 25mL de capacidad, aforar con agua destilada (Extracto B), utilizado para la determinación de compuestos no fenoles.

6.5. DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN FENÓLICA NO TANINOS

- h) Tomar 10 mL del extracto crudo y llevar a pH 4 con HCl 0.1N.
- i) Precipitar el extracto crudo añadiendo solución de Gelatina-NaCl (1:1) hasta ausencia de floculación.

- j) Centrifugar durante 15 minutos a 450rpm y transferir el sobrenadante a un balón volumétrico y aforar con agua ultrapura (Extracto C). Este extracto se emplea en la determinación de no taninos.

6.6. CUANTIFICACIÓN EN EL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VISIBLE

- k) Transferir cuantitativamente en un tubo de ensayo 1mL de los extractos A, B o C.
- l) Añadir 6mL de agua ultrapura o bidestilada y 1mL de reactivo de Folin & Ciocalteu, luego de tres minutos añadir 2mL de la solución de Carbonato de Sodio al 20%; agitar en el equipo Vortex y calentar en baño maría a 40°C por 2 minutos (Este procedimiento se realiza tanto para las muestras como para los estándares).
- m) Pasar la solución a una celda de vidrio y leer la absorbancia en un Espectrofotómetro UV-VIS bajo las siguientes condiciones:
- Longitud de onda: 760 nm
 - Temperatura: ambiente
 - Slit: 0.2nm

7. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación se realiza por comparación de la absorbancia de cada extracto en la curva de calibración y utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{mg}{g} \text{ Ácidogálico} = \frac{a * b * d * f}{p}$$

a = Concentración de Ácido Gálico obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L)

b = Volumen total de extracto (100 mL)

d = Factor de dilución (10)

f = Factor para transformar unidades (f = 0.001)

p = Peso de la muestra g

El contenido de las diferentes fracciones de los polifenoles se realiza utilizando las siguientes ecuaciones:

Fenoles totales: PT = A equivalentes de Ácido Gálico – B equivalentes de Ácido Gálico

No taninos totales: nT = C equivalentes de Ácido Gálico – B equivalentes de Ácido Gálico

Taninos Totales = PT – nT

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 56(11):317-333
2. Calderón, L. 2002. Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación con la calidad. Tesis Licenciada en Ciencias Químicas, Especialización Química Analítica. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 144p
3. Lange, H.; Fincke, A. 1970. Kakao und Schokolade. In L. Acker, K-G. Bergner & W. Diemair, *Handbuch der Lebensmittel* Band VI: Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz 210-309. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 37: 289-296
4. Shahidi F, Naczki M. 1995. Food phenolics: sources, chemistry, effects, and applications. Lancaster
5. Samaniego, I. 2012. Caracterización de la evolución de los polifenoles durante la fermentación del cacao: Un estudio de Espectroscopia de Infrarrojo Cercano NIRS y HPLC. Tesis de M.Sc. Universidad de Montpellier, Francia. P 5 - 7

6.8. PIGMENTOS ANTOCIÁNICOS

1. INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos vegetales solubles en agua y son responsables del color de flores y frutos de las plantas superiores. El término antocianina se refiere a los glucósidos de antocianidina (por ejemplo malvidina, cianidina). Las antocianinas y pigmentos poliméricos formados a partir de antocianinas por condensación con otros flavonoides son responsables del color del vino tinto (Bravo, 1998).

En el cacao las antocianinas constituyen aproximadamente el 4% del total de los polifenoles del cacao y esta fracción está formada principalmente de Cianidina 3- α -L- arabinosido y Cianidina 3- α -D-galactósido (Wollgast, 2000).

En el laboratorio se ha adaptado una metodología de análisis para determinar el contenido total de antocianinas en cacao utilizando Espectrofotometría Uv-Vis y tomando como referencia el método Colorimétrico, para determinar los pigmentos del cacao descrito en la International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery (Hasing, 2004).

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los pigmentos antociánicos del cacao son extraídos con una solución de Alcohol n-amílico acidificado con HCL 0.1N y posteriormente cuantificados por Espectrofotometría Uv-Vis a 544nm.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo se aplica a polvo de almendras de cacao secas, fermentadas, no fermentadas y licor de cacao.

4. REACTIVOS

- HCl fumante, concentración 36.5-38%, densidad 1.19
- HCl 0.1N
- Alcohol n-amílico acidificado con HCl 0.1N
- Carbonato de Sodio anhidro (Patrón Primario)

4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **HCl 0.1N:** Transferir 8.06mL de ácido HCl fumante a un balón aforado de 1000mL, llevar al volumen con agua destilada y homogenizar. Esta solución se estandariza con Carbonato de Sodio anhidro.
- **Saturación del Alcohol n-amílico con HCl:** Mezclar partes iguales de Alcohol n-amílico con HCl 0.1N.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Molino, Mr. Coffee, IDS-5
- Mortero de vidrio y pistilo de 30-40mL
- Bureta de 25mL
- Centrífuga Wifug, 3000 a 4000rpm
- Tubos de centrífuga de 25mL
- Pipetas volumétricas de 10mL
- Balones volumétricos de 25mL con tapas TS de vidrio
- Espectrofotómetro Uv-Vis
- Balanza analítica precisión de ± 0.1 mg
- Tubos de ensayo graduados de 25mL
- Malla de acero inoxidable de 42mesh
- Nitrógeno líquido

6. PROCEDIMIENTO

- a) Pesar con precisión de 0.1mg, aproximadamente 1g del material seco y no desengrasado en un mortero.
- b) Añadir 2mL de ácido clorhídrico 0.1N utilizando una bureta que contiene 20mL de ácido y triturar bien.
- c) Añadir el ácido restante, dejar reposar por una hora, mezclando ocasionalmente.

- d) Transferir el contenido del mortero a un tubo de centrifuga, sin enjuagar el mortero.
- e) Centrifugar 10 minutos a una velocidad de 3000 a 4000rpm.
- f) Tomar 10mL del sobrenadante del extracto ácido con ayuda de una pipeta volumétrica y transferir a un tubo de ensayo graduado.
- g) Añadir 10mL de Alcohol n-amílico saturado con HCl 0.1N y agitar por un minuto.
- h) Transferir a un tubo de centrifuga y separar las dos fases, centrifugando por 5 minutos, a una velocidad de 3000 a 4000rpm.
- i) Tomar una alícuota de la capa superior con una pipeta y transferir a una celda de vidrio o cuarzo para el análisis espectrofotométrico.
- j) Medir la absorbancia de los extractos a una longitud de onda de 544nm, empleando la solución de Alcohol n-amílico saturado con HCl 0.1N como blanco.

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan en valores de absorbancia obtenidos a 544nm.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 56(11):317-333
2. Hasing, M.E. 2004. Estudio de la variación en los contenidos de polifenoles y alcaloides en almendras de cacao por efecto de los procesos de fermentación y tostado. Tesis Doctorado en Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 128p
3. IOCCC (International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery). 1990. *Methods of Analysis*. Analytical Method 8. Colorimetric determination of the cocoa pigments. Bruselas, Bélgica. 1p
4. Wollgast, J.; Elke, A. 2000. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Journal of Food Research International*, 33:423-447.

6.9. CATEQUINA, EPICATEQUINA Y PROCIANIDINAS B1, B2 Y C1

1. INTRODUCCIÓN

Los polifenoles están presentes en una cantidad significativa en las almendras de cacao (hasta un 20% en masa). En el cacao los flavan-3-ols son los polifenoles mayoritarios (37%), siendo la epicatequina el polifenol más abundante con un 35% del total de polifenoles del cacao; de igual manera en las almendras del cacao existen polifenoles oligómeros, que son polímeros formados por la unión de varios

monómeros de (+)-epicatequina y (-)-epicatequina conocidos como procianidinas, ellos representan el 58% de los polifenoles del cacao (Wollgast, 2000).

Para la identificación y cuantificación de los flavan-3-ols del cacao se ha adaptado una metodología analítica, tomando como referencia el método de análisis de polifenoles en frutas y vegetales del Laboratorio de Investigación de la Calidad Nutricional y Funcional de los Alimentos del CIRAD-UMR-QUALISUD de Francia, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC, acoplado a un Detector de Arreglo de Diodos DAD, (Samaniego, 2012).

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los polifenoles del polvo de cacao son extraídos con una solución de acetona/agua/ácido fórmico al 70/30/0.1 v/v/v, mediante agitación continua durante 3 minutos en un vortex, 10 minutos en el ultrasonido y 10 minutos en la centrífuga. El extracto obtenido se lo lleva a un balón de 25mL, se repite la extracción por 4 ocasiones, finalmente se purifica el extracto con membrana de 0.22µm y se realiza la identificación y cuantificación utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplado a detector de Arreglo de Diodos (DAD).

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este método se aplica a las almendras de cacao secas fermentadas, no fermentadas en el polvo y el licor de cacao.

4. REACTIVOS

- Acetona, grado p.a.
- Ácido Fórmico, grado p.a. 98-100%
- Acetonitrilo, grado HPLC.
- Agua ultrapura o bidestilada.
- Metanol grado HPLC.

1.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución Acetona/Agua/Ácido Fórmico (70/30/0.1):** Transferir cuantitativamente 70mL de acetona grado p.a en un balón volumétrico de 100mL, aforar con agua bidestilada y adicionar 0.1mL de Ácido Fórmico p.a.
- **Fase móvil: Agua/Acetonitrilo/Ácido Fórmico (99/0.8/0.2):** Transferir cuantitativamente 8mL de Acetonitrilo grado HPLC y 2mL de Ácido Fórmico grado p.a., en un balón aforado de 1000mL, aforar con agua bidestilada y filtrar al vacío utilizando membrana Millipore HV de 0.45µm.
- **Solución estándar:** Pesar 0.01g de estándar de Catequina, Epicatequina, Procianidinas, B1, B2 y C1, en un balón de 100mL y aforar con Metanol.

4. EQUIPOS Y MATERIALES

- Membrana de 0.45 μm de poro
- Membrana de 0.22 μm de poro
- Jeringas plásticas de 10mL
- Balones volumétricos ámbar de 25mL
- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Tubos de centrifuga con capacidad de 10mL
- Pipetas volumétricas de 5 y 10mL
- Baño ultrasonido
- Agitador de tubos
- Centrífuga
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC)
- Viales ámbar capacidad 2mL

5. PROCEDIMIENTO

- a) Pesar aproximadamente 0.3g de muestra de polvo de cacao desengrasado en un tubo de centrifuga de capacidad 10mL.
- b) Adicionar 3mL de solución Acetona/Agua/Ácido Fórmico (70/30/0.1) v/v/v.
- c) Tapar el tubo de centrifuga, agitar durante 3 minutos en un vortex, posteriormente agitar en un baño ultrasonido por 10 minutos y centrifugar por 10 minutos a 5700rpm.
- d) Pasar la solución sobrenadante a un balón volumétrico ámbar de 25mL.
- e) Repetir el procedimiento de extracción (b y c) por 4 ocasiones y aforar a 25mL con la solución de Acetona/Agua/Ácido Fórmico (70/30/0.1) v/v/v.
- f) Filtrar la solución por membrana de 0.22 μm y colocar en viales ambar (aproximadamente 1.5mL).
- g) Inyectar en el HPLC, utilizando las siguientes condiciones cromatográficas:
 - Columna: AGILENT Eclipse XDB-C18 4.6 x 250mm, tamaño de partícula de 5 μm
 - Temperatura de columna: 35°C
 - Flujo: 0,8mL/min
 - Volumen de Inyección: 20 μL
 - Detector: DAD. Longitud de Onda 280nm
 - Fase móvil. A: Agua/Acetonitrilo/Ácido Fórmico (99/0.8/0.2) v/v/v. B: Acetonitrilo.

- Bomba binaria, gradiente de elución: 5% de B a 100% de B en 67 minutos.

6. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración preparada previamente en el equipo, el cálculo de la concentración de cada polifenol se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{mg}{g} \text{ Polifenoles} = \frac{C * V_t * F_d}{p}$$

C = Concentración en mg/L obtenida a partir de la curva de calibración

V_t = Volumen total de extracto (0.025L)

F_d = Factor de dilución

p = Peso de la muestra g

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Samaniego, I. 2012. Caracterización de la evolución de los polifenoles durante la fermentación del cacao: Un estudio de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano NIRS y HPLC. Tesis de M.Sc. Universidad de Montpellier. Francia., p 11-13
2. Wollgast, J.; Elke, A. 2000. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Journal of Food Research International, **33**: 423-447

6.10. ALCALOIDES

1. INTRODUCCIÓN

La Teobromina y la Cafeína constituyen más del 99% del contenido de purinas en la especie *Theobroma cacao*, casi todo el remanente son trazas de Teofilina y Salsolinol. Estos alcaloides no revelan transformaciones químicas durante la fermentación, pero pierden alrededor del 20% de la Teobromina presente en los cotiledones frescos en el curso de la fermentación por difusión en los tejidos y migración a los tegumentos de las almendras, cuyo contenido aumenta considerablemente. Esta pérdida de Teobromina, es en gran parte responsable de la disminución del amargor de las almendras "bien fermentadas" (Wakao, 2002).

La astringencia en los granos de cacao, es causada por los polifenoles, mientras que el sabor amargo es causado por la sinergia de las reacciones entre la Teobromina, Cafeína y las Dicotopiperazinas.(Biehl,1996). La Teobromina (3-7-dimetilxantina) y la Cafeína (1-3-7-trimetilxantina) estarían ligadas a los taninos para formar en los cotiledones frescos compuestos complejos relacionados con los atributos

de sabor del cacao. Desde el punto de vista fisiológico es de gran importancia el contenido de Teobromina, a la que debe el cacao su marcada acción estimulante (Wakao, 2002).

La determinación de Teobromina y Cafeína, permite establecer la relación Teobromina/ Cafeína (T/C), parámetro medible y promisorio para la diferenciación de cacaos por su origen.

El método propuesto está basado en el Método Oficial 980.14 de la AOAC (1995) modificado por Marcos Paiva del Departamento de Horticultura de la Universidad de Purdue, USA y el Método MO EC 009, del Laboratorio Cantonal de Neuchatel Suiza.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los alcaloides del cacao Teobromina, Cafeína y Teofilina, son extraídos del polvo de cacao desengrasado en medio acuoso y cuantificados por HPLC, por medio de un detector Uv-Vis, utilizando la Teofilina como estándar interno.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento se aplica a las muestras de almendras secas fermentadas, no fermentadas, polvo y licor de cacao libres de grasa.

4. REACTIVOS

- Agua bidestilada
- Metanol, grado HPLC
- Cafeína anhidra 99.9%
- Teobromina anhidra 99.9%
- Teofilina anhidra 99.9%
- Éter de Petróleo (rango de ebullición de 40 a 60°C)
- Hexacianoferrato de Potasio trihidratado, grado p.a.
- Sulfato de Zinc dihidratado, grado p.a.
- Agua ultrapura o bidestilada

4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución Estándar Interno:** Transferir cuantitativamente 100mg de Teofilina al 99.9%, en un balón volumétrico de 200mL, completar a volumen con agua ultrapura o bidestilada.

- **Solución Estándar Madre:** Transferir cuantitativamente 20mg de Cafeína anhidra al 99.9% y 20mg de Teobromina al 99.9%, en un balón volumétrico de 200mL, completar a volumen con agua ultrapura o bidestilada.
- **Solución Estándar 100ppm:** Transferir cuantitativamente 10mg de Cafeína anhidra al 99.9% y 10mg de Teobromina al 99.9%, en un balón volumétrico de 100mL, añadir 10mL de estándar interno y completar a volumen con agua ultrapura o bidestilada.
- **Solución Carrez 1:** Transferir cuantitativamente 15g de Hexacianoferrato de Potasio trihidratado en un balón volumétrico de 100mL, y completar a volumen con agua ultrapura o bidestilada.
- **Solución Carrez 2:** Transferir cuantitativamente 30g de Sulfato de Zinc dihidratado en un balón volumétrico de 100mL, y completar a volumen con agua ultrapura o bidestilada.
- **Fase Móvil: Metanol: Agua. 25:75 (v/v).** Mezclar 250mL de Metanol grado HPLC con 750ml de agua ultrapura. Homogenizar y filtrar a través de membrana millipore de 0.22µm, desgasificar la solución en un baño ultrasonido por 10 minutos.
- **Soluciones Estándar para curva de calibración:** A partir de la solución estándar Madre se realiza la curva tomando en consideración lo indicado en la tabla 3:

Volumen de Estándar (mL)	Volumen de Agua (mL)	Volumen Estándar Interno (mL)	Concentración de Cafeína y Teobromina (ppm)
5	85	10	5
20	70	10	20
50	40	10	50
80	10	10	80

Tabla 3. Curva de calibración para análisis de alcaloides en cacao

Nota: Dentro de la curva de calibración se añade el punto de 100ppm, tomando directamente de la solución estándar de 100ppm.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Papel filtro cualitativo de 16cm
- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Probetas de vidrio borosilicato de 100, 50, 1000mL
- Erlenmeyer de vidrio borosilicato de 250mL con tapa rosca.
- Vasos de precipitación de borosilicato de 10, 100 y 600mL
- Embudos de filtración de vidrio 12.5cm de diámetro

- Sistema de extracción al vacío compuesto de kitasato de 1000mL, reservorios de 500mL con membrana de filtro poroso y pinza metálica.
- Micropipeta automática de 100 a 1000µL
- Papel filtro de 12.5cm de diámetro Whatman 4 o equivalente
- Baño Ultrasonido
- Placa de calentamiento

6. PROCEDIMIENTO

6.1 DESENGRASADO DE LA MUESTRA

Proceder de acuerdo a lo descrito en la Sección 1: Preparación de muestras.

6.2. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

- En un erlemeyer de 250mL pesar 0.3g de muestra desengrasada.
- Adicionar 90mL de agua bidestilada y 10mL de estándar interno.
- Conducir la muestra a la placa de calentamiento y hervir por 30 minutos aproximadamente hasta que el volumen se reduzca a la mitad (50mL).
- Sacar el erlenmeyer con el extracto de la plancha de calentamiento y añadir inmediatamente 1mL de solución Carrez 1 y Carrez 2.
- Filtrar el extracto a través de papel Whatman N° 4 en un balón volumétrico de 100mL, lavar el filtrado y aforar con agua ultrapura o bidestilada.
- Tomar una alícuota del filtrado, pasar por una membrana millipore de 0.22µm y colocar en un vial para inyección en el HPLC.
- El extracto restante taparlo y almacenar en refrigeración.

6.3. CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Inyectar 20µL en el HPLC bajo las siguientes condiciones:

- Columna: STR ODS II; 150mm x 4.6mm ID.
- Temperatura de Columna: ambiente
- Detector UV-VIS: Longitud de Onda 273nm
- Fase móvil: Metanol:Agua (25:75 v/v)
- Flujo: 1mL/minuto
- Volumen de Inyección: 20µL
- Tiempo de Cromatografía: 15 minutos

7. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo y utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Alcaloide} = \frac{a * b * f}{p} * 100$$

a = Concentración de alcaloide obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L)

b = Volumen total de extracto (100mL)

f = Factor para transformar unidades (f = 0.000001)

p = Peso de la muestra en gramos

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemist, USA). 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International: Cacao beans & its product.16 ed. Gaithersburg, USA. 2: 1-17
2. Caperos, J.; Girard J.P. 2000. Dosage de la caféine, théobromine et théophylline. Manual de Calidad. Capítulo 10A. MO EC 009. Laboratorio Cantonal de Neuchatel, Suiza. p 1
3. Paiva, M.; Janick, W. 1990. Alkaloid variation in Teobroma cacao L. IN: International Cocoa Research Conference. Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.p 99
4. Wakao, H. 2002. Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional durante el proceso de beneficio. Tesis de Licenciada en Ciencias Químicas, Especialización Química Analítica. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 91p

6.11. AZÚCARES

1. INTRODUCCIÓN

El rol de los azúcares en los procesos de fermentación y tostado del cacao es fundamental, así la transformación de los azúcares en alcohol y dióxido de carbono, la elevación del pH debido al consumo del Ácido Cítrico y la desagregación de la pulpa permiten la penetración de pequeñas cantidades de aire creando condiciones favorables al desarrollo de bacterias y por tanto de la fase microbiana de la fermentación (Ilangantileke, 1991).

La Sacarosa en las almendras de cacao frescas es hidrolizada a Glucosa y Fructosa durante la fermentación, presentando bajos contenidos en granos poco o no fermentados. La concentración óptima de azúcares reductores en el grano de cacao, se alcanza al mismo tiempo del máximo desarrollo del sabor y coincide aproximadamente con la máxima concentración de aminoácidos libres, aspectos

útiles para definir el grado de fermentación de las almendras (Rohan, 1967). Los azúcares reductores que se encuentran en las almendras fermentadas forman parte de los precursores del aroma. Durante la torrefacción, intervienen en las reacciones complejas con los ácidos aminados que provienen de la degradación de las proteínas para constituir los aldehídos volátiles responsables de los aromas característicos de cada variedad de cacao (Brito, 2000; Pazmiño, 2004).

Los procedimientos analíticos de laboratorio para la evaluación de los contenidos de Glucosa, Fructosa y Sacarosa, en cacao, se realizaron con base a las metodologías propuestas por Caperos et Girard., del Laboratorio Cantonal de Neuchatel Suiza, estas metodologías fueron validadas y adaptadas a las condiciones de los laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, obteniendo un protocolo único aplicado a todas las muestras analizadas.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los azúcares son extraídos del polvo de cacao en una solución acuosa de Metanol al 80% mediante agitación magnética por una hora, el extracto obtenido es filtrado en un balón volumétrico y se afora con agua bidestilada a 50mL, una alícuota del extracto se pasa por membrana millipore de 0.22µm y es analizado por HPLC, acoplado al detector de Índice de Refracción (IR).

2.3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento se aplica a muestras de almendras de cacao secas, fermentadas, no fermentadas, polvo y licor de cacao

4. REACTIVOS

- Agua ultrapura
- Metanol, grado HPLC
- Acetonitrilo, grado HPLC
- D (-) Fructosa anhidra, 99%
- D (+) Glucosa anhidra, 99%
- D (+) Sacarosa anhidra 99%

4.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución estándar 1g/L:** Transferir cuantitativamente 100mg de Glucosa, Fructosa y Sacarosa, en un balón volumétrico de 100mL, disolver y completar a volumen con agua ultrapura.
- **Fase móvil Acetonitrilo:Agua 78:22 (v/v):** Mezclar 780mL de Acetonitrilo grado HPLC con 220mL de agua ultrapura. Homogenizar y filtrar a través de membrana millipore de 0.22µm, desgasificar la solución en un baño ultrasonido por 10 minutos.

- **Solución estándar de calibración:** A partir de la solución estándar de 1g/L, inyectar 10, 20, 30 μ L en el HPLC para obtener concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0g/L.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Probetas de vidrio borosilicato de 100, 50mL
- Erlenmeyer de vidrio borosilicato de 250mL con tapa rosca
- Vasos de precipitación de borosilicato de 10, 100 y 600mL
- Embudos de filtración de vidrio 12.5cm de diámetro
- Sistema de extracción al vacío compuesto de kitasato de 1000mL, reservorios de 500mL con membrana de filtro poroso y pinza metálica
- Micropipeta automática de 100 a 1000 μ L
- Puntas para micropipeta automática
- Papel filtro de 12.5cm de diámetro Whatman 4 o equivalente
- Baño ultrasonido
- HPLC, acoplado a detector de Índice de Refracción (IR)
- Agitador rotativo

6. PROCEDIMIENTO

6.1. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

- En un erlenmeyer de 125mL tapa rosca, pesar 5g de muestra.
- Adicionar 25mL de Metanol al 80%.
- Colocar la muestra en el agitador rotativo, y agitar por una hora.
- Filtrar el extracto a través de papel Whatman N° 4 en un balón volumétrico de 50mL, lavar el filtrado y aforar con agua bidestilada.
- Tomar una alícuota del filtrado, pasar por membrana millipore de 0.22 μ m y colocar en un vial para inyección en HPLC.
- El extracto restante taparlo y almacenar en refrigeración.

6.2. CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Inyectar 20 μ L en el HPLC bajo las siguientes condiciones:

- Columna: Shodex Asahipak NH₂P. 4.6 x 250mm

- Temperatura de Columna: 30°C
- Detector IR: temperatura ambiente
- Fase móvil: Acetonitrilo:Agua (78:22 v/v)
- Flujo: 0.8mL/minuto
- Volumen de Inyección: 20µL

7. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo y utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{azúcar} = \frac{a * b * f}{p} * 100$$

a = Concentración de azúcar obtenida a partir de la curva de calibración (g/L)

b = Volumen total de extracto (25mL)

f = Factor para transformar unidades (f = 0.001)

p = Peso de la muestra (5g)

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brito, E. S.; Perzoa, N. H.; Gallão, M. I.; Cortelazzo, A. L. Fevereiro, P. S.; Braga, M. R. 2000. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation, drying and roasting. Journal of the Science of Food and Agriculture. 81: 281-288
2. Caperos, J.; Girard J.P. 2000. Dosage des sucres.par HPLC. Manual de Calidad. Capitulo 10A. MO EC 040 y MO EC 052, Laboratorio Cantonal de Neuchatel, Suiza. p 4
3. Ilangantileke, S.; Wahyudi, Y.; Bailon, M. Assessment methodology to Predict Quality of Cocoa Bean for Export. Journal of Food Quality. 1991. Vol 14.p.481-496
4. Pazmiño, K. 2005. Estudio del comportamiento de Fructosa, Glucosa y Sacarosa en almendras de cacao de producción nacional durante la fermentación. Tesis Doctorado en Química. Riobamba, Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 115p

6.12. COMPONENTES VOLÁTILES

1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios se han enfocado a lo largo de los últimos años en la identificación de los componentes químicos volátiles responsables del sabor y aroma del cacao, refiriendo alrededor de 500 componentes químicos, entre ellos 94 Pirazinas que representan en número la fracción mayoritaria. El aroma del cacao, incluye varias fracciones determinadas en los granos de cacao frescos, fermentados y secos; una constituida por alcoholes y ésteres, una fracción volátil que se produce en la fermentación y una fracción que se desarrolla durante el tostado (Armijos, 2002).

Los cambios observados en el sabor y aroma del cacao por efecto de la fermentación, están vinculados entre otros, con los compuestos químicos volátiles, así un sabor base a chocolate depende de compuestos como las pirazinas y aldehídos, un aroma frutal está relacionado con los ésteres, la astringencia y el amargor con los polifenoles, purinas y dicetopirazinas, el sabor a avellana o nuez se ha reportado de la formación de polipéptidos-fenoles y pirazinas, la acidez se ha relacionado con el ácido láctico y acético (Brown, 1957). El estudio de los precursores de aromas y los perfiles aromáticos del cacao durante todo el proceso poscosecha, la torrefacción y la fabricación de chocolates, constituyen una de las herramientas fundamentales para establecer la calidad de las almendras y su principal producto de transformación, el chocolate.

En el laboratorio con la finalidad de evaluar los perfiles aromáticos en cacao se adaptó una metodología analítica tomando como referencia los estudios realizados por Alvarez (2008). La preparación de las muestras se realizó por Micro Extracción en Fase Sólida y Headspace (HS/SPME), técnica basada en la sorción de los analitos en un material polimérico que recubre a una fibra de sílica y posterior desorción térmica para liberar los mismos mediante inyección automática en un sistema Cromatógrafo de Gases GC (Agilent Technologies 7890 A) acoplado a detector FID y a un detector selectivo de masas MSD (Agilent 5975C XL EI/CI MSD).

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los componentes volátiles son extraídos directamente del polvo de cacao mediante Micro Extracción en Fase Sólida y Headspace (HS/SPME), posteriormente son desorbidos en el Cromatógrafo de Gases para su separación, cuantificación e identificación utilizando detectores FID y Espectrometría de Masas.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento se aplica a muestras de almendras de cacao secas fermentadas, no fermentadas, polvo y licor de cacao.

4. REACTIVOS

- Agua ultrapura o bidestilada.
- Estándar de 2 Heptanona, >99%
- Estándar de Pirazina, >99%
- Estándar de 2 Metilpirazina, >99%

- Estándar de 2-3-5 Trimetilpirazina, >99%
- Estándar de Linalol, >99%
- Estándar de Benzaldehído, >99%
- Estándar de Ácido Butírico, >99%
- Cloroformo, grado HPLC

4.1 PREPARACION DE REACTIVOS

- **Solución estándar de 2 Heptanona de 200ppm:** Pesar 0.02g de estándar 2 Heptanona en un balón de 100mL, disolver y aforar con Cloroformo grado HPLC.
- **Solución estándar de Pirazina de 200ppm:** Pesar 0.02g de estándar Pirazina en un balón de 100mL, disolver y aforar con Cloroformo grado HPLC.
- **Solución estándar de 2 Metilpirazina de 200ppm:** Pesar 0.02g de estándar 2 Metilpirazina en un balón de 100mL, disolver y aforar con Cloroformo grado HPLC.
- **Solución estándar de 2-3-5 Trimetilpirazina de 200ppm:** Pesar 0.02g de estándar 2-3-5 Trimetilpirazina en un balón de 100mL, disolver y aforar con Cloroformo grado HPLC.
- **Solución estándar de Linalol de 200ppm:** Pesar 0.02g de estándar Linalol en un balón de 100mL, disolver y aforar con Cloroformo grado HPLC.
- **Solución estándar de Benzaldehído de 200ppm:** Pesar 0.02g de estándar Benzaldehído en un balón de 100mL, disolver y aforar con Cloroformo grado HPLC.
- **Solución estándar de Ácido Butírico de 200ppm:** Pesar 0.02g de estándar Ácido Butírico en un balón de 100mL, disolver y aforar con Cloroformo grado HPLC.

5. EQUIPOS Y MATERIALES:

- Balanza analítica de precisión 0.0001g
- Molino para granos de cacao y café
- Micropipeta automática de 100 a 1000 μ L, con puntas
- Viales de 10mL, balones de 100mL aforados
- E spátula para pesaje de muestra
- Cromatógrafo de Gases, acoplado a Detector FID y Espectrómetro de Masas

6. PROCEDIMIENTO

- a) Pesar 2.8 gramos de muestra en un vial de 10mL de capacidad.
- b) Agregar 3mL de agua ultrapura.
- c) Colocar el vial con la muestra en el dispositivo de calentamiento del Head Space para posterior extracción mediante SPME. La muestra extraída en la fibra se

desorbe directamente en el Cromatógrafo de Gases para la separación, identificación y cuantificación de los compuestos volátiles; utilizando las siguientes condiciones:

6.1. EXTRACCIÓN POR HEAD SPEACE Y SPME

- Fibra PDMS/DVB 65µm, sílica fundida
- Tiempo de pre-incubación: 1200 segundos
- Temperatura de Incubación: 60°C
- Velocidad de agitación de pre – incubación: 500rpm
- Tiempo de agitación: 5 segundos
- Tiempo de pos – agitación: 2 segundos
- Penetración de la fibra en el vial: 22mm
- Tiempo de Extracción: 3600 segundos
- Tiempo de desorción: 240 segundos
- Tiempo de acondicionamiento de la fibra: 3600 segundos

6.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

- Columna: DB-WAXETR, 60m x 0.250mm x 0.50µm; 30°C a 250°C
- Temperatura de Columna: 140°C (5 minutos), 4°C/min hasta 240°C
- Temperatura de detector (FID): 250°C
- Flujo de aire: 250mL/min
- Flujo de hidrogeno: 45mL/min
- Nitrógeno: 20mL/min
- Temperatura del Inyector: 220°C
- Gas portador: Helio
- Detector de Masas: Cuadrupolo Hiperbólico Monolítico; Ionización por Impacto electrónico 70eV

7. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los compuestos volátiles que forman parte del perfil aromático del cacao fueron identificados de acuerdo a sus características de retención cromatográfica y espectros de masas, comparando con la base de datos NIST y Wiley 8.0.

La cuantificación se realiza mediante comparación de las áreas de los compuestos de la muestra con relación al área del estándar de Linalol, expresando los resultados como mg equivalentes de Linalol por gramo de cacao.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez, C. 2008. Caracterización y tipificación de los parámetros físicos, químicos, físico-químicos y componentes del sabor y aroma de una población de cacao criollo híbrido de Venezuela. Tesis Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela.
2. Armijos, A.I. 2002. Características de acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación. Tesis Licenciada en Ciencias Químicas, Especialización Química Analítica. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 107 p
3. Brown, H.B. 1957. Changes observed in cocoa due to fermentation and their relation to chocolate flavor; IN: The Cocoa, Chocolate and Confectionery Alliance: Proceeding. Londres, Inglaterra. p 165-167

6.13. ÁCIDOS GRASOS

1. INTRODUCCIÓN

La grasa del cacao se considera como uno de los componentes más importantes de la almendra, debido a sus propiedades físicas (reología y textura), propiedades químico-nutricionales (composición de ácidos grasos) y propiedades organolépticas, por las cuales existe una alta demanda en la industria alimentaria. Estas características, que la diferencian de las otras grasas vegetales comestibles, son muy útiles en la fabricación de una gran variedad de productos en las industrias del chocolate, cosméticos y farmacéuticos.

La cantidad de manteca de cacao y el perfil de ácidos grasos en el cacao y el producto final de transformación el chocolate, dependen de las condiciones del cultivo, la variedad de cacao entre otros factores. Se ha reportado en varios estudios que cuantitativamente los ácidos; Palmítico C16:0 (>25%), Esteárico C18:0 (>33%) y Oleico C18:1 (> 34%), son los ácidos grasos más importantes y su concentración depende del origen geográfico de las almendras de cacao.

Los triglicéridos de la manteca de cacao son una combinación de ácidos grasos saturados AGS (Palmítico y Esteárico) y de ácidos grasos insaturados AGI (Oleico y Linoléico) los cuales se encuentran en niveles significativos y bajo la forma de triglicéridos monoinsaturados.

Con la finalidad de establecer los perfiles de ácidos grasos como herramienta de calidad del cacao, se adaptó una metodología de análisis tomando como referencia el estudio realizado por Villavicencio, 2001 y el método AOAC 996.06.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La grasa extraída del cacao se somete a una reacción de esterificación utilizando una solución alcohólica de Hidróxido de Potasio y una solución alcohólica de Ácido Clorhídrico en baño maría a ebullición. Los ácidos grasos esterificados se extraen con Hexano y se concentran a sequedad, se reconstituyen en 2mL de

Hexano y se cuantifican e identifican mediante Cromatografía de Gases con detector de flama FID.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento se aplica a muestras de grasa de almendras de cacao secas fermentadas, no fermentadas, polvo y licor de cacao.

4. REACTIVOS

- Hexano, grado HPLC
- Hidróxido de Potasio, p.a.
- Ácido Clorhídrico, p.a.
- Agua ultrapura o bidestilada
- Metanol, grado HPLC
- Sulfato de Sodio, anhidro
- Estándar F.A.M.E. mix C4 a C24 (100mg)

4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución KOH/Metanol 0.5M:** Pesar 2.8g de KOH en un balón aforado de 100ml. Aforar con Metanol grado HPLC.
- **Ácido Clorhídrico en Metanol 4:1 v/v:** Transferir con una probeta 80mL de Ácido Clorhídrico a un balón volumétrico de 100mL y aforar con Metanol grado HPLC.
- **Solución estándar de Ácidos Grasos 10000ppm:** Abrir la ampolla del estándar y adicionar 1mL de Hexano grado HPLC, agitar y pasar a un balón volumétrico de 10mL, repetir la adición del Hexano grado HPLC, por 5 veces agitar y pasar al balón, aforar a 10mL con Hexano grado HPLC.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Cromatógrafo de Gases con detector FID
- Micropipeta de 100µL y 1000µL
- Balanza analítica de precisión 0.1mg
- Agitador de tubos
- Tubos de ensayo con tapa rosca para esterificación de muestras
- Vasos de precipitación
- Pipetas Pasteur. Pera de succión
- Baño de agua

- Gradilla, espátula
- Viales ámbar capacidad 2mL

6. PROCEDIMIENTO

- Pesar 0.05g de muestra en tubos de ensayo con tapa rosca.
- Adicionar 1mL de solución KOH/Metanol 0.5M.
- Tapar bien el tubo y colocar en un baño de agua a ebullición durante 10 minutos.
- Sacar los tubos y añadir 0.4mL de HCL/Metanol 4:1 v/v.
- Tapar bien el tubo y colocar en un baño de agua a ebullición durante 25 minutos.
- Sacar los tubos del baño de agua y dejar enfriar a temperatura ambiente. Luego añadir 2mL de agua bidestilada.
- Añadir 3mL de Hexano, agitar el tubo 30 segundos, colocar en la gradilla y dejar separar las fases.
- Con una pipeta pasteur extraer la fase orgánica (fase superior) y colocar en otro tubo de ensayo, repetir el paso g, por una ocasión más.
- Con una espátula adicionar Sulfato de Sodio anhidro en el tubo con el extracto etéreo para eliminar el residuo acuoso, pasar el extracto a otro tubo y secar con corriente de Nitrógeno a temperatura ambiente.
- Reconstituir la muestra con 2mL de Hexano, agitar y colocar en un vial ámbar.
- Inyectar en el Cromatógrafo de Gases con detector FID, programado con las siguientes condiciones:
 - Columna: Columna Capilar, SUPELCO SP TM 2560. 100m x 0,25mm x 0,2µm
 - Programación de Horno de Columna: 140°C x 5 minutos; Rampa: 4°C/min hasta 240 minutos
 - Gas Portador: Helio Ultrapuro (Flujo 1.0695mL/min)
 - Detector: FID
 - Temperatura del detector: 250°C
 - Inyector: Modo Split relación 40:1
 - Temperatura del Inyector: 260°C

7. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación se realizó por estandarización externa, relacionando las áreas de los Metil Esteres de ácido graso de la muestra, con su respectivo Metil Ester de ácido graso del estándar, mediante la siguiente ecuación:

$$\%AcidoGraso = \frac{\frac{Am}{As} * C_s * V_t * F}{p}$$

Am: Área del Metil Ester de ácido graso en la muestra

As: Área del Metil Ester de ácido graso correspondiente en el estándar

C: Concentración del Estandar (10000ppm)

Vt: Volumen total

F: Factor de transformación de Ester a ácido graso

P: Peso de muestra (0.05 gramos)

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemist, USA). 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International: Cacao beans & its product.16 ed. Gaithersburg, USA. 2: 1-17
2. Villavicencio, A. 2001. Caracterización química del nivel de fermentación y estudio de los parámetros de calidad del cacao (*Theobromacacao* L.) producido en el Ecuador. Tesis de Licenciada en Ciencias Químicas, Especialización Química Analítica. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.128p

6.14. DETERMINACIÓN DE OCRATOXINA A

1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos que constituyen un importante problema económico y de peligro para la salud. Entre las micotoxinas, la Ocratoxina A (OTA) representa una de las sustancias más difundidas y peligrosas. Químicamente la OTA es una isocumarina clorinada y se produce en forma natural en alimentos como: cereales, vino, especias, café, mostos, jugo de uva, productos lácteos, cacao, cerveza, frutos secos, entre otros. Actualmente, está clasificada por la International Agency for Research on Cancer (IARC) como posible carcinogénica para el hombre (Portilla, 2010)

La Ocratoxina A es producida principalmente por hongos del tipo *Aspergillus Ochraceus*, *A. Carbonarius* y por *Penicillium Verrucosum* en regiones tropicales y climas templados. El cacao puede actuar como un substrato para el crecimiento de hongos en condiciones climáticas favorables de los países donde es cultivado, así como también en los procesos de poscosecha, durante el transporte y en el almacenamiento. El Codex alimentarius establece criterios para evitar que se comercialicen productos que puedan ocasionar daños a la salud de los consumidores, determinando límites máximos permisibles de contaminación que deben ser cumplidos y respetados (Espin, 2010).

La determinación de OTA ha sido estudiada desde 1974 por varios investigadores, el análisis de OTA envuelve un complejo proceso de varios pasos en los que se incluye la extracción, purificación generalmente en fase sólida y cuantificación con técnicas cromatográficas; en la actualidad se ha implementado la utilización de columnas de inmunoafinidad para la purificación de la toxina y cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de fluorescencia; mediante estas técnicas se logra obtener extractos limpios, cromatogramas bien definidos sin interferencia y estabilidad de los tiempos de retención, permitiendo obtener límites de detección igual o inferiores a 0.20 partes por billón.

El laboratorio LSAIA del INIAP, dispone el Certificado de Acreditación N° OAE LEC 10-003 con alcance al ensayo "Ocratoxina A por HPLC-Fluorescencia en almendras y polvo de cacao", demostrando su competencia técnica.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Este procedimiento se basa en la extracción de la OTA en una solución de Metanol:Bicarbonato de Sodio 3% (7:3 v/v), una alícuota de este extracto se diluye con solución salina PBS 1%-Tween 20, se purifica en una columna de inmunoafinidad. El extracto purificado se seca, se redisuelve en solución Metanol:Agua:Ácido Acético. 70:30:1 (v/v/v), y se cuantifica por HPLC con detector de fluorescencia.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento se aplica a muestras de almendras de cacao secas fermentadas, no fermentadas, polvo y licor de cacao

4. REACTIVOS

- Agua purificada conductividad 18.2 MΩ/cm a 25°C
- Bicarbonato de Sodio grado p.a. pureza del 99.9%
- Acetonitrilo, grado HPLC
- Metanol, grado HPLC y grado p.a. 99.8%
- Cloruro de Potasio, grado p.a. pureza > 99.5%
- Cloruro de Sodio, grado p.a. pureza > 99.5%
- Dihidrógeno Fosfato de Potasio anhidro
- Hidrógeno Fosfato Disódico dihidratado
- Ácido Acético grado p.a. pureza del 99.8%
- Gas nitrógeno al 99.9%.de pureza
- Tolueno >99.9%
- Tween 20

4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Solución Buffer Fosfato Salino PBS 1%-Tween 20:** Transferir cuantitativamente e individualmente 0.2g de Dihidrógeno Fosfato de Potasio, 1.5g de Hidrógeno Fosfato Disódico Dihidratado, 8.0g de Cloruro de Sodio, 0.2g de Cloruro de Potasio, en un balón volumétrico de 1000mL completar a volumen con agua ultrapura, agregar 2 gotas de Tween 20 y homogenizar vigorosamente.
- **Solución Bicarbonato de Sodio al 3%:** Pesar 30g de Bicarbonato de Sodio, transferir a un balón de 1000mL y completar el volumen con agua purificada y homogenizar.
- **Solución de Extracción:** Mezclar 700mL de Metanol grado p.a. y 300mL de Bicarbonato de Sodio al 3%, homogenizar.
- **Fase móvil: Acetonitrilo/Ácido Acético en agua (0.2%). 49:51 (v/v):** mezclar 490mL de Acetonitrilo grado HPLC + 200mL de agua purificada + 1020µL de Ácido Acético y llevar a 1000mL con agua purificada. Homogenizar y filtrar a través de membrana millipore de 0.45µm, desgasificar la solución en un baño ultrasonido por 10 minutos.
- **Solución de Inyección: Metanol:Agua:Ácido Acético. 30:70:1 (v/v/v):** en un balón volumétrico de 100mL poner 30mL de Metanol grado HPLC y aforar a 100mL con agua purificada, a continuación añadir 1mL de Ácido Acético.
- **Solución estándar Madre:** Remover con cuidado el seguro de la parte superior del vial de estándar de OTA de 5mg e introducir con cuidado la aguja de una jeringuilla de vidrio de 10mL en el vial, inyectar 4mL de solución de Tolueno:Ácido Acético (99:1 v/v), agitar por dos minutos, tomar 100µL de esta solución y diluir a 100mL con Tolueno:Ácido Acético (99:1 v/v).
- **Solución estándar de calibración (50ng/mL).**

- a) Calcular el volumen de estándar madre de acuerdo a la concentración valorada, mediante la siguiente fórmula:

$$V1 = \frac{C2V2}{C1}$$

C1 = Concentración de la solución madre de OTA

C2 = 50 ng/mL

V2 = 100mL

- b) Tomar el volumen calculado en un balón de 100mL y secar con corriente de Nitrógeno en un baño maría a 50±5°C. Añadir 50mL de Metanol, redissolver con agitación y colocar el balón en el ultrasonido por 5 minutos, aforar a 100mL con Metanol grado HPLC, A partir de esta solución preparar una curva de calibración con un mínimo de 5 estándares de concentración entre 1.55 a 25ng/mL.

5. EQUIPOS Y MATERIALES

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución HPLC con Detector de Fluorescencia
- Espectrofotómetro Uv-Vis
- Balón volumétrico de: 50 mL, 200 mL, 1000mL
- Vasos de precipitación de 1000mL
- Sistema de filtración al vacío compuesto de Kitasato de 1000mL, reservorios de 500mL, con membrana de filtro poroso y pinza metálica
- Micropipetas automáticas de 100 a 1000 μ L de 10 a 100 μ L
- Vasos de vidrio para licuadora de 500mL.
- Espátula de metal
- Papel filtro de 12.5cm de diámetro Whatman N. 1 o equivalente
- Membranas Millipore GV (Durapore) EM PVDF 0.22 μ m de poro, 25mm de diámetro, hidrofílica lisa o su equivalente
- Embudos de filtración de vidrio
- Pipetas volumétricas de 10mL
- Jeringuillas de polipropileno desechables de: 10 mL y 60mL
- Columnas de inmunoafinidad para Ocratoxina
- Tubos de ensayo de vidrio con punta cónica de 15mL
- Puntas para micropipeta automática
- Tubos de centrifuga de 50mL

6. PROCEDIMIENTO

6.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- a) Moler 1kg de cacao en grano en el molino con tamiz de 2mm.
- b) Colocar un frasco de vidrio con número de identificación de la muestra sobre la balanza de capacidad para 4200 gramos y precisión ± 0.01 g, encerar la balanza.
- c) Homogenizar la muestra realizando movimientos envolventes de la muestra dentro de la funda plástica.
- d) Pesar 10 gramos de muestra previamente homogenizada en el frasco de vidrio con la ayuda de una espátula.
- e) Llevar el frasco de vidrio con la muestra hacia el lugar de extracción.

Observaciones:

- Para la operación de pesado de la muestra se debe tomar en consideración dos cifras decimales.
- Si en caso existe dificultad con la molienda de los granos, se recomienda utilizar Nitrógeno líquido para congelar la muestra y facilitar el proceso

6.2 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

- Adicionar al frasco con la muestra de cacao 200mL de solución de Metanol: Bicarbonato de Sodio 3% (7:3 v/v).
- Colocar la tapa con las cuchillas, asegurar en la base de la licuadora, y agitar durante 3 minutos a alta velocidad.
- Tomar 50mL de extracto en un tubo de centrifuga y centrifugar por 15 minutos a 3500rpm.
- Filtrar la muestra por gravedad usando papel filtro Watman N. 1.
- Pasar el extracto filtrado a través de membrana millipore de 0.22µm de poro, utilizando una jeringuilla de polipropileno de 60mL.
- Tomar 10mL del extracto pasado por membrana en un balón volumétrico de 50mL, aforar con buffer Fosfato Salino PBS 1% - Tween 20 y homogenizar.
- El extracto restante identificar, taparlo y almacenar en refrigeración, hasta liberación de resultados.

6.3 PURIFICACIÓN DE LA MUESTRA

- Adaptar una jeringa de polipropileno de 60mL a una columna de inmovoafinidad y conectar al sistema de filtración al vacío.
- Pasar cuantitativamente el contenido de la muestra a la columna, dejar pasar a través de la columna de inmovoafinidad utilizando vacío (presión inferior a 1mmHg).
- Lavar la columna de inmovoafinidad con 10mL de PBS/Tween 20.
- Lavar la columna de inmovoafinidad con 10mL de agua ultrapura.
- Desconectar la columna del sistema de vacío.
- Sustituir la jeringa de plástico de 60mL por una jeringa de plástico de 10mL.
- Transferir 2mL de Metanol grado HPLC en la columna de inmovoafinidad, conectar una jeringa de plástico de 10mL, realizar un efecto de contraflujo en 3 a 4 tiempos y dejar en contacto por 3 minutos (aproximadamente), eluir la Ocratoxina A, controlando el flujo por medio del émbolo de la jeringa.
- Transferir nuevamente 2mL de Metanol grado HPLC en la columna de inmovoafinidad, conectar una jeringa de plástico de 10mL, realizar un efecto de contraflujo en 3 a 4 tiempos y dejar en contacto por 3 minutos

(aproximadamente), eluir la Ocratoxina A, controlando el flujo por medio del émbolo de la jeringa.

- i) Evaporar el eluido a sequedad utilizando Nitrógeno, en baño de agua con agitación y control de temperatura a $50 \pm 5^\circ\text{C}$.

- j) Redisolver los residuos obtenidos en la etapa de purificación con $250\mu\text{L}$ de Metanol:Agua:Ácido Acético 70:30:1 (v/v/v). Agitar utilizando un agitador de tubos por dos minutos y en un baño ultrasonido por 10 minutos.

- k) Inyectar $20\mu\text{L}$ de muestra en el HPLC bajo las siguientes condiciones:
 - Columna: Zorbax SB - C18 (150 x 4.6mm), tamaño de partícula de $5\mu\text{m}$.
 - Temperatura de Columna: 40°C .
 - Detector de Fluorescencia: Longitud de Onda de Excitación 333nm, Emisión 443nm.
 - Fase móvil: Acetonitrilo: Ácido Acético 0.2% en agua (49:51v/v).
 - Flujo: 1mL/minuto.
 - Volumen de Inyección: $20\mu\text{L}$.

7. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan como nanogramos de Ocratoxina A por gramo de cacao (ppb), utilizando la siguiente fórmula:

$$OTAng / g \frac{M}{W} \approx \frac{M}{M_s} * \frac{V_1}{V_2} * \frac{V_3}{V_4}$$

M = Masa de OTA en nanogramos inyectados en ($20\mu\text{L}$)

W = Equivalente en peso de muestra inyectada en $20\mu\text{L}$

M_s = Peso de muestra (10g)

V₁ = Volumen de extracción (200mL)

V₂ = Volumen de alícuota del extracto aplicado en la columna de inmunoafinidad (10mL)

V₃ = Volumen final de extracto redisolto en metanol ($250\mu\text{L}$)

V₄ = Volumen de extracto inyectado ($20\mu\text{L}$)

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amézqueta, S.; González-Peñas, E.; Murillo, M.; López de Cerain, A. 2004. Validación de un método analítico por HPLC para cuantificación de Ocratoxina A en granos de cacao. Food Additives and Contaminants. 21 (11): 1096-1106
2. Espín, S.; Cevallos, A.; Samaniego, I.; Zambrano, J.; Elizalde, X. 2010. Evaluación cuantitativa de Ocratoxina A como contaminante del cacao ecuatoriano de exportación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. IN: Informe Anual de Actividades Departamento de Nutrición y Calidad, INIAP. Quito, Ecuador, p. 186
3. Portilla, A.; 2010. Evaluación de la Capacidad Ocratoxigénica de hongos productores de Ocratoxina A en café verde ecuatoriano. Tesis Químico en Alimentos Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador 127 p



SECCIÓN 3

ANEXOS

7.1 ABREVIATURAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemist
AGS	Ácidos Grasos Saturados
AGI	Ácidos Grasos Insaturados
CIRAD	Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo
CFC	Common Fund for Commodities
cm	Centímetro
°C	Grado Centígrado
DNC	Departamento de Nutrición y Calidad
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DO	Densidad Óptica
EESC	Estación Experimental Santa Catalina
EETP	Estación Experimental Tropical Pichilingue
FID	Detector de Ionización de flama
g	Gramos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
ICCO	International Cocoa and Coconut Organization
IOCCC	International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery
ISO	Organización Internacional de Normalización
IEC	Comisión Electrotécnica Internacional
INEN	Servicio Ecuatoriano de Normalización
IF	Índice de fermentación
ID	Diaméto interno
LSAIA	Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos
L	Litro

m	Metro
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
M	Molar
Mesh	Tamaño de malla
meq	Miliequivalentes
MSD	Detector de Masas
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
N	Normal
nm	Nanómetros
OTA	Ocratoxina A
ppm	Parte por millón
ppb	Parte por billón
p.a.	Para análisis
pH	Potencial Hidrógeno
P	Peso
rpm	Revoluciones por minuto
SAE	Servicio Ecuatoriano de Acreditación
SPME	Microextracción en fase sólida
T/C	Relación Teobromina/Cafeína
tm	Tonelada Métrica
µL	Microlitro
µg	Microgramo
µm	Micrometros
v	Volumen
v/v	Volumen/volumen

7.2 GALERIA DE FOTOS

1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS QUÍMICO



Foto 1. Descascarillado manual de muestras



Foto 2. Molienda de muestras utilizando equipo RETCH ZM-200

2. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD



Foto 3. Secado de muestras de cacao en estufa

3. DETERMINACIÓN ACIDEZ VOLÁTIL



Foto 4. Equipo de destilación, tipo Lickens Nickelson

4. DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE FERMENTACIÓN



Foto 5. Extractos de cacao para análisis de Índice de Fermentación



Foto 6. Espectrofotómetro Uv- Vis Shimadzu UV 2600

5. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

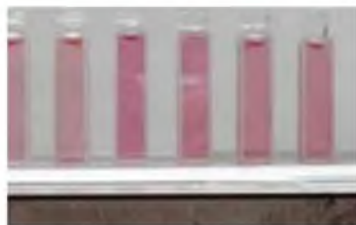


Foto 7. Preparación de Extractos para medir las Antocianinas en cacao

6. DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES

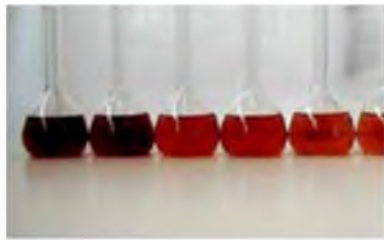


Foto 8. Preparación de extractos para cuantificar Alcaloides

7. EQUIPOS DE CROMATOGRAFÍA PARA ANÁLISIS DE COMPONENTES QUÍMICOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES



Foto 9. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) Agilent 110/1200 Series



Foto 10. Cromatógrafo de gases (GC). Agilent 7890 Series



Este manual, es parte de los resultados de las investigaciones realizadas en cacao, que recopila los métodos de análisis utilizados en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, para la identificación de componentes químicos relacionados con la calidad de este cultivo; se espera que constituya en una guía útil para investigadores, docentes, estudiantes y demás actores de la cadena de valor, vinculados a la investigación, la innovación y el desarrollo industrial.

El Laboratorio LSAIA del INIAP, trabaja bajo un sistema de gestión de la calidad, cumpliendo la norma internacional ISO/IEC 17025 y está reconocido por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano desde el año 2010.



Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)
Av. Eloy Alfaro N30-350 y Amazonas. Quito-Ecuador
Teléfono 593 2 2567645
Correo electrónico: iniap@iniap.gob.ec
www.iniap.gob.ec
Quito - Ecuador

ISBN: 978-9942-22-082-0

