

**IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DEL ACEITE  
ESENCIAL DE LAS SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) POR  
GC/FID/MSD**

**JIM NIXON LEON ERASO  
JANELLA CRISTINA LOPEZ ZAMBRANO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2005**

**IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DEL ACEITE  
ESENCIAL DE LAS SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) POR  
GC/FID/MSD**

**JIM NIXON LEON ERASO  
JANELLA CRISTINA LOPEZ ZAMBRANO**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de:  
Químico

Asesor

**M.S.c. ALBA TERESA ALVAREZ M.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2005**

**“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”**

**Artículo 1. del acuerdo No, 324 de octubre 14e 1966, emanada del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño”**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

---

**Firma del presidente del jurado**

---

**Firma del jurado**

---

**Firma del jurado**

**San Juan de Pasto, Mayo de 2005**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos de manera especial a la Msc. Alba Teresa Alvarez, por su colaboración prestada en el desarrollo del trabajo de investigación y sus recomendaciones acertadas.

De igual manera a nuestros jurados calificadores Msc. Olga Lucia Benavides y el Msc. Juan José Lozada y a todas las personas que colaboraron en el desarrollo del trabajo.

## **DEDICATORIA**

A Dios, nuestro hijo Ivan David León López, nuestros padres y hermanos gracias por su apoyo.

## CONTENIDO

	<b>pág.</b>
INTRODUCCIÓN	21
1. ANTECEDENTES	23
1.1 DESCRIPCIÓN DEL CACAO	23
1.1.1 Cultivo del cacao	24
1.2 ACEITES ESENCIALES	25
1.2.1 Concepto	25
1.2.2 Clasificación	26
1.2.3 Distribución y estado natural	27
1.2.4 Características	28
1.2.5 Funciones	29
1.3 HISTORIAL QUÍMICO DE LAS SEMILLAS DE CACAO	30
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	33
2.1 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	33
2.1.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD)	33
2.2 METODO DE OBTENCIÓN DE VOLATILES Y SEMIVOLÁTILES DEL ACEITE ESENCIAL	34
2.2.1 Microextracción en fase sólida (SPME)	34
2.2.2 Formas de extracción en SPME	37
2.2.3 Desorción	38
2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS	39

2.3.1 Cromatografía de gases (GC)	39
2.3.2 Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (GC-MS)	40
2.3.3 Índices de Retención de Kovats ( $k$ )	41
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
2.4.1 Diseño irrestrictamente al azar (DIA)	43
3. METODOLOGÍA	45
3.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LA SEMILLA DE CACAO	45
3.1.1 Recolección del material vegetal	45
3.1.2 Obtención del aceite esencial (AE) por hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD)	45
3.2 ANÁLISIS INSTRUMENTAL	47
3.2.1 Análisis de los extractos de la semilla de cacao por cromatografía de gases (GC)	47
3.2.2 Análisis de los metabolitos secundarios de las semillas de cacao por espectrometría de masas (MS)	47
3.3 ANÁLISIS DE DATOS	48
3.3.1 Flujo óptimo	48
3.3.2 Nivel mínimo de detección	48
3.3.3 Nivel mínimo de cuantificación	48
3.3.4 Análisis de la reproducibilidad de los índices de Kovats ( $k$ )	49
3.3.5 Factor de Respuesta (Rf)	49
3.4 EXPOSICIÓN DE LA FIBRA DE MICROEXTRACCION EN FASE SÓLIDA (SPME) AL ACEITE ESENCIAL (AE) OBTENIDO POR HIDRODESTILACION ASISTIDA POR RADIACION CON MICROONDAS (MWHD)	50

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	51
4.1 ANÁLISIS INSTRUMENTAL	51
4.1.1 Factor de Respuesta (Rf)	51
4.1.2 Análisis de la reproducibilidad de los índices de Kovats ( $I_k$ ) de algunos componentes del aceite esencial (AE) de las semillas de cacao	
4.2 ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.	52
4.2.1 Análisis de los componentes del AE de las semillas de cacao por cromatografías de gases (GC) y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC – MS)	54
4.2.2 Estandarización de la técnica de extracción hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHM) por número de compuestos	57
4.2.3 Análisis de los componentes responsables del aroma del aceite esencial (AE) de las semillas de cacao utilizando microextracción en fase sólida espacio cabeza (HS-SPME) y cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID)	60
4.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL (AE) DE LAS SEMILLAS DE CACAO POR DETECTOR SELECTIVO DE MASAS (MSD)	63
4.3.1 Fragmentación en espectrometría de masas de alcoholes	63
4.3.2 Fragmentación en espectrometría de masas de Aldehídos	67
4.3.3 Fragmentación en espectrometría de masas de Cetonas	68
4.3.4 Fragmentación en espectrometría de masas de los Ácidos	72
4.3.5 Fragmentación en espectrometría de masas de Ésteres	74
4.3.6 Fragmentación en espectrometría de masas de la Tetrametil pirazina	76
4.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LAS SEMILLAS DE CACAO	78

4.4.1 Estandarización de la técnica de extracción hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) por concentración de los componentes del aceite esencial (AE) de las semillas de cacao	80
5. CONCLUSIONES	82
6. RECOMENDACIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXOS	90

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Distribución del AE en las plantas	28
<b>Tabla 2.</b> Actividad biológica de algunos aceites esenciales y su uso en la medicina	30
<b>Tabla 3.</b> Fases estacionarias usadas en SPME	36
<b>Tabla 4.</b> Diseño Experimental para MWHD	47
<b>Tabla 5.</b> Repetibilidad de las áreas cromatográficas de n-tetradecano	51
<b>Tabla 6.</b> Reproducibilidad de los índices de Kovats( $I_k$ ) experimentales de algunos compuestos del AE de las semillas de cacao	53
<b>Tabla 7.</b> Componentes del AE de las semillas de cacao obtenido por MWHD	54
<b>Tabla 8.</b> Diseño DIA para MWHD	57
<b>Tabla 9.</b> ANDEVA para el número de compuestos extraídos por MWHD	58
<b>Tabla 10.</b> Aplicación prueba de Tukey para el número de compuestos extraídos por MWHD	58
<b>Tabla 11.</b> Grupos funcionales presentes en el AE de las semillas de cacao a potencia 8.0 y 60 minutos de extracción	59
<b>Tabla 12.</b> Reproducibilidad de los índices de Kovats( $I_k$ ) experimentales de los compuestos responsables del aroma del AE de las semillas de cacao	61
<b>Tabla 13.</b> Compuestos responsables del aroma del AE de las semillas de cacao	62
<b>Tabla 14.</b> Concentración relativa de los componentes del AE de las semillas de cacao obtenido por MWHD	78
<b>Tabla 15.</b> ANDEVA para la concentración de los compuestos del AE de las semillas de cacao extraídos por MWHD	80
<b>Tabla 16.</b> Aplicación prueba de Tukey para la concentración de los compuestos extraídos por MWHD	81

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Árbol de cacao	23
<b>Figura 2.</b> Habas o granos de cacao	24
<b>Figura 3.</b> Monoterpenos	25
<b>Figura 4.</b> Sesquiterpenos	26
<b>Figura 5.</b> Estructura química de la Teobromina	31
<b>Figura 6.</b> Montaje microextracción en fase sólida	37
<b>Figura 7.</b> Partes principales de un cromatógrafo de gases	40
<b>Figura 8.</b> Partes principales de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas	41
<b>Figura 9.</b> Montaje MWHD	46
<b>Figura 10.</b> Determinación del factor de respuesta	52
<b>Figura 11.</b> Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de las semillas de cacao por MWHD a potencia 7.0 y 30 minutos de extracción.	55
<b>Figura 12.</b> Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de las semillas cacao por MWHD a potencia 7.0 y 60 minutos de extracción.	56
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de cacao por MWHD a potencia 8.0 y 30 minutos de extracción.	56
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de cacao por MWHD a potencia 8.0 y 60 minutos de extracción	57
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de los compuestos presentes en el AE de las semillas de cacao a potencia 8.0 y 60 minutos de extracción	59
<b>Figura 16.</b> Perfil cromatográfico por GC-FID de los componentes responsables del aroma del AE de las semillas de cacao obtenido por HS-SPME	63
<b>Figura 17.</b> Espectro de masas del Linalool	64
<b>Figura 18.</b> Posibles rutas de fragmentación del linalool	65
<b>Figura 19.</b> Espectro de masas del Alcohol isoamílico	66
<b>Figura 20.</b> Posibles rutas de fragmentación del alcohol isoamílico	66
<b>Figura 21.</b> Espectro de masas del fenil acetaldehído	67
<b>Figura 22.</b> Posibles rutas de fragmentación del Fenil acetaldehído	67
<b>Figura 23.</b> Espectro de masas del Benzaldehido.	68
<b>Figura 24.</b> Posibles rutas de fragmentación del Benzaldehido	68
<b>Figura 25.</b> Espectro de masas de la Acetofenona	69
<b>Figura 26.</b> Posibles rutas de fragmentación de la acetofenona	70
<b>Figura 27.</b> Espectro de masas de la 2- Nonanona.	71
<b>Figura 28.</b> Posibles rutas de fragmentación de la 2- Nonanona	71
<b>Figura 29.</b> Espectro de masas del Acido acético	72
<b>Figura 30.</b> Posibles rutas de fragmentación del Acido acético	72
<b>Figura 31.</b> Espectro de masas del Acido hexadecanoico	73

<b>Figura 32.</b> Posibles rutas de fragmentación del Acido hexadecanoico	73
<b>Figura 33.</b> Espectro de masas del Fenil acetato de etilo	74
<b>Figura 34.</b> Posibles rutas de fragmentación del Fenil acetato de etilo	75
<b>Figura 35.</b> Espectro de masas del Acetato de linalool	75
<b>Figura 36.</b> Posibles rutas de fragmentación del Acetato de linalool	76
<b>Figura 37.</b> Espectro de masas de la Tetrametil pirazina	76
<b>Figura 38.</b> Posibles rutas de fragmentación de la Tetrametil pirazina	77
<b>Figura 39.</b> Concentración de los compuestos del AE de las semillas de cacao obtenido por MWHD	79

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
<b>Anexo A.</b> Perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C <sub>6</sub> - C <sub>18</sub>	91
<b>Anexo B.</b> Ecuaciones para el cálculo de ANDEVA	92
<b>Anexo C.</b> Cuadro de datos para la estandarización de la técnica de extracción HDMW por número de compuestos	93
<b>Anexo D.</b> Ecuación para el comparador de Tukey	94
<b>Anexo E.</b> Cuadro de datos de las concentraciones obtenidas por MWHD	95

## GLOSARIO

**AE:** aceite Esencial

**AEs:** Aceites Esenciales

**ANDEVA:** análisis de Varianza

**CM:** cuadrados medios.

**CV:** coeficiente de Variación

**DES:** destilación Extracción Simultánea

**?** : desviación estándar.

**d.i:** diámetro Interno.

**DIA:** diseño irrestrictamente al azar

**DMS:** diferencia Mínima significativa.

**EE:** error Experimental.

**EM:** error de Muestreo.

**Fcal:** F calculada.

**FID:** detector de ionización en llama.

**F tab:** F tabulada.

**GC:** cromatografía de Gases o Cromatógrafo de Gases según contexto.

**GC – MS:** cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas o Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas según contexto

**GL:** grados de libertad

**HS–SPME:** micro Extracción en Fase Sólida (espacio cabeza)

**I<sub>k</sub>:** índice de Kovats.

**MS:** espectrometría de Masas o Espectrómetro de Masas según contexto.

**MWHD:** hidrodestilación asistida por radiación con microondas

**MSD:** detector Selectivo de Masas.

***m/z*** : relación masa (*m*) carga (*z*) del ión

**NPD:** detector de Nitrógeno Fósforo

**NIST:** National International Standar

**p.i.** : patrón Interno

**SC:** suma de cuadrados.

**SPME:** micro Extracción en Fase Sólida

***t<sub>R</sub>*** : tiempo de retención

## RESUMEN

Se obtuvo el aceite esencial de las semillas de cacao utilizando como método de extracción Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHHD), se realizaron variaciones de potencia y tiempo de exposición, y se estandarizó a una potencia de 80% de radiación total y 60 minutos de exposición del material vegetal a radiación de microondas. Se analizó por GC-FID mediante comparación de los índices de retención de Kovats ( $I_K$ ) y se identificó por MS un total de 24 compuestos oxigenados y 1 amina.

Posteriormente se extrajeron los metabolitos secundarios volátiles responsables del aroma del aceite esencial de las semillas de cacao, 13 en total, utilizando Microextracción en Fase Sólida con espacio-cabeza (HS-SPME) y se los identificó por cromatografía de gases (GC-FID) por índices de retención de Kovats, se encontró como principal responsable del aroma al Benzoato de isobutilo.

La cuantificación se realizó por el método del estándar interno utilizando n-tetradecano, 4 compuestos superaron los 50 ppm correspondientes a 2 alcoholes: Alcohol amílico 54.4 ppm y alcohol isoamílico 118.4 ppm y 2 aldehidos: Benzaldehido 91.9 ppm y Fenil acetaldehído 164.2 ppm.

## ABSTRACT

The essential oil of the seeds of cocoa was obtained using as extraction method hydrodistillation assisted by radiation with microwaves (MWHD), they were carried out variations of power and time of exhibition, and standardizes it to a power of 80% of total radiation and 60 minutes of exhibition from the vegetable material to radiation of microwaves. It was analyzed for GC-FID by means of comparison of the indexes of retention of Kovats ( $I_K$ ) and it was identified by MS a total of 24 oxygenated compounds and 1 amine.

Later on the volatile secondary metabolites responsible for the aroma of the essential oil was of the seeds of cocoa was extracted, 13 in total, using Microextraction in solid phase with space-head (HS-PME) and it was identified them to him for GC-FID for indexes of retention of Kovats, it was at main responsible for the aroma to the benzeneacetic acid, isobutyl ester.

The quantification was carried out for the method of the internal standard using n-Tetradecane, 4 compounds overcame the 50 ppm corresponding to 2 alcohols: Amyl alcohol 54.4 ppm and Isoamyl alcohol 118.4 ppm, and 2 aldehydes: Benzaldehyde 91.9 ppm and Benzene acetaldehyde 164.2 ppm.

## INTRODUCCIÓN

“El cacao es una especie nativa de América y su mayor producción se presenta en la zona ecuatorial del continente, lo que convierte a Colombia en uno de los principales cultivadores de este producto. Nariño resalta como uno de los primeros productores de cacao en el país”<sup>1</sup>, pero el cultivo de cacao en nuestro Departamento tiende a ser reemplazado por el de la palma de cera, razón por la cual en estos últimos años ha disminuido de manera significativa la producción de cacao.

La gran utilidad del cacao se debe a la multiplicidad de sus componentes y por esta razón ha sido bastante estudiado, siendo su parte útil la semilla.

Según:

El estudio de los aceites esenciales (AEs) como materia prima básica para la industria de fragancias y sabores, se ha transformado en una de las áreas de investigación y desarrollo más importantes en nuestro país. Inicialmente eran considerados como material de desecho de las plantas y en los últimos años su importancia biológica fue reconocida debido a su gran aplicabilidad en diversos campos como la industria (elaboración de perfumes y diversas fragancias), medicina (aromaterapia), agricultura (utilizados como agentes alelopáticos) etc.<sup>2</sup>.

“La calidad de un aceite esencial (AE) es medida en relación al número de compuestos oxigenados volátiles que posea, siendo de menor calidad los saturados de mono y sesquiterpenos”<sup>3</sup>

Actualmente el estudio de la semilla de cacao se ha enfatizado en su aceite fijo (manteca de cacao), dejando atrás su parte volátil (aceite esencial). A pesar de que en la literatura se reporta que éste aceite tiene actividad antibacteriana en especial contra la bacteria<sup>4</sup> *Helicobacter pylori*, que es la principal causa de la

---

<sup>1</sup> BADUI, Salvador. Química de los alimentos. México : Alambra UNAM, 1996. p.123

<sup>2</sup> MANTRA. Extracción de los aceites. [en línea]. [Argentina]. Febrero 2002. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet: <URL: [http:// www.mantra.com.ar/](http://www.mantra.com.ar/)>

<sup>3</sup> SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang- Ylang en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección y de su posible actividad antioxidante “in vitro”. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander. 2002. p. 4-18

<sup>4</sup> CONABIO Los catecoles. [en línea]. [Argentina]. Junio 2003. [Citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.conabio.gob.mx/arboles/pdfespecies/68-ster03m.pdf>.>

úlceras gástricas y el carcinoma gástrico<sup>5</sup>; no existen reportes bibliográficos precisos sobre la composición de este aceite esencial.

Debido a lo anterior la presente investigación estuvo encaminada en identificar por cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS) los compuestos que se encuentran formando parte de la fracción volátil de las semillas de cacao, con el fin de que con los resultados obtenidos permita llevar a cabo un estudio sobre la actividad antibacteriana que presenta este AE.

---

<sup>5</sup> CABRA, E. R. Los aceites esenciales panorama internacional y del mercado colombiano. Santa Fe de Bogotá : Mc. Graw Hill, 1998. p. 8.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 DESCRIPCIÓN DEL CACAO

El cacao cuyo nombre científico es *Theobroma cacao* L., [4] es una planta originaria de los trópicos húmedos de América. Su centro de origen parece estar situado en el noroeste de América del Sur, en la zona amazónica<sup>6</sup>. Grive afirma que: “Actualmente es cultivado en la mayoría de los países tropicales, en una zona comprendida entre los 20° de latitud norte y los 20° de latitud sur”<sup>7</sup>[5].

Según Enríquez: “El árbol alcanza alturas de 6 a 8 metros, aunque puede alcanzar alturas hasta de 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa, entre mas sombra tenga el árbol mayor es su crecimiento sobre todo si recibe excesiva sombra de otros árboles de mayor altura”<sup>8</sup>. Como se observa en la Figura 1.

**Figura 1. Árbol de cacao**



Fuente: [http:// www.chocolate.htm](http://www.chocolate.htm).

---

<sup>6</sup> HURTADO, F. OBREGÓN, H. Estudio Agroeconómico del cacao (*Theobroma cacao* L.). San Juan de Pasto : Universidad de Nariño. 1987. p. 27.

<sup>7</sup> GRIEVE, M. A modern herbal. [en línea]. [Argentina]. Febrero 2002. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : [http:// www.Botanical.com/mgmh/mgmh.html](http://www.Botanical.com/mgmh/mgmh.html).>

<sup>8</sup> ENRIQUEZ, Gustavo. Botánica. [en línea]. [Colombia]. Marzo 2002 [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://ww.infoagro.go.cr/default.htm>.>

Según el LINN: "El fruto por lo general contiene de 20 a 40 semillas, ellas son su parte útil, son del tamaño de una almendra, color chocolate o púrpúreo, de 2 a 3 cm de largo y de sabor amargo. No tiene albumen y están recubiertas por una pulpa mucilaginoso de color blanco y de sabor dulce y acidulado"<sup>9</sup>. Wren sostiene que: "Todo el volumen de la semilla en el interior está prácticamente ocupado por los 2 cotiledones del embrión. Se les llama "habas" o "granos" de cacao"<sup>10</sup> ver Figura 2.

**Figura 2. Habas o granos de cacao**



Fuente: <http://www.chocolate.htm>.

García afirma que: "Las semillas se encuentran colocadas en 5 filas sobre una placenta central, los granos son aplanados y elipsoidales de 2 a 4 cm de longitud, ricas en almidón, en proteínas, en materia grasa, lo cual les confiere un valor nutritivo real"<sup>11</sup>.

### **1.1.1 Cultivo del cacao.** Como dice Hurtado

En Colombia el cultivo del cacao se ha desarrollado en áreas planas, con alturas entre los 800 y 1300 m.s.n.m. De altas precipitaciones y temperaturas, entre los departamentos de mayor producción de cacao se pueden citar Santander, Huila, Antioquia, Nariño y el Eje Cafetero.

En el Departamento de Nariño, el cultivo de cacao se da en el municipio de Tumaco ubicado en la costa nariñense, el cual se halla dividido en 6

---

<sup>9</sup> LINN. *Theobroma cacao*. [en línea] [Argentina]. Junio 2002 [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.conabiogob.mx/arboles/pdf/especies.pdf>. Junio/28/2002

<sup>10</sup> WREN, R. *Potters new cyclopedia of botanical drugs and preparations*. México : Grijalvo, 1944. p. 148

<sup>11</sup> GARCIA, Hernando. *Flora medicinal de Colombia*. Bogotá : Tercer mundo, 1992. p. 208

zonas de producción: Río Mira, Río Chagüí, Río Rosario y Caunapí, San Luis Robles y Espriella<sup>12</sup>

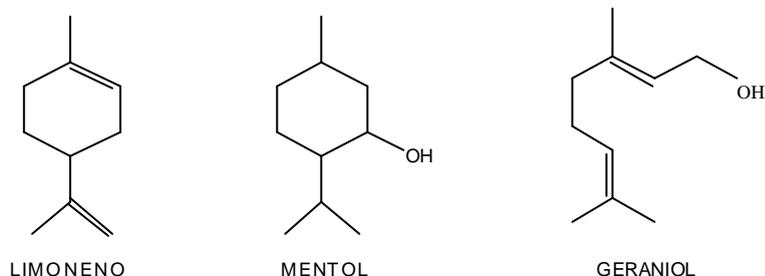
El cacao tiene la siguiente clasificación taxonómica

**Clase:** Dicotiledónea.  
**Subclase:** Arquielaquíneas.  
**Orden:** Malvales.  
**Familia:** Esterculiáceas.  
**Género:** Theobroma  
**Especie:** Cacao L.<sup>13</sup>

## 1.2 ACEITES ESENCIALES

**1.2.1 Concepto.** “El AE es una mezcla de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas, son mezclas mas o menos complejas en cuya composición entra una porción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que responden a la fórmula  $(C_5H_8)_n$  (Monoterpenos  $n=2$ , Sesquiterpenos  $n=3$  y Diterpenos  $n=4$  etc.)”<sup>14</sup> Figuras 3 y 4, junto con otros compuestos casi siempre oxigenados que son los que transmiten a las esencias el aroma que las caracteriza<sup>15</sup>

**Figura 3. Monoterpenos**



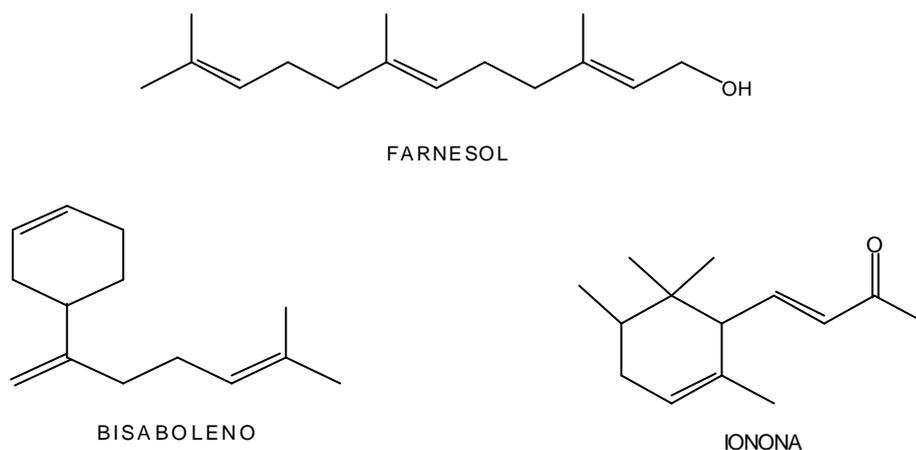
<sup>12</sup> HURTADO, F. Y OBREGON H. Op.cit., p. 25

<sup>13</sup> SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE SENA. Cultivo de Cacao, beneficio del cacao. En : Cartilla. Colombia. No. 4. (1993);

<sup>14</sup> BILBO. Aceites Esenciales. [en línea]. Febrero 2002 [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.bilbo.edu.uy/planta/pdf/bolilla-4pdf> >

<sup>15</sup> ELDER, H. y SPEKULJAK, Z. Aprovechamiento integral de especies vegetales aromáticas y medicinales. [en línea]. Enero 2002 [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.sitingenieria.com/sitaceites.html> >

**Figura 4. Sesquiterpenos**



Fuente: <http://www.bilbo.edu.uy/planta/pdf/bolilla-4pdf>

Según Domínguez<sup>16</sup>: “Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia que es bastante parecida a los aceites grasos, pero se distinguen de ellos por que al dejar caer unas gotas de la esencia sobre el papel ésta se volatiliza fácilmente sin dejar ninguna huella ni mancha grasosa”.<sup>17</sup>

**1.2.2 Clasificación.** Martínez afirma que: “Los AEs se clasifican con base en diferentes criterios como son: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios”<sup>18</sup>

? **Consistencia.** El mismo autor afirma que :

Los AEs se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente, los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas<sup>19</sup>

<sup>16</sup> DOMÍNGUEZ, X. Métodos de investigación Fotoquímica : LIMUSA. 1991. p. 229

<sup>17</sup> MEZA, A. análisis químico del aceite esencial de Eucalyptus Globulus Nariñense. Medellín : Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Química, 1998. p. 28.

<sup>18</sup> MARTÍNEZ, Alejandro. Aceites esenciales. Medellín : Universidad de Antioquia, 2001. p. 229-238.

<sup>19</sup> Ibid., p. 229-238

? **Origen.** Según Stashenko:

Se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes. Los AEs sintéticos como su nombre lo indica son producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y se utilizan como saborizantes y aromatizantes<sup>20</sup>

? **Naturaleza química.** Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja, los AEs se pueden clasificar de acuerdo con los tipos de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites ricos en monoterpenos se denominan AEs monoterpenoides<sup>21</sup>. Según Martínez: “Los ricos en sesquiterpenos se llaman AEs sesquiterpenoides. Los ricos en fenilpropanos se denominan AEs fenilpropanoides”<sup>22</sup>

**1.2.3 Distribución y estado natural.** Como dice González<sup>23</sup> Los AEs se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas etc.<sup>24</sup>

Los AEs se les pueden encontrar en diferentes partes de la planta como se indica en la Tabla 1:

---

<sup>20</sup> STASHENKO, Elena. Fitoquímica. En: CONGRESO NACIONAL DE FITOQUÍMICA 4º : 1996 : Bucaramanga. Memorias del IV Congreso Nacional de Fitoquímica. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander, 1996. p. 29

<sup>21</sup> MARTINEZ, Op.cit., p. 238

<sup>22</sup> STASHENKO, Op.cit., p. 29

<sup>23</sup> GONZALEZ, P. Utilización terapéutica de muestras medicinales. Bogotá : Universidad de la Salle, 1984. p. 159

<sup>24</sup> KIMBERLY, A. Phytochemical in essential oil. In : J. Nat. Prod. No. 59 Vol. 1 (1996); p. 77-79

**Tabla 1. Distribución del AE en las plantas**

PARTE DE LA PLANTA	PLANTA
HOJAS	Ajenjo, albaca, buchú, cedrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.
RAICES	Angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.
SEMILLAS	Anís, cardamomo, cacao, eneldo, hinojo, comino, etc.
TALLO	Canela, Caparrapi, etc.
FLORES	Árnica, Lavanda, Manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.
FRUTO	Alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.

Fuente: Memorias IV congreso Nacional de Fotoquímica 1996.

**1.2.4 Características.** Guinard et al. Afirman que: “Los AEs, en la mayoría de los casos, son líquidos a temperatura ambiente, volátiles, de consistencia aceitosa, más o menos fluidos, su densidad es a menudo inferior a la del agua y varía de 0.759 g/ml a 1.187g/ml”<sup>25</sup>. Manss afirma que: “Dextrógiros o Levógiros y generalmente ópticamente activos, sensibles a la acción de los rayos ultravioleta”<sup>26</sup>

Stashenko afirma que: “Son poco solubles en agua pero son solubles en alcohol, éter, cloroformo y en la mayor parte de los solventes orgánicos”<sup>27</sup>. Kimberly reporta que: “Su volatilidad los distingue de los otros aceites fijos o lípidos”<sup>28</sup>

<sup>25</sup> GUINARD, J. et. al. Abrege de Phytochimie. In : J. Nat. Prod Miami : Academic Press. 1985. p. 225-232

<sup>26</sup> D. MANSS. Phytochemistry. In : J. Nat. Prod. Miami. No. 39 Vol. 5 (1995); p. 115

<sup>27</sup> STASHENKO, Elena. Fitoquímica. En : CONGRESO NACIONAL DE FITOQUÍMICA, Op.cit., p. 29

<sup>28</sup> Kimberly, Op.cit., p. 79

Stashenko reporta que:

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los componentes que forman parte de la fracción aromática del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados, pueden estar asociados formando mezclas con otros productos naturales como es el caso de las resinas y productos relacionados<sup>29</sup>

Según martinez: Los AEs y los extractos naturales, obtenidos a partir de las especies vegetales, con características alimenticias o medicinales, están formados por una mezcla compleja de compuestos orgánicos que, aunque disímiles algunas veces entre sí, guardan una relación armónica en cuanto a su composición<sup>30</sup>. Stashenko afirma que: “Estos compuestos son susceptibles de ser aislados y utilizados en orden a sus características fisicoquímicas”<sup>31</sup>

**1.2.5 Funciones.** Según Domínguez: “Dos son las funciones básicas del AE: por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades, e incluso de la invasión de otras plantas<sup>32</sup>. Por otra parte, Meza asegura que: “Dan un aroma a la flor que ejerce atracción sobre insectos y aves, favoreciendo el proceso de polinización”<sup>33</sup>. Stashenko reporta que: “Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades tales como: antiséptica, antiinflamatoria, antidepresiva, antibacteriana, alelopática, afrodisíaca y otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites”<sup>34</sup>, como se muestra en la Tabla 2.

---

<sup>29</sup> STASHENKO, Elena. Aceites esenciales. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander Escuela de Cromatografía, 2002. p. 68-78.

<sup>30</sup> MARTINEZ, Op.cit., p. 238

<sup>31</sup> STASHENKO, Elena. Aceites esenciales, Op.cit., p. 68-78

<sup>32</sup> DOMINGUEZ, Op.cit., p. 229

<sup>33</sup> MEZA, Op.cit., p. 28

<sup>34</sup> STASHENKO, Elena. Aceites esenciales, Op.cit., p. 68-78

**Tabla 2. Actividad biológica de algunos aceites esenciales y su uso en la medicina**

<b>EFEECTO DIRECTO PRODUCIDO</b>	<b>PLANTAS QUE CONTIENEN EL ACEITE ESENCIAL</b>
<i>USO EXTERNO</i>	
Hiperdémico	Eucalipto, Enebro, Romero
Anti-inflamatorio	Manzanilla, Árnica
Antiséptico	Anís, Caléndula, Clavo, Limón, Menta, Hinojo; Salvia, Tomillo.
Desodorizante	Manzanilla, Cítrico, Toronjil
<i>USO INTERNO</i>	
Expectorante (Actividad Mucocinética)	Anís, Canela, Eneldo, Hinojo, Eucalipto, Ciprés, Tomillo, Menta, Manzanilla; Pino; Salvia (alcanfor, mentol).

Fuente: Domínguez X.

### 1.3 HISTORIAL QUÍMICO DE LAS SEMILLAS DE CACAO

Estudios realizados por científicos de la Universidad de Barcelona<sup>35</sup> y la Universidad de California en Davis<sup>36</sup> encontraron que la semilla del cacao es una importante fuente de polifenoles como la catequina, epicatequina y quercetina, antioxidantes potencialmente beneficiosos para prevenir patologías cancerígenas.

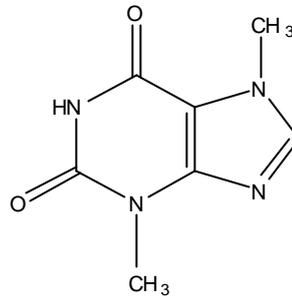
Soler y Batler citados por García<sup>37</sup> encontraron que la semilla contiene teobromina figura 5 alcaloide de fórmula  $C_7H_8N_4O_2$  (1.5% – 2.5%) y manteca de cacao (40% - 56%). La teobromina es un derivado de la xantina de la misma familia de la cafeína y teofilina.

<sup>35</sup> UNIVERSIDAD DE BARCELONA. Antioxidantes beneficiosos para la prevención de enfermedades cardiovasculares. [en línea]. [Barcelona España]. Noviembre de 2001. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.medicinainternet.com/portada.htm> >

<sup>36</sup> UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA. El cacao es bueno para el corazón. [en línea]. [Davis California]. Noviembre 2001. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.odontored.cl/main.htm> >

<sup>37</sup> GARCIA, Op.cit., p. 208

**Figura 5. Estructura química de la Teobromina**



Fuente: <http://www.conabiogob.mx/arboles/pdf/especies.pdf>

Otros autores como M. Grieve citados por Duke<sup>38</sup>. encontraron que:

La composición de esta semilla es altamente nutritiva, debido a que contienen 50% de grasa, 20% de hidratos de carbono, 18% de proteínas, 5% de agua, 5% de teobromina, 4% de minerales y vitaminas como la A, Tiamina, Niacina y Riboflavina además de fósforo, potasio, sodio, albuminoides, cafeína, taninos, aceite esencial y trazas de asparagina<sup>39</sup>

Jiménez en la conferencia mundial del cacao afirma, que:

Se realizó en Londres en octubre del 2000, uno de los estudios expuestos concluyó que la semilla del cacao contiene ciertos flavonoides (catequinas) que pueden controlar el crecimiento desordenado de las células y el daño del tejido fino en los seres humanos evitando la aparición de sarcomas (formaciones de tejido conjuntivo en huesos, músculos y órganos diversos) y epitelomas y carcinomas (formaciones de tejido epitelial en la piel y las mucosas o en las glándulas)<sup>40</sup>

---

<sup>38</sup> DUKE, Jim. Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Chemicals in Theobroma cacao L. (sterculiaceae) – cacao. Ontario, Canada : Agricultural Research Service, 2001. p. 17-25

<sup>39</sup> GOVINDARAJAN, V. Turmeric chemistry technology and quality. *In* : CRC critical reviews in food science and nutrition. Miami No. 12 Vol. 3. (1980); p. 229

<sup>40</sup> JIMÉNEZ, Y. L. Informe especial. [en línea]. Agosto 2000. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet: <URL : <http://www.nacion.com/egado.gif>>

“Algunos autores señalan que la semilla contiene un AE que le da un sabor aromático particular contiene 50% de linalool (C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>OH), ácido alifático y algunos ésteres”<sup>41</sup>. “Además parece ser que el AE presenta propiedades antibacterianas en especial contra la bacteria causante de la úlcera gástrica y el carcinoma gástrico *Helicobacter pylori*”<sup>42</sup>.

---

<sup>41</sup> OKAYAMA. Cocoa of Theobroma. [en línea]. Marzo 2003. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.okayama-u.ac.jp/doc/lab.htm>>

<sup>42</sup> CONABIO, Op.cit., p. 1

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Con el fin de obtener una mezcla de volátiles que posea las características similares en cuanto a su olor, se han desarrollado varias técnicas de extracción para la obtención de metabolitos secundarios volátiles de las plantas<sup>43</sup>

Según Esme, Dannel y Roux entre algunas técnicas se pueden destacar: “La destilación, el arrastre con vapor de agua, la extracción con solventes, la extracción con fluidos supercríticos, la destilación extracción simultánea (DES), la hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) etc.”<sup>44</sup>

**2.1.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD).** “Este es un nuevo método de extracción de AE, el cual combina la hidrodestilación normal con la radiación de microondas”<sup>45</sup>

Las microondas son una forma de radiación electromagnética que son generadas por un magnetrón, éste es un cilindro hueco encerrado en un imán con forma de herradura. En el centro del cilindro hay una barra como cátodo y las paredes del cilindro realizan la función de ánodo, cuando se calienta el cátodo emite electrones que viajan hacia el ánodo y un campo magnético obliga a los electrones a moverse en una trayectoria circular. Este movimiento de partículas cargadas genera microondas y las aspas giratorias de un ventilador hacen que las microondas se dispersen en todas las partes del horno.

La interacción entre el componente del campo eléctrico de la radiación con las moléculas del material vegetal generalmente agua, hacen que las moléculas circundantes de éste se calienten.

---

<sup>43</sup> RAFOLS, Wilfredo. Aprovechamiento industrial de los productos agrícolas, aceites esenciales. Barcelona : Salvat Editores, 1964. p. 471-477.

<sup>44</sup> ESME, J. DANEEL, F. ROUX, D. Studies on the activities of essential oil and related compounds from medicinal plants and drugs. *ln* : J. chem. Educ. No. 57 (1980); p. 57

<sup>45</sup> SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang-Ylang en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección y de su posible actividad antioxidante “in vitro”. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander, 2002. p. 4-18

Change y Collage afirman lo siguiente:

Todas las moléculas se encuentran girando a temperatura ambiente y si la frecuencia de la radiación y la frecuencia de la rotación son iguales se puede transferir energía desde las microondas hacia las moléculas polares, girando las moléculas con mayor rapidez aumentando la energía rotacional de las moléculas de agua y las moléculas polares<sup>46</sup>

La fricción que se desarrolla por la rápida rotación de las moléculas de agua hace que se calienten las moléculas del material vegetal rompiéndose las estructuras celulares que contienen el AE el cuál es recogido sobre un solvente.

La radiación no es absorbida por las moléculas no polares y por lo tanto puede alcanzar diferentes partes del material vegetal al mismo tiempo.

Las ventajas de este método son

1. Reduce tiempos de extracción.
2. No afecta la naturaleza del AE<sup>47</sup>.

## **2.2 METODO DE OBTENCIÓN DE VOLATILES Y SEMIVOLÁTILES DEL ACEITE ESENCIAL**

**2.2.1 Microextracción en fase sólida (SPME).** Pino y Martin afirman que: “La microextracción en fase sólida (SPME), es una técnica que permite el completo análisis de una muestra en el menor tiempo posible sin el requerimiento de solventes, ni un montaje complicado. Es utilizada para el análisis de componentes volátiles y poco volátiles en muestras líquidas y gaseosas”<sup>48</sup>

Esta técnica fue desarrollada por Belardi y Pawliszyn de la Universidad de Waterloo en Canadá y la matriz puede ser aire, agua, suelo entre otros<sup>49</sup>

Eisert se basa en la partición de: “Los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra, luego el transporte de los analitos comienza cuando se expone la fibra de sílice fundida recubierta con un material adsorbente a la muestra y la extracción termina cuando se alcanza el equilibrio de distribución

---

<sup>46</sup> CHANGE, Raymond. COLLEGE, W. Microwade. México : Mc Graw Hill, 1998. p. 238-240.

<sup>47</sup> SERRANO, Op.cit., p. 18

<sup>48</sup> PINO, J. MARTI, M. Head –space solid phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma. *J. chromatogr* No. 954 (2002); p. 51-57

<sup>49</sup> EISERT, R. PAWLISZYN, J. Critical reviews in analytical chemistry. *J. New trends in solid phase microextraction*. Canada. No. 2 (1997); p. 103-135.

entre la muestra y la fibra<sup>50</sup>. Pawliszyn afirma que: 'Una vez concentrados los analitos son desorbidos en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases o un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas'<sup>51</sup>.

Las ventajas que presenta esta técnica de extracción de volátiles y semivolátiles de muestras complejas en especial de aceites esenciales son:

Bajo costo

Requiere pequeños volúmenes de muestra

No se utilizan solventes orgánicos

Es un método de tiempo de aplicación corto<sup>52</sup>

Según Pawliszyn: 'La eficiencia de la extracción depende del coeficiente de partición o de distribución que depende de la afinidad analito-fibra y que describe las propiedades del recubrimiento de la fibra'<sup>53</sup>, a su vez juegan un papel muy importante la polaridad, intensidad de agitación de la muestra, el método de muestreo, pH, contenido de sal, volumen de muestra<sup>54</sup> ver Tabla 3.

---

<sup>50</sup> Ibid., p. 103--105

<sup>51</sup> PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction theory and practice. Ontario Canadá : Wiley University of waterloo, 1997. p. 12

<sup>52</sup> SCREIER, P. Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles. Canada : Cuiley, 1984. p 2-12.

<sup>53</sup> PAWLISZYN, Op.cit., p. 47

<sup>54</sup> HAAGEN, S. Industry engineering chemical environmental chemical. Colorado : s.n., 1982. p. 1544

**Tabla 3. Fases estacionarias usadas en SPME**

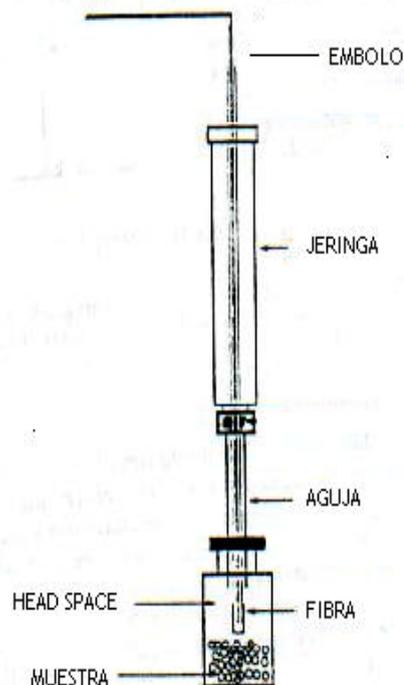
<b>FASE ESTACIONARIA ESPESOR</b>	<b>ANALITOS</b>	<b>POLARIDAD</b>	<b>USO RECOMENDADO</b>
<b>PDMS</b>			
100?m	Volátiles	No Polar	GC/HPLC
30?m	Semivolátiles Apolares	No polar	GC/HPLC
7?m	Semivolátiles apolares Polaridad media	No Polar	GC/HPLC
<b>PDMS/DVB</b>			
65?m	Volátiles polares	Bipolar	GC
60?m	No volátiles	Bipolar	GC/HPLC
<b>POLIACRILATO</b>			
85?m	Semivolátiles polares	Polar	GC/HPLC
<b>CARBOXEN/PDMS</b>			
75?m	Gases y analitos de bajo peso moleculr	Bipolar	GC
<b>CARBOWAX (CW). CW/DVB</b>			
65?m	Analitos polares	Polar	GC
<b>CW7RESINA TEMPLADA</b>			
50?m	Surfactantes	Polar	HPLC

Fuente: Pawliszyn J.

Teniendo en cuenta las anteriores condiciones Galleti afirma que: “La muestra se coloca en un vial cerrado, se perfora el septum, se expone el material adsorbente en agitación durante un periodo de tiempo en el cual se evalúa el mejor tiempo de extracción de la muestra, se retira la fibra del vial y se perfora con la fibra el puerto de inyección del cromatógrafo de gases”<sup>55</sup>. Ver Figura 6.

<sup>55</sup> GALLETI, Guido. Analytical methods in the study of essential oil extraction. *In* : Separation and identification techniques. No. 16 (1998); p. 291-296

**Figura 6. Montaje microextracción en fase sólida**



**2.2.2 Formas de extracción en SPME.** Según Rawliszyn<sup>56</sup> existen dos formas de extracción en SPME, introduciendo la fibra directamente en la muestra y la otra opción es el espacio cabeza o head-space

? **Extracción directa.** Haagen afirma que: 'En esta técnica la fibra recubierta del polímero se sumerge en la muestra y los analitos son transportados desde la matriz de esta a la fibra en inmersión hasta que se alcanza el equilibrio después de un tiempo y temperatura determinados'<sup>57</sup>

Según Eisert y Pawliszyn:

Este tipo de exposición de la fibra se utiliza cuando los componentes de la muestra no son volátiles o poco volátiles. La desventaja de esta exposición es que se ve reducida la vida útil de la fibra, inclusive cuando se coloca una membrana de protección.

---

<sup>56</sup> RAWLISZYN, Op.cit., p. 47

<sup>57</sup> HAAGEN, Op.cit., p. 1544

? **HS- SPME espacio cabeza.** El tipo de extracción Head Space – Micro Extracción en Fase Sólida (HS – SPME), la fibra se expone a la muestra con un espacio cabeza y los analitos volátiles y semivolátiles son adsorbidos por la fibra<sup>58</sup>

Rawliszyn afirma que: “Esta técnica HS–SPME permite proteger la fibra de compuestos de elevado peso molecular y otras interferencias no volátiles, de igual forma permite modificar la matriz variando el pH sin dañar la fibra”<sup>59</sup>. Gerecke reporta que: “La vida útil de la fibra es mas larga en comparación a la inmersión directa”<sup>60</sup>

Galleti manifiesta que: “Las investigaciones en la aplicación de HS–SPME en los AEs, permiten establecer que en condiciones normales (temperatura ambiente) de exposición de la fibra al AE se extraen los compuestos responsables del aroma en la planta sin determinar la concentración total de los metabolitos secundarios volátiles bajo estudio”<sup>61</sup>

**2.2.3 Desorción.** Después que la extracción llega al equilibrio, la fibra de SPME que contiene los analitos es transferida a un cromatógrafo líquido de alta resolución o al puerto de inyección de un cromatógrafo de gases o un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS)<sup>62</sup>. Según Gerecke: “En este caso la desorción se realiza térmicamente en el inyector del GC ó GC-MS, de forma que al aumentar la temperatura la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos en la columna analítica por el gas de arrastre”<sup>63</sup>

Por otra parte Serrano reporta que “El diámetro del liner del inyector debe ser lo mas similar posible al diámetro de la fibra de SPME para que se realice una transferencia de los analitos desde el inyector a la columna, de igual forma la fibra de SPME debe quedar centrada durante la desorción para que se produzca un calentamiento rápido”<sup>64</sup>

---

<sup>58</sup> EISERT y PAWLISZYN, Op.cit., p. 135

<sup>59</sup> RAWLISZYN, Op.cit., p. 47

<sup>60</sup> GERECKE, Alex. Chromatography. New York : J. analytical chemical, 2001. p. 908.

<sup>61</sup> GALLETI, Op.cit., p. 291-296

<sup>62</sup> EISERT y PAWLISZYN, Op.cit., p. 103-135

<sup>63</sup> GERECKE, Op.cit., p. 908

<sup>64</sup> SERRANO, Op.cit., p. 4-18

## 2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

Según Formacek y Kubeczka<sup>65</sup> se distinguen dos tipos de técnicas muy importantes utilizadas en el análisis de AEs que son: GC y MS; las cuales cobran cada día mas importancia no sólo en este campo, sino en otros, tales como medicina, bioquímica, química farmacéutica y control ambiental.

Serrano afirma que: “Para el análisis de AEs cualquiera de los dos métodos pueden usarse individualmente o en combinación”<sup>66</sup>

**2.3.1 Cromatografía de gases (GC).** La GC es una de las más importantes herramientas de análisis de AEs y es muy utilizada en el estudio de volátiles<sup>67</sup> (Ver Figura 7).

Según Nair: “La función de la GC consiste en la separación de compuestos volátiles debido al paso de un gas portador inerte por una columna capilar con una determinada fase estacionaria”<sup>68</sup>. Guidad reporta que: “Una vez separados, los componentes de la muestra llegan al detector que genera una señal que tiene como características la posición y la intensidad correspondiendo al orden de elusión y la proporción en la cual se encuentra cada componente en el AE”<sup>69</sup>

Bertsch y Jennings afirman que: “Se utiliza detector de ionización en llama (FID) para registrar todos los componentes del AE o detector de nitrógeno fósforo (NPD) para solo compuestos Nitrogenados”<sup>70</sup>.

---

<sup>65</sup> FORMACEK, V. KUBECZKA, K. Essential Oils analysis by capillary gas chromatography and carbon 13 NMR spectroscopy. Canada : Willey, 1982. p. 7

<sup>66</sup> SERRANO, Op.cit., p. 4-18

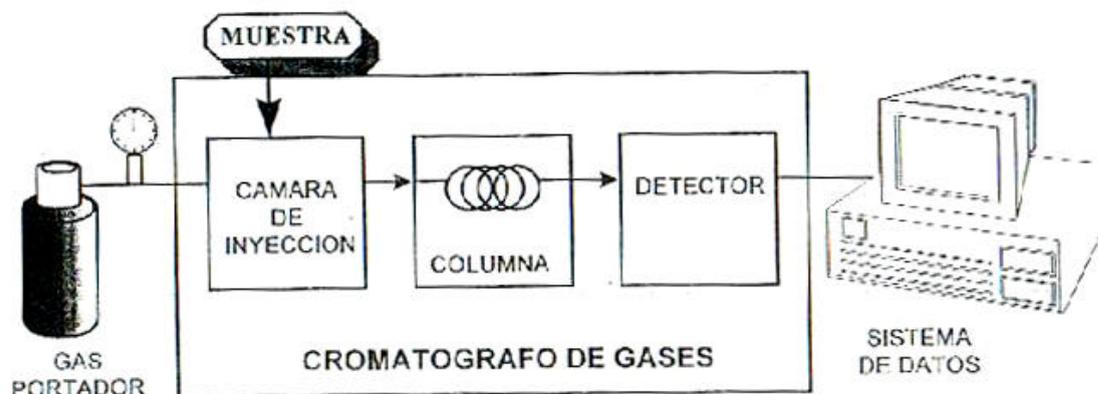
<sup>67</sup> Ibid., p. 4-18

<sup>68</sup> MC. NAIR, Harold. Cromatografía de gases. Virginia : Secretaría general de la organización de los estados americanos OEA, 1981. p. 3-11.

<sup>69</sup> GUILD, L. Gas chromatography butter worth. Londres : Heilderberg, 1958. p. 107.

<sup>70</sup> BERTSCH, W. JENNINGS, W. Capillary gas chromatography – mass spectrometry in medicine and pharmacology. USA : Heidelberg. 1987. p. 107

**Figura 7. Partes principales de un cromatógrafo de gases**



**2.3.2 Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (GC-MS).** Según Bertsch y Jennings: “La combinación de la GC-MS es una de las técnicas mas avanzadas. El acoplamiento permite hacer un análisis rápido y seguro de mezclas complejas identificando simultáneamente cuántos y cuáles constituyentes y en que proporción entran en su composición”<sup>71</sup>. Gootlieb y Braz afirman que: “El método es altamente sensible y con él se logra determinar impurezas en mínimas cantidades (hasta  $10^{-14}$  g)”<sup>72</sup>.

Skoog Afirma que: “El MS, está conectado con un sistema de datos computarizado que realiza la conversión de las señales procedentes del MS en la forma estandarizada y normalizada de cromatogramas y espectros de masas”<sup>73</sup>, permitiendo obtener información cualitativa y cuantitativa de cada uno de los componentes de la mezcla<sup>74</sup>. (Ver Figura 8.

Es un método completamente adecuado para la identificación de componentes del AE puesto que éstos son generalmente compuestos volátiles y de bajo peso molecular<sup>75</sup>.

<sup>71</sup> Ibid., p. 107

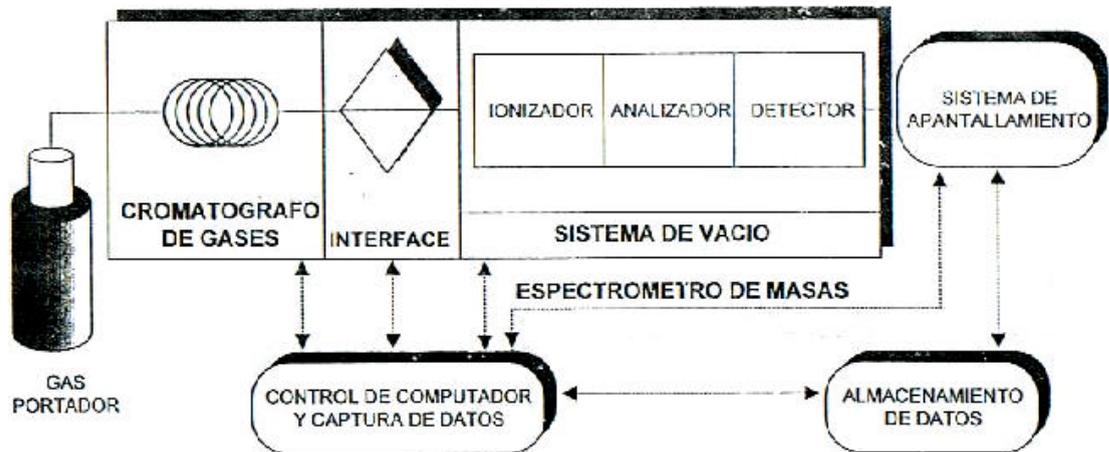
<sup>72</sup> GOTTLIEB, Otto. BRAZ, R. Introducción a la espectrometría de masas de sustancias orgánicas. USA : Secretaría general de la organización de los estados americanos OEA, 1983. p. 7-15

<sup>73</sup> SKOOG, Douglas. Análisis instrumental. México : Mc. Graw Hill, 1994. p. 704-710.

<sup>74</sup> ZULOAGA, F. INSUASTY, B. y YATES, B. Análisis orgánico y espectral. Cali : Universidad del Valle. Departamento de Química, 1999. p. 189-202.

<sup>75</sup> SUR, S. V. Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. s.i. : J. Chrom atogr, 1991p. 451-458.

**Figura 8. Partes principales de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas**



**2.3.3 Índices de Retención de Kovats ( $I_K$ ).** “Fue desarrollado por E. Kovats en 1958, y lo definió como una medida de la retención relativa la cual usa los alcanos normales como un estándar de referencia. El índice de Kovats ( $k$ ), para cada alcano es cien veces su número de átomos de carbono”<sup>76</sup>.

Bertsch reporta que ‘Cuando se utiliza condiciones isotérmicas los tiempos de retención ( $t_R$ ), ajustados aumentan exponencialmente con el número de carbonos, por esto los índices son calculados para los otros compuestos por interpolación logarítmica y no lineal del  $t_R$  ajustado”<sup>77</sup>.

$$I_k = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{\log t_{R_x} - \log t_{R_n}}{\log t_{R_{n+1}} - \log t_{R_n}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$I_K$ : índice de Kovats.

$X$ : analito problema.

$n$ : número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes de X.

$N$ : número de átomos de carbono del n-alcano que eluye después de X.

<sup>76</sup> ETTRE, L. S. The Kovats Retention Index System Report. Ln: J. anal. Chem, Canada (5 mar., 1964). p. 31A-41A.

<sup>77</sup> BERTSCH, W. Chromatographic methods capillary gas chromatography in essential oil analysis. USA : Heidelberg, 1987. p. 221-222

$t_{RX}$ : tiempo de retención ajustado del analito X.  
 $t_{Rn}$ : tiempo de retención ajustado del n-alcano que eluye antes que X.  
 $t_{RN}$ : tiempo de retención del n-alcano que eluye después de X.

Se utiliza temperatura programada los  $t_R$  aumentan linealmente con el número de átomos de carbono y los índices son calculados por interpolación lineal<sup>78</sup>

$$I_k = 100 \frac{t_{Rn} - t_{RX}}{t_{RN} - t_{RX}} \quad \text{Ecuación 2}$$

## 2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Martínez García afirma que:

En la planeación de todo experimento se debe tener presente el conocimiento de la estadística, ya que es una herramienta que permite hacer un análisis más completo de los resultados

El diseño experimental permite que una parte de la variabilidad entre las unidades experimentales sea físicamente manejada, en forma que casi no interfieran en la diferencia entre los promedios de los tratamientos tendiendo a la disminución del error experimental. Después de hacer un análisis profundo del diseño experimental mas adecuado para la investigación realizada, se evalúa la existencia de la diferencia significativa entre tratamientos a través de un análisis de varianza<sup>79</sup>.

El análisis de varianza (ANDEVA), ideada por Fisher es una técnica estadística que sirve para desglosar la varianza total en varios componentes identificables, en el cuadro de análisis de varianza intervienen los siguientes elementos: fuente de variación, grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM) o varianza, F calculada (Fcal) y F tabulada (Ftab).

Si la Fcal es mayor que la Ftab se considera que hay diferencia significativa entre tratamientos. La prueba F utilizada para ANDEVA indica si hay o no diferencia entre los tratamientos, y es necesario conocer cuál es el mejor tratamiento para

---

<sup>78</sup> Ibid., p. 221-222

<sup>79</sup> MARTINEZ, GARZA, Ángel. Diseños Experimentales métodos y elementos de teoría. Madrid : Trillas, 1988. p 14

así utilizar pruebas de significación entre ellas: t - student, diferencia mínima significativa (DMS), Duncan , Tukey entre otras.

Legarda Reporta que: 'La prueba de Tukey es la más exigente, rigurosa y es la más usada por ser la mejor entre todas las pruebas de significación. Esta prueba tiene como base la amplitud total estudentizada. Se utiliza para comparar más de dos tratamientos en un mismo experimento. La prueba es exacta y de uso muy simple cuando el número de replicaciones es igual para todos los tratamientos'<sup>80</sup>.

**2.4.1 Diseño irrestrictamente al azar (DIA).** El mismo autor afirma que:

Este diseño se considera como el más simple como su nombre lo dice, sus tratamientos tienen un arreglo que les permite estar con una casualidad irrestricta, generalmente se usa en experimentos en donde la variabilidad sea pequeña o se puedan controlar factores que la aumentan, además ofrece una evaluación inmediata de la variabilidad relativa de cada tratamiento y permite obtener un máximo número de grados de libertad para la suma de cuadrados del error permitiendo mayor precisión en el experimento<sup>81</sup>

Modelo matemático:

$$X_{ij} = u + T_i + E_{ij}$$

**Ecuación 3**

**X<sub>ij</sub>**: variable de respuesta del tratamiento i, repetición j

**u** : media general

**T<sub>i</sub>** : efecto del tratamiento i

**E<sub>ij</sub>**: componente aleatorio llamado error experimental para el tratamiento i, repetición j.

Modelo matemático con submuestra

$$X_{ijk} = u + T_i + E_{ij} + d_{ijk}$$

**Ecuación 4**

**X<sub>ijk</sub>**: variable de respuesta en la unidad de observación

**u** : media general

**T<sub>i</sub>** : efecto del tratamiento i

**E<sub>ij</sub>**: componente aleatoria correspondiente al tratamiento i y a la unidad experimental j.

---

<sup>80</sup> LEGARDA, Lucio. Guía para la planificación de diseños experimentales. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas, 1980. p 55-70.

<sup>81</sup> Ibid., p. 55-70.

$d_{ijk}$ : componente aleatoria correspondiente al tratamiento  $i$ , la unidad experimental  $j$  y la submuestra  $k$ .

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LA SEMILLA DE CACAO

**3.1.1 Recolección del material vegetal.** La recolección del cacao se realizó en Espriella, corregimiento del municipio de Tumaco en la costa pacífica Nariñense, ubicada a 265 Km de San Juan de Pasto con una temperatura promedio de 28 ° C, donde se encuentran cultivos representativos por ser una de las 5 zonas de mayor cultivo de cacao en la costa Nariñense.

La técnica de muestreo a seguir fue aleatorio simple el cual fue aplicado en un cultivo de 20 árboles recolectando 10 frutos maduros al azar por cada árbol, teniendo en cuenta un color semejante (amarillo) y un tamaño uniforme.

El material vegetal utilizado fueron semillas secas obtenidas de los frutos maduros de cacao, fueron transportados cuidadosamente refrigerados y protegidos de golpes, hasta la ciudad de Pasto, a las semillas se les retiró el mucílago y se secaron al sol por 8 días.

Una vez secas las semillas se mantuvieron en un lugar oscuro envueltas en papel aluminio para protegerlas de la humedad.

**3.1.2 Obtención del aceite esencial (AE) por hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD).** La extracción del AE de la semilla de cacao se realizó en un equipo de hidrodestilación normal con la modificación de la radiación con microondas (ver Figura 9). 500g de semillas secas se licuaron en un litro de agua destilada y se colocaron en un balón de 4 litros, el cual se lo ubicó dentro de un microondas comercial LG modelo MB-314UG con 120 vatios de potencia y una frecuencia de 2450 MHz, ajustado al equipo de hidrodestilación. El AE obtenido de las semillas de cacao, por ser hidrosoluble se atrapó en 5 ml de acetato de etilo debido a su afinidad con los componentes formando una fase solvente-AE.

**Figura 9. Montaje MWHD**



Las semillas secas se expusieron a 70% y 80% de radiación total (7.0 y 8.0), con 2 tiempos de extracción (30 y 60 minutos) realizándose cada proceso por triplicado como se indica en la Tabla 4.

En ensayos preliminares se observó que a 60% de radiación total (6.0) no se logró obtener AE de las semillas de cacao.

La extracción del AE a potencia 9.0 (90%) no se realizó, debido a la degradación que sufrió la muestra lo cual se detectó por condiciones organolépticas en los primeros 20 minutos de extracción, al igual que se presentó degradación térmica de los analitos al incrementar el tiempo de exposición del material vegetal a la radiación con microondas por encima de los 70 minutos.

Los extractos obtenidos se guardaron en viales de 2 ml y se almacenaron a 4°C, fueron protegidos de la luz, para su posterior análisis instrumental, el cual fue realizado en un tiempo máximo de 4 horas para evitar cualquier pérdida de volátiles.

Para estandarizar las condiciones de extracción se aplicó un diseño irrestrictamente al azar DIA con cuatro tratamientos y tres replicas (Tabla 4).

**Tabla 4. Diseño Experimental para MWHD**

<b>NUMERO DE MUESTRAS</b>	<b>POTENCIA</b>	<b>TIEMPO DE EXTRACCIÓN (Min)</b>
3	7.0	30
		60
	8.0	30
		60

Se definieron dos hipótesis en la planeación del diseño y la aplicación de un ANDEVA, por una parte encontrar si existe diferencia significativa entre tratamientos en relación al número de compuestos extraídos, y por otra evaluar la diferencia significativa de acuerdo a la concentración de los compuestos comunes entre tratamientos.

### **3.2 ANÁLISIS INSTRUMENTAL**

El análisis se realizó por GC y GC-MS.

El estudio del AE de la semilla de cacao se realizó en dos partes:

? **Parte 1.** Análisis de los principales compuestos del AE de la semilla de cacao obtenido por MWHD, a diferentes potencias y tiempos de extracción.

? **Parte 2** Análisis de los compuestos responsables del aroma del AE de la semilla de cacao obtenidos por HS – SPME.

**3.2.1 Análisis de los extractos de la semilla de cacao por cromatografía de gases (GC).** Se utilizó un GC-MS SHIMADZU QP 5000 ubicado en el laboratorio de cromatografía de la Universidad de Nariño, equipado con un detector de ionización en llama (FID).

Para los análisis cromatográficos se utilizó una columna MDN-5, con una longitud de 30 m y un diámetro interno (d.i.) de 0.25 mm cubierta de una película de 0.25  $\mu$ m de espesor de fase estacionaria y un flujo de columna de 1ml/min.

La programación de temperatura empleada fue: 29 °C por 10 min @ 3 °C/min a 70 °C @ 5 °C a 250 °C por 5 min. Como gas de arrastre se utilizó Helio con una velocidad lineal de 39 cm/s.

**3.2.2 Análisis de los metabolitos secundarios de las semillas de cacao por espectrometría de masas (MS).** Para confirmar los resultados obtenidos en el laboratorio de cromatografía de gases de la Universidad de Nariño se solicitó la colaboración del laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de

Santander (UIS). Para la identificación de los componentes se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP 5890 A serie II (Palo Alto, C.A., U.S.A.), equipado con un inyector split/splitless, inyector automático HP 6890, un sistema de datos HP ChemStation (versión 1.05), equipado con dos bases de datos NBS75K y Wiley 138K, un detector selectivo de masas HP 5972 con sistema de ionización por impacto de electrones de 70 eV, una temperatura de la cámara de ionización de 180°C y un analizador másico cuadrupolar.

### 3.3 ANÁLISIS DE DATOS

Para determinar las condiciones óptimas de la corrida cromatográfica fue necesario realizar ajustes de algunos parámetros que se describen a continuación.

**3.3.1 Flujo óptimo.** Según Gómez y Moran: “El valor del flujo óptimo (1ml/min) fue tomado como referencia del trabajo de investigación Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica Candamarcensis Hooker filius* realizado por Gómez D y Morán M”<sup>82</sup>.

**3.3.2 Nivel mínimo de detección.** Según Huber: “El límite de detección es la cantidad inyectada que da como resultado un pico con una altura al menos tres veces mayor que el ruido de la línea base”<sup>83</sup>.

Gómez y Morán<sup>84</sup> El valor del nivel mínimo de detección (0.8ppm)

**3.3.3 Nivel mínimo de cuantificación.** Para Huber<sup>85</sup> la determinación de la cantidad mínima cuantificable requiere que las alturas del pico sean de 10 a 20 veces mayores que el ruido de la línea base.

Según Gómez y Moran “Para la cuantificación se utilizó n-tetradecano como estándar interno, y el valor del nivel mínimo de cuantificación (3.8 ppm)”<sup>86</sup>.

---

<sup>82</sup> GOMEZ, D. MORAN, M. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica Candamarcensis Hoorker filius*. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2005. p 48, 49

<sup>83</sup> HUBER, L. Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de fabricación actuales. Miami : HEWLETT-PACKARD COMPANY, 1994. p 160.

<sup>84</sup> GOMEZ y MORAN, Op.cit., p. 48-49

<sup>85</sup> HUBER, Op.cit., p. 160

<sup>86</sup> GOMEZ y MORAN, Op.cit., p. 48-49

**3.3.4 Análisis de la reproducibilidad de los índices de Kovats (I<sub>k</sub>).** Con los resultados obtenidos por GC se analizó la reproducibilidad de los I<sub>k</sub> a partir de los t<sub>R</sub>, mediante la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (%CV), los cuales se determinaron con las siguientes ecuaciones:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

**Ecuación 5**

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

**Ecuación 6**

- CV:** Coeficiente de variación
- n:** Número de mediciones
- X:** Valores de la variable
- s :** Desviación estándar
- $\bar{x}$  :** Valor promedio

**3.3.5 Factor de Respuesta (Rf).** Se prepararon soluciones del estándar en condiciones de 76, 382, 763 y 1526 ppm las cuales se inyectaron por triplicado para evaluar la repetibilidad de las áreas cromatográficas mediante la desviación estándar y el coeficiente de variación ecuaciones 6 y 7 respectivamente.

El factor de respuesta se calculó mediante la pendiente de la recta con la ecuación

$$Rf = \frac{\text{Area}(cuentas)}{\text{Concentración (mg/l)}}$$

**Ecuación 7**

Para el análisis cuantitativo se empleó la técnica del patrón interno (p.i) utilizando n-tetradecano como p.i. La concentración del p.i. en los extractos fue de 100 µg/ml. Esta concentración junto con el área del estándar interno en cada cromatograma se utilizó para hallar el factor de respuesta del p.i. y se halló la concentración de cada componente mediante la siguiente ecuación:

$$C_x = \frac{A_x}{Rf} \cdot \frac{W_f}{W_x}$$

**Ecuación 8**

- C<sub>x</sub> :** Concentración del analito
- A<sub>x</sub> :** Área cromatográfica del analito
- R<sub>f</sub> :** Factor respuesta del estándar interno

**Vf** : Volumen final del extracto  
**Wx** : Peso de la muestra tomada (kg)

### **3.4 EXPOSICIÓN DE LA FIBRA DE MICROEXTRACCION EN FASE SÓLIDA (SPME) AL ACEITE ESENCIAL (AE) OBTENIDO POR HIDRODESTILACION ASISTIDA POR RADIACION CON MICROONDAS (MWHM)**

Según la técnica estandarizada por Jaramillo B, Stashenko E. y colaboradores

La exposición del AE se realizó con el objetivo de encontrar los componentes responsables del aroma. La fibra fue expuesta a temperatura ambiente durante 60 minutos utilizando el método espacio – cabeza como se observa en la Figura 6. La exposición se realizó por triplicado a las muestras obtenidas a una potencia 8.0 con 60 minutos de exposición a radiación con microondas. Posteriormente se retiró la fibra del vial y se desorbió en el puerto de inyección del GC, utilizando las condiciones establecidas en la sección 3.2.1<sup>87</sup>

---

<sup>87</sup> JARAMILLO, B. STASHENKO, E. Análisis por HRGC/FID/MSD de metabolitos secundarios de *Lippia alba* (Mill). En : CONGRESO COLOMBIANO DE QUIMICA (12º : 2001 : Bogotá). Memorias XII Congreso Colombiano de Química. Bogotá : Escuela de Química UIS, 2001 . p. 8

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

**4.1.1 Factor de Respuesta (Rf).** De acuerdo a la sección 3.3.5 se determinó el factor de respuesta utilizando las ecuaciones 7 y 8.

La repetibilidad de las áreas cromatográficas y los factores de respuesta se analizaron mediante la desviación estándar (?) y el coeficiente de variación (CV) como parámetros estadísticos (sección 3.3.4).

**Tabla 5. Repetibilidad de las áreas cromatográficas de n-tetradecano**

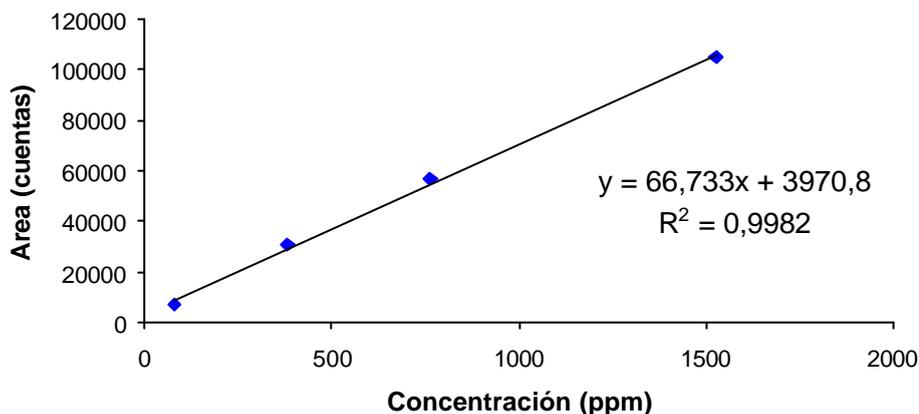
CONCENTRACIÓN (ppm)	ÁREA CUENTAS	ÁREA PROMEDIO	?	%CV
76	7431 7185 6884	7200	274	3.82
382	30117 31640 30203	31000	873	2.85
763	56465 58542 54956	57000	1800	3.18
1526	102786 101356 109992	105000	4630	4.42

Garner, Bargem y Ussurty afirman que:

Los valores del porcentaje del coeficiente de variación (%CV) oscilaron entre 0.63% y 4.42%, lo que indica que el método es altamente reproducible, teniendo en cuenta que el coeficiente de variación, es una estimación del error relativo que permite comparar la precisión de los resultados, se observa que son inferiores al 5% como lo recomiendan las buenas prácticas de laboratorio”<sup>88</sup>

La pendiente obtenida (66.733) corresponde al factor de respuesta que se utilizó para la cuantificación de los metabolitos secundarios del AE de las semillas de cacao.

**Figura 10. Determinación del factor de respuesta**



**4.1.2 Análisis de la reproducibilidad de los índices de Kovats ( $I_k$ ) de algunos componentes del aceite esencial (AE) de las semillas de cacao.** La Tabla 6, muestra la reproducibilidad de los Índices de Kovats ( $k$ ) de los componentes mayoritarios del AE de la semilla de cacao.

---

<sup>88</sup> GARNER, W. BARGEM, Y. USSURTY, J. Good Laboratory Practice Standards. Washington : ACS Professional Reference Book, 1992. p. 325.

**Tabla 6. Reproducibilidad de los índices de Kovats( $I_K$ ) experimentales de algunos compuestos del AE de las semillas de cacao**

COMPUESTO	$I_K$	$I_K$ Promedio	?	%CV
Alcohol Isoamílico	726	727	0.5	0.1
	727			
	727			
Alcohol Amílico	752	752	1.4	0.2
	751			
	753			
Heptanal	900	899	1.2	0.1
	898			
	898			
Benzaldehido	954	953	1.0	0.1
	952			
	953			
Fenil Acetaldehido	1037	1036	0.6	0.1
	1036			
	1036			
Acetofenona	1066	1066	0.6	0.1
	1065			
	1066			
Tetrametil Pirazina	1083	1082	0.6	0.1
	1082			
	1082			
Linalool	1098	1098	0.6	0.1
	1099			
	1098			
Fenil Etanol	1112	1113	0.6	0.1
	1113			
	1113			
Acetato de Linalool	1230	1232	1.5	0.1
	1232			
	1233			

Garner, Bargem y Ussurty afirman que: “Los valores de la desviación estándar (?) oscilaron entre 0.5 y 1.5, y los coeficientes de variación (%CV), no superaron el 0.2% lo que indica que la medición fue altamente reproducible como lo recomienda las Buenas Prácticas de Laboratorio”<sup>89</sup>

<sup>89</sup> Ibid., p. 325

## 4.2 ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.

**4.2.1 Análisis de los componentes del AE de las semillas de cacao por cromatografías de gases (GC) y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC – MS).** “Con base en los  $k$  calculados a partir de los tiempos de retención de los analitos y la mezcla de parafinas (Anexo A), y comparación de los espectros de masas”<sup>90</sup>, se identificaron en total 28 compuestos químicos presentes en los diferentes extractos de AE de la semilla de cacao obtenido por MWHD. El pico número 25 corresponde al estándar (n-tetradecano) utilizado para la cuantificación de los componentes.

**Tabla 7. Componentes del AE de las semillas de cacao obtenido por MWHD**

PICO No.	COMPUESTO	$t_r$	$I_k$
1	2-Butanol	4.416	701
2	Acido acético	5.375	719
3	Alcohol isoamílico	5.725	727
4	Alcohol amílico	5.891	752
5	2-3 Butanodiol	7.558	762
6	Acetato de isopentilo	14.966	869
7	Acetato de 2-metil butilo	15.807	879
8	2-Heptanona	16.649	890
9	Heptanal	17.599	899
10	Benzaldehido	21.015	955
11	Hexanoato de etilo	23.875	993
12	Fenil acetaldehído	26.182	1037
13	Acetofenona	27.332	1066
14	Tetrametil pirazina	28.432	1082
15	2-Nonanona	28.773	1090
16	Linalool	29.090	1099
17	Fenil etanol	29.731	1113
18	N.I	30.631	1134
19	Ocatanoato de etilo	32.896	1191
20	N.I	33.786	1218
21	Acetato de linalool	34.223	1232
22	Fenil acetato de etilo	34.512	1240
23	Acetato de 2-fenil etilo	34.921	1252
24	Benzoato de isobutilo	37.121	1323
25	Istd	39.351	1400
26	Dodecanoato de etilo	40.664	1448
27	Acido hexadecanoico	44.330	1587
28	Hexadecanoato de etilo	48.214	1754
29	N.I	50.672	----

<sup>90</sup> ADAMS, Robert. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois USA : Allured Publishing Corporation,. 1995. p. 251-257

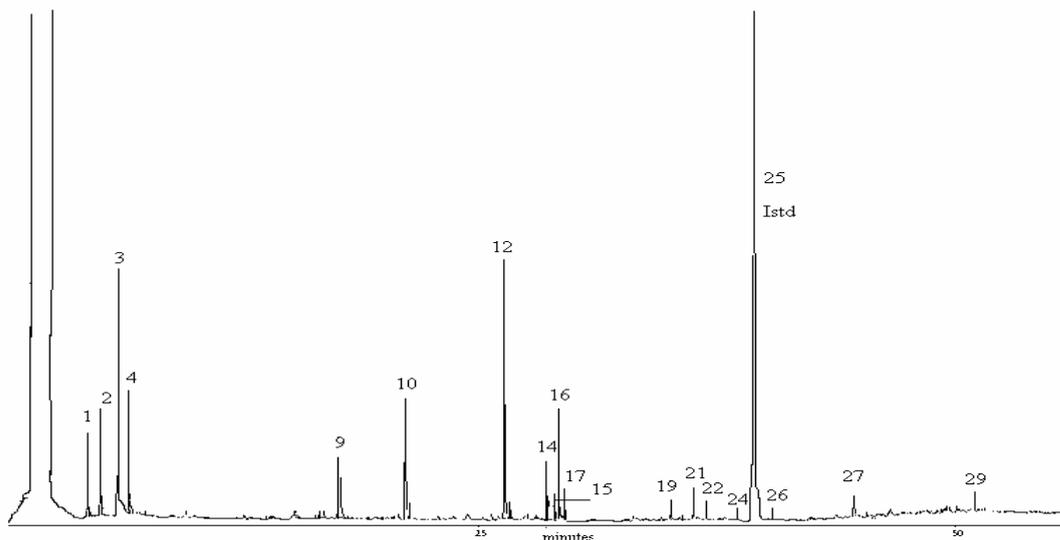
Aplicando el diseño experimental de la Tabla 4, en la primera extracción realizada se encontraron 18 compuestos como se indica en la Figura 11, destacándose por su intensidad el alcohol isoamílico (pico 3), alcohol amílico (pico 4), Benzaldehído (pico 10) y fenilacetaldéido (pico 12).

En el perfil cromatográfico de la Figura 12, se observa la aparición de tres nuevos compuestos correspondientes a: 2-Heptanona (pico 8), Acetofenona (pico 13) y Hexanoato de etilo (pico 28).

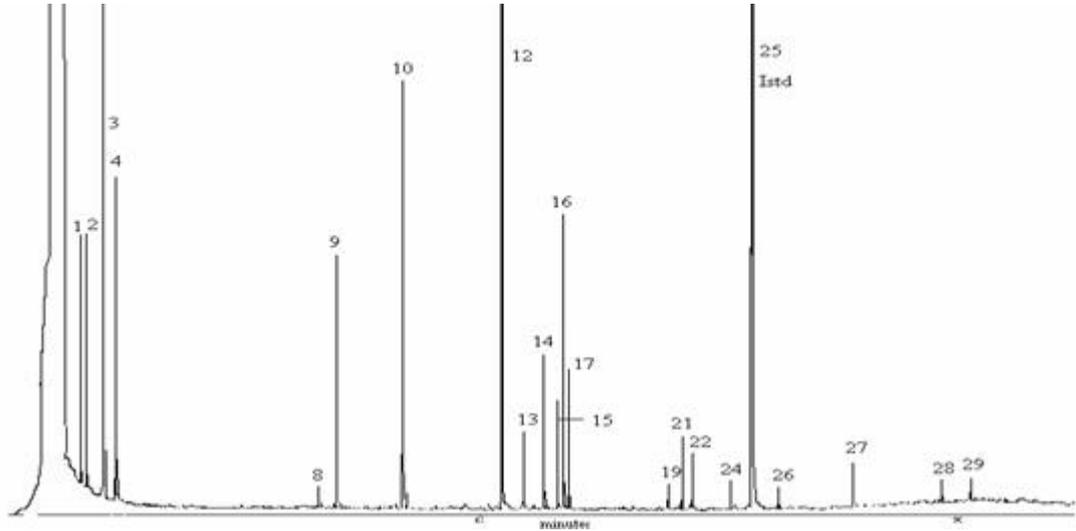
Al incrementar la potencia a 8.0 con 30 minutos de extracción se extrajeron 5 compuestos más, propios de los picos 5, 6, 7, 11 y 23 correspondientes a 2-3 butanodiol, acetato de isopentilo, Acetato de 2-metilbutilo, Hexanoato de etilo y Hexanoato de 2-feniletilo respectivamente, como se observa en el perfil de la Figura 13.

Al aumentar el tiempo de radiación con microondas a 60 minutos con potencia 8.0 se encontraron 2 compuestos más, los cuales corresponden a los picos 18 y 20 del cromatograma de la Figura 14, compuestos que no fue posible identificarlos por no corresponder sus patrones de fragmentación con los de la biblioteca del equipo, ni con los comparados con los de la literatura.

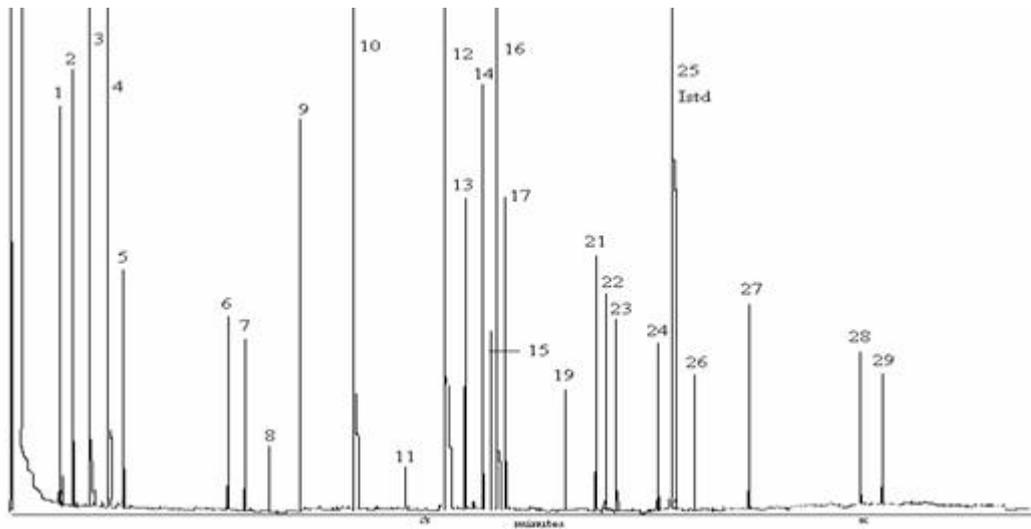
**Figura 11. Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de las semillas de cacao por MWHD a potencia 7.0 y 30 minutos de extracción.**



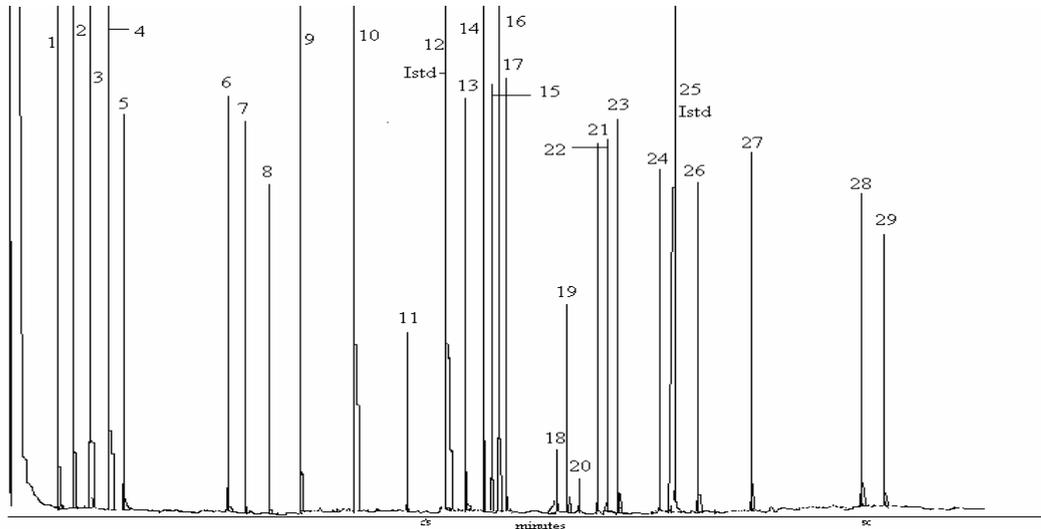
**Figura 12. Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de las semillas cacao por MWHD a potencia 7.0 y 60 minutos de extracción.**



**Figura 13. Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de cacao por MWHD a potencia 8.0 y 30 minutos de extracción.**



**Figura 14. Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de cacao por MWHD a potencia 8.0 y 60 minutos de extracción**



**4.2.2 Estandarización de la técnica de extracción hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) por número de compuestos.** Para determinar el mejor tratamiento de extracción de los componentes del AE de la semilla de cacao de acuerdo al número de compuestos extraídos, se aplicó un diseño DIA.

**Tabla 8. Diseño DIA para MWHD**

Tratamiento	Potencia	Tiempo ( min )
T <sub>1</sub>	7.0	30
T <sub>2</sub>	7.0	60
T <sub>3</sub>	8.0	30
T <sub>4</sub>	8.0	60

Además se aplicó un análisis de varianza (Anexo B.) para estimar si existe diferencia significativa entre los tratamientos para MWHD, en el Anexo C. se indica el cuadro ordenado de datos.

**Tabla 9. ANDEVA para el número de compuestos extraídos por MWHD**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabulada
Tratamientos	3	174	58	580	8
Error	8	1	0.1		
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>175</b>			

El ANDEVA, nos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos por el número de compuestos extraídos en la relación F calculada y F tabulada al 99% de confianza, debido a que la F calculada es mayor a la F tabulada, por lo tanto es necesario aplicar una prueba de significación estadística que determine cual es el mejor tratamiento para el número de compuestos extraídos por MWHD.

**Tabla 10. Aplicación prueba de Tukey para el número de compuestos extraídos por MWHD**

	T <sub>1</sub> 18	T <sub>2</sub> 21	T <sub>3</sub> 26	T <sub>4</sub> 28
T <sub>4</sub> 28	10*	7*	2*	----
T <sub>3</sub> 26	8*	5*	----	
T <sub>2</sub> 21	3*	----		
T <sub>1</sub> 18	----			

\*Diferencia significativa entre los tratamientos comparados

El valor obtenido del comparador de Tukey al 99% de confianza, es igual a 1.03 (Anexo D.) lo que indica que no hay ligamientos entre tratamientos para el número de compuestos extraídos por MWHD debido a que la diferencia entre tratamientos es mayor al valor del comparador de Tukey, por tanto las condiciones de potencia 8.0 y 60 minutos (tratamiento 4) de exposición a la radiación con microondas del material vegetal, son óptimas para aislar el mayor número de compuestos del AE

de cacao porque el tratamiento 4 presenta diferencia significativa con los demás tratamientos.

La composición del AE de la semilla de cacao consta básicamente de compuestos oxigenados y una amina los cuáles los hemos clasificado de acuerdo a sus grupos funcionales como se indica en la Tabla 11.

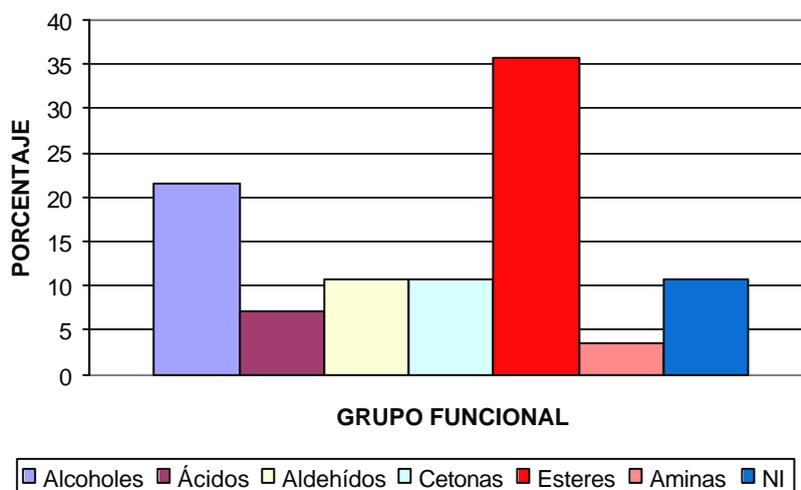
**Tabla 11. Grupos funcionales presentes en el AE de las semillas de cacao a potencia 8.0 y 60 minutos de extracción**

GRUPO FUNCIONAL	NUMERO DE COMPUESTOS	PORCENTAJE
Alcoholes	6	21.43
Ácidos	2	7.14
Aldehídos	3	10.71
Cetonas	3	10.71
Ésteres	10	35.71
Aminas	1	3.57
N.I	3	10.71

N.I : Compuesto no identificado

En la Figura 15, se observa que los ésteres son el grupo funcional que se encuentra en mayor porcentaje con respecto a los otros grupos funcionales superando el 35%, seguido de los alcoholes con un 21%.

**Figura 15. Porcentaje de los compuestos presentes en el AE de las semillas de cacao a potencia 8.0 y 60 minutos de extracción**



**4.2.3 Análisis de los componentes responsables del aroma del aceite esencial (AE) de las semillas de cacao utilizando microextracción en fase sólida espacio cabeza (HS-SPME) y cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID).** Jaramillo y Stashenko reportan que:

Se utilizó HS-SPME como método de extracción de los volátiles responsables del aroma del AE de la semilla de cacao, obtenido por MWHD en condiciones de potencia 8.0 y 60 minutos de extracción, para posteriormente realizar la exposición a la fibra durante 60 minutos a temperatura ambiente condiciones estandarizadas por Jaramillo B, Stashenko E. y colaboradores en el trabajo análisis por HRGC/FID/MSD de metabolitos secundarios de *Lippia alba (Mill)*<sup>91</sup>

Se encontraron 13 compuestos responsables del aroma del AE (ésteres, aldehídos, alcoholes y cetonas), ver Tabla 12, que se identificaron en relación a los  $I_K$  encontrados, proceso que se realizó por triplicado (Tabla 12). Las condiciones de corrida cromatográfica fueron las mismas que se utilizaron en la identificación de los componentes del AE de la semilla de cacao en la sección 3.2.1.

---

<sup>91</sup> JARAMILLO y STASHENKO, Op.cit., p. 8

**Tabla 12. Reproducibilidad de los índices de Kovats(I<sub>K</sub>) experimentales de los compuestos responsables del aroma del AE de las semillas de cacao**

Pico No.	COMPUESTO	I <sub>K</sub>	I <sub>K</sub> Promedio	?	%CV
6	Acetato de Isopentilo	867	869	1.7	0.2
		870			
		870			
8	2-Heptanona	891	890	1.0	0.1
		889			
		890			
9	Heptanal	897	899	1.5	0.2
		900			
		899			
10	Benzaldehido	952	955	2.6	0.3
		957			
		956			
12	Fenil Acetaldehido	1033	1037	3.2	0.3
		1039			
		1038			
15	2-Nonanona	1093	1090	3.1	0.3
		1087			
		1089			
16	Linalool	1098	1099	0.6	0.1
		1099			
		1099			
17	Fenil Etanol	1116	1103	3.1	0.3
		1110			
		1114			
19	Octanoato de Etilo	1189	1191	3.8	0.3
		1188			
		1195			
21	Acetato de Linalool	1235	1232	2.6	0.2
		1230			
		1231			
23	Acetato de 2-feniletilo	1254	1252	1.5	0.1
		1251			
		1252			
24	Benzoato de Isobutilo	1225	1223	2.6	0.2
		1220			
		1224			
26	Dodecanoato de etilo	1450	1448	2.1	0.2
		1446			
		1447			

Garner, Bargem y ussurty afirman que: “Los valores de la desviación estándar (?) oscilaron entre 0.6 y 3.8, y los coeficientes de variación (CV), no superaron el 0.3% lo que indica que la medición fue altamente reproducible como lo recomienda las Buenas Prácticas de Laboratorio”<sup>92</sup>.

**Tabla 13. Compuestos responsables del aroma del AE de las semillas de cacao**

PICO No	COMPUESTO	I <sub>k</sub>	PORCENTAJE (%)
6	Acetato de isopentilo	869	4.18
8	2-Heptanona	890	5.81
9	Heptanal	899	9.60
10	Benzaldehido	955	10.48
12	Fenil acetaldehído	1037	17.08
15	2-Nonanona	1090	4.77
16	Linalool	1099	6.11
17	Fenil etanol	1113	11.99
19	Octanoato de etilo	1191	1.34
21	Acetato de linalool	1232	2.12
23	Acetato de 2- fenil etilo	1252	2.12
24	Benzoato de isobutilo	1223	27.90
26	Dodecanoato de etilo	1448	1.53

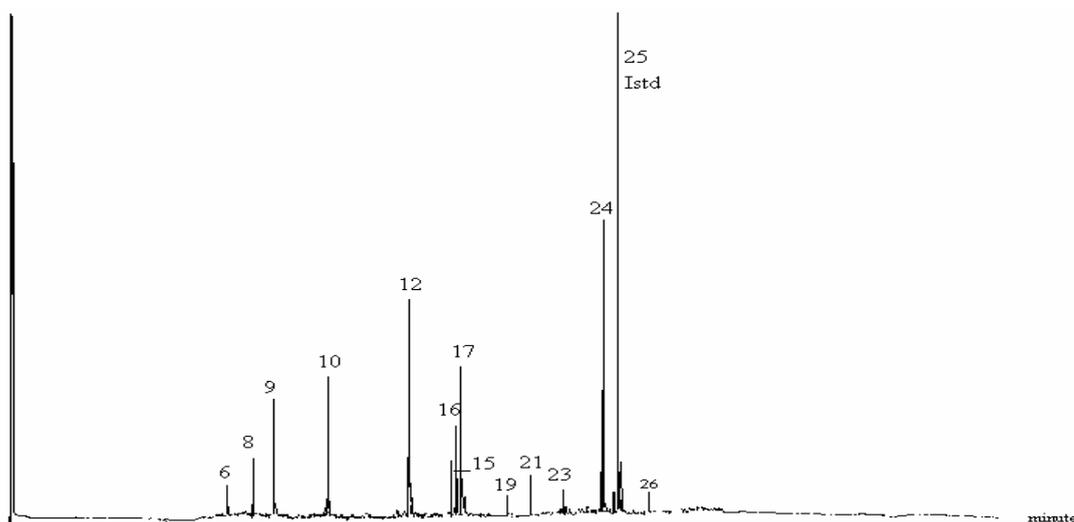
Como se observa en la Tabla 13, todos los compuestos responsables del aroma del AE de la semilla de cacao son oxigenados y le proporcionan en mayor o menor grado su olor característico.

<sup>92</sup> GARNER, BARGEM y USSURTY, Op.cit., p. 325

Estos 13 compuestos le dan un aroma característico a las semillas de cacao presentando un aroma fuerte y molesto al concentrar su AE pero que en dilución genera un aroma agradable.

Jaramillo y Stashenko: "Además no todos los componentes de un AE son los responsables del aroma de un determinado material vegetal, generalmente lo conforman los metabolitos secundarios volátiles oxigenados que le dan en conjunto un olor característico a la planta en estudio"<sup>93</sup>

**Figura 16. Perfil cromatográfico por GC-FID de los componentes responsables del aroma del AE de las semillas de cacao obtenido por HS-SPME**



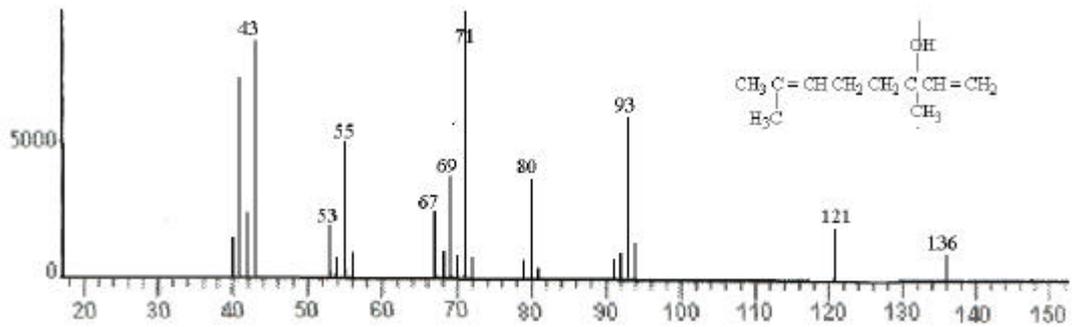
### **4.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL (AE) DE LAS SEMILLAS DE CACAO POR DETECTOR SELECTIVO DE MASAS (MSD)**

**4.3.1 Fragmentación en espectrometría de masas de alcoholes.** Antes de la ionización, algunos alcoholes suelen sufrir deshidratación térmica, también se observa la ruptura  $\beta$ ,  $\gamma$ , y la deshidrogenación de algunos alcoholes para formar aldehídos y cetonas.

---

<sup>93</sup> JARAMILLO y STASHENKO, Op.cit., p. 8

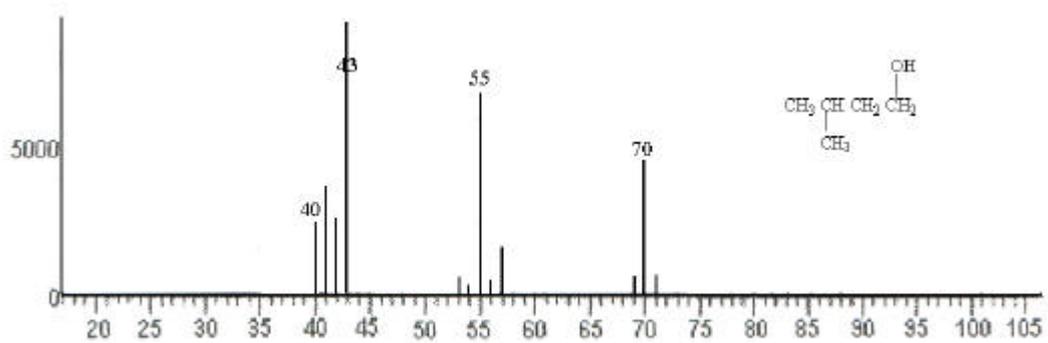
Figura 17. Espectro de masas del Linalool



El espectro de masas del linalool, presenta un pico base en m/z 71, debido a la pérdida de un radical alquilo como se indica en la Figura 18.

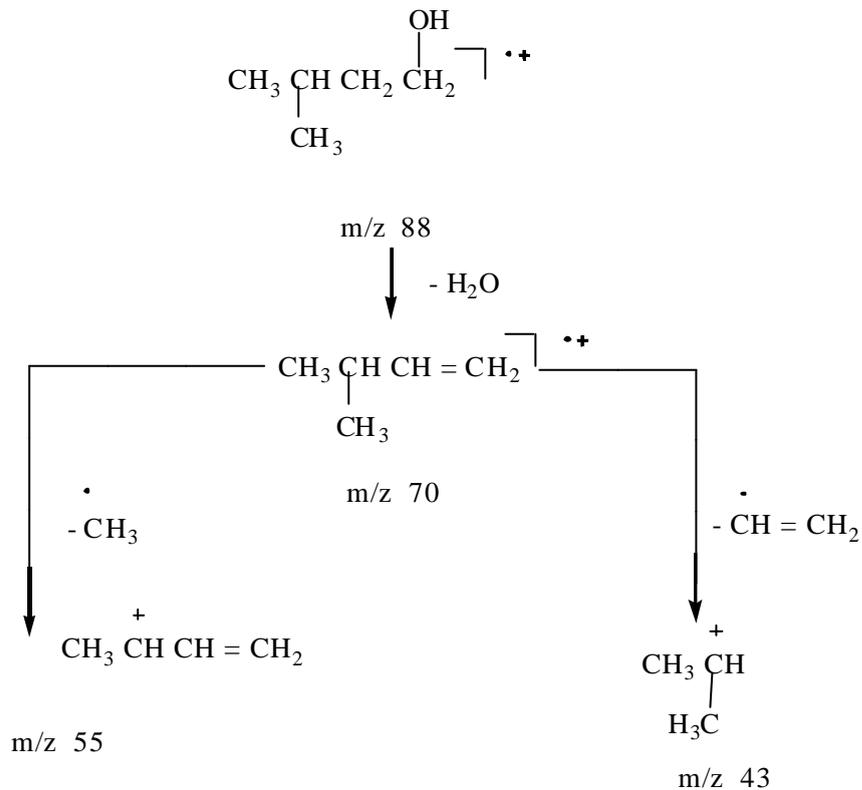


**Figura 19. Espectro de masas del Alcohol isoamílico**



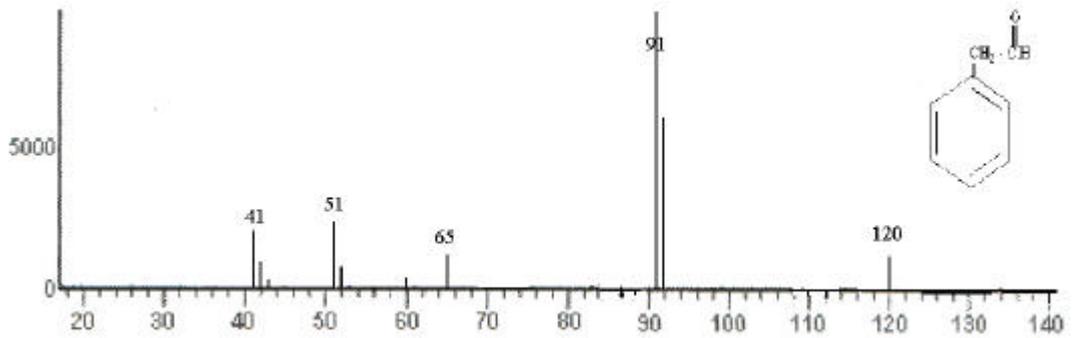
El pico base del alcohol isoamílico se presenta en m/z 43, debido a la deshidratación del ion molecular seguido de la pérdida de un radical. Las posibles rutas de fragmentación se indican en la Figura 20.

**Figura 20. Posibles rutas de fragmentación del alcohol isoamílico**



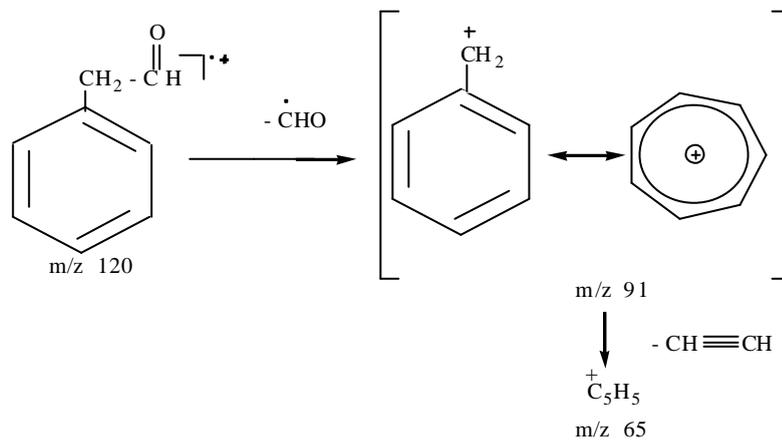
**4.3.2 Fragmentación en espectrometría de masas de Aldehídos.** El pico del ion molecular en los aldehídos inferiores es intenso, el cual disminuye al aumentar el peso molecular del aldehído o las ramificaciones.

**Figura 21. Espectro de masas del fenil acetaldehído**

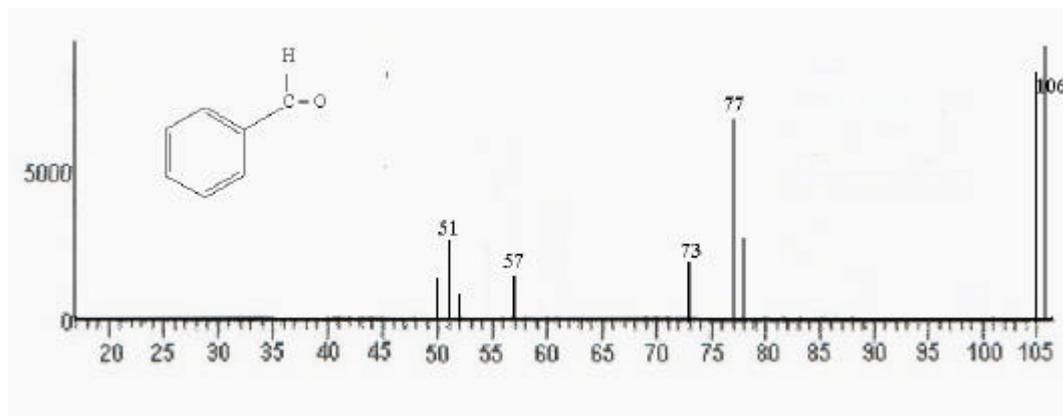


El pico base aparece en la relación m/z 91 que resulta de la pérdida del grupo aldehído del ion molecular en m/z 120.

**Figura 22. Posibles rutas de fragmentación del Fenil acetaldehído**

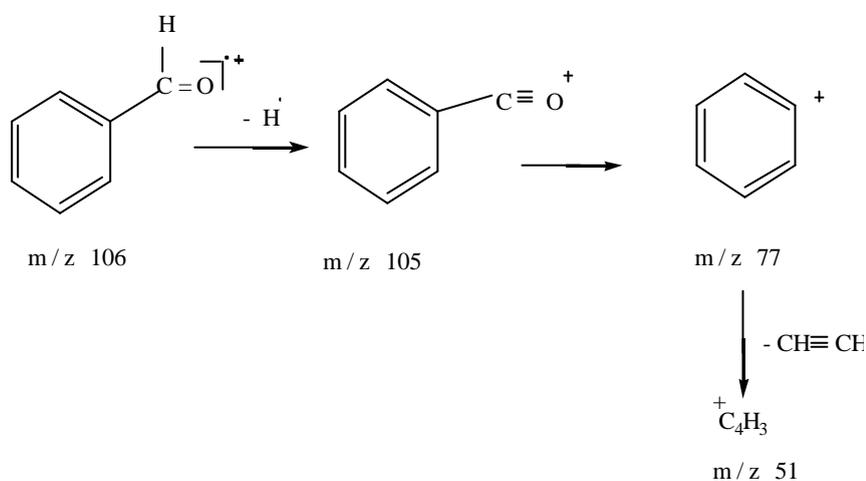


**Figura 23. Espectro de masas del Benzaldehido.**



El ion molecular del Benzaldehido coincide con el pico base en la relación  $m/z$  106, las posibles rutas de fragmentación se detallan en la Figura 24.

**Figura 24. Posibles rutas de fragmentación del Benzaldehido**

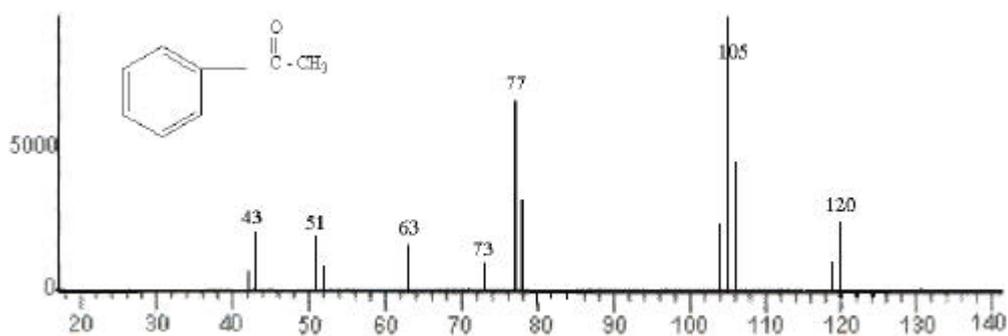


**4.3.3 Fragmentación en espectrometría de masas de Cetonas.** El pico del ion molecular al igual que en los aldehídos es intenso y casi siempre está presente.

El patrón de fragmentación de las cetonas alifáticas es muy similar al de los aldehídos. La pérdida de grupos alquilo por escisión de los enlaces contiguos al grupo carbonilo produciendo fragmentos hidrocarbonados y carbonilados es un

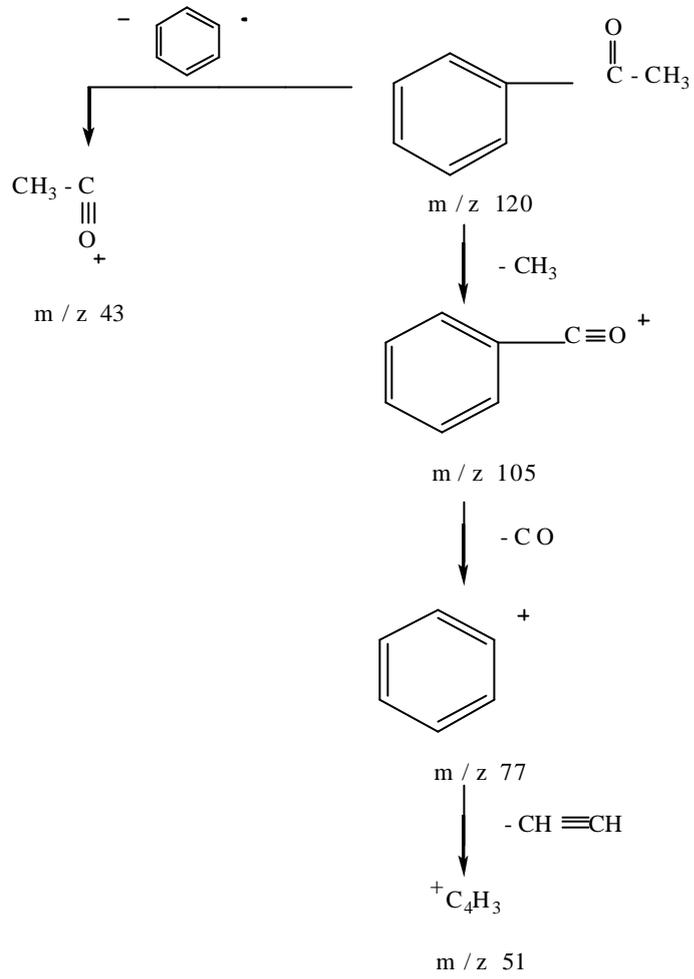
modo importante de fragmentación. El grupo alquilo de los dos unidos al grupo carbonilo es mas probable que se pierda.

**Figura 25. Espectro de masas de la Acetofenona**

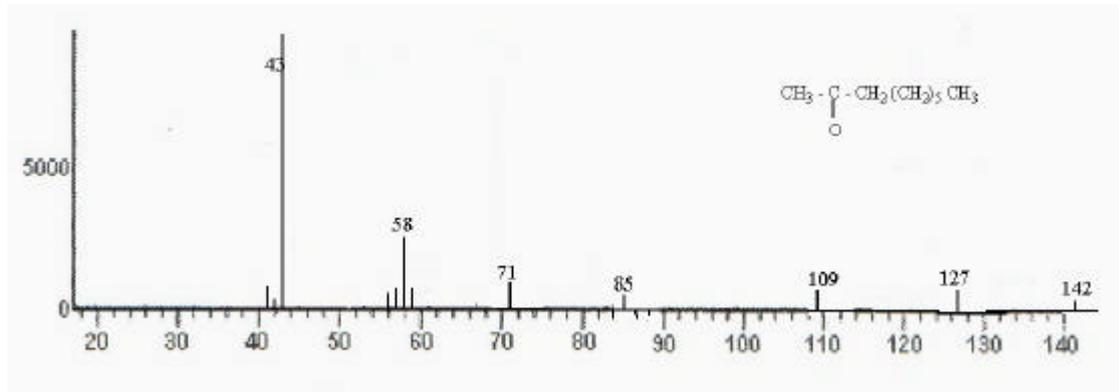


El ion molecular se presenta en m/z 120, y da lugar al pico base en m/z 105 al perder un radical metilo.

Figura 26. Posibles rutas de fragmentación de la acetofenona

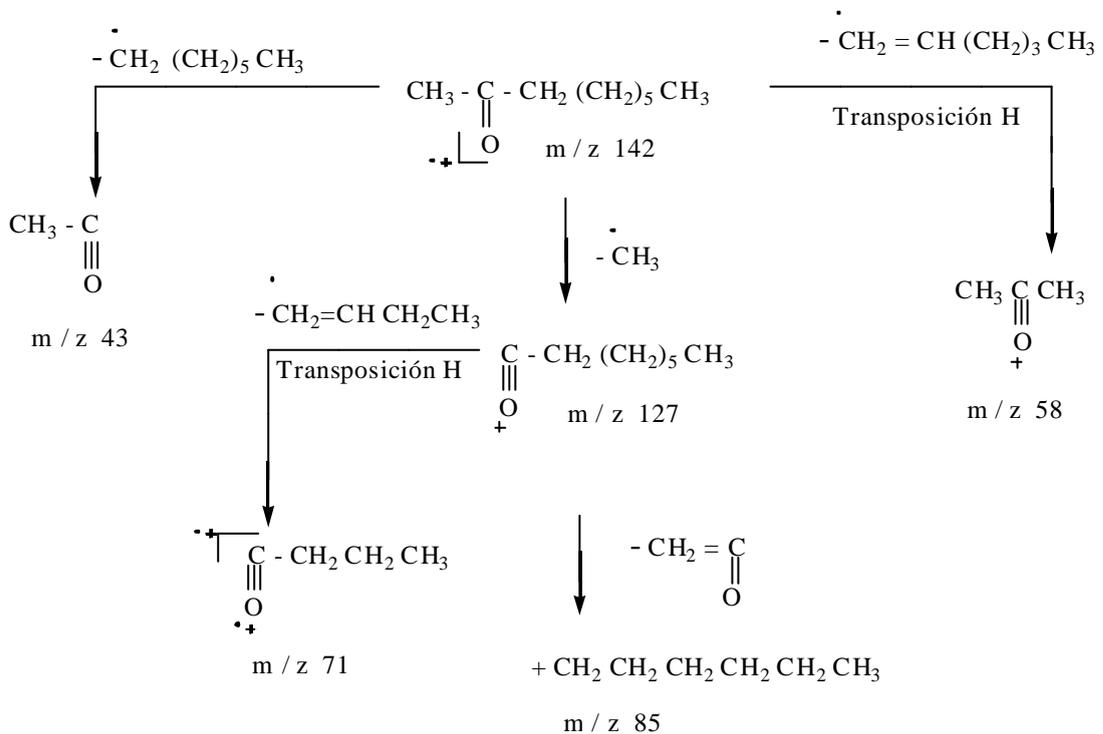


**Figura 27. Espectro de masas de la 2- Nonanona.**



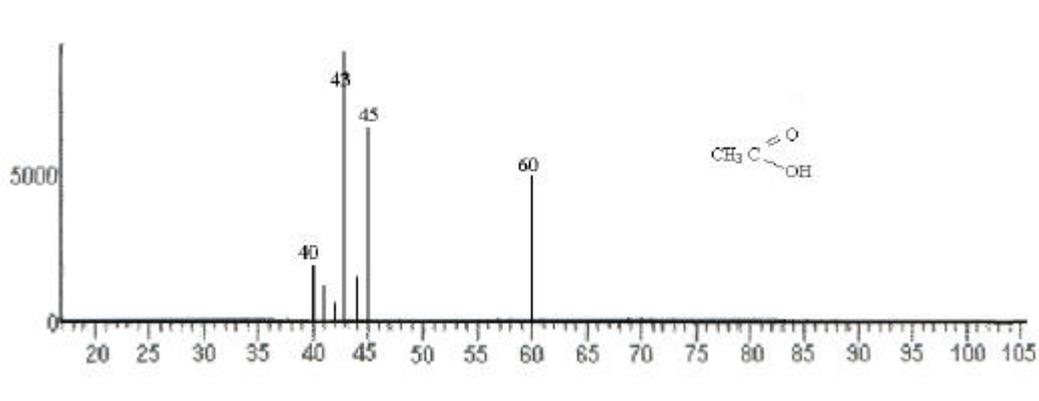
El pico del ion molecular se registra en m/z 142, y da lugar al pico base en m/z 43 por escisión? . Las posibles rutas de fragmentación se indican en la Figura 28.

**Figura 28. Posibles rutas de fragmentación de la 2- Nonanona**



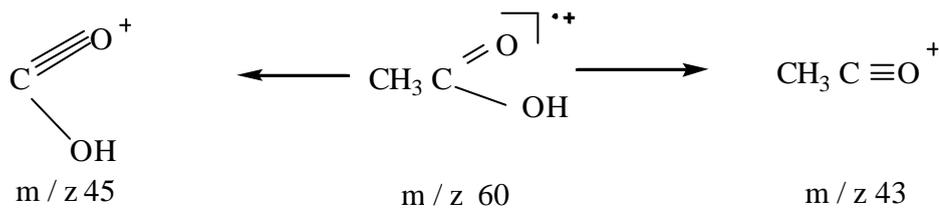
**4.3.4 Fragmentación en espectrometría de masas de los Ácidos.** El pico del ion molecular de los ácidos monocarboxílicos alifáticos generalmente es observable aunque es débil. En los compuestos muy ramificados o poliácidos no existe  $M^+$ , o es pequeño. En los ácidos de cadena corta se observan picos a  $[M-OH]$  y  $[M-COOH]$  debido a la escisión (al lado y ladodel grupo carbonilo).

**Figura 29. Espectro de masas del Acido acético**

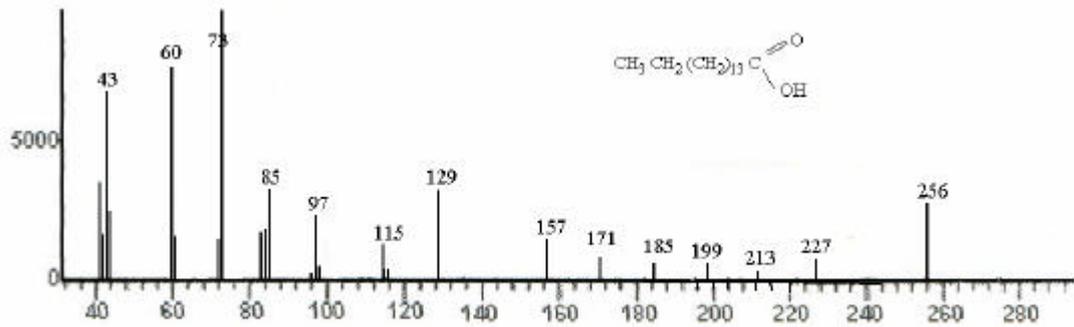


El pico base del ácido acético se observa en  $m/z$  43 y se genera a partir del ion molecular en  $m/z$  60 por pérdida del grupo hidroxilo ( $OH^-$ ).

**Figura 30. Posibles rutas de fragmentación del Acido acético**

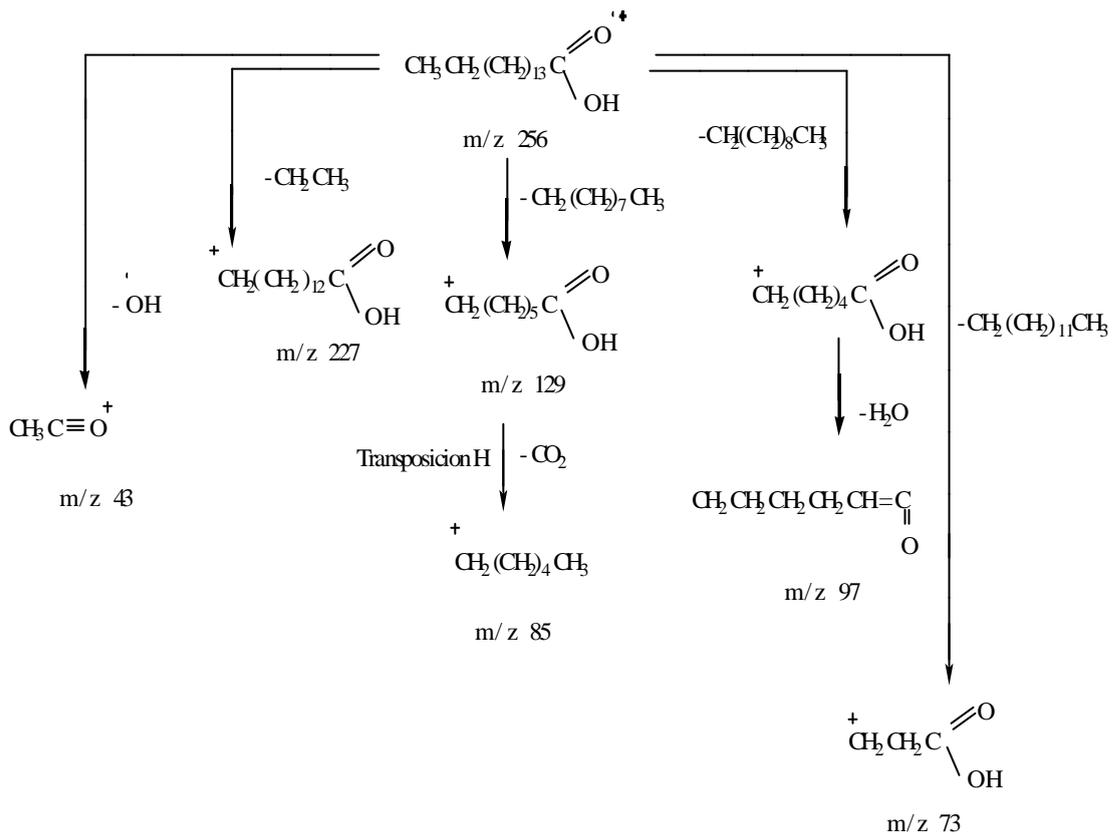


**Figura 31. Espectro de masas del Acido hexadecanoico**



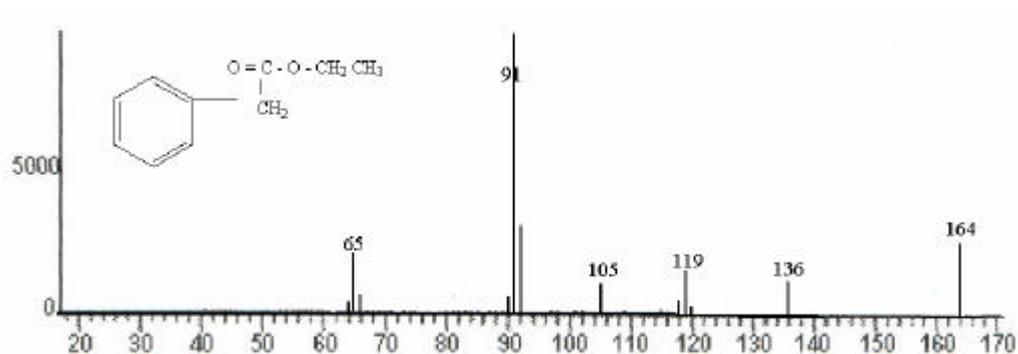
El ion molecular en  $m/z$  256, da lugar al pico base en  $m/z$  73 por una escisión  $\beta$ , con la posterior pérdida de un radical alquilo.

**Figura 32. Posibles rutas de fragmentación del Acido hexadecanoico**



**4.3.5 Fragmentación en espectrometría de masas de Ésteres.** Según Zuolaga, Insuasty y Yates: 'El pico del ion molecular en los ésteres metílicos de cadena normal generalmente es definido. El ion molecular es débil en el intervalo de  $m/z$  130 hasta cerca de  $m/z$  200 los iones resultan de las escisiones  $\alpha$  y  $\beta$ '<sup>94</sup>.

**Figura 33. Espectro de masas del Fenil acetato de etilo**



El pico base se presenta en  $m/z$  91, y se forma a partir del ion molecular en  $m/z$  164 por la pérdida del radical etoxi y posterior pérdida de una molécula de monóxido de carbono.

<sup>94</sup> ZOLUAGA, INSUASTY y YATES, Op.cit., p. 189-202

Figura 34. Posibles rutas de fragmentación del Fenil acetato de etilo

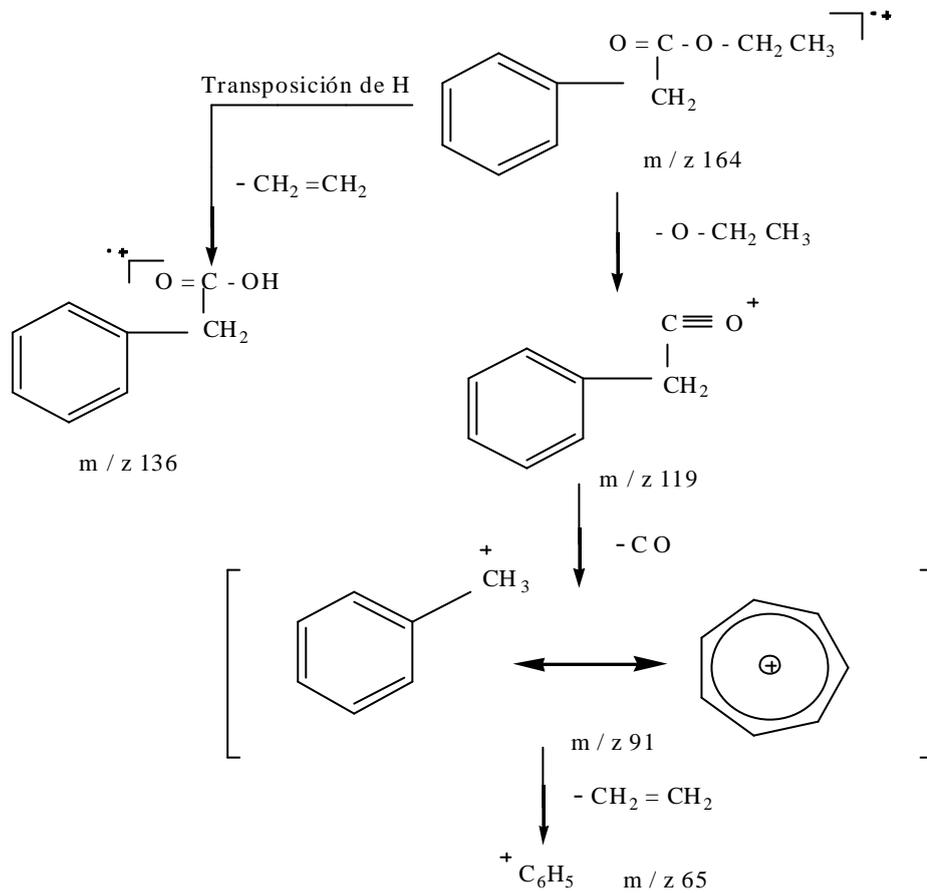
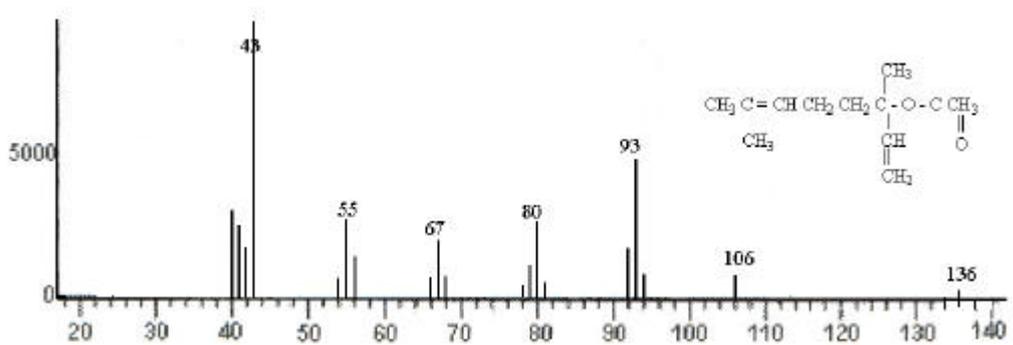
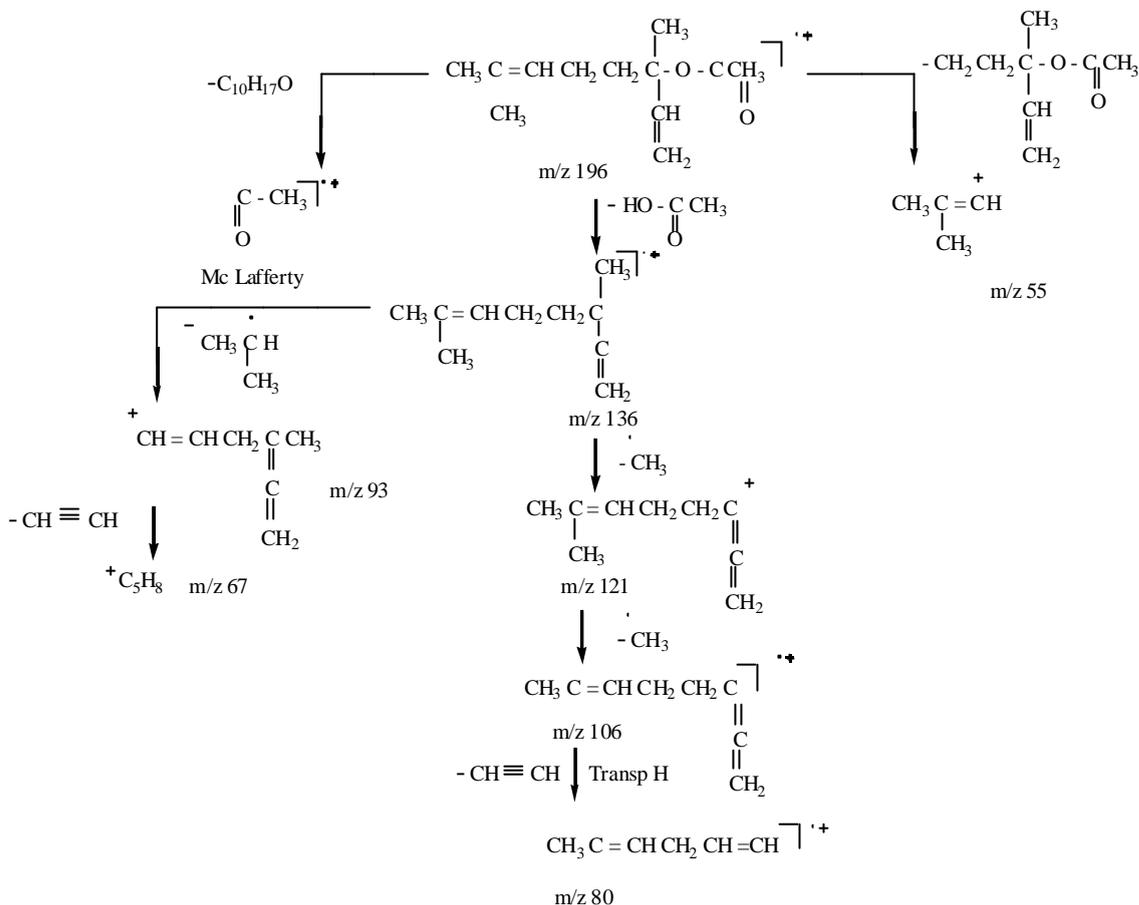


Figura 35. Espectro de masas del Acetato de linalool



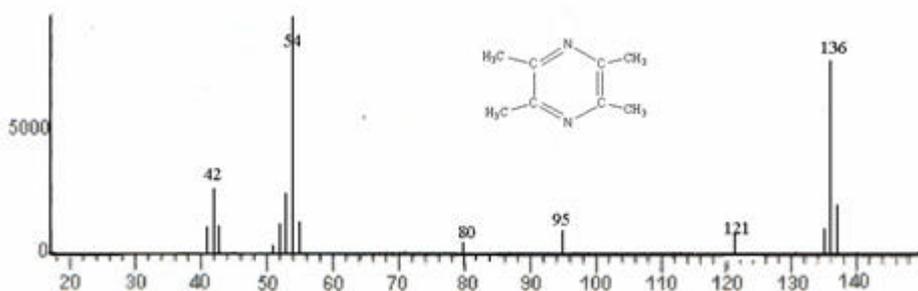
El pico base en m/z 43, se origina por la pérdida del alcoxi del ion molecular en m/z 196. Las posibles rutas de fragmentación se indican en la Figura 36.

**Figura 36. Posibles rutas de fragmentación del Acetato de linalool**



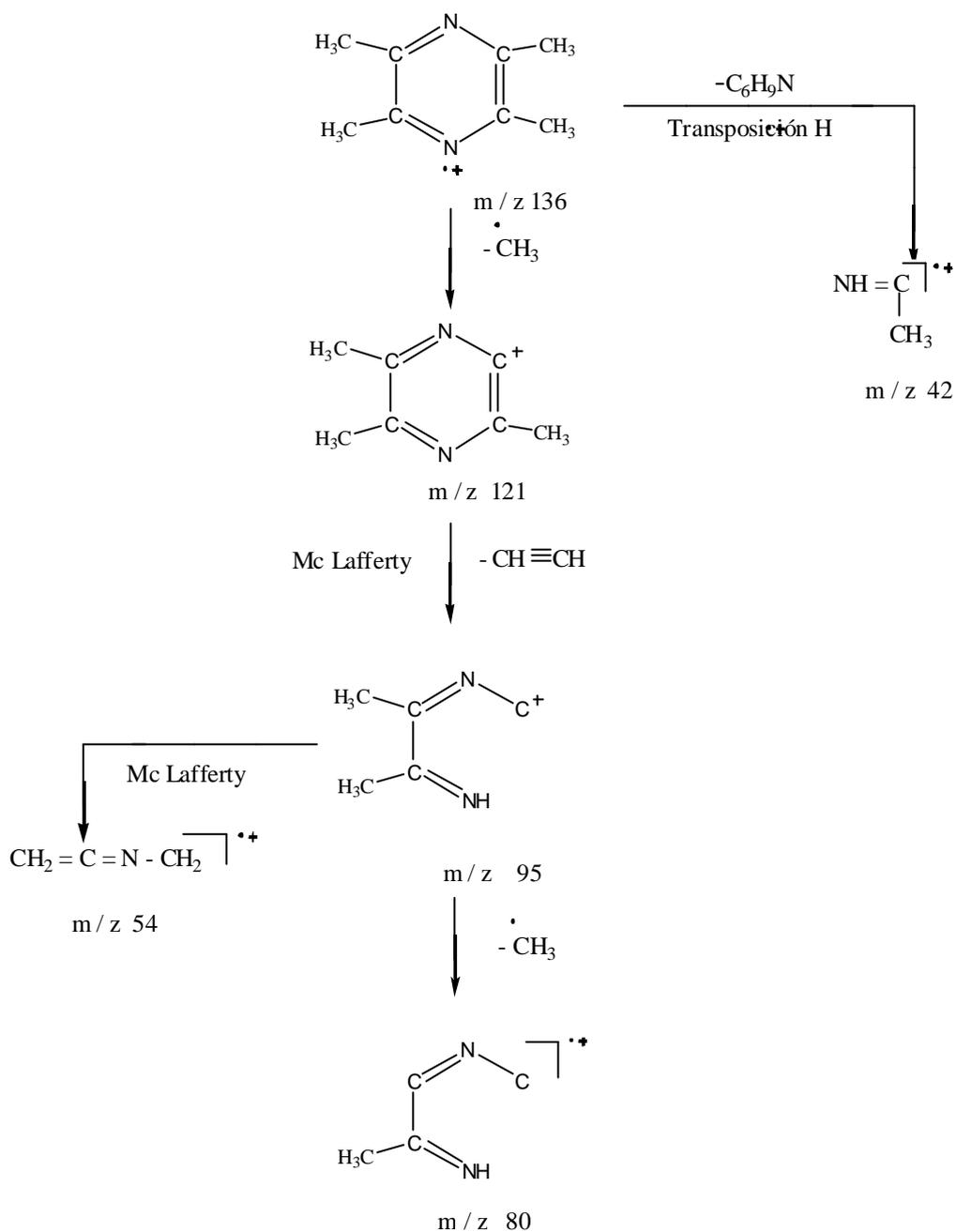
#### 4.3.6 Fragmentación en espectrometría de masas de la Tetrametil pirazina

**Figura 37. Espectro de masas de la Tetrametil pirazina**



El pico base en m/z 54 se forma a partir del ion molecular en m/z 136, como se indica en las posibles rutas de fragmentación de la Figura 38.

**Figura 38. Posibles rutas de fragmentación de la Tetrametil pirazina**



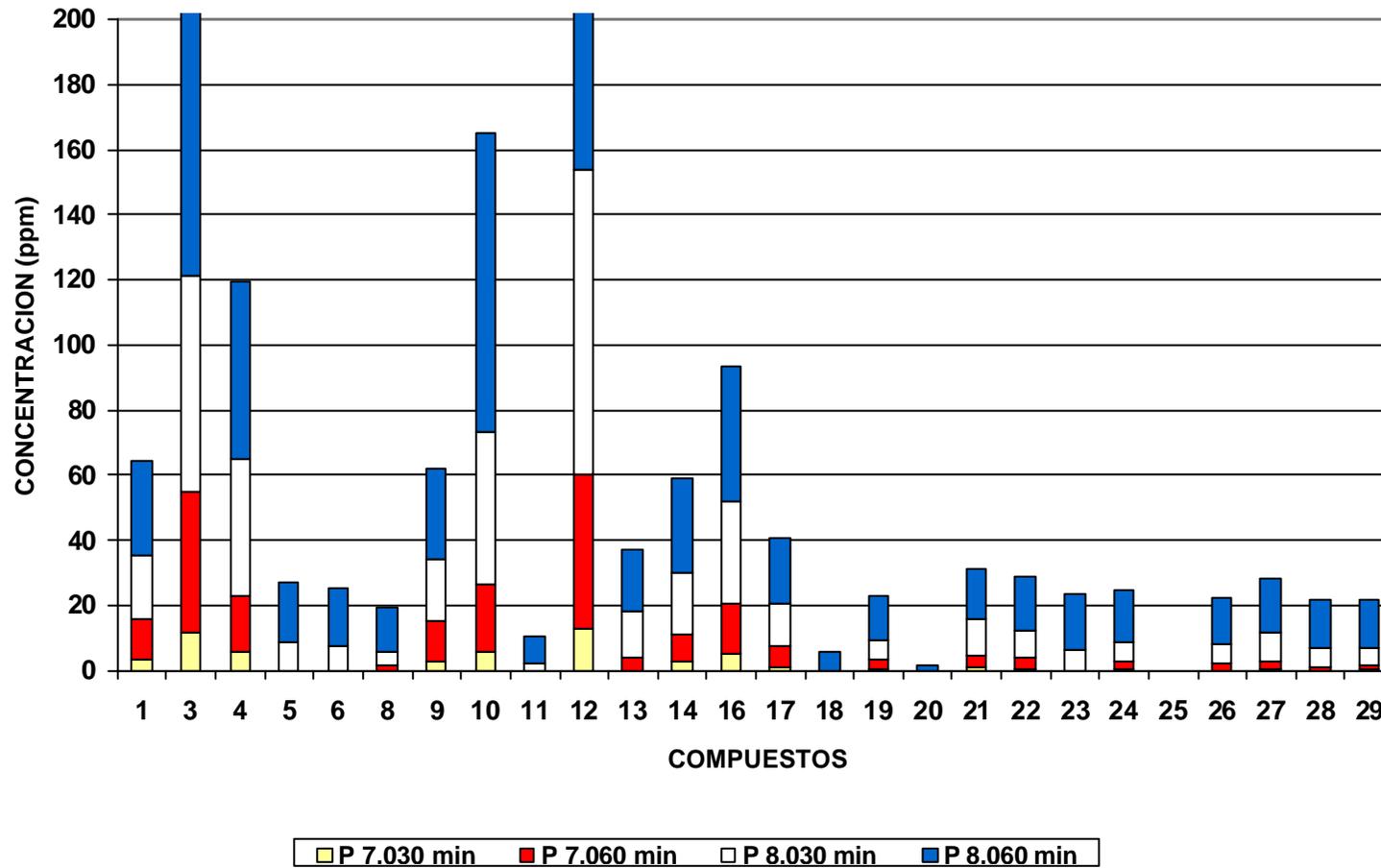
#### 4.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LAS SEMILLAS DE CACAO

La cuantificación se llevó a cabo por la técnica del patrón interno (n-tetradecano) para el AE de las semillas de cacao obtenida por MWHD teniendo en cuenta la ecuación 8 con un valor de factor de respuesta (Rf) = 66.733 cuentas \* L/mg, Vf = 0.005 L y Wx = 0.5 Kg. En la Tabla 15 se muestran las concentraciones obtenidas aplicando el diseño experimental de la Tabla 14.

**Tabla 14. Concentración relativa de los componentes del AE de las semillas de cacao obtenido por MWHD**

PICO No.	COMPUESTO	I <sub>k</sub>	CONCENTRACIÓN (mg/Kg)			
			Potencia 7.0		Potencia 8.0	
			30 min	60 min	30 min	60min
1	2-Butanol	701	3.5	12.2	19.9	28.8
2	Acido acético	719	4.4	13.5	23.1	36.5
3	Acohol isoamílico	727	11.5	43.7	66.0	118.4
4	Alcohol amílico	752	5.8	17.4	41.9	54.4
5	2,3-Butanodiol	762	----	----	8.7	18.5
6	Acetato de isopentilo	869	----	----	7.4	17.9
7	Acetato de 2-metil butilo	879	----	----	5.7	17.3
8	2-Heptanona	890	----	1.6	4.2	13.6
9	Heptanal	899	2.7	12	19.1	27.5
10	Benzaldehido	955	5.8	20.6	47.0	91.9
11	Hexanoato de etilo	993	----	----	2.2	8.5
12	Fenil acetaldehído	1037	12.9	47.3	93.5	164.2
13	Acetofenona	1066	----	4.3	14.1	18.7
14	Tetrametil pirazina	1082	2.9	8.3	19.0	29.1
15	2-Nonanona	1090	1.1	4.6	8.9	19.2
16	Linalool	1099	5.2	15.8	30.8	41.7
17	Fenil etanol	1113	1.3	6.1	13.5	19.6
18	N. I	1134	----	----	----	5.6
19	Octanoato de etilo	1191	0.7	2.8	5.7	13.9
20	N.I	1218	----	----	----	1.5
21	Acetato de linalool	1232	1.2	3.6	11.0	15.8
22	Fenil acetato de etilo	1240	0.7	3.2	8.5	16.8
23	Acetato de 2-fenil etilo	1252	----	----	6.4	17.4
24	Benzoato de isobutilo	1323	0.4	2.4	6.0	16.2
26	Dodecanoato de etilo	1448	0.2	2.1	5.8	14.4
27	Acido hexadecanoico	1587	0.7	2.2	8.6	16.6
28	Hexadecanoato de etilo	1754	----	0.9	5.8	15.2
29	NI		0.4	1.2	5.3	14.8

Figura 39. Concentración de los compuestos del AE de las semillas de cacao obtenido por MWHD



En la Figura 39 se observa cómo a medida que se incrementa la potencia y los tiempos de extracción, las concentraciones de los compuestos aumentan de manera significativa en algunos de los componentes como el Alcohol isoamílico (3), Benzaldehído (10) y Fenil acetaldehído (12).

**4.4.1 Estandarización de la técnica de extracción hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) por concentración de los componentes del aceite esencial (AE) de las semillas de cacao.** Para determinar el mejor tratamiento de extracción según la concentración de los componentes del AE de la semilla de cacao, se aplicó un diseño DIA (Tabla 8), teniendo en cuenta el número de compuestos comunes en todas la extracciones. Además se realizó un análisis de varianza para estimar si existe diferencia significativa entre tratamientos. El cuadro ordenado de datos se indica en el Anexo E.

**Tabla 15. ANDEVA para la concentración de los compuestos del AE de las semillas de cacao extraídos por MWHD**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>F calculada</b>	<b>F tabulada</b>
<b>Tratamientos</b>	3	43197	14399	23	8
<b>Error Experimental EE</b>	8	87572	613		
<b>Error de Muestreo EM</b>	204	42382			
<b>Total</b>	215	173151			

El ANDEVA, nos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos, en la relación F calculada y F tabulada al 99% de confianza, debido a que la F calculada es mayor que la F tabulada, por lo tanto es necesario aplicar una prueba de significación estadística que determine cual es el mejor tratamiento para la mayor concentración de los compuestos extraídos por MWHD.

**Tabla 16. Aplicación prueba de Tukey para la concentración de los compuestos extraídos por MWHD**

	<b>T<sub>1</sub> 61.4</b>	<b>T<sub>2</sub> 215.6</b>	<b>T<sub>3</sub> 432.6</b>	<b>T<sub>4</sub> 739.7</b>
<b>T<sub>4</sub> 739.7</b>	678.3*	524.1*	307.1*	----
<b>T<sub>3</sub> 432.6</b>	371.2*	217.0*	----	
<b>T<sub>2</sub> 215.6</b>	154.2*	----		
<b>T<sub>1</sub> 61.4</b>	----			

\*Diferencia significativa entre los tratamientos comparados

El valor obtenido del comparador de Tukey al 99% de confianza, es igual a 80.48 (Anexo D.) lo que indica que no hay ligamientos entre tratamientos para la concentración de los compuestos extraídos por MWHD debido a que la diferencia entre tratamientos es mayor que el valor del comparador de Tukey, por lo tanto las condiciones de potencia 8.0 y 60 minutos (tratamiento 4) de exposición a la radiación con microondas del material vegetal, son óptimas para obtener la mayor concentración de los compuestos del AE de las semillas de cacao porque el tratamiento 4 presenta diferencias significativas con los demás tratamientos.

## 5. CONCLUSIONES

? Por medio del método de Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) con variaciones de tiempo y potencia, se obtuvieron los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de las semillas de cacao.

? Utilizando cromatografía de gases (GC) con Detector de ionización en llama (FID) y detector selectivo de masas (MSD) se determinó la composición cualitativa y cuantitativa de los principales componentes del aceite esencial de las semillas de cacao.

? Por medio de Microextracción en fase sólida con espacio-cabeza (HS-SPME) como método de extracción y utilizando cromatografía de gases (GC) con Detector de ionización en llama (FID) se determinó la composición cualitativa de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles responsables del aroma de las semillas de cacao.

? La identificación de los metabolitos secundarios de las semillas de cacao se realizó con base en los índices de Kovats ( $k$ ) y espectros de masas (EI, 70 eV). Se detectaron en total 28 compuestos en los diferentes extractos obtenidos de las semillas de cacao. En condiciones de potencia 7.0 a 30 minutos de exposición se extrajeron 18 compuestos, potencia 7.0 con 60 minutos de exposición 21 compuestos, potencia 8.0 con 30 minutos de exposición 26 compuestos y potencia 8.0 con 60 minutos de exposición 28 compuestos.

? De acuerdo con el análisis estadístico realizado, el mejor tratamiento para la extracción del mayor número de compuestos, correspondió a las condiciones de potencia 8.0 y 60 minutos de exposición del material vegetal a las microondas.

? Al aumentar el tiempo de exposición del material vegetal a la radiación con microondas por encima de 70 minutos o incrementar la potencia a un valor mayor al 80% de radiación total, los metabolitos secundarios volátiles sufren degradación térmica.

? La identificación de los metabolitos secundarios responsables del aroma se realizó con base a los índices de Kovats ( $I_k$ ) 13 en total. El Benzoato de isobutilo, Fenil acetaldehído, Benzaldehido, Fenil etanol y Heptanal fueron los principales componentes.

? Se logró identificar 25 de los 28 metabolitos secundarios del aceite esencial de las semillas de cacao, correspondientes al 89.29%. Esteres (35.71%), Alcoholes

(21.43%), Aldehídos (10.71%), Cetonas (10.71%), Ácidos (7.14%), Aminas (3.57%).

? El Fenil acetaldehído fue el principal componente del aceite esencial de las semillas de cacao y el Benzoato de isobutilo fue el metabolito secundario principal del aroma de las semillas de cacao, por lo cual no siempre el componente que se encuentre en mayor concentración en el aceite esencial, es el principal responsable del aroma.

? Se cuantificó con el método del estándar interno utilizando n-tetradecano como estándar interno, y se encontraron 4 compuestos que superaron los 50 ppm, 2 alcoholes: Alcohol isoamílico 118.4 ppm y Alcohol amílico 54.4 ppm, y 2 aldehídos: Benzaldehido 91.9 ppm y Fenil acetaldehído 164.2 ppm respectivamente.

? Según el análisis estadístico realizado para la determinación del mejor tratamiento con relación a la concentración de los componentes del AE, las condiciones de potencia 8.0 y 60 minutos de exposición de las semillas de cacao a la radiación con microondas, son las mas adecuadas.

? El AE de las semillas de cacao obtenido por Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHM), es de alta calidad debido al número de compuestos oxigenados que posee 24 en total correspondientes al 85.71% de la constitución del aceite esencial.

? Con los resultados obtenidos en el desarrollo del trabajo de investigación se contribuye en la identificación química de los metabolitos secundarios volátiles de las semillas de cacao.

## 6. RECOMENDACIONES

? Utilizar acetato de etilo como solvente para aislar el aceite esencial obtenido por Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD), debido a la selectividad que presenta para los grupos presentes en el aceite esencial.

? Implementar otros métodos de extracción como destilación extracción simultanea (DES) o extracción con solventes, del AE de las semillas de cacao y hacer un cuadro comparativo con la Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD), sobre la composición del aceite esencial.

? Trabajar con el AE de las semillas de cacao con el fin de verificar su actividad antibacteriana contra la bacteria *H. Pylori*, principal causante de la úlcera gástrica y el cáncer gástrico.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, Robert. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois USA : Allured Publishing Corporation,. 1995. 358 p.
- BADUI, Salvador. Química de los alimentos. México : Alambra UNAM, 1996. p.123
- BERTSCH, W. Chromatographic methods capillary gas chromatography in essential oil analysis. USA : Heidelberg, 1987. p. 221-222
- BERTSCH, W. JENNINGS, W. Capillary gas chromatography – mass spectrometry in medicine and pharmacology. USA : Heidelberg. 1987. p. 107
- BILBO. Aceites Esenciales. [en línea]. Febrero 2002 [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.bilbo.edu.uy/planta/pdf/bolilla-4pdf> >
- CABRA, E. R. Los aceites esenciales panorama internacional y del mercado colombiano. Santa fe de Bogotá : Mc. Graw Hill, 1998. p. 8.
- CHANGE, Raymond. COLLEGE, W. Microwade. México : Mc Graw Hill, 1998. p. 238-240.
- CONABIO. Los catecoles. línea]. Junio 2003. [Citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.conabio.gob.mx/arboles/pdf/especies/68-steria03m.pdf>>
- DOMÍNGUEZ, X. Métodos de investigación Fitoquímica. Ed. LIMUSA. 1991. p. 229
- D. MANSS. Phytochemistry. In : J. Nat. Prod. Miami. No. 39 Vol. 5 (1995); p. 115
- DUKE, Jim. Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Chemicals in Theobroma cacao L. sterculiaceae) – cacao. Ontario, Canada : Agricultural Research Service, 2001. p. 17-25
- EISERT, R. PAWLISZYN, J. Critical reviews in analytical chemistry. In : New trends in solid phase microextraction. Canada. No. 2 (1997); p. 103-135.
- ELDER, H. y SPEKULJAK, Z. Aprovechamiento integral de especies vegetales aromáticas y medicinales. [en línea]. Enero 2002 [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : [http:// www.sitingenieria.com/sitaceites.html](http://www.sitingenieria.com/sitaceites.html)>

- ENRIQUEZ, Gustavo. Botánica. [en línea]. Marzo 2002 [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://ww.infoagro.go.cr/default.htm>.>
- ESME, J. DANEEL, F. ROUX, D. Studies on the activities of essential oil and related compounds from medicinal plants and drugs. In : J. chem. Educ. No. 57 (1980); p. 57
- ETTRE, L. S. The Kovats Retention Index System Report. In: J. anal. Chem, Canada (5 mar., 1964). p. 31A-41A.
- FORMACEK, V. KUBECZKA, K. Essential Oils analysis by capillary gas chromatography and carbon 13 NMR spectroscopy. Canada : Willey, 1982. 117 p.
- GALLETI, Guido. Analytical methods in the study of essential oil extraction. In : Separation and identification techniques. No. 16 (1998); p. 291-296
- GARCIA, Hernando. Flora medicinal de Colombia. Bogotá : Tercer mundo, 1992. 220 p.
- GARNER, W. BARGEM, Y. USSURTY, J. Good Laboratory Practice Standards. Washington : ACS Professional Reference Book, 1992.425 p.
- GERECKE, Alex. Chromatography. New York : J. analytical chemical, 2001. 908 p.
- GONZALEZ, P. Utilización terapéutica de muestras medicinales. Bogotá : Universidad de la Salle, 1984. 128 p.
- GOMEZ, D. MORAN, M. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica Candamarcensis Hoorker filius*. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2005.128 p.
- GOTTLIEB, Otto. BRAZ, R. Introducción a la espectrometría de masas de sustancias orgánicas. USA : Secretaría general de la organización de los estados americanos OEA, 1983. 115 p.
- GOVINDARAJAN, V. Turmeric chemistry technology and quality. In : CRC critical reviews in food science and nutrition. Miami No. 12 Vol. 3. (1980); p. 229
- GUILD, L. Gas chromatography butter worth. Londres : Heilderberg, 1958. 368 p.
- GUINARD, J. et. al. Abrege de Phytochimie. In : J. Nat. Prod Miami : Academic Press. 1985. p. 225-232

- GRIEVE, M. A modern herbal. [en línea]. Febrero 2002. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : [http:// www.Botanical.com/mgmh/mgmh.html](http://www.Botanical.com/mgmh/mgmh.html)>.
- HAAGEN, S. Industry engineering chemical environmental chemical. Colorado : s.n., 1982. p. 1544
- HUBER, L. Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de fabricación actuales. Miami : HEWLETT-PACKARD COMPANY, 1994. 160 p.
- HURTADO, F. OBREGÓN, H. Estudio Agroeconómico del cacao (*Theobroma cacao* L.). San Juan de Pasto : Universidad de Nariño. 1987. 128 p.
- JARAMILLO, B. STASHENKO, E. Análisis por HRGC/FID/MSD de metabolitos secundarios de *Lippia alba* (Mill). En : CONGRESO COLOMBIANO DE QUIMICA (12º : 2001 : Bogotá). Memorias XII Congreso Colombiano de Química. Bogotá : Escuela de Química UIS, 2001. 150 p.
- JIMÉNEZ, Y. L. Informe especial. [en línea]. Agosto 2000. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet: <URL : <http://www.nacion.com/egado.gif>>
- KIMBERLY, A. Phytochemical in essential oil. In : J. Nat. Prod. No. 59 Vol. 1 (1996); p. 77-79
- LEGARDA, Lucio. Guía para la planificación de diseños experimentales. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas, 1980. 140 p
- LINN. *Theobroma cacao*. [en línea] Junio 2002 [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://ww.conabiogob.mx/arboles/pdf/especies.pdf>. Junio/28/2002
- MANTRA. Extracción de los aceites. [en línea]. Febrero 2002. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet: <URL: [http:// www.mantra.com.ar /Febrero/ 7/2002](http://www.mantra.com.ar/Febrero/7/2002)>
- MARTÍNEZ, Alejandro. Aceites esenciales. Medellín : Universidad de Antioquia, 2001. 305 p.
- MARTINEZ, GARZA, Ángel. Diseños Experimentales métodos y elementos de teoría. Madrid : Trillas, 1988. 190 p.
- MEZA, A. análisis químico del aceite esencial de *Eucalyptus Globulus* Nariñense. Medellín : Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Química, 1998. p. 28.
- MC. NAIR, Harold. Cromatografía de gases. Virginia : Secretaría general de la organización de los estados americanos OEA, 1981. 127 p.

OKAYAMA. Cocoa of Theobroma. [en línea]. Marzo 2003. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.okayama-u.ac.jp/doc/lab.html>>

PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction theory and practice. Ontario Canadá : Wiley University of waterloo, 1997. p. 12

PINO, J. MARTI, M. Head –space solid phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma. In : J. cromatogr No. 954 (2002); p. 51-57

RAFOLS, Wilfredo. Aprovechamiento industrial de los productos agrícolas, aceites esenciales. Barcelona : Salvat Editores, 1964. 612 p.

SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE SENA. Cultivo de Cacao, beneficio del cacao. En : Cartilla. Colombia. No. 4. (1993); p. 45

SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang- Ylang en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección y de su posible actividad antioxidante “in vitro”. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander, 2002. p. 4-18

SCREIER, P. Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles. Canada : Cuiley, 1984. p 2-12.

SKOOG, Douglas. Análisis instrumental. Santa Fe de Bogotá : Mc. Graw Hill, 1994. p. 704-710.

SUR, S. V. Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. Ciudad : J. Chromatogr. 1991p. 451-458.

STASHENKO, Elena. Fitoquímica. En : CONGRESO NACIONAL DE FITOQUÍMICA. 4º : 1996 : Bucaramanga. Memorias del IV Congreso Nacional de Fitoquímica. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander, 1996. p. 29

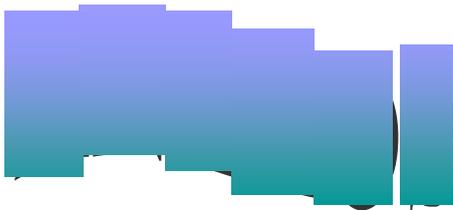
STASHENKO, Elena. Aceites esenciales. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander Escuela de Cromatografía, 2002. p. 68-78.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA. Antioxidantes beneficiosos para la prevención de enfermedades cardiovasculares. [en línea]. [Barcelona España]. Noviembre de 2001. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.medicinainternet.com/portada.htm>>

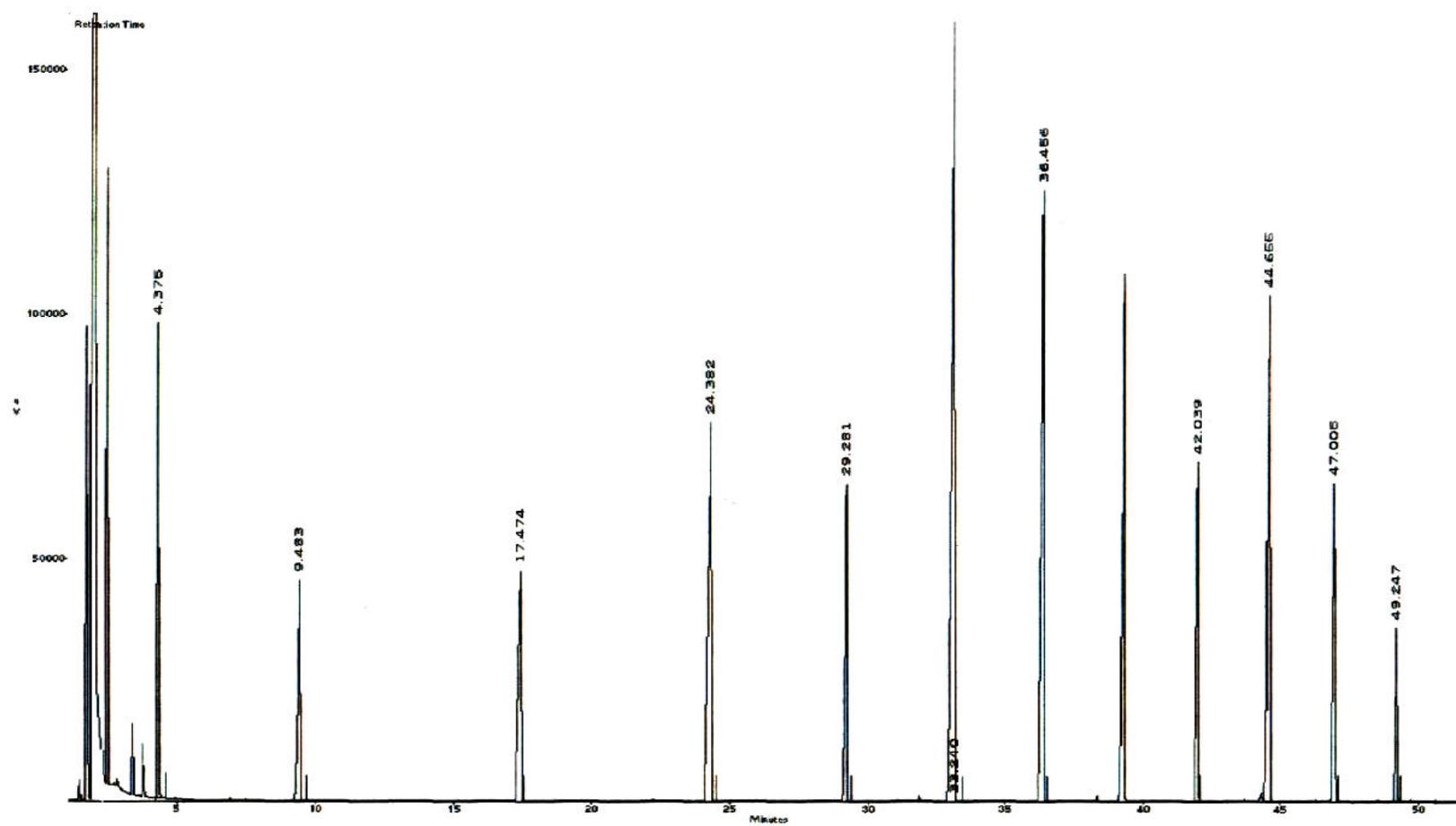
UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA. El cacao es bueno para el corazón. [en línea]. [Davis California]. Noviembre 2001. [citado Feb., 2004]. Disponible en Internet : <URL : <http://www.odontored.cl/main.htm>>

WREN, R. Potters new cyclopedia of botanical drugs and preparations. México : Grijalvo, 1944. p. 148

ZULOAGA, F. INSUASTY, B. y YATES, B. Análisis orgánico y espectral. Cali : Universidad del Valle. Departamento de Química, 1999. p. 189-202.



### Anexo A. Perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C<sub>6</sub> - C<sub>18</sub>



## Anexo B. Ecuaciones para el cálculo de ANDEVA

### Ecuaciones para un diseño DIA.

<b>Grados de libertad (GL)</b>		
Tratamientos	t-1	
Error	t(r-1)	donde r # repeticiones
Total	(t*r)-1	

### Factor de corrección

$$F_c = (Y_{..})^2/n \quad n = \# \text{ datos}$$

### Suma de cuadrados

Tratamientos	$SC_t = \sum (Y_i^2/r) - FC$	
Total	$SCT = \sum \sum Y_{ij}^2 - FC$	$Y_{ij} = \text{datos}$
Error	$SC_e = SCT - SC_t$	

### Cuadrados medios

Tratamientos	$CM_t = SC_t/GL_t$
Error	$CME = SC_e/GLE$

### Ecuaciones para un diseño DIA con submuestra

#### Grados de libertad (GL)

Tratamientos	t-1	
Error Experimental (EE)	t(r-1)	donde r # repeticiones
Error de Muestreo (EM)	t*r (m-1)	m = Submuestras
Total	(t*r*m)-1	

**Factor de corrección**  $(\sum \sum X_{ijk})^2 / t*r*m$

#### Suma de cuadrados

Tratamientos	$SC_t = \sum (X_i)^2 / m*r - FC$	
Total	$SCT = \sum \sum X_{ij}^2 - FC$	$Y_{ij} = \text{datos}$
Submuestras	$SC_{sub} = \sum (X_i^2 / m) - FC$	
EE	$SCEE = SC_{sub} - SC_t$	
EM	$SC_{EM} = SCT - SC_{sub}$	

#### Cuadrados medios

Tratamientos	$CM_t = SC_t/GL_t$
EE	$CM_{EE} = (SCEE + SC_{EM}) / (GLEE + GLEM)$
EM	
F Tabulada	$F_{cal} = CM_t / CM_{EE}$

**Anexo C. Cuadro de datos para la estandarización de la técnica de extracción HDMW por número de compuestos**

<b>REPETICION</b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>	<b>T<sub>4</sub></b>	<b>TOTAL</b>
1	18	21	26	27	
2	18	21	26	28	
3	18	21	25	28	
<b>S</b>	54	63	77	83	277
<b>PROMEDIO</b>	18	21	26	28	

#### Anexo D. Ecuación para el comparador de Tukey

$$Comp = V_{tt} \sqrt{\frac{CM \text{ Error}}{R}}$$

V<sub>tt</sub>: Valor tabla de Tukey al 99% = 5.63

CM: Cuadrados medios del error.

R: Repeticiones

**Anexo E. Cuadro de datos de las concentraciones obtenidas por MWHD**

Repetición (j)	Submuestra (k) (Compuestos)	Tratamientos (i)			
		1	2	3	4
1	1	3,46	12,24	19,97	29,28
	2	4,42	13,33	22,42	37,88
	3	11,55	43,58	64,69	120,91
	4	5,85	17,63	41,79	56,16
	9	2,73	12,62	17,66	27,10
	10	5,78	20,72	47,12	91,03
	12	12,99	48,59	92,21	164,11
	14	2,91	8,3	19,58	28,16
	15	1,13	4,59	8,61	18,82
	16	5,05	16,05	31,33	43,19
	17	1,33	6,02	13,77	19,82
	19	0,67	2,82	5,63	13,57
	21	1,18	3,47	10,77	15,25
	22	2,73	3,18	8,22	17,37
	24	0,41	2,29	5,84	15,53
	26	0,23	2,09	5,73	14,56
	27	0,74	2,15	8,68	16,78
	29	0,39	1,16	5,49	14,91
		<b>Subtotal</b>	61,6	220,8	429,5
2	1	3,49	12,45	20,32	28,09
	2	4,43	13,90	23,25	36,46
	3	11,60	43,76	67,38	118,79
	4	5,88	17,47	42,97	52,77
	9	2,75	13,17	18,08	26,66
	10	5,81	20,11	48,63	93,33
	12	13,05	45,86	94,33	169,23
	14	2,93	8,11	18,78	29,35
	15	1,15	4,76	9,12	19,68
	16	5,31	15,60	31,17	41,42
	17	1,35	6,32	13,11	19,19
	19	0,70	2,71	5,95	13,88
	21	1,20	3,51	11,22	15,84
	22	0,72	3,15	8,48	16,80
	24	0,42	2,41	5,99	16,29
26	0,22	2,02	6,02	14,03	

	27	0,75	2,31	8,66	16,14
	29	0,40	1,17	5,18	14,44
	<b>Subtotal</b>	62,2	218,8	438,6	742,4
3	1	3,44	11,99	19,40	29,03
	2	4,32	13,58	23,55	35,24
	3	11,36	43,67	65,80	115,37
	4	5,67	17,12	41,01	54,27
	9	12,65	12,22	18,41	28,60
	10	5,66	20,93	45,34	91,43
	12	12,70	47,53	93,93	159,38
	14	2,85	8,48	18,67	29,87
	15	1,11	4,58	9,10	19,07
	16	5,23	15,82	29,78	40,34
	17	1,32	5,90	13,63	19,89
	19	0,70	2,78	5,61	14,33
	21	1,16	3,72	10,91	16,30
	22	0,69	3,30	8,78	16,16
	24	0,40	2,44	6,22	16,65
	26	0,21	2,13	5,70	14,51
	27	0,71	2,21	8,37	16,91
	29	0,41	1,13	5,34	14,90
	<b>Subtotal</b>	60,6	207,3	429,60	732,3
	<b>Sumatoria Tratamientos</b>	184,3	646,9	1297,70	2219,1
	<b>Promedio</b>	61,4	215,6	432,60	739,7
	<b>Gran Total</b>	4348			