

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIA AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**“COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CACAO CRIOLLO
ORGÁNICO (*Theobroma cacao L.*) DURANTE
FERMENTACIÓN CULTIVO-DEPENDIENTE”**

Autora:

Bach. Alexa Jahayra Pajuelo Muñoz

Asesor:

Mg. César Rafael Balcázar Zumaeta

Coasesor:

Ms. Juan Carlos Alvarado Ibañez

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2023

AUTORIZACION DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Alexa Jahayra Pajuelo Muñoz
DNI N°: 72559746
Correo electrónico: 7255974661@untrm.edu.pe
Facultad: Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias
Escuela Profesional: Ingeniería Agroindustrial

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Facultad: _____
Escuela Profesional: _____

2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Compuestos bioactivos en cacao criollo orgánico (Theobroma cacao L.) durante fermentación cultivo - dependiente

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Balcázar Zumaeta César Rafael
DNI, Pasaporte, C.E N°: 46734552
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) 0000-0002-3033-6440

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Alvarado Ibáñez Juan Carlos
DNI, Pasaporte, C.E N°: 42520390
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) 0000-0002-6413-3457

4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Immunología)

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html
1.00.00 -- Ciencias Naturales 1.04.00 -- Química 1.04.01 -- Química orgánica

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 30 / diciembre / 2022

Firma del autor 1

Firma del Asesor 1

Firma del autor 2

Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Maribel y Jesus, por siempre brindarme su apoyo, el cariño y amor manifestado y por mostrarme que en esta vida todo es posible para alcanzar las metas trazadas.

A mi hermana Brunella, a todas las personas que me ayudaron para culminar esta meta y en especial a mis amigos por compartir malos y buenos momentos, pero siempre mostrar su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a la Virgen de la Puerta por siempre guiar mis pasos, darme fuerzas para superar los obstáculos de la vida y con mucha sabiduría mostrarme personas valiosas en mi camino, que contribuyen en mi formación personal y profesional.

A mis Padres por ser los principales promotores para lograr mis sueños, por confiar y creer en mí, gracias por enseñarme los buenos valores, sus consejos y principios con los que me criaron.

Mi agradecimiento muy especial al Mg. César Rafael Balcázar Zumaeta; Ms. Juan Carlos Alvarado Ibañez mis asesores, por su apoyo constante, guía, paciencia y dedicación a la presente investigación.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo por la colaboración y crítica constructiva; y a todos quienes de alguna manera participaron en la realización de la presente tesis.

Agradezco al Laboratorio de Investigación en Ingeniería de Alimentos y postcosecha (LIAP) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, donde se realizó todo el trabajo experimental.

Este trabajo fue financiado por CONCYTEC PROCIENCIA – CONTRATO 056-2021 FONDECYT Proyectos de investigación básica 2021-01 E041-2021-01 - “Estudio metabólico del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.) nativo orgánico fino de aroma”

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA
Rector

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES
Vicerrector Académico

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA
Vicerrectora de Investigación

M.Sc. ARMSTRONG BARNARD FERNÁNDEZ JERI
Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OBTENIMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (x) / Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Compuestos bioactivos en cacao criollo orgánico (Theobroma cacao L.) durante fermentación cultivo - dependiente.; del egresado Alexa Jahayra Pajuelo Muñoz de la Facultad de Ingeniería y ciencias agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 27 de octubre de 2022

Firma y nombre completo del Asesor
César Rafael Balcazar Zumaeta

VISTO BUENO DEL COASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

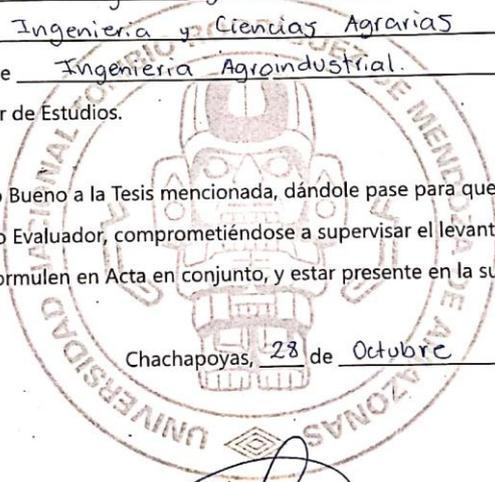
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "Compuestos bioactivos en cacao criollo orgánico Theobroma cacao L. durante fermentación cultivo - dependiente." del egresado Alexa Jahayra Pajuelo Muñoz de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de esta Casa Superior de Estudios.

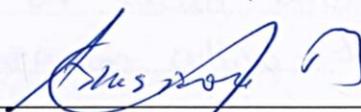
El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 28 de Octubre de 2022

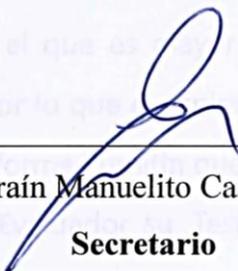
Firma y nombre completo del Asesor
Ms. Juan Carlos Alvarado Ibañez



JURADO EVALUADOR DE TESIS



M.Sc. Armstrong Barnard Fernández Jeri
Presidente



Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo
Secretario



Mg. Roberto Carlos Mori Zabarburú
Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Compuestos bioactivos en cacao criollo orgánico (*Theobroma cacao* L.)
durante fermentación cultivo - dependiente

presentada por el estudiante (Vegresado (N) Alexa Jahayra Pajuelo Muñoz

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

con correo electrónico institucional 7255974661@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 17 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 42 de diciembre del 2022


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 23 de diciembre del año 2022 siendo las 9:10 horas, el aspirante: Alexa Johayra Pajuelo Muñoz, asesorado por Mg. César Rafael Balcázar Zumaeta defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: Compuestos bioactivos en cacao criollo orgánico (Theobroma cacao L.) durante fermentación cultivo - dependiente. para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Mg.Sc. Armstrong Bamard Fernández Savi

Secretario: Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo.

Vocal: Ms. Roberto Carlos Mori Zababurú.



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

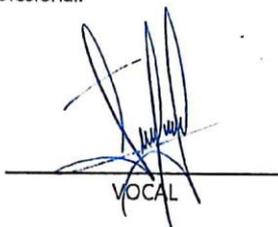
Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 10:05 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACION DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	vi
VISTO BUENO DEL COASESOR DE TESIS.....	vii
JURADO EVALUADOR DE TESIS	viii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	ix
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	x
ÍNDICE GENERAL	xi
ÍNDICE DE TABLA.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT.....	xvii
I. INTRODUCCIÓN.....	18
II. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1. Área de estudio	20
2.2. Material.....	21
2.3. Diseño de estudio	21
2.4. Métodos y técnicas.....	23
2.4.1. Fermentación de cacao	23
2.4.2. Caracterización fisicoquímica	24
2.4.3. Prueba de corte	24

2.4.4.	Liofilizado y desgrasado del cacao	25
2.4.5.	Preparación de extractos	25
2.4.6.	Contenido de polifenoles	25
2.4.7.	Capacidad antioxidante	26
2.4.8.	Cuantificación de catequina, epicatequina, cafeína y teobromina	27
2.5.	Análisis de datos	27
III.	RESULTADOS	28
3.1.	Caracterización de los parámetros del proceso de fermentación del cacao criollo orgánico	28
3.2.	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de cacao criollo orgánico en fermentación cultivo - dependiente	30
3.3.	Determinación del contenido de compuestos bioactivos en cacao criollo orgánico en fermentación cultivo – dependiente	33
IV.	DISCUSIÓN	42
V.	CONCLUSIONES	47
VI.	RECOMENDACIONES	48
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Arreglo de datos.....	22
Tabla 2. Cálculo del porcentaje de fermentación mediante prueba de corte	53
Tabla 3. Promedio reportado de los granos de cacao procedentes de Copallin (\pm desviación estándar) con letras mayúsculas diferentes en las mismas columnas (Tipo de fermentación) y con letras minúsculas diferentes en la misma línea (Tiempo de fermentación) son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $p \leq 0.05$).....	54
Tabla 4. Promedio reportado de los granos de cacao procedentes de Tolopampa (\pm desviación estándar) con letras mayúsculas diferentes en las mismas columnas (Tipo de fermentación) y con letras minúsculas diferentes en la misma línea (Tiempo de fermentación) son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $p \leq 0.05$).....	55
Tabla 5. Promedio reportado de los granos de cacao procedentes de Guadalupe (\pm desviación estándar) con letras mayúsculas diferentes en las mismas columnas (Tipo de fermentación) y con letras minúsculas diferentes en la misma línea (Tiempo de fermentación) son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $p \leq 0.05$).....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Georreferenciación de los puntos de recolección de los granos de cacao.....	20
Figura 2. Comparación de los parámetros de fermentación, durante la fermentación controlada y fermentación espontánea	29
Figura 3. Comparación de los parámetros fisicoquímicos durante el proceso de fermentación espontánea	31
Figura 4. Comparación de los parámetros fisicoquímicos durante el proceso de fermentación controlada.....	32
Figura 5. Comparación de polifenoles totales, actividad antioxidante, flavan-3-ol y metilxantinas durante la fermentación espontánea.....	34
Figura 6. Comparación de polifenoles totales, actividad antioxidante, flavan-3-ol y metilxantinas durante la fermentación controlada	35
Figura 7. Comparación de los componentes principales (PCA) durante la fermentación espontánea	37
Figura 8. Comparación de los componentes principales (PCA) durante la fermentación controlada	38
Figura 9. Comparación de clúster (HCA) durante la fermentación espontánea	40
Figura 10. Comparación de clúster (HCA) durante la fermentación controlada.....	41
Figura 11. Activación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
Figura 12. Placas para sembrar las levaduras	57
Figura 13. Preparación del caldo YPD en el que se colocarán las levaduras	58
Figura 14. Cajones de fermentación usados para el proceso de fermentación	59
Figura 15. Medición de temperatura, pH y oxígeno disuelto en los granos de cacao ...	59
Figura 16. Medición de temperatura, pH y oxígeno disuelto en los granos de	60
Figura 17. Cambio de cajón de los granos de cacao durante la fermentación.....	60
Figura 18. Secado de los granos de cacao de la fermentación controlada.....	61
Figura 19. Prueba de corte realizada a 100 granos de cacao después del proceso de ...	61
Figura 20. Conservación de los granos de cacao	62
Figura 21. Medición del pH interno de los granos de cacao fermentados.....	62
Figura 22. Extractos obtenidos de los granos de cacao fermentados para medir	63
Figura 23. Medición de actividad de agua de los granos de cacao fermentados.	63
Figura 24. Medición de la acidez titulable en los extractos.....	64
Figura 25. Reacción de los extractos con Folin para calcular el contenido de	64

Figura 26. Reacción de los extractos en DPPH para calcular la actividad	65
Figura 27. Colocación de los viales con extracto de granos de cacao para	65

RESUMEN

En este trabajo se estudió los compuestos bioactivos presentes en la fermentación del cacao criollo orgánico *Theobroma cacao L.* proveniente de 3 zonas de la provincia de Bagua: Copallin (zona alta), Tolopampa (Zona media) y Guadalupe (Zona baja) y fermentado mediante dos tipos de fermentación, una con cultivo iniciador (Controlada) y otra sin cultivo iniciador (Espontánea) por 7 días con una recolección de muestras de cada 12 horas, se evaluaron parámetros de fermentación como el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto además de parámetros fisicoquímicos como humedad, actividad de agua y acidez titulable, también se determinó el contenido de fenoles totales (PFT), la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS), flavan-3-ol (epicatequina y catequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína), los resultados mostraron el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto se comportaron de forma similar en los 3 lugares y ambos tipos de fermentación y que el pH y la acidez son inversamente proporcionales, a su vez se identificó que los mejores resultados se obtuvieron en la fermentación controlada, y que la altitud del cultivo del cacao está involucrado en el contenido de flavan-3-ol (epicatequina y catequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína) a mayor altitud dichos compuestos van a disminuir y por ende el contenido total de fenoles y la capacidad antioxidante.

Palabras clave: Fermentación espontánea, fermentación controlada, flavan-3-ol, metilxantinas.

ABSTRACT

In this work, the bioactive compounds present in the fermentation of organic criollo cocoa *Theobroma cacao* L. from 3 areas of the Bagua province were studied: Copallin (upper area), Tolopampa (middle area) and Guadalupe (lower area) and fermented by two types of fermentation, one with starter culture (Controlled) and another without starter culture (Spontaneous) for 7 days with a sample collection every 12 hours, fermentation parameters such as pH, temperature and dissolved oxygen were evaluated in addition to Physicochemical parameters such as humidity, water activity and titratable acidity, the content of total phenols (PFT), antioxidant capacity (DPPH and ABTS), flavan-3-ol (epicatechin and catechin) and methylxanthines (theobromine and caffeine) were also determined. , the results showed that pH, temperature and dissolved oxygen behaved similarly in the 3 places and both types of fermentation and that pH and acidity are inversely proportional, in turn, it was identified that the best results were obtained in controlled fermentation, and that the altitude of cocoa cultivation is involved in the content of flavan-3-ol (epicatechin and catechin) and methylxanthines (theobromine and caffeine) at higher altitudes. These compounds will decrease and therefore the total content of phenols and the antioxidant capacity.

Keywords: Spontaneous fermentation, controlled fermentation, flavan-3-ol, methylxanthines.

I. INTRODUCCIÓN

El cacao es el grano indispensable para la producción de chocolate de las cuales las variedades más reconocidas son 3: Forastero, Trinitario y Criollo; este último se dice es la mejor variedad. (Castro et al., 2022) Los granos de cacao deben pasar por diversos procesos tecnológicos, incluyendo la fermentación, que es un paso crucial en el desarrollo de los precursores del sabor del cacao. (do Carmo Brito et al., 2017). Durante la fermentación el cacao es fermentado por acción de las levaduras y bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, estas generan reacciones que son responsables del sabor dulce, amargo, ácido y astringente. (Nazaruddin et al., 2006)

Las características fisicoquímicas que suelen tener los granos de cacao fermentados suelen ser variables y se asocia a la genética u otros factores como las regiones geográficas de cultivo, las prácticas agronómicas y las condiciones climáticas. (Andrade et al., 2019) menciona que el factor de mayor relevancia es la humedad del grano ya que si este sobrepasa el 8% genera deterioro del grano, así como también una humedad menor a 6% puede ocasionar unos granos más quebradizos, además mencionan que el cacao criollo presenta niveles mayores de acidez, humedad y proteínas a comparación del cacao forastero que posee altos valores de pH y taninos.

En los granos de cacao sin fermentar, los compuestos fenólicos son alrededor del 12-18% de los componentes totales. Las principales clases de fitoquímicos detectados en el cacao en grano son los derivados de ácidos fenólicos, flavonoides, derivados de aminoácidos y otros compuestos polares. (Di Mattia et al., 2017; Septianti, 2020) y se sabe que los frijoles sin fermentar contienen niveles muy altos de flavan-3-oles, principalmente epicatequina y sus oligómeros derivados, que representan hasta el 18% del peso seco junto con flavan-4-ones (naringenina), flavonoles (quercetina), flavones (apigenina, luteolina). (Eyamo et al., 2016)

Durante el proceso de fermentación diferentes microorganismos, incluida las levaduras, las bacterias del ácido láctico (LAB), las bacterias del ácido acético (AAB), las bacterias formadoras de esporas y los mohos se involucran y producen varias reacciones bioquímicas. Inicialmente, la levadura y las bacterias ácido lácticas convierten el azúcar de pulpa en etanol y, cuando comienza la aireación, la tensión de oxígeno aumenta y las

bacterias ácido acéticas producen ácido acético a partir del etanol; ambas reacciones son altamente exotérmicas, aumentando la temperatura de la masa de cacao. Hay una disminución del pH y un aumento de la acidez titulable (Deus et al., 2020). El etanol y el ácido acético se difunden en el frijol causando la muerte del embrión y la ruptura de la pared celular con la liberación de enzimas endógenas, lo que lleva a una cascada de reacciones enzimáticas. Hay una disminución del contenido fenólico por la actividad de las fenoloxidasas, disminuyendo el amargor y la astringencia, al finalizar el proceso de fermentación los granos deben cumplir con parámetros fisicoquímicos y contener polifenoles que dan como resultado la formación de compuestos que son relevantes en la generación del sabor y aroma del cacao durante el tostado del cacao.(Afoakwa et al., 2008; Castro-Alayo, 2019; Hu et al., 2016)

Estos fitoquímicos han demostrado múltiples beneficios, incluido el potencial antioxidante, la prevención de la diabetes mellitus tipo 2, la actividad antimicrobiana, la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y la disminución de la presión arterial y la actividad antimicrobiana. (Rodríguez-Campos et al., 2012)

Anteriormente se ha demostrado que el cacao sin fermentar posee altos niveles de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, sin embargo cuando se realiza el proceso de fermentación, tiende a perder gran porcentaje de dichos compuesto, Por lo tanto para llenar el vacío que existe en la literatura, este estudio tuvo como objetivo explorar la concentración de los compuestos fenólicos en los granos de cacao y si estos se ven influenciados por el tiempo de fermentación, el lugar de procedencia y el tipo de fermentación que reciben, evaluando parámetros como temperatura, acidez, pH y determinando el contenido total de fenoles, la capacidad antioxidante, las concentraciones de flavan-3-ol (epicatequina y catequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

La presente investigación se desarrolló en los ambientes de la Cooperativa de servicios múltiples APROCAM que se encuentra ubicado en la Car. Bagua - Copallín Km. 4 - Provincia de Bagua - Departamento de Amazonas - Perú, donde por medio de sus productores, se recolectó cacao criollo orgánico proveniente de la zona alta, media y baja siendo estas: Copallín, Tolopampa y Guadalupe respectivamente.

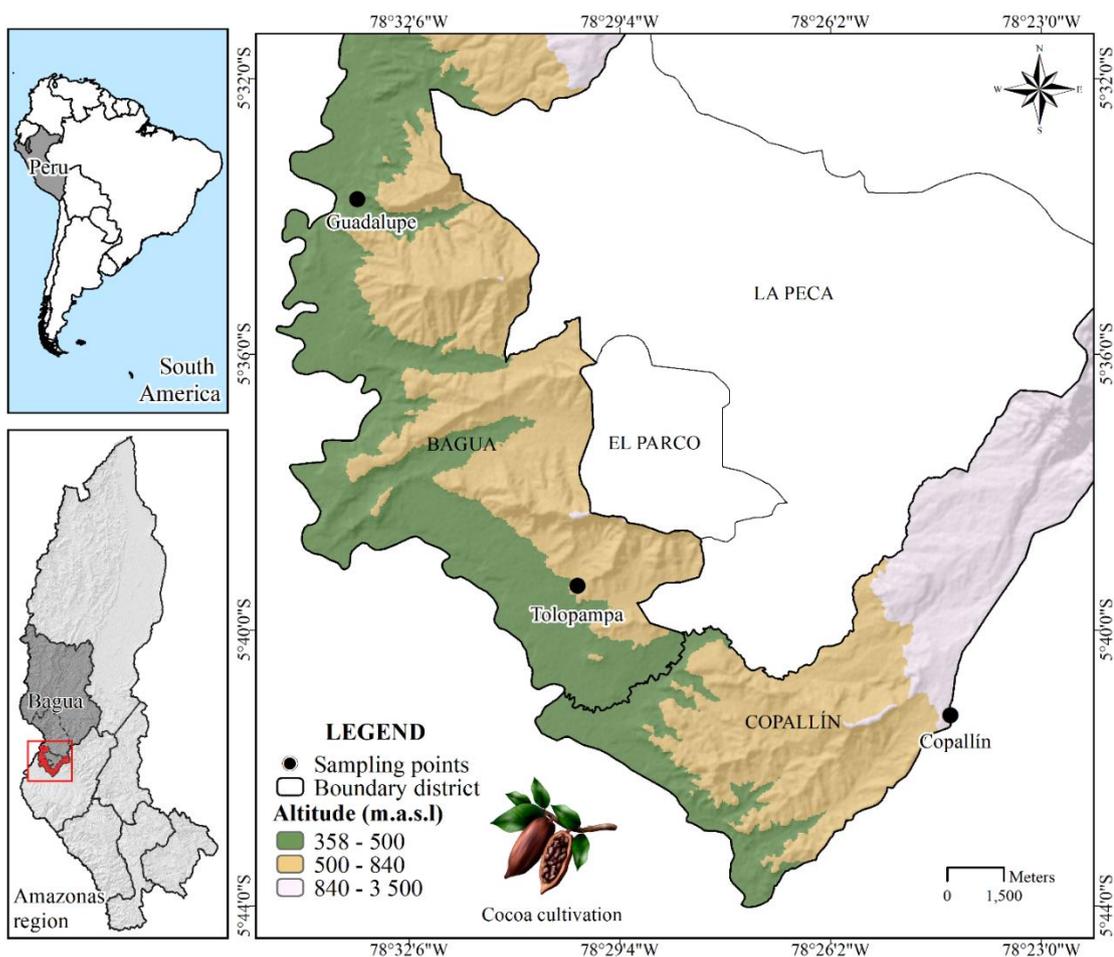


Figura 1. Georreferenciación de los puntos de recolección de los granos de cacao

2.2. Material

Se trabajó con granos de cacao criollo orgánico proveniente de tres zonas de la provincia de Bagua, para el proceso de fermentación se usaron cajones fermentadores de madera recubiertos internamente con láminas de acero inoxidable con una capacidad de 40 kg.

2.3. Diseño de estudio

Se hizo un diseño experimental de bloques completamente al azar, para determinar fermentación cultivo-dependiente (controlada) y una fermentación cultivo-independiente (espontánea) cada 12 horas por 7 días, de 3 zonas productoras de cacao nativo orgánico y con 3 repeticiones.

Tabla 1. Arreglo de datos

Lugar	Fermentación	Tiempo de fermentación (horas)															
		En coco	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168
Copallin	Esponánea (CI)	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
	Controlada (CD)	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
Tolopampa	Esponánea (CI)	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
	Controlada (CD)	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
Guadalupe	Esponánea (CI)	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
	Controlada (CD)	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R

2.4. Métodos y técnicas

2.4.1. Fermentación de cacao

a. Fermentación espontánea

Para realizar la fermentación espontánea se usó cajones de madera cubiertos internamente con acero inoxidable, los granos de cacao procedentes de Copallín, Tolopampa y Guadalupe se recibieron y se pesaron 40 kg de granos por cada lugar, una vez pesado se colocó en los primeros cajones durante 2 días tapándolo con un saco para mantener el calor, se controló la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH y a su vez se recolectó las muestras de cacao cada 12 horas, a las 48 horas de fermentación el cacao se cambió de cajón midiendo los mismos parámetros y recolectado las muestras monitoreando cada 12 horas, a las 96 horas se volvió a cambiar de cajón realizando el procedimiento ya explicado y a las 144 horas se efectuó el último volteo de cajón recolectando muestras y midiendo los parámetros, así hasta cumplir las 168 horas.

b. Fermentación controlada

El proceso de fermentación controlada se realizó siguiendo el descrito por (Chagas et al., 2021) primero se activó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en placas Petri que contenían agar YPD estéril incubados a 28 °C durante 72 h. Después de la incubación, las colonias se transfirieron a nuevas placas para seguir cultivando *Saccharomyces*, con las colonias ya replicadas, se usó el agua peptonada como medio para transferir las *Saccharomyces* de las placas a un medio líquido, la cantidad a usar de cacao fue de 40 kg entonces para preparar el cultivo en un matraz Erlenmeyer se preparó 500ml de agua peptonada, se usaron 16 placas con *Saccharomyces*, a cada placa se le agregó 2 ml de agua peptonada y luego con un hisopo estéril se limpiaron todas las placas y el contenido de cada una se trasvasó al matraz con el agua peptonada, todo el proceso de activación de la cepa se realizó en el laboratorio de química de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. El medio con las cepas fue trasladado a la cooperativa APROCAM para empezar con la fermentación, se limpió los cajones y se pesó 40 kg de granos de cacao de las mismas zonas que la fermentación espontánea, se vació el cacao en el primer

cajón y de manera uniforme se fue agregando el medio de cultivo, luego el procedimiento de fermentación y recolección de muestras fue el mismo que en la fermentación espontánea.

2.4.2. Caracterización fisicoquímica

Una vez concluida la recolección de granos, en el laboratorio de postcosecha de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza se midió la actividad de agua, el porcentaje de humedad, pH interno siguiendo el establecido por la (AOAC 970.21) donde se tomó 5 g de cacao molido y se mezcló con 45 ml de agua caliente, se esperó a que enfriará para inmediatamente determinar el pH y también se midió la acidez titulable usando el método establecido por la (AOAC 942.15) que consistió en agregar 3 gotas de fenolftaleína a los extractos, luego usando un equipo de titulación con NaOH 0.1N se adiciono al extracto hasta que este cambie el color a uno rosáceo, para posteriormente medir el gasto de NaOH y mediante el uso de una fórmula calcular el porcentaje de acidez titulable.

$$\% \text{ de acidez titulable} = \left(\frac{AxNx C}{M} \right) x 100$$

A: Gasto de NaOH (ml)

N: Normalidad

C: Peso miliequivalente del ácido predominante

M: peso de la muestra (g)

2.4.3. Prueba de corte

Se siguió la propuesta por Melo et al. (2021) después del proceso de fermentación, 100 granos de cacao provenientes de cada una de las zonas antes mencionadas, fueron cortados por la mitad y examinados, haciendo un recuento por separado de los granos defectuosos con mohos, pizarrosos, germinado, sin fermentar y sobre fermentado, estos resultados de cada tipo de defecto se expresaron como un porcentaje de los 100 granos evaluados.

2.4.4. Liofilizado y desgrasado del cacao

El liofilizado y desgrasado de los granos de cacao se realizó en el Laboratorio de Investigación en Ingeniería de Alimentos y postcosecha (LIAP) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, para el liofilizado se trabajó en un equipo liofilizador (marca LABCONCO, modelo 117 (A65312906), fabricado en Kansas – Missouri), dentro de los contenedores del equipo se colocaron tubos falcon de 50 ml que contenían granos de cacao enteros y despulpado, el equipo trabajó a una presión de 0.008 bar y a -84°C , después de 18 horas de liofilización los tubos fueron retirados y se procedió a realizar el desgrasado, usando el equipo extractor Soxhlet (marca DAIHAN Scientific, fabricado en Corea del Sur), se envolvió 7 gramos de cacao molido en papel filtro, usando 110 ml de éter de petróleo y controlando 8 sifoneadas para un correcto desgrasado, una vez desgrasado las muestras se colocaron al ambiente para evaporar los restos de éter de petróleo para finalmente guardarlos en un lugar seco.

2.4.5. Preparación de extractos

Para los extractos el método se basó en el descrito por Melo et al. (2021) se preparó 1 g de cacao desgrasado en 50 ml de metanol al 80 %, en tubos falcon de 50 ml se colocó la muestra pesada y el metanol, se agitó en un vórtex durante 1 minuto y se centrifugó durante 10 minutos a 12 rpm. Después se filtró y se colocó en tubos falcon de 10 ml para realizar los análisis de fenoles y antioxidantes, y también se filtró con filtros millipore de $0.45\ \mu\text{m}$ y se almacenarán en viales a -6°C para los análisis en HPLC.

2.4.6. Contenido de polifenoles

Para determinar el contenido de polifenoles se siguió el método planteado por Floegel et al. (2011) primero se preparó el reactivo folin, se usó 30 ml de folin en 270 ml de agua, y 9.6 g de carbonato en 230.4 ml de agua para obtener carbonato al 4%, una vez preparados los reactivos en tubos de ensayo se colocó primero 100 ul de extracto, 2.5 ml de folin y 2 ml de carbonato, se guardó en un sitio oscuro por dos horas y luego se procedió a medir la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro. Para calcular el contenido de polifenoles primero se tuvo que

realizar la curva de calibración usando ácido gálico, una vez obtenida la curva se trabajó con la siguiente ecuación y se expresó en mg GAE/g muestra.

$$\text{Contenido total de fenoles} = \left(\frac{A * 0.1924}{0.0004} \right) / 0.5$$

A representa el valor obtenido de la absorbancia de cada muestra.

2.4.7. Capacidad antioxidante

Técnica DPPH

Se realizó siguiendo el descrito por Gültekin et al. (2016), se diluyó 35.4 mg de reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) en alcohol de 96° hasta que la absorbancia sea 7, una vez preparado el reactivo, se tomó 100 ul de extracto y 3.9 ml de DPPH, se almacenó en un sitio oscuro por 30 minutos y luego se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (marca SECOMAM, modelo UviLine 9400, fabricado en Francia) a 517 nm, inmediatamente se realizó una curva patrón con trolox para calcular la capacidad antioxidante de cada muestra.

$$X = \frac{A - 0.8502}{0.2213}$$

$$\text{Capacidad antioxidante} = \frac{X * V}{1000}$$

Donde A fue la medida de la absorbancia de cada muestra y V el volumen de la muestra, los resultados se expresaron en umol TE/g muestra, esta ecuación se usó también para el cálculo de la técnica ABTS.

Técnica ABTS

Para este método se tomó de referencia a Floegel et al. (2011) se prepararon tres soluciones, la solución A contenía 38 mg de ABTS y 10 ml de agua, la solución B contenía 5 ml de agua y 0.1892 mg de persulfato de potasio; y la solución C contenía 5 ml de solución A y 88 ul de solución B, una vez realizada esa mezcla se aforo con papel aluminio todo el matraz, se agitó y se dejó reposar por 16 horas, luego de ese tiempo se agregó alcohol y se midió la absorbancia hasta llegar a 7, una vez preparado el reactivo se colocó en tubos 30 ul de extracto y 3 ml de ABTS,

se dejó reaccionar por 6 minutos y luego se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 734 nm.

2.4.8. Cuantificación de catequina, epicatequina, cafeína y teobromina

La determinación de compuestos fenólicos monoméricos (catequina y epicatequina) y metilxantinas (cafeína y teobromina) se realizó de acuerdo con el descrito por Cruz et al. (2015). Diez microlitros de cada solución de muestra se analizaron mediante un equipo UHPLC (marca AGILENT Technologies, modelo 1290 Infinity, fabricado en Estados Unidos) equipado con inyector VI Flow, columna C18 (100 mm × 4,6 mm O.D.S.-2, 3 μm) y utilizando los disolventes (A): ácido acético al 2% en agua y (B): una mezcla de acetonitrilo, agua y ácido acético (400:90:10 v/v/v). Se realizó la elución con un gradiente lineal. Los compuestos fueron monitoreados por detección UV a una longitud de onda de 280 nm. la corrida total el tiempo fue de 20 min y la temperatura de 26 °C.

2.5. Análisis de datos

Los valores de los parámetros estudiados, las características fisicoquímicas así como también los polifenoles, la capacidad antioxidante, catequina, epicatequina, cafeína y teobromina que se obtuvieron durante la evaluación se sistematizarán en una hoja Excel y se trabajó con los promedios y la desviación estándar, posteriormente se hizo un análisis estadístico mediante análisis de varianza ANOVA y prueba Tukey para evaluar el comportamiento y las diferencias entre el tipo, la procedencia y el tiempo de fermentación, se trabajó con Matlab. Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) usando el software estadístico STATISCA y cluster (HCA) que se trabajó con RStudio, a los polifenoles totales (PFT), la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS), flavonoides (Catequina y epicatequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína).

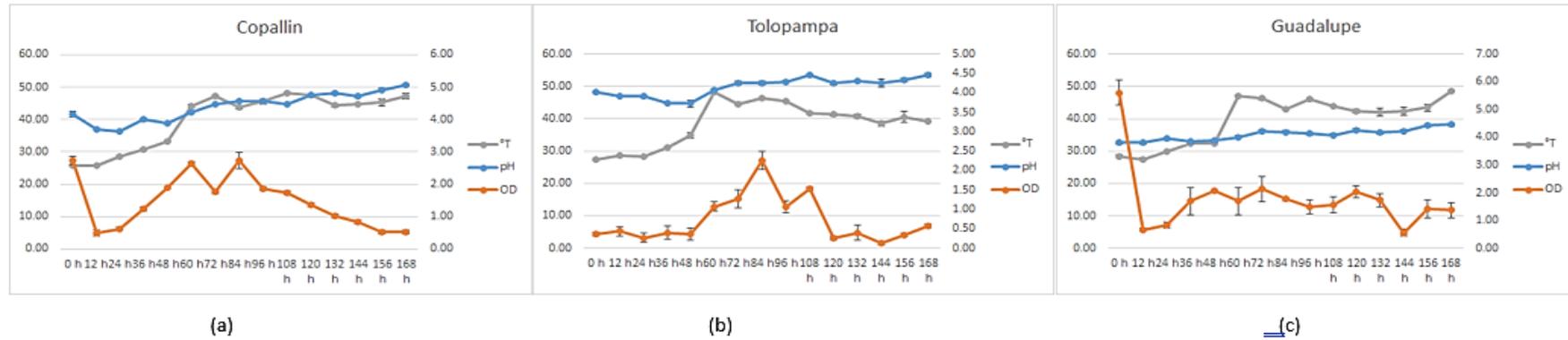
III. RESULTADOS

3.1. Caracterización de los parámetros del proceso de fermentación del cacao criollo orgánico

En la figura 2 se puede apreciar el comportamiento de la temperatura durante la fermentación controlada y fermentación espontánea en los granos de cacao provenientes de Copallin, Tolopampa y Guadalupe, estos llegan a la temperatura más alta entre las 60 y 72 horas, alcanzando temperaturas de hasta 50 °C, además los granos extraídos de Copallin y Guadalupe la temperatura final oscila entre 47 a 48 °C a diferencia de los granos procedentes de Tolopampa que culmina con 37°C, esto sucedió tanto en la fermentación espontánea como en la controlada, también se muestra la conducta del pH, de acuerdo a los resultados y cuadros obtenidos este varía dependiendo del lugar, más el tipo de fermentación no tiende a influir, puesto que en los granos que venían de Copallin para la fermentación espontánea y controlada el pH inicial es de 4.15 y culmina con 5.07 con ligeras variaciones decimales, lo mismo ocurre con los granos provenientes de Guadalupe que tiene un pH inicial de 3.80 y un pH final de 4.47 pero en los granos procedentes de Tolopampa los cambios en el pH inicial y final no tienden a variar demasiado ya que empiezan con 4.02 finalizando con 4.45. En el caso del oxígeno disuelto los resultados varían respecto al sitio, los granos de cacao de Tolopampa tiene los valores más bajos al inicio y al final de las fermentaciones con valores de 0.37 mg/L a 0.57 mg/L respectivamente, los granos de Guadalupe en la fermentación espontánea empezó con 5.60 y terminó con 1.37 mg/L lo que no ocurrió con la fermentación controlada, esta inició con 0.77 y culminó con 1.70 mg/L, en los granos que se extrajeron de Copallin para ambas fermentaciones el valor inicial fue de 2.73 y finalizó con 0.53 mg/L.

En los anexos (Tabla 2) se visualiza los resultados obtenidos de la prueba de corte, ambas fermentaciones de los granos de cacao procedentes de Copallin, Tolopampa y Guadalupe superaron el 75% del porcentaje de fermentación lo que indica que el proceso se realizó de manera adecuada.

Fermentación espontánea



Fermentación controlada

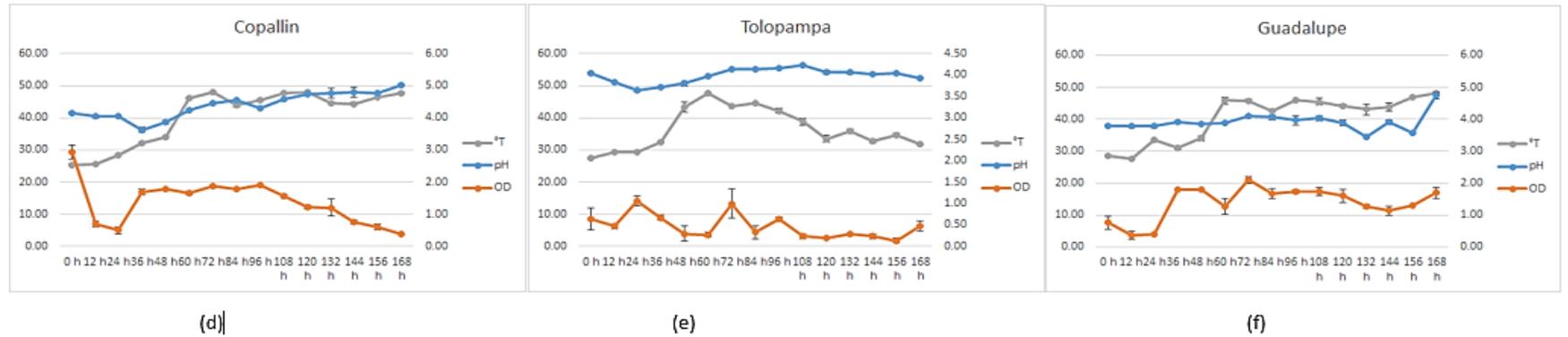


Figura 2. Comparación de los parámetros de fermentación, durante la fermentación controlada y fermentación espontánea

3.2. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de cacao criollo orgánico en fermentación cultivo - dependiente

Se aprecia el comportamiento del pH interno, la acidez titulable, humedad y actividad de agua de los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea en la figura 3, respecto al pH interno en los granos provenientes de Copallin, Tolopampa y Guadalupe se observa un comportamiento adecuado de los datos obtenidos respecto a referencia bibliográficas, empezando con un pH promedio de las 3 zonas de 6.5 y culminando con un pH promedio de 4.5, la misma conducta poseen los resultados obtenidos en la fermentación controlada representados en la figura 4, para la acidez titulable mostrada en ambas figuras, empiezan con niveles bajos pero llega a su concentración más alta a las 108 h lo que no ocurre en la fermentación controlada ya que esta llega a la concentración más alta a las 96 h, 12 horas antes que la fermentación espontánea, además se observa que la interacción entre estos dos parámetros es inversamente proporcional, mientras que el pH disminuye la acidez titulable aumenta.

También se logra observar en la fermentación espontánea y controlada, la interacción entre la humedad y la actividad de agua demostrando que son proporcionales entre ellas, si la humedad aumenta la actividad de agua también lo hace, además durante los tiempos transcurridos en la fermentación espontánea la diferencia del porcentaje de humedad inicial con la final no fue muy representativo, los granos de cacao procedentes de Copallín empezó con 26.16% de humedad y finalizo con 28.09%, los granos recolectados en Tolopampa inició con 25.34% disminuyendo hasta 23.39% y los granos que provenían de Guadalupe empezó con 32.65% para acabar con 36.19%, en la fermentación controlada los granos de cacao de Copallín, Tolopampa y Guadalupe iniciaron con el mismo porcentaje de humedad que en la fermentación espontánea pero culminaron con 34.58%, 31.16% y 35.94% respectivamente.

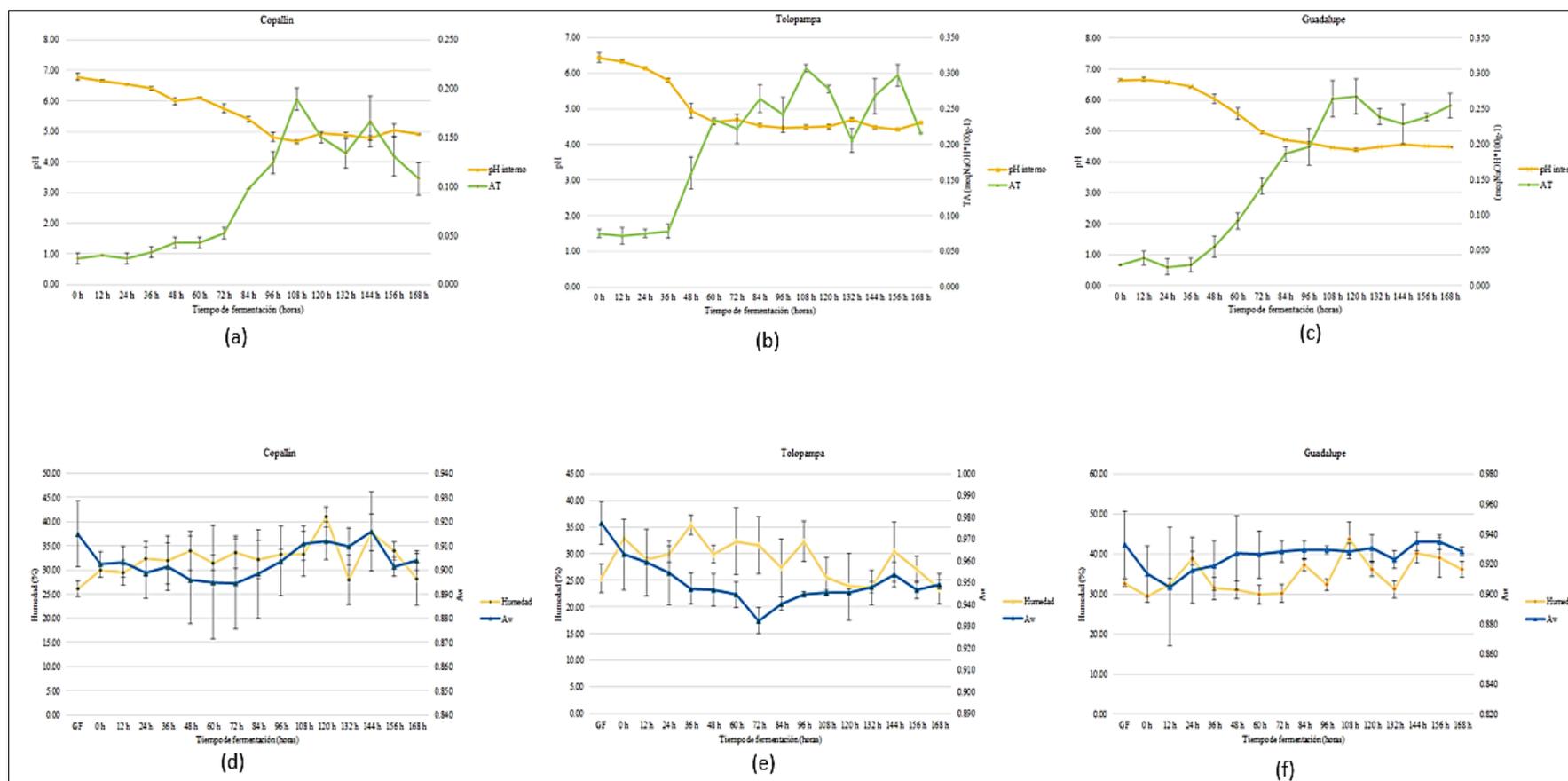


Figura 3. Comparación de los parámetros fisicoquímicos durante el proceso de fermentación espontánea

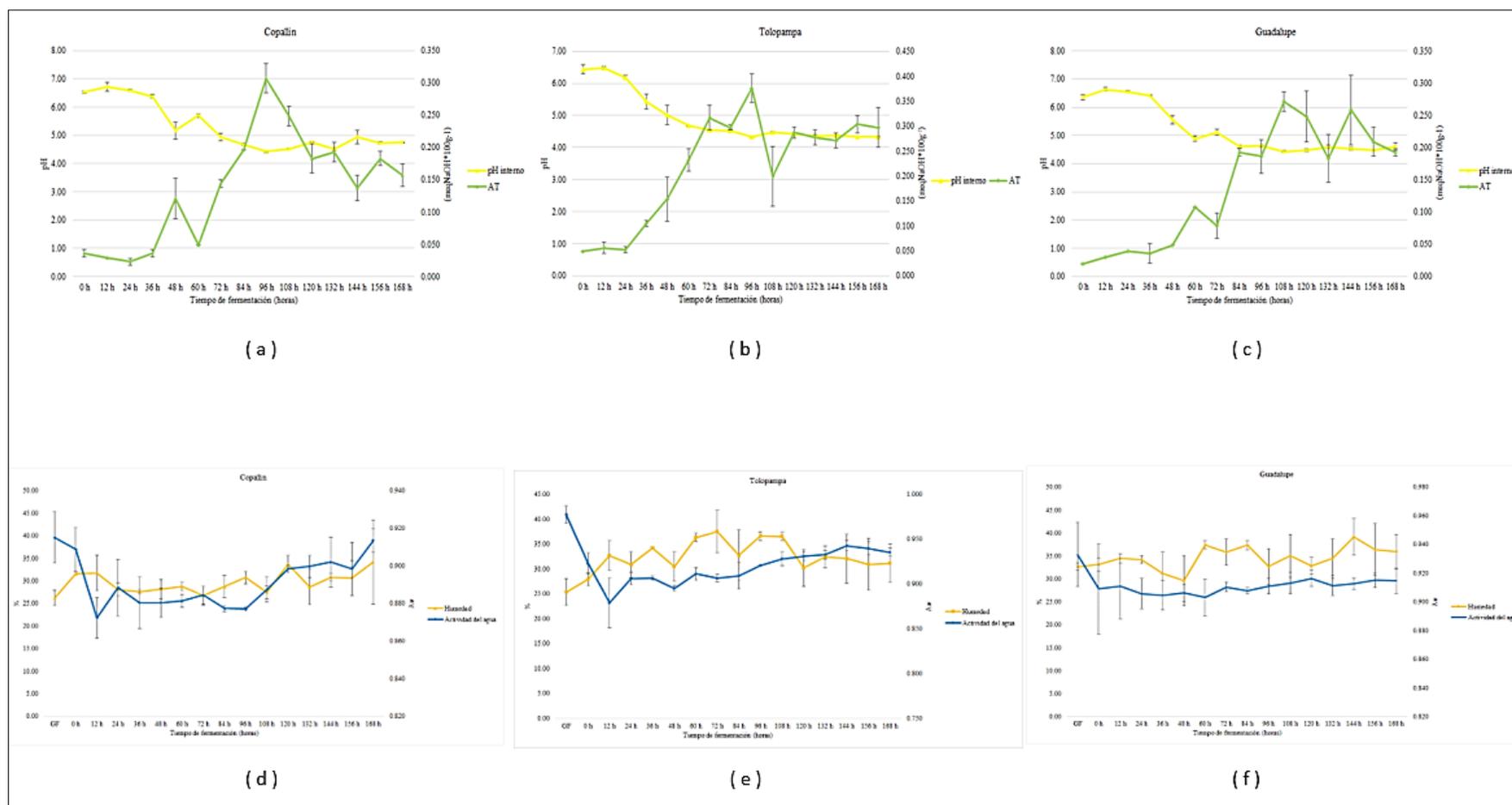


Figura 4. Comparación de los parámetros fisicoquímicos durante el proceso de fermentación controlada

3.3. Determinación del contenido de compuestos bioactivos en cacao criollo orgánico en fermentación cultivo – dependiente

Las figuras 5 y 6, muestran en la primera fila los gráficos con el patrón que siguen los métodos usados para determinar fenoles totales y capacidad antioxidante, en los granos de cacao provenientes de Copallín, Tolopampa y Guadalupe; y tanto en la fermentación espontánea y controlada se observa que la capacidad antioxidante determinada mediante los métodos DPPH y ABTS al principio de la fermentación es alta y con el transcurso de los días esta va disminuyendo, de igual modo los fenoles totales, esto nos indica que mientras más días de fermentación se le dé a los granos de cacao tanto la actividad antioxidante como el contenido de fenoles totales irá disminuyendo. La segunda fila de las figuras expone la interacción de los flavan-3-ol epicatequina y catequina, ambos dependen el uno del otro, es decir si la epicatequina disminuye la catequina también lo hace, pero se puede apreciar que durante el proceso de fermentación la epicatequina es el flavan-3-ol más abundante a comparación de la catequina que durante los últimos días tiende a bajar sus niveles hasta casi desaparecer, esto ocurre con los granos recolectados en Copallin y Tolopampa para ambas fermentaciones, sin embargo en los granos recogidos de Guadalupe la catequina se pierde por completo durante las 48 y 60 horas, esto podría deberse a condiciones de siembra, la zona de la que proviene, entre otros. La tercera fila ilustra la interacción de las metilxantinas teobromina y cafeína, se observó que la cafeína durante la fermentación espontánea muestra niveles más altos entre las 24 y 36 horas luego empieza a descender, en cambio durante la fermentación controlada las concentraciones son variables y están en un constante aumento y descenso. La teobromina en cambio para los granos procedentes de Copallin en los dos tipos de fermentación inició con un promedio de 16 mg de teobromina/g de muestra y finalizó con aproximadamente 19 mg/g, lo que no ocurre con los granos recolectados en Tolopampa y Guadalupe, que durante los días de fermentación su concentración solo disminuyó.



Figura 5. Comparación de polifenoles totales, actividad antioxidante, flavan-3-ol y metilxantinas durante la fermentación espontánea

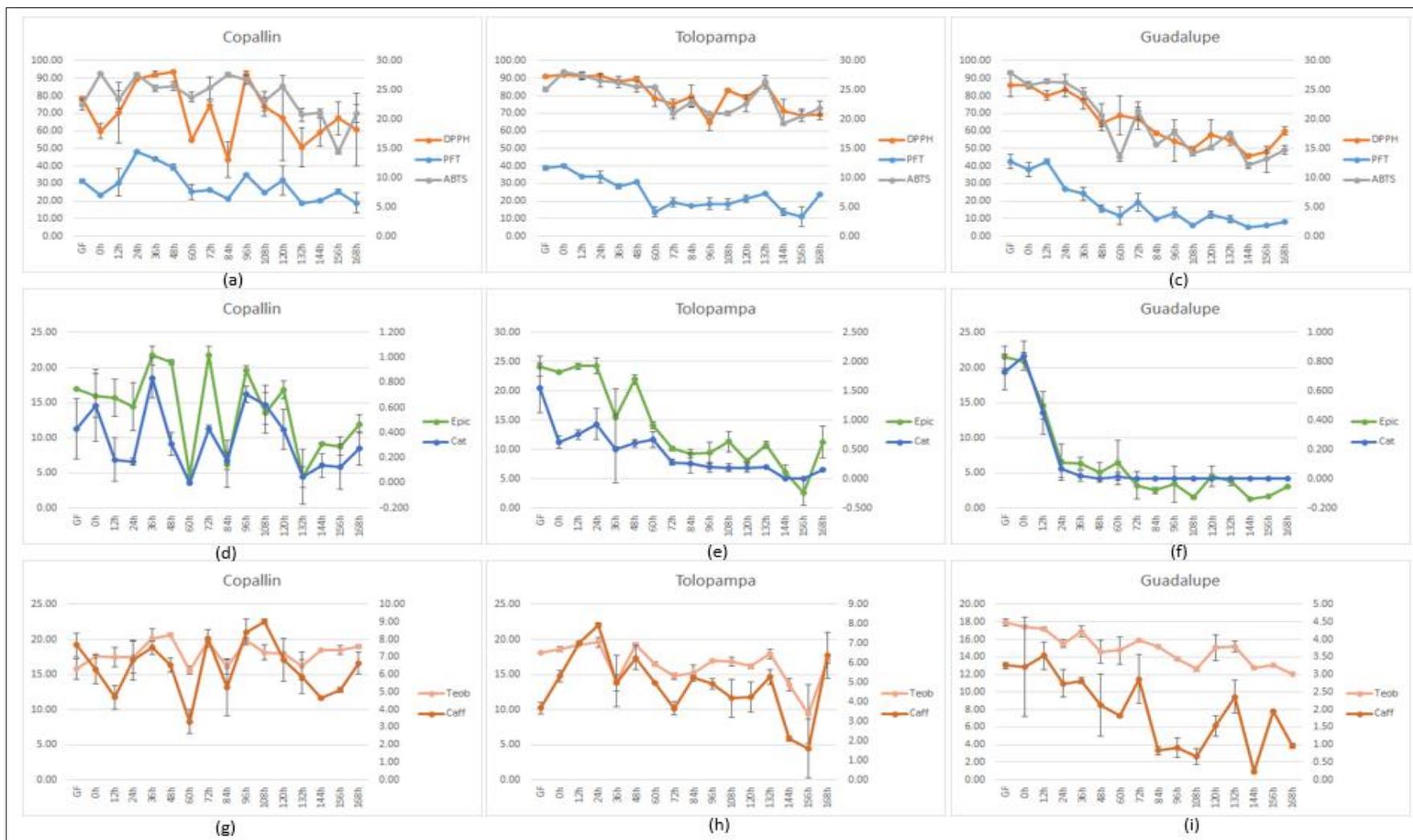


Figura 6. Comparación de polifenoles totales, actividad antioxidante, flavan-3-ol y metilxantinas durante la fermentación controlada

En las figuras 7 y 8 observamos los resultados del análisis de componentes principales, la figura 7 representa la fermentación espontánea y la figura 8 la fermentación controlada, durante esta investigación solo se tomaron dos grupos de componentes principales que representaron más del 50% de la varianza. Para los granos de cacao recolectados en Copallín, en la fermentación espontánea el PCA1 es representado por tener altos niveles de polifenoles totales (PFT), gran capacidad antioxidante (DPPH y ABTS), flavan-3-ol (Epicatequina y Catequina) y cafeína, el PCA 2 representa solo teobromina, esto varía en la fermentación controlada donde el PCA1 está compuesto por los flavan-3-ol (Epicatequina y Catequina), DPPH y cafeína, el PCA2 muestra una respuesta más alta de fenoles totales (PFT), ABTS y teobromina. En los granos de cacao recogidos en Tolopampa, durante la fermentación espontánea el PCA1 representa fenoles totales (PFT), flavan-3-ol (epicatequina y catequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína) y el PCA2 muestra la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS), pero en la fermentación controlada el PCA1 muestra fenoles totales (PFT), capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) y flavan-3-ol (epicatequina y catequina) por otro lado el PCA2 solo ilustra el contenido de metilxantinas (teobromina y cafeína). Finalmente, los granos procedentes de Guadalupe para la fermentación espontánea el PCA coincide con el de la fermentación espontánea de los granos de Tolopampa, pero en la fermentación controlada el PCA1 está compuesto por fenoles totales (PFT), capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) y metilxantinas (teobromina y cafeína); y el PCA2 está formado por los flavan-3-ol (epicatequina y catequina).

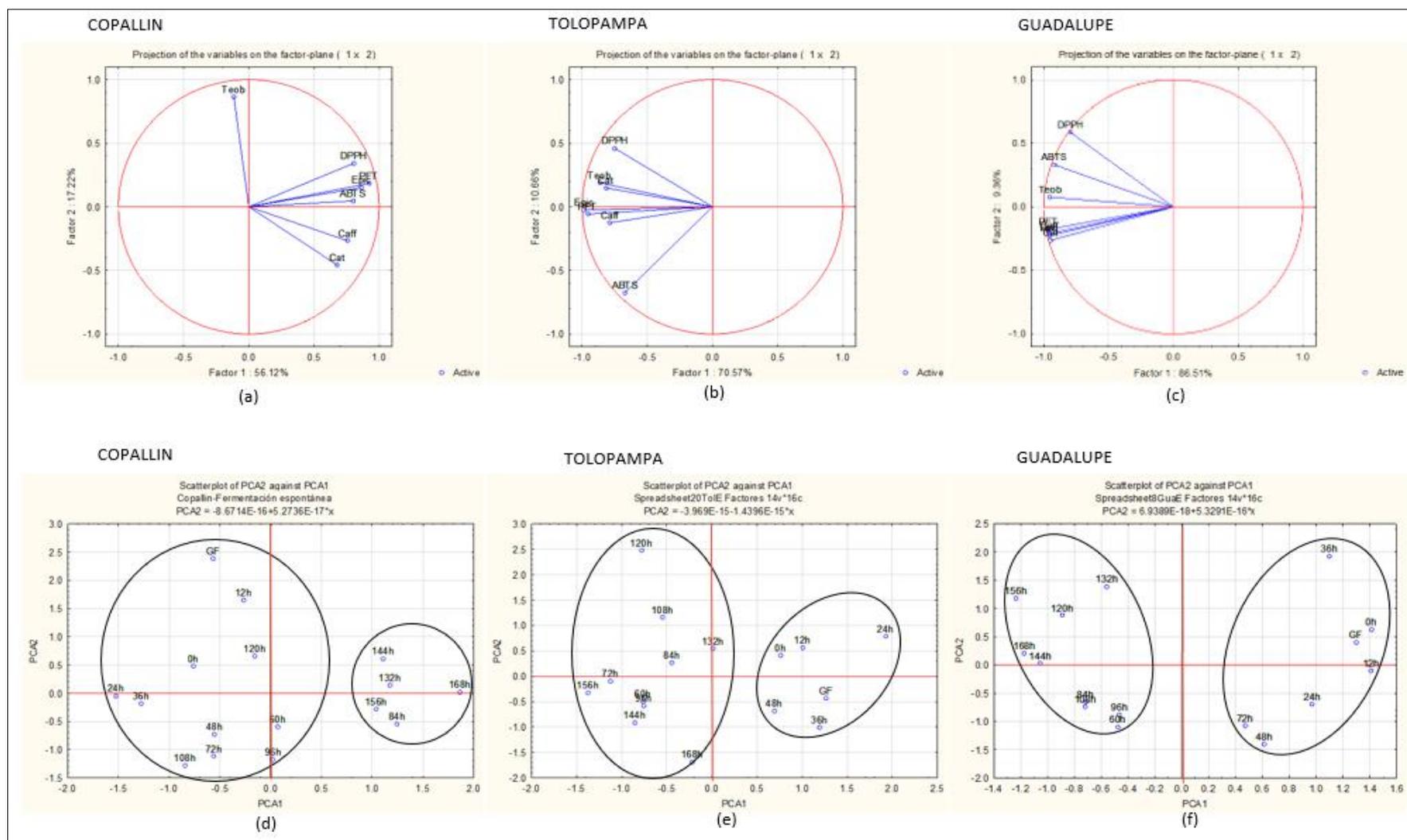


Figura 7. Comparación de los componentes principales (PCA) durante la fermentación espontánea

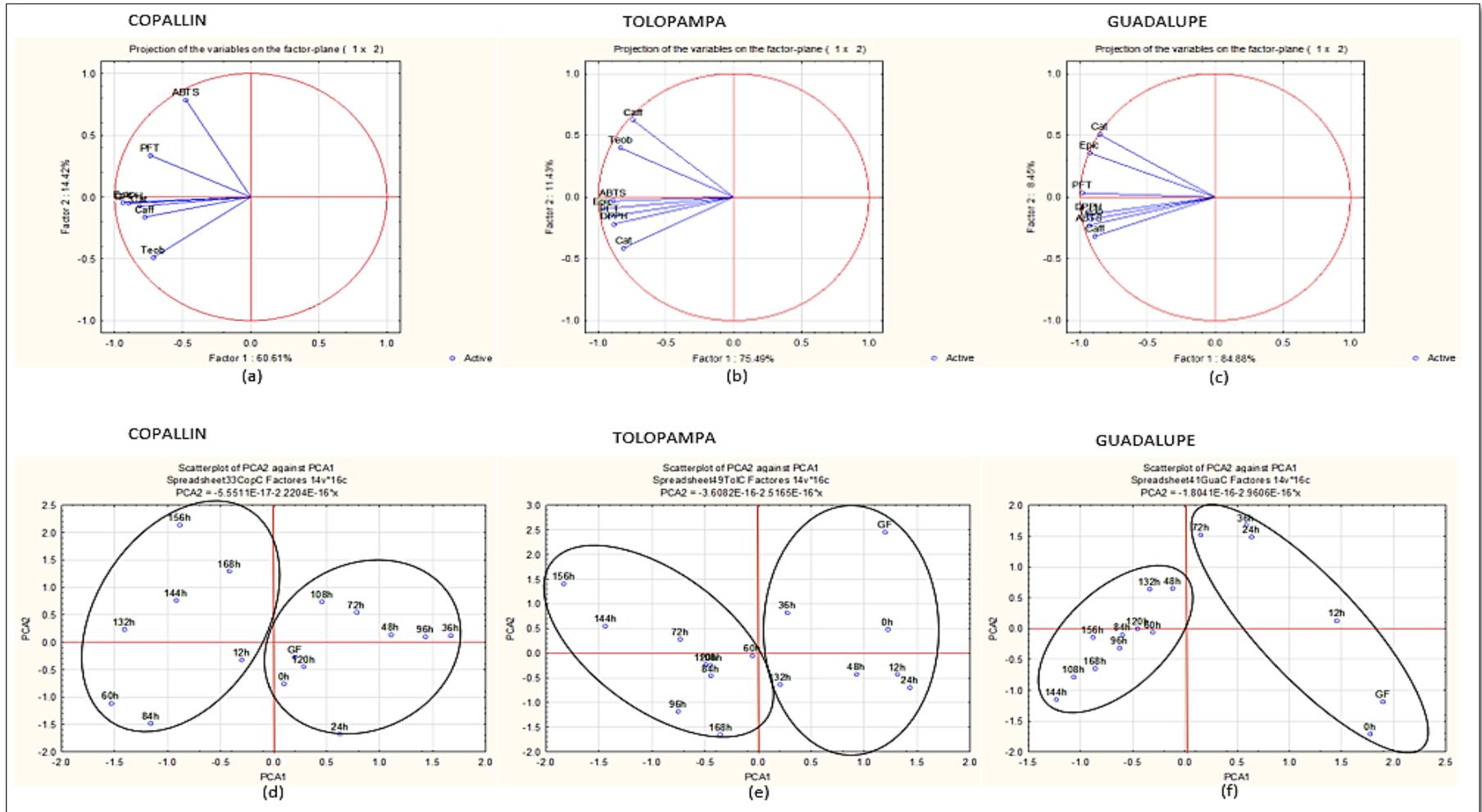


Figura 8. Comparación de los componentes principales (PCA) durante la fermentación controlada

Durante el análisis de los datos usando RStudio mediante el método cluster y según los parámetros incluidos en esta investigación se representaron dos momentos de la fermentación, tanto para la fermentación espontánea como para la fermentación controlada, los resultados obtenidos se muestran en las figuras 9 y 10. En los granos de cacao provenientes de Copallin durante la fermentación espontánea (Figura 9) señala que durante los primeros 5 días el cacao tiene niveles elevados de flavan-3-ol y cafeína por lo tanto gran capacidad antioxidante y elevado contenidos de fenoles totales, pero a partir del sexto día (132 horas) y hasta finalizar la fermentación, los niveles que se presentaron en los primeros días disminuyen pero se nota gran presencia de teobromina, lo que no ocurre con la fermentación controlada (Figura 10), ya que esta muestra niveles altos de flavan-3-ol (epicatequina y catequina), también evidencia a la cafeína y una capacidad antioxidante determinada por el método DPPH esto sucede a partir de las 132 horas hasta culminar las 168 horas, y desde el grano fresco hasta las 120 horas de fermentación figuran niveles altos de teobromina y niveles altos de fenoles. Los granos de cacao recogidos en Tolopampa muestra que hasta el segundo día del proceso de fermentación espontánea (Figura 9) el contenido de epicatequina y cafeína son elevados, a partir del tercer día en adelante estos disminuyen, pero se hace más notorio la presencia de catequina y teobromina, a su vez demuestran una buena capacidad antioxidante y elevado contenido de fenoles totales, la fermentación controlada (Figura 10) muestra que dentro de los 2 primeros días los niveles de flavan-3-ol (epicatequina y catequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína), son elevados en el tercer día y hasta culminar el proceso se evidencia una buena actividad antioxidante y contenido de fenoles totales. En los granos recolectados en Guadalupe la fermentación espontánea (Figura 9) las primeras 72 horas que corresponde a los primeros 3 días destacan por su actividad antioxidante y los fenoles totales y desde las 84 horas hasta las 168 horas la presencia de flavan-3-ol (epicatequina y catequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína) es notoria, en la fermentación controlada (Figura 10) expone que desde el grano fresco hasta las 36 horas la capacidad antioxidante es mayor y hay más concentraciones de teobromina y epicatequina sin embargo a partir de las 48 horas estas disminuyen pero la presencia de catequina y cafeína es más fuerte.

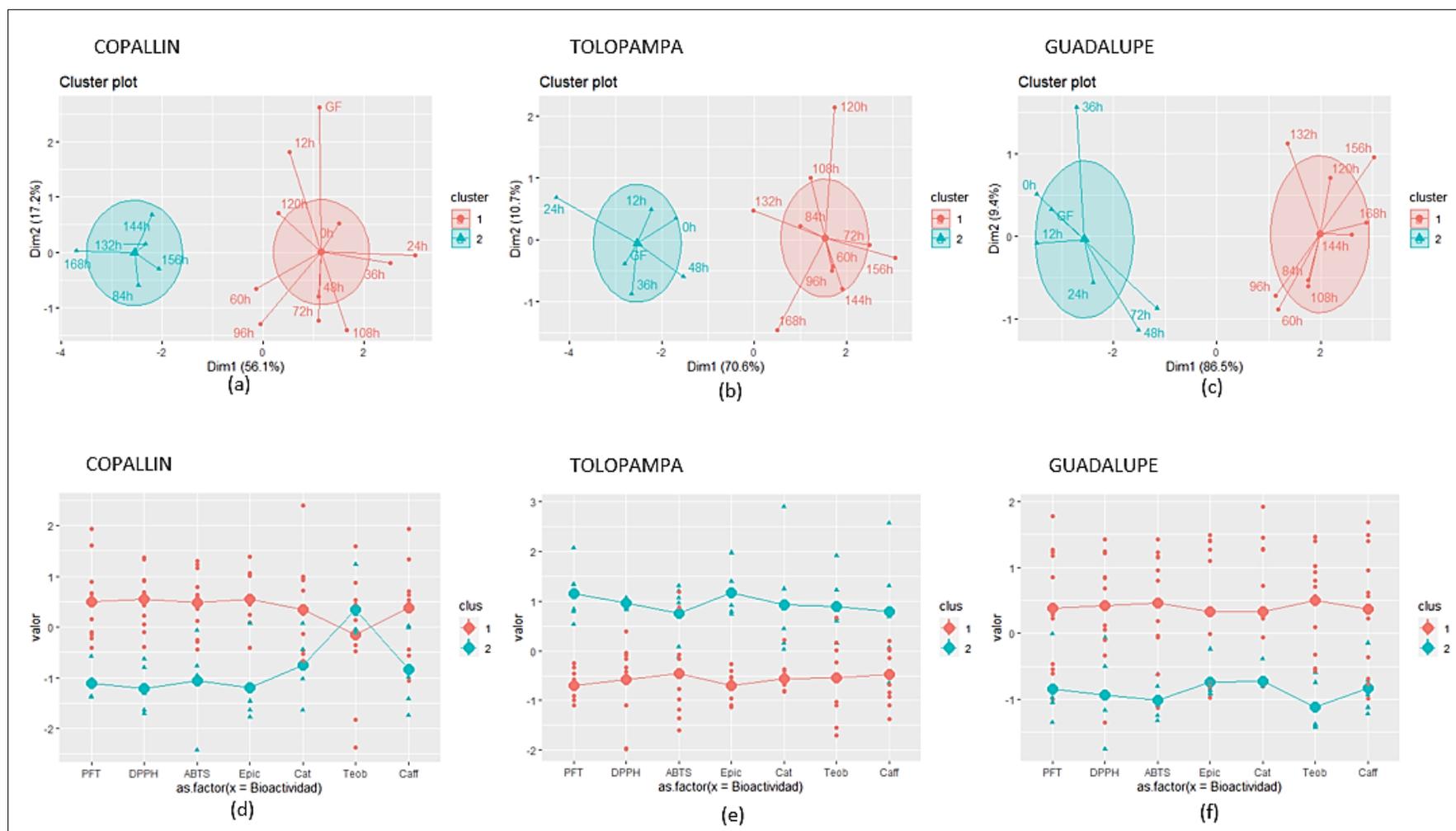


Figura 9. Comparación de clúster (HCA) durante la fermentación espontánea

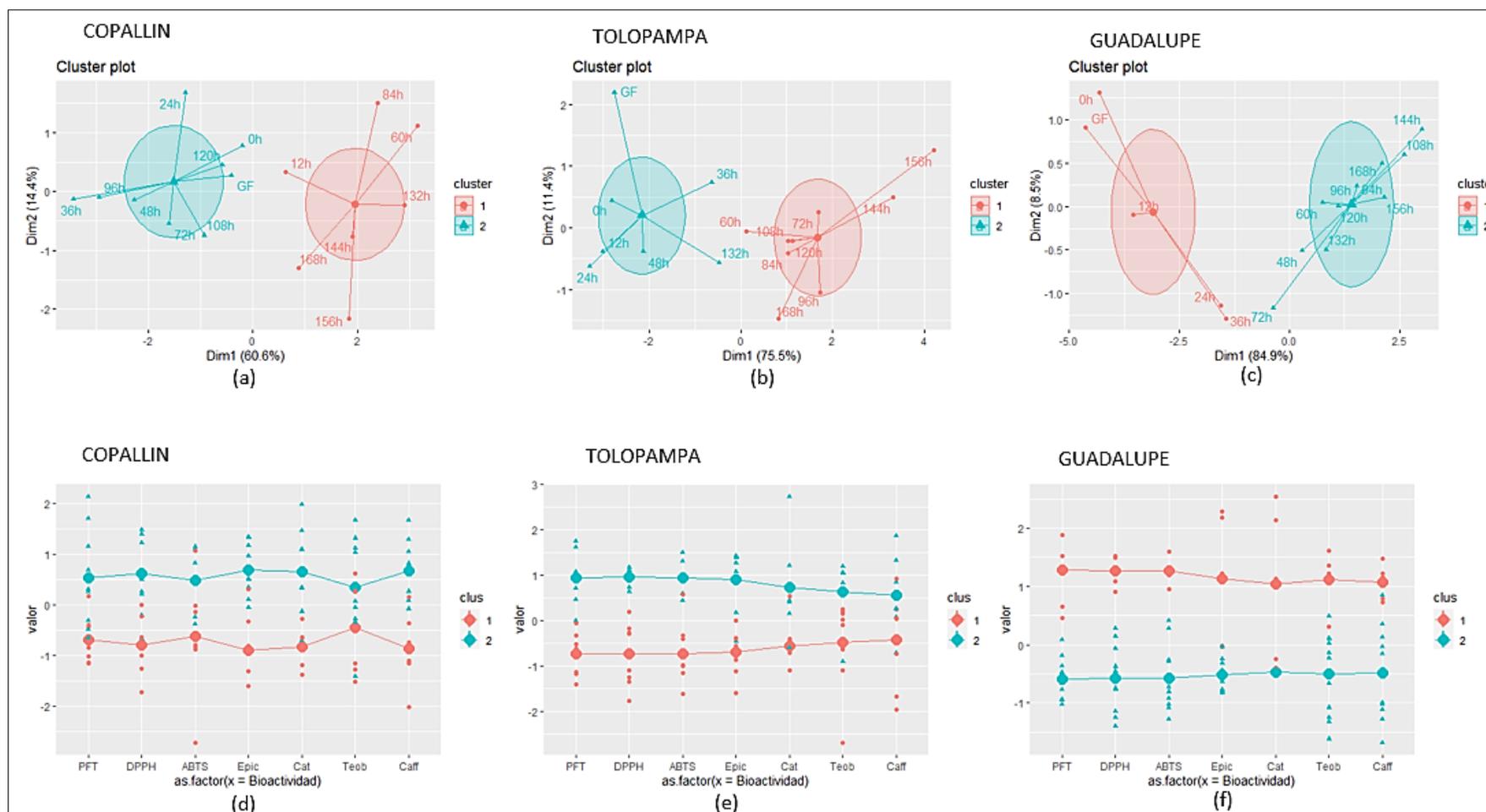


Figura 10. Comparación de clúster (HCA) durante la fermentación controlada

IV. DISCUSIÓN

Según (Eyamo Evina et al., 2016) durante el proceso de fermentación encontraron que el color de los granos de cacao evolucionaba en todas sus fermentaciones, desde pizarrosa en granos sin fermentar hasta violeta en el día 2 y marrón en el día 5 (granos de cacao bien fermentados). Por lo tanto, suponen que la difusión de ácido láctico y ácido acético imitaron bien la entrada de metabolitos generalmente emitidos por actividades microbianas además explican químicamente que la desaparición del color púrpura puede explicarse por hidrólisis de antocianinas mientras que el color marrón se debe a la oxidación de cianidinas, otros fenoles libres y complejos proteína-fenólicos, esto coincide con los resultados obtenidos en esta investigación ya que durante los primeros días el color violeta aún se mantenía y a partir del quinto día este se fue tornando marrón.

(do Carmo Brito et al., 2017) realizaron un estudio en las aminas bioactivas y los compuestos fenólicos en los granos de cacao afectados por la fermentación, mencionan en su investigación que durante el proceso de fermentación que realizaron, la temperatura aumentó de 22 °C al inicio de la fermentación alcanzando un máximo de 41 °C en el quinto día de fermentación, luego disminuyó a 34 °C al final de la fermentación, los valores de pH disminuyeron a lo largo de la fermentación, de 6.56 a 5 y la acidez total aumentó de 2.85 mEq NaOH/100 g alcanzando un máximo en el tercer día de fermentación (15.25 mEq NaOH/100 g), seguido de una ligera disminución al final del proceso de fermentación (13.78 mEq NaOH/00 g). Estos datos de temperatura señalados no coinciden con los obtenidos en esta investigación ya que las temperaturas más altas se evidenciaron durante el tercer día llegando a casi 50 °C y terminando en 47 – 48 °C a excepción de los granos de cacao provenientes de Tolopampa que culminó con 34 °C, el comportamiento del pH coincide con los obtenidos ya que todas las fermentación empezaron aproximadamente 6.5 y disminuyeron a 4.5, pero en la acidez los resultados obtenidos muestran que el punto más alto de acidez se da en el quinto día en la fermentación espontánea y en el cuarto día en la fermentación controlada además de que los granos recogidos en Copallin muestra una acidez menor respecto a los granos de cacao recolectados en Tolopampa y Guadalupe. Estos cambios se deben a las reacciones bioquímicas que ocurren durante la fermentación del cacao, las cuales están asociadas con las actividades de

algunos microorganismos tolerantes a ácidos que se encuentran naturalmente en los granos de cacao también que el aumento del pH, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno favorecen a las bacterias del ácido acético, que requieren 30 °C y un pH entre 5 a 6.5 para metabolizar el etanol en ácido acético a través de un proceso altamente exotérmico, lo que lleva a un rápido aumento de la temperatura, alcanzando la masa de fermentación temperaturas superiores a los 45 °C y la altitud de las zonas de siembra también podría influir debido al tipo y nutrientes del suelo, el clima, entre otros. (Afoakwa et al., 2008; Andrade et al., 2019; Deus et al., 2020; Hu et al., 2016) (Di Mattia et al., 2017) mencionan en su investigación acerca del efecto de la fermentación y secado en las procianidinas, actividad antioxidante y reducción de propiedades en los granos de cacao; que la actividad antioxidante, determinada por los métodos ABTS, DPPH y FRAP, generalmente siguen el mismo destino que el contenido fenólico, con niveles de reducción del 20 al 40%. En un estudio sobre el efecto de la fermentación y tostado en las concentraciones fenólicas y actividad antioxidante en granos de cacao provenientes de Nicaragua hecho por (Suazo et al., 2014), se determinó una reducción de alrededor del 80% en los valores de DPPH, mientras que se observó un aumento en la capacidad antioxidante total (50-160%), evaluada usando métodos DPPH y ABTS, en variedades de cacao después de la fermentación espontánea. En este trabajo los resultados obtenidos coinciden con el de Di Mattia, puesto que los niveles de capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles también disminuyó entre un 20 % a 40%, DPPH y ABTS se vieron influenciadas de la misma manera que PFT. (Samaniego et al., 2020) muestra que las diferencias geográficas afectan ampliamente el PFT de los granos de cacao ya que, en este estudio, las muestras cosechadas en los cantones de la región Amazónica presentaron PFT superiores a las obtenidas para los de la Costa del Pacífico (entre $42,75 \pm 8,19$ y $71,66 \pm 3,94$ mg GAE/g y entre $33,55 \pm 5,74$ y $47,40 \pm 6,20$ mg GAE/g, respectivamente). El contenido promedio de fenoles totales por provincia varió en el siguiente orden: Napo, Sucumbíos, Francisco de Orellana, Guayas, Manabí, Los Ríos, siendo estas diferencias entre provincias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Los resultados obtenidos en este trabajo son similares con lo expuesto ya que los granos de cacao recolectados en Copallin tuvo menos capacidad antioxidante y menor contenido de fenoles totales a diferencia de los granos de cacao recogidos en Tolopampa y Guadalupe.

(Carrillo et al., 2014) en su investigación compararon los polifenoles, metilxantinas y actividad antioxidante en granos de cacao de diferentes zonas cacaoteras de Colombia y estos sugieren que cuanto menor es la altitud, más polifenoles y flavan-3-oles son producidos por la planta, las metilxantinas (teobromina y cafeína) se encontraron en mayor concentración que las catequinas, siendo la teobromina el compuesto predominante en los extractos esto coincide con los resultados obtenidos por (Quelal-Vásquez et al., 2020) donde identificaron que la metilxantina más abundante fue la teobromina, cuyo contenido varió de 1.53 ± 0.02 a 2.4 ± 0.1 g/100 g al considerar todas las muestras. El contenido de cafeína osciló entre 0.1503 ± 0.0003 y 0.412 ± 0.003 g/100 g. y entre los flavan-3-ol, la epicatequina fue el analito más abundante. El mayor contenido (536.59 ± 0.08 mg/100 g) fue para una muestra etiquetada como origen Ecuatorial. Respecto a los resultados obtenidos en esta investigación los granos de cacao provenientes de Tolopampa y Guadalupe muestran niveles altos de Flavan-3-ol y metilxantinas respecto a los granos de cacao recogidos en Copallin que tenía niveles más bajos de dichos compuestos bioactivos. Corroborando lo que establece Carrillo ya que Copallin está identificada como la zona alta de la que se recolecto los granos de cacao.

(Vázquez-Ovando et al., 2016) estudiaron los alcaloides y polifenoles del cacao, como mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma; estos mencionan que la catequina y la epicatequina son compuestos fenólicos que contribuyen a la astringencia y actividad antioxidante, mientras que la teobromina y cafeína brinda el amargor característico del cacao; además, determinan que la cantidad de dichos compuestos puede llegar a variar debido a la altitud en la que se encuentran las plantaciones de cacao y lo asocian con las diferencias de radiación UV-B que influye de manera directa en la biosíntesis de polifenoles, otros factores aplicables son el manejo pre y postcosecha como las prácticas de manejo de la siembra, que en los cultivos de Suramérica las plagas y enfermedades oprimen a este cultivo, el tipo de fertilización, la forma en la que se realiza la cosecha, la diferencia de tiempo transcurrido entre la cosecha y el proceso de fermentación que puede ser espontánea o con ayuda de cultivos iniciadores. Durante el proceso de fermentación realizado en este estudio, al culminar la fermentación controlada los niveles de epicatequina, catequina, teobromina y cafeína disminuyeron mucho más a comparación de la fermentación controlada por ejemplo en los granos de cacao

recolectados en Guadalupe tanto la fermentación controlada y espontánea empezaron con 22.44 mg/g de epicatequina, 0.730 mg/g de catequina, 17.90 mg/g de teobromina y 3.26 mg/g de cafeína, al cumplir las 168 horas de fermentación, las cantidades disminuyeron a 1.46 mg/g de epicatequina, 0.00 mg/g de catequina, 13.01 mg/g de teobromina y 0.52 mg/g de cafeína esto para la fermentación espontánea, en la fermentación controlada se obtuvo 3.11 mg/g de epicatequina, 0.00 mg/g de catequina, 12.09 mg/g de teobromina y 0.96 mg/g de cafeína, por otro lado los granos de cacao extraídos de Tolopampa empezaron con 24.20 mg/g de epicatequina, 1.554 mg/g de catequina, 18.05 mg/g de teobromina y 3.68 mg/g de cafeína al finalizar la fermentación, se obtuvieron 11.02 mg/g de epicatequina, 0.432 mg/g de catequina, 18.16 mg/g de teobromina y 4.54 mg/g de cafeína esto para la fermentación espontánea, en la fermentación controlada se obtuvo 11.29 mg/g de epicatequina, 0.154 mg/g de catequina, 17.13 mg/g de teobromina y 6.38 mg/g de cafeína y finalmente en los granos de cacao provenientes de Copallin inicio con 16.98 mg/g de epicatequina, 0.688 mg/g de catequina, 16.75 mg/g de teobromina y 7.68 mg/g de cafeína al terminar la fermentación, se obtuvieron 5.42 mg/g de epicatequina, 0.00 mg/g de catequina, 18.24 mg/g de teobromina y 3.16 mg/g de cafeína esto para la fermentación espontánea, en la fermentación controlada se obtuvo 11.97 mg/g de epicatequina, 0.274 mg/g de catequina, 19.02 mg/g de teobromina y 6.65 mg/g de cafeína.

(Chagas Junior et al., 2021) estudiaron las implicaciones químicas y reducción del tiempo de fermentación del cacao en finca por *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii* analizando sus resultados mediante PCA y HCA, para todos los tratamientos, la fermentación se separó en tres grupos (HCA) que, según los parámetros incluidos en este estudio, representaron tres momentos de fermentación: grupo 1 (0 y 24 horas), que se caracterizó por el pH más alto, TRS (azúcares reductores totales) y TPC (compuestos fenólicos totales), es decir, el inicio del proceso de fermentación; grupo 2 (48, 72, 96 y 120 horas) para tratamientos CF, Sc y Pk; y 48, 72 y 96 h para el tratamiento ScPk, tiempos de fermentación intermedios, que se caracterizaron por menor TPC y pH, y mayor TTA (acidez titulable) y temperatura; y grupo 3 (144 y 168 horas) para tratamientos CF, Sc y Pk; y 120 y 144 h para el tratamiento con ScPk, que se caracterizaron por los altos conteos de levaduras, LAB y AAB. A diferencia de este trabajo que solo agrupo en dos HCA

donde el primer grupo conformado por las primeras horas (0, 12, 24, 36, 48, 60) que presento alto contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante por ende elevados niveles de flavan-3-ol y metilxantinas, el segundo grupo representaron las horas restantes desde las 72 horas hasta las 168 horas estas presentaron disminución de flavan-3-ol y metilxantinas. Pero los mejores resultados se obtuvieron en la fermentación controlada que se realizó con cultivo iniciador *Saccharomyces cerevisiae*.

V. CONCLUSIONES

Durante la caracterización de los parámetros de fermentación se identificó que la temperatura más alta de fermentación espontánea y controlada se alcanza entre las 60 y 72 horas de fermentación de los granos del cacao, también se determinó que el pH externo de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo varía dependiendo del lugar de procedencia de los granos del cacao más no del tipo de fermentación.

En la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los granos de cacao se comprobó primero, el pH interno en los granos de cacao provenientes de Copallín, Tolopampa y Guadalupe, durante el proceso de fermentación espontánea y controlada se comportan de manera similar, pero que está fuertemente ligado a la acidez titulable ya que mientras el pH baja la acidez aumenta, también que la altitud de la zona de donde proviene el cacao incide en los compuestos bioactivos, y que, a mayor altitud, los compuestos bioactivos disminuyen.

Se determinó el contenido de compuestos bioactivos en los granos de cacao, los resultados obtenidos en este trabajo exponen que la fermentación mediante acción de las levaduras y las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas provoca una reducción de flavan-3-ol (epicatequina y catequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína) por ende también disminuye el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante. Además, se identificó que el tipo de fermentación al que es sometido los granos de cacao afecta las concentraciones de flavan-3-ol y metilxantinas.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar más estudios acerca de la influencia de las zonas de cultivo del cacao y la influencia que estas tienen en los polifenoles y las metilxantinas.

Estudiar fermentaciones con más cultivos iniciadores, que busquen reducir los tiempos de fermentación manteniendo concentraciones de compuestos bioactivos óptimos para el proceso de obtención de chocolate.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840-857.
<https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Andrade, J. A., Rivera-García, J., Chire-Fajardo, G. C., & Ureña-Peralta, M. O. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*, 10(4), 1-12.
<https://doi.org/10.29019/enfoque.v10n4.462>
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273-280.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- Castro-Alayo, E. M. (2019). *Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa*. 29.
- Castro-Alayo, E. M., Torrejón-Valqui, L., Medina-Mendoza, M., Cayo-Colca, I. S., & Cárdenas-Toro, F. P. (2022). Kinetics Crystallization and Polymorphism of Cocoa Butter throughout the Spontaneous Fermentation Process. *Foods*, 11(12), 1769.
<https://doi.org/10.3390/foods11121769>
- Chagas Junior, G. C. A., Ferreira, N. R., Gloria, M. B. A., Martins, L. H. da S., & Lopes, A. S. (2021). Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia*

- kudriavzevii. *Food Chemistry*, 338, 127834.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127834>
- Cruz, J. F. M., Leite, P. B., Soares, S. E., & Bispo, E. da S. (2015). Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao*, L) cultivars during fermentation. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(2), 279-284. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6541>
- Deus, V. L., Bispo, E. S., Franca, A. S., & Gloria, M. B. A. (2020). *Influence of cocoa clones on the quality and functional properties of chocolate – Nitrogenous compounds*. 8.
- Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D., & Serafini, M. (2017). From Cocoa to Chocolate: The Impact of Processing on In Vitro Antioxidant Activity and the Effects of Chocolate on Antioxidant Markers In Vivo. *Frontiers in Immunology*, 8, 1207.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01207>
- do Carmo Brito, B. de N., Campos Chisté, R., da Silva Pena, R., Abreu Gloria, M. B., & Santos Lopes, A. (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, 228, 484-490.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>
- Eyamo Evina, V. J., De Taeye, C., Niemenak, N., Youmbi, E., & Collin, S. (2016). Influence of acetic and lactic acids on cocoa flavan-3-ol degradation through fermentation-like incubations. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 514-522. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.047>
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in

- popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Gültekin-Özgüven, M., Berktaş, İ., & Özçelik, B. (2016). Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 252-259. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.047>
- Hu, Y., Pan, Z. J., Liao, W., Li, J., Gruget, P., Kitts, D. D., & Lu, X. (2016). Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 202, 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.130>
- Melo, T. S., Pires, T. C., Engelmann, J. V. P., Monteiro, A. L. O., Maciel, L. F., & Bispo, E. da S. (2021). Evaluation of the content of bioactive compounds in cocoa beans during the fermentation process. *Journal of Food Science and Technology*, 58(5), 1947-1957. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04706-w>
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.03.013>
- Quelal-Vásquez, M. A., Lerma-García, M. J., Pérez-Esteve, É., Arnau-Bonachera, A., Barat, J. M., & Talens, P. (2020). Changes in methylxanthines and flavanols during cocoa powder processing and

their quantification by near-infrared spectroscopy. *LWT*, 117, 108598.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108598>

Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M.,
Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., & Lugo-Cervantes, E. (2012).

Effect of fermentation time and drying temperature on volatile
compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1), 277-288.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.078>

Samaniego, I., Espín, S., Quiroz, J., Ortiz, B., Carrillo, W., García-Viguera, C.,
& Mena, P. (2020). Effect of the growing area on the methylxanthines

and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador. *Journal of Food
Composition and Analysis*, 88, 103448.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103448>

Septianti, E. (2020). *Perfil de compuestos bioactivos, componente antioxidante
y aromático de varios clones de granos de cacao durante la
fermentación*. 17.

Suazo, Y., Davidov-Pardo, G., & Arozarena, I. (2014). Effect of Fermentation
and Roasting on the Phenolic Concentration and Antioxidant Activity
of Cocoa from Nicaragua: Effect of Process on Cocoa from Nicaragua.

Journal of Food Quality, 37(1), 50-56.

<https://doi.org/10.1111/jfq.12070>

Vázquez-Ovando, A., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Betancur-
Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles
del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones
en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(3),
239-254.

ANEXOS

Tabla 2. Cálculo del porcentaje de fermentación mediante prueba de corte

Copallin Controlada	%	Copallin Espontanea	%
granos sin fermentar	3	granos sin fermentar	3
granos sobrefermentados	2	granos sobrefermentados	1
granos germinados	0	granos germinados	0
granos mohosos	0	granos mohosos	0
granos pizarrosos	7	granos pizarrosos	5
granos totales	100	granos totales	100
% de fermentación	88	% de fermentación	91
Tolopampa Controlada	%	Tolopampa Espontanea	%
granos sin fermentar	4	granos sin fermentar	3
granos sobrefermentados	2	granos sobrefermentados	2
granos germinados	0	granos germinados	0
granos mohosos	0	granos mohosos	0
granos pizarrosos	18	granos pizarrosos	9
granos totales	100	granos totales	100
% de fermentación	76	% de fermentación	86
Guadalupe Controlada	%	Guadalupe Espontanea	%
granos sin fermentar	4	granos sin fermentar	3
granos sobrefermentados	3	granos sobrefermentados	3
granos germinados	0	granos germinados	0
granos mohosos	0	granos mohosos	0
granos pizarrosos	4	granos pizarrosos	6
granos totales	100	granos totales	100
% de fermentación	89	% de fermentación	88

Tabla 3. Promedio reportado de los granos de cacao procedentes de Copallín (\pm desviación estándar) con letras mayúsculas diferentes en las mismas columnas (Tipo de fermentación) y con letras minúsculas diferentes en la misma línea (Tiempo de fermentación) son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $p \leq 0.05$)

Copallín								
	Espontánea				Controlada			
Tiempo	Catequina	Epicatequina	Cafeina	Teobromina	Catequina	Epicatequina	Cafeina	Teobromina
GF	0.68 \pm 0.20aA	16.98 \pm 0.03abA	7.67 \pm 0.67abcA	16.75 \pm 1.53bcA	0.43 \pm 0.24abcdeA	16.98 \pm 0.03abcdA	7.67 \pm 0.67abcA	15.79 \pm 1.46bcA
0 h	0.44 \pm 0.09bA	14.71 \pm 1.54abcA	7.08 \pm 1.05bcdA	17.93 \pm 0.75abcA	0.61 \pm 0.28abcdA	15.98 \pm 3.11abcdA	6.30 \pm 0.83bcdeA	17.60 \pm 0.29abcA
12 h	0.25 \pm 0.22bcA	16.79 \pm 3.32abA	6.38 \pm 1.57bcdeA	16.26 \pm 0.51cA	0.18 \pm 0.17deA	15.72 \pm 2.62abcdA	4.70 \pm 0.68efA	17.48 \pm 1.35abcA
24 h	0.44 \pm 0.14abA	21.72 \pm 4.07aA	9.95 \pm 0.92aA	18.73 \pm 1.21abcA	0.16 \pm 0.03eB	14.49 \pm 3.41bcdeA	6.81 \pm 1.14abcdeB	17.50 \pm 2.26abcA
36 h	0.43 \pm 0.01abB	19.72 \pm 0.65aA	7.55 \pm 2.22abcA	18.30 \pm 0.26abcA	0.83 \pm 0.16aA	21.70 \pm 1.38aA	7.53 \pm 0.37abcdA	20.12 \pm 1.45aA
48 h	0.19 \pm 0.06bcA	16.72 \pm 4.82abA	7.36 \pm 1.07abcA	18.82 \pm 0.13abB	0.31 \pm 0.09bcdeA	20.79 \pm 0.40abA	6.53 \pm 0.41bcdeA	20.68 \pm 0.16aA
60 h	0.16 \pm 0.17bcA	17.55 \pm 4.07abA	4.42 \pm 0.41defA	18.17 \pm 1.18abcA	0.00 \pm 0.00eA	4.53 \pm 0.89gB	3.31 \pm 0.66fA	15.63 \pm 0.51cB
72 h	0.16 \pm 0.14bcB	19.96 \pm 2.02aA	5.35 \pm 0.27cdefB	18.46 \pm 1.01abcA	0.43 \pm 0.02abcdeA	21.79 \pm 1.20aA	8.03 \pm 0.51abcA	19.69 \pm 0.09aA
84 h	0.29 \pm 0.14abcA	14.69 \pm 3.48abcA	3.77 \pm 0.35efA	19.43 \pm 1.31aA	0.17 \pm 0.07eA	6.27 \pm 3.31fgB	5.27 \pm 1.62defA	16.02 \pm 1.01bcB
96 h	0.20 \pm 0.04bcB	15.55 \pm 0.71abB	5.55 \pm 0.36cdefB	19.11 \pm 0.08abB	0.70 \pm 0.06abA	19.57 \pm 0.62abcA	8.42 \pm 0.74abA	19.82 \pm 0.37aA
108 h	0.40 \pm 0.07abcA	17.32 \pm 0.19abA	7.68 \pm 0.57abcB	19.74 \pm 0.38aA	0.62 \pm 0.15abcA	13.58 \pm 2.92cdeA	8.99 \pm 0.14aA	18.16 \pm 1.04abcA
120 h	0.32 \pm 0.05abcA	12.08 \pm 0.25bcdB	8.85 \pm 1.26abA	18.03 \pm 0.15abcA	0.42 \pm 0.15abcdeA	16.84 \pm 1.30abcdA	6.83 \pm 1.20abcdeA	17.95 \pm 0.17abcA
132 h	0.15 \pm 0.10bcA	4.72 \pm 0.26dA	6.40 \pm 0.08bcdeA	18.68 \pm 1.19abcA	0.04 \pm 0.08eA	4.46 \pm 3.89gA	5.86 \pm 0.94cdeA	16.21 \pm 1.99bcA
144 h	0.20 \pm 0.28bcA	6.42 \pm 1.19dB	6.35 \pm 0.11bcdeA	18.30 \pm 0.47abcA	0.13 \pm 0.09eA	9.16 \pm 0.17efgA	4.63 \pm 0.08efB	18.45 \pm 0.16abcA
156 h	0.10 \pm 0.08bcA	8.04 \pm 1.18cdA	4.56 \pm 0.15defB	18.55 \pm 0.34abcA	0.13 \pm 0.17eA	8.80 \pm 1.31efgA	5.10 \pm 0.14efA	18.48 \pm 0.63abcA
168 h	0.00 \pm 0.00cB	5.42 \pm 2.57dB	3.16 \pm 0.33fB	18.24 \pm 0.25abcB	0.27 \pm 0.13cdeA	11.96 \pm 1.37defA	6.64 \pm 0.62abcdeA	19.02 \pm 0.26abA

Tabla 4. Promedio reportado de los granos de cacao procedentes de Tolopampa (\pm desviación estándar) con letras mayúsculas diferentes en las mismas columnas (Tipo de fermentación) y con letras minúsculas diferentes en la misma línea (Tiempo de fermentación) son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $p \leq 0.05$)

	Tolopampa							
	Espontánea				Controlada			
Tiempo	Catequina	Epicatequina	Cafeina	Teobromina	Catequina	Epicatequina	Cafeina	Teobromina
GF	1.55±0.42aA	24.20±1.74bcA	3.68±0.28defA	18.05±0.11bcdA	24.20±1.74aA	25.11±0.33cdA	18.05±0.11abcA	1.55±0.42aA
0 h	0.35±0.11cdefB	20.76±1.83cA	4.89±0.04bcdeA	17.32±0.44cdeB	23.30±0.29aA	28.09±0.09aA	18.62±0.40abA	0.62±0.11bcA
12 h	0.52±0.09bcdB	21.76±0.35bcB	7.05±0.81abA	18.40±0.79bcA	24.28±0.51aA	27.54±0.60abA	19.21±0.00abA	0.75±0.08bcA
24 h	0.86±0.09bA	30.42±1.06aA	9.20±0.73aA	19.07±0.39abA	24.35±1.36aA	26.64±1.10abcB	19.57±0.74aB	0.93±0.26ab
36 h	0.69±0.21bcA	25.72±3.18abA	5.95±0.49bcA	20.22±0.75aA	15.46±4.97bA	26.34±0.34abcB	14.06±3.64cA	0.51±0.54bcdB
48 h	0.40±0.01cdefB	20.31±0.59cA	6.14±0.63bcA	18.15±0.48bcdB	21.98±0.85aA	25.54±0.86bcA	19.20±0.28abA	0.61±0.07bcdA
60 h	0.00±0.00fB	8.48±0.39defgB	3.22±0.10defB	16.67±0.35defgA	14.13±0.66bcA	25.48±0.02bcA	16.50±0.32abcA	0.66±0.13bcA
72 h	0.00±0.00fB	5.02±4.09gA	2.91±0.21efB	14.23±0.49iA	10.12±0.33bcdA	21.03±0.92efgA	14.75±0.45bcA	0.28±0.05cdA
84 h	0.06±0.07efA	8.53±0.57defgA	4.87±1.17bcdeA	17.06±0.17cdefA	9.29±0.79cdA	22.93±0.74deA	15.16±1.16abcA	0.26±0.17cdB
96 h	0.01±0.01fB	6.49±0.40efgA	4.80±1.55cdeA	16.13±0.06efghB	9.42±1.86cdA	20.98±0.12efgA	16.98±0.13abcA	0.19±0.08cdA
108 h	0.12±0.01defA	9.81±0.22defgA	5.15±0.60bcdA	17.09±0.28cdeA	11.37±1.75bcdA	21.03±0.33efgA	16.84±0.67abcA	0.19±0.06cdA
120 h	0.09±0.05efA	10.07±0.58defA	3.33±0.78defA	15.25±0.74ghiA	7.99±0.54deA	22.69±1.42efB	16.17±0.29abcA	0.19±0.08cdA
132 h	0.19±0.05defA	12.16±0.27dA	4.83±0.25bcdeA	17.32±0.32cdeA	10.84±0.61bcdA	26.35±1.10abcB	17.95±0.67abcA	0.20±0.02cdA
144 h	0.16±0.15defA	8.59±0.20defgA	3.61±0.03defA	15.35±0.04fghiA	6.16±1.12deA	19.24±0.26gB	13.56±0.89cdB	0.00±0.00dB
156 h	0.00±0.00f	5.37±1.91fgA	2.42±1.31fA	14.48±1.21hiA	2.65±2.18e	20.54±0.89fgA	9.34±4.19dA	0.00±0.00dA
168 h	0.43±0.03cdeA	11.02±1.58deA	4.54±0.25cdefA	18.15±0.90bcdA	11.29±2.72bcdB	21.84±1.21efA	17.13±0.51abcA	0.15±0.01cdA

Tabla 5. Promedio reportado de los granos de cacao procedentes de Guadalupe (\pm desviación estándar) con letras mayúsculas diferentes en las mismas columnas (Tipo de fermentación) y con letras minúsculas diferentes en la misma línea (Tiempo de fermentación) son estadísticamente diferentes (Prueba Tukey, $p \leq 0.05$)

	Guadalupe							
	Espontánea				Controlada			
Tiempo	Catequina	Epicatequina	Cafeina	Teobromina	Catequina	Epicatequina	Cafeina	Teobromina
GF	0.73 \pm 0.12abA	22.43 \pm 1.61aA	3.26 \pm 0.09abA	17.90 \pm 0.38abcA	0.73 \pm 0.12abA	21.47 \pm 1.57aA	3.26 \pm 0.09abA	17.90 \pm 0.38aA
0 h	0.96 \pm 0.05aA	21.68 \pm 0.11aA	3.94 \pm 0.72aA	18.40 \pm 0.39abA	0.84 \pm 0.01aA	20.85 \pm 1.26aA	3.21 \pm 1.42abA	17.43 \pm 0.13abB
12 h	0.73 \pm 0.13abA	21.63 \pm 0.13aA	3.82 \pm 0.04aA	19.23 \pm 0.18abA	0.44 \pm 0.14bA	14.61 \pm 1.95bB	3.53 \pm 0.38aA	17.20 \pm 0.24abcB
24 h	0.53 \pm 0.08bcA	19.03 \pm 1.86aA	2.78 \pm 0.39bcA	18.20 \pm 0.70abcA	0.06 \pm 0.06cB	6.49 \pm 2.59cB	2.74 \pm 0.39abcA	15.54 \pm 0.49bcdefB
36 h	0.79 \pm 0.14abA	20.53 \pm 0.09aA	4.18 \pm 0.34aA	19.38 \pm 0.06aA	0.02 \pm 0.03cB	6.40 \pm 0.87cdB	2.82 \pm 0.08abcB	16.91 \pm 0.59abcdB
48 h	0.36 \pm 0.29cdA	9.30 \pm 3.49bcA	2.84 \pm 0.16bcA	17.68 \pm 0.43abcA	0.00 \pm 0.00cA	5.06 \pm 1.39cdeA	2.12 \pm 0.87abcdeA	14.58 \pm 1.31efghiB
60 h	0.00 \pm 0.00eA	1.98 \pm 3.37eA	0.82 \pm 0.66fgA	16.32 \pm 0.50cdeA	0.01 \pm 0.02cA	6.44 \pm 3.17cdA	1.82 \pm 0.04bcdeA	14.74 \pm 1.54efghA
72 h	0.26 \pm 0.10cdeA	12.33 \pm 2.27bA	2.35 \pm 0.07bcdA	17.37 \pm 0.16bcdA	0.00 \pm 0.00cB	3.23 \pm 1.98cdeA	2.87 \pm 0.70abcA	15.88 \pm 0.07abcdeB
84 h	0.00 \pm 0.00e	1.30 \pm 0.38eB	1.16 \pm 0.39efgA	14.76 \pm 0.91efA	0.00 \pm 0.00c	2.52 \pm 0.43cdeA	0.83 \pm 0.11efA	15.21 \pm 0.05cdefA
96 h	0.00 \pm 0.00e	2.75 \pm 0.57deA	1.60 \pm 0.14defA	14.91 \pm 0.06efA	0.00 \pm 0.00c	3.39 \pm 2.60cdeA	0.91 \pm 0.26defB	13.80 \pm 0.20fghijA
108 h	0.00 \pm 0.00e	0.86 \pm 0.20eB	1.10 \pm 0.33efgA	15.38 \pm 1.01deA	0.00 \pm 0.00c	1.50 \pm 0.23eA	0.65 \pm 0.21efA	12.62 \pm 0.28ijB
120 h	0.00 \pm 0.00e	2.89 \pm 1.41deA	1.19 \pm 0.21efgA	14.83 \pm 1.06efA	0.00 \pm 0.00c	4.53 \pm 1.43cdeA	1.54 \pm 0.28cdefA	15.04 \pm 1.43defgA
132 h	0.14 \pm 0.13de	7.32 \pm 2.31cdA	1.88 \pm 0.08cdeA	14.43 \pm 0.05efA	0.00 \pm 0.00c	3.77 \pm 0.59cdeA	2.36 \pm 0.46abcdA	15.19 \pm 0.59cdefA
144 h	0.00 \pm 0.00e	2.81 \pm 0.59deA	0.64 \pm 0.09fgA	12.96 \pm 0.24fA	0.00 \pm 0.00c	1.28 \pm 0.02eB	0.24 \pm 0.026fB	12.76 \pm 0.12hijA
156 h	0.00 \pm 0.00e	1.77 \pm 0.43eA	0.88 \pm 0.05fgB	12.91 \pm 0.14fA	0.00 \pm 0.00c	1.62 \pm 0.01deA	1.95 \pm 0.03bcdeA	13.05 \pm 0.13ghijA
168 h	0.00 \pm 0.00e	1.46 \pm 0.73eB	0.52 \pm 0.19gB	13.01 \pm 1.62fA	0.00 \pm 0.00c	3.10 \pm 0.13cdeA	0.96 \pm 0.07defA	12.08 \pm 0.07jA



Figura 11. Activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*



Figura 12. Placas para sembrar las levaduras

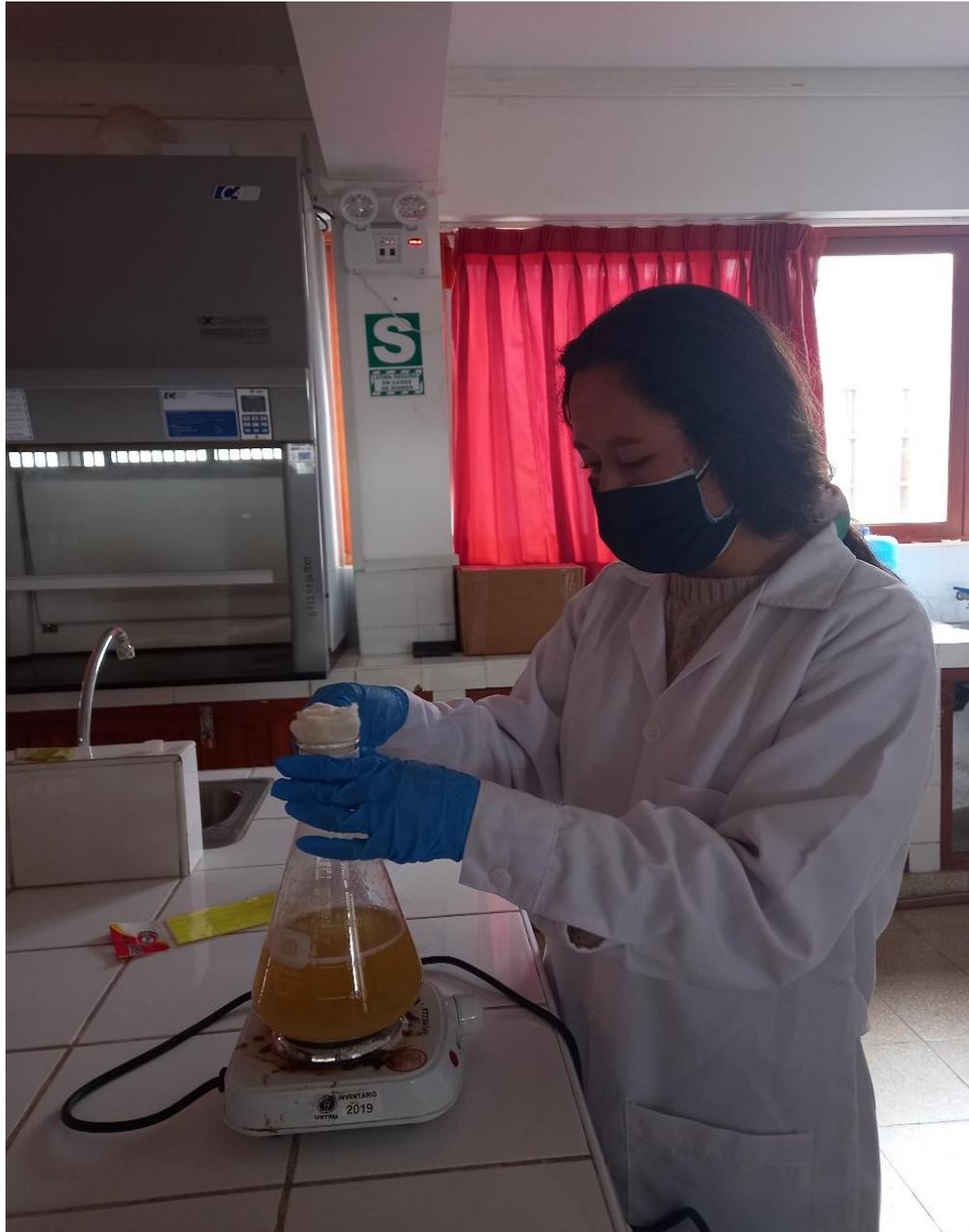


Figura 13. Preparación del caldo YPD en el que se colocarán las levaduras



Figura 14. Cajones de fermentación usados para el proceso de fermentación espontánea y fermentación controlada.



Figura 15. Medición de temperatura, pH y oxígeno disuelto en los granos de cacao durante las primeras horas de fermentación.



Figura 16. Medición de temperatura, pH y oxígeno disuelto en los granos de cacao durante las últimas horas de fermentación.



Figura 17. Cambio de cajón de los granos de cacao durante la fermentación.



Figura 18. Secado de los granos de cacao de la fermentación controlada (Izquierda) y fermentación espontánea (Derecha)



Figura 19. Prueba de corte realizada a 100 granos de cacao después del proceso de fermentación.



Figura 20. Conservación de los granos de cacao fermentados en tanques de nitrógeno líquido



Figura 21. Medición del pH interno de los granos de cacao fermentados.



Figura 22. Extractos obtenidos de los granos de cacao fermentados para medir acidez titulable



Figura 23. Medición de actividad de agua de los granos de cacao fermentados.



Figura 24. Medición de la acidez titulable en los extractos de los granos de cacao fermentados.



Figura 25. Reacción de los extractos con Folin para calcular el contenido de polifenoles de los granos de cacao fermentados.

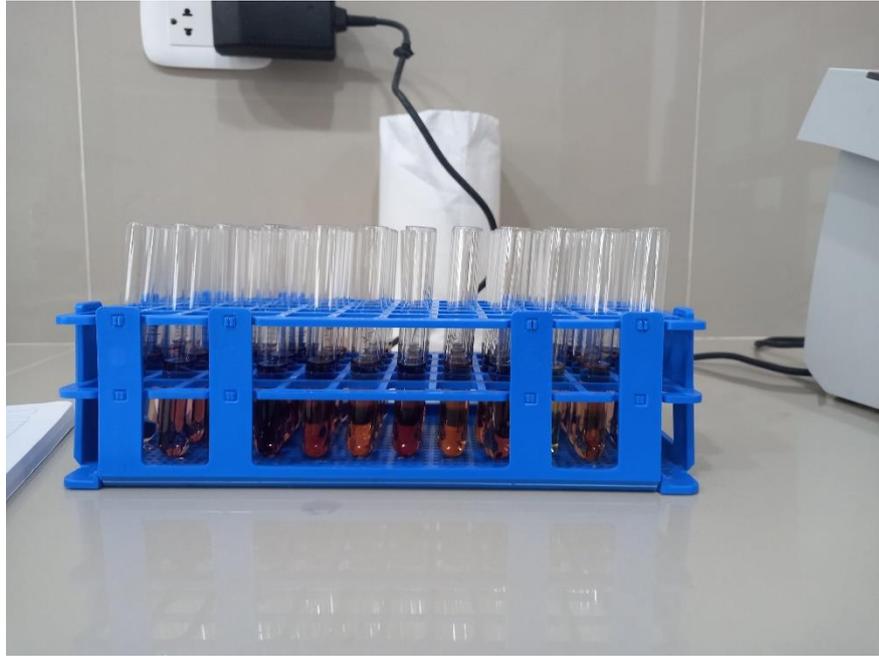


Figura 26. Reacción de los extractos en DPPH para calcular la actividad antioxidante de los granos de cacao fermentados.



Figura 27. Colocación de los viales con extracto de granos de cacao para cuantificar flavan-3-ol y metilxantinas.