

**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
INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

**“CUANTIFICACIÓN DE PRECURSORES AROMÁTICOS
EN FERMENTACIÓN CULTIVO-DEPENDIENTE DE
CACAO CRIOLLO ORGÁNICO (*Theobroma cacao* L.)”**

Autora: Bach. Clorinda Yordana Chacón Ortiz

Asesor: Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo

Co-asesor: Dr. Juan Carlos Alvarado Ibañez

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2023

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE 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): Chacón Ortiz Clarinda yordana
DNI N°: 73297306
Correo electrónico: 7329730661@untrm.edu.pe
Facultad: 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

Cuantificación de precursores aromáticos en la fermentación cultivo dependiente del cacao Cuello Orgánico (Theobroma cacao L.)

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Castro Alayo Etian Manuelito
DNI, Pasaporte, C.E N°: 78204816
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) 0000-0003-4322-8970

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Awarido Ibáñez Juan Carlos
DNI, Pasaporte, C.E N°: 48520390
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, 07 / Diciembre / 2022


Firma del autor 1


Firma del Asesor 1

Firma del autor 2


Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres porque me apoyaron, motivaron e inspiraron en cada etapa del proceso de mi formación académica, por los valores que me enseñaron a continuar y lograr las metas propuestas.

Agradezco a mis hermanos por su confianza y motivación brindada durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, por su apoyo incondicional durante todo este proceso; a mis hermanos por la confianza y motivación brindada cada día de mi formación académica.

Al Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo, por su asesoría, constancia, tiempo y paciencia durante todo el desarrollo del proyecto; al Ms. Juan Carlos Alvarado Ibañez por el tiempo y apoyo brindado.

A la ing Llisela Torrejón Valqui encargada del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas de Amazonas por su guía, paciencia, tiempo y conocimientos compartidos en el uso del Espectrofotómetro Raman.

Al Ms. Cesar Rafael Balcázar Zumaeta investigador principal del proyecto “Estudio metabolómico del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.) nativo orgánico fino de aroma” por la oportunidad brindada de hacer tesis en el proyecto.

A la Cooperativa de servicios múltiples APROCAM de Bagua por el apoyo en la colección de muestras, facilitarnos el uso de sus instalaciones y guía de su personal.

Al Proyecto C.U.I. N° 234309: Creación de los Servicios de investigación en ingeniería de alimentos y post cosecha de la UNTRM por facilitarnos el uso de sus laboratorios.

Financiado por CONCYTEC PROCIENCIA-CONTRATO 056-2021 FONDECYT Proyecto de investigación básica 2021-01 E041-2021-01- “Estudio metabolómico 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

Dr. Erick Aldo Auquiñivin Silva

Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA 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 (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Cuantificación de precursores aromáticos durante la fermentación Cultivo-dependiente del cacao Criollo orgánico (Theobroma Cacao L.); del egresado Clorinda yordana Chacón Ortiz 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, 07 de Diciembre de 2022



Firma y nombre completo del Asesor
Dr. Efran Manuelito Castro Alayo

VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE LA 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 Cuantificación de precursores aromáticos en la fermentación cultivo-dependiente del cacao Criollo orgánico (Theobroma cacao L.); del egresado Clarinda yordana Chacón ortiz 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, 07 de Diciembre de 2022

Firma y nombre completo del Asesor
Dr. Juan Carlos Alvarado Ibanez

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Ms. Robert Javier Cruzalegui Fernández;

Presidente



M.Sc. Aline Camila Caetano

Secretario



M.Sc. Armstrong Fernández Jeri

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:

Cuantificación de precursores aromáticos en la fermentación Cultivo-
dependiente del cacao Criollo Orgánico (Theobroma Caca L.)

presentada por el estudiante ()/egresado (X) Norma Yordana Charón Ortiz

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

con correo electrónico institucional 7329830661@untrm.edu.pe

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

- La citada Tesis tiene 23 % 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, 2 de marzo del 2023

Alina Camila Cautano
SECRETARIO

[Firma]
PRESIDENTE

[Firma]
VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



ANEXO 3-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 09 de marzo del año 2023 siendo las 15 horas, el aspirante: Clorinda Yordana Chacón Ortiz, asesorado por Dr Efraín Manuelito Castro Alayo defiende en sesión pública presencial (X) / a distancia () la Tesis titulada: Cuantificación de Precursores Aromáticos en Fermentación Cultivo-Dependiente de Cacao Criollo Orgánico (Theobroma cacao L.), 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: Ms. Robert Javier Cruzalegui Fernández

Secretario: M.Sc. Aline Camila Castano

Vocal: M.Sc. Armstrong Barnard Fernandez Jeri

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 (X) por Unanimidad (X)/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 15:50 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

Aline Camila Castano
SECRETARIO

[Signature]
VOCAL

[Signature]
PRESIDENTE

OBSERVACIONES:
.....

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE 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 LA TESIS	vi
VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE LA TESIS.....	vii
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS.....	viii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	ix
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	x
ÍNDICE GENERAL	xi
INDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	17
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
2.1. Área de estudio.....	19
2.2. Material	19
2.3. Diseño del estudio	19
2.4. Métodos y técnicas.....	19
2.4.1. Fermentación de cacao.....	19
2.4.2. Liofilización.....	20
2.4.4. Eliminación de polifenoles	20
2.4.5. Análisis de aminoácidos y azúcares reductores	21
2.5. Análisis de datos	21
III. RESULTADOS.....	22
3.1. Identificación de estándares de precursores del flavor	22
3.2. Identificación de los precursores aromáticos en la muestra de cacao	25
3.3. Análisis de componentes principales (PCA).....	28
3.4. Precursores del flavor por tipo de fermentación y lugar de procedencia.....	29
IV. DISCUSIÓN.....	32

4.1.	Identificación Raman de espectros de los precursores aromático.....	32
4.2.	Análisis multivariado	33
4.3.	Cuantificación Raman de precursores del aroma del cacao.....	34
V.	CONCLUSIONES.....	38
VI.	RECOMENDACIONES	39
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
	ANEXOS.....	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Arreglo de datos.....	19
--------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectros de los estándares de aminoácidos y azúcares reductores.....	23
Figura 2. Identificación de aminoácidos en la muestra de cacao	25
Figura 3. Identificación de azúcares en la muestra de cacao	26
Figura 4. Análisis de componentes principales de los tres lugares de procedencia y fermentación espontánea y controlada.....	28
Figura 5. Precursores aromáticos de muestras procedentes de Tolopampa y fermentación cultivo dependiente	30
Figura 6 . precursores aromáticos de muestras procedentes de Tolopampa y fermentación espontánea	31
Figura A1. precursores aromáticos de muestras procedentes de Copallin y fermentación cultivo dependiente.....	48
Figura A2. precursores aromáticos de muestras procedentes de Copallin y fermentación espontánea	49
Figura A3. precursores aromáticos de muestras procedentes de Guadalupe y fermentación cultivo dependiente.....	50
Figura A4. precursores aromáticos de muestras procedentes de Guadalupe y fermentación espontánea.....	51
Figura A5. Siembra del cultivo iniciador (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	52
Figura A6. Fermentación de los granos de cacao y almacenamiento de las muestras	52
Figura A7. Liofilización de las muestras de cacao	52
Figura A8. Desgrasado y eliminación de polifenoles de las muestras	53
Figura A9. Analisis de las muestras por espectroscopía Raman.....	53

RESUMEN

Se cuantificó los precursores aromáticos durante la fermentación cultivo-dependiente de cacao criollo orgánico (*Theobroma cacao* L.) procedentes de tres zonas geográficas (Copallin, Tolopampa y Guadalupe) y dos tipos de fermentación (espontánea y cultivo-dependiente) se cuantificaron mediante Espectroscopia Raman los siguientes precursores aromáticos: alanina, fenilalanina, isoleucina, leucina, sacarosa, fructosa y glucosa. Se observó que durante la fermentación los aminoácidos tienden a aumentar su contenido, mostrando mayor concentración en la fermentación con cultivo-dependiente que en la espontánea; mientras que en los azúcares se muestra una degradación entre las 48 y 120 horas y una tendencia a disminuir de la sacarosa y la glucosa y a aumentar de la fructosa durante el proceso de fermentación de igual manera se muestra mayor degradación de azúcares en la fermentación cultivo-dependiente; en el análisis de componentes principales se pudo observar que las muestras con fermentación cultivo dependiente muestran mayor cantidad de agrupaciones lo cual indicaría que existen diferentes componentes según el tiempo de fermentación del grano Por su lado el lugar de procedencia se observó un mejor desarrollo de precursores aromáticos en las muestras procedentes de Tolopampa.

Palabras claves: Precursores aromáticos, fermentación, aminoácidos, azúcares reductores

ABSTRACT

The aromatic precursors were quantified during the culture-dependent fermentation of organic criollo cacao (*Theobroma cacao* L.) from three geographical areas (Copallin, Tolopampa and Guadalupe) and two types of fermentation (spontaneous and culture-dependent) were quantified by Raman Spectroscopy. the following aroma precursors: alanine, phenylalanine, isoleucine, leucine, sucrose, fructose and glucose. It was observed that during fermentation the amino acids tend to increase their content, showing a higher concentration in the culture-dependent fermentation than in the spontaneous one; while in sugars there is a degradation between 48 and 120 hours and a tendency to decrease in sucrose and glucose and to increase in fructose during the fermentation process, in the same way, greater degradation of sugars is shown in the fermentation culture- dependent; In the principal component analysis, it was possible to observe that the samples with crop-dependent fermentation show a greater number of groupings, which would indicate that there are different components depending on the fermentation time of the grain. On the other hand, the place of origin observed a better development of aromatic precursors. in the samples from Tolopampa.

Keywords: Aromatic precursors, fermentation, amino acids, reducing sugars

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la producción mundial de cacao se centra en los continentes de África, Asia y América con una producción total de 68%, 15% y 13% respectivamente (Jagoret et al., 2017; Tardzenyuy et al., 2020). Las variedades de cacao cultivados se clasifican en tres grupos: Trinitario, Forastero y Criollo (Adeigbe et al., 2021); este último representa entre el 7 y el 10% de toda la producción de cacao y se cultiva en países de Sudamérica como: Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú (Delgado-Ospina et al., 2020). El cacao criollo es conocido como fino de aroma (Delgado-Ospina et al., 2020) debido a sus características sobresalientes por sobre las otras variedades, mismas que hacen de este un producto muy atractivo para el mercado internacional (Brunetto et al., 2020; Cuadra, 2020). Se estima que un 75% de las exportaciones peruanas de cacao pertenecen a esta variedad y se produce en las regiones norteñas del país como: San Martín, Amazonas y Cajamarca (Ministerio de Desarrollo y Riego.,2020)

Las características de los granos de cacao dependen de factores como el genotipo y el lugar de cultivo; sin embargo, hay otras características que se desarrollan y dependen directamente de las prácticas de post cosecha entre ellas: la fermentación (Hinne et al., 2018). La fermentación en los granos de cacao es un proceso espontáneo debido a que el mucílago que recubre el grano es rico azúcares como: la glucosa, fructosa y sacarosa (Kouamé et al., 2021) los cuales son hidrolizados en los primeros 3 días de fermentación (72 horas) por bacterias ácido lácticas (LAB) convirtiendo la glucosa y fructosa en ácido láctico y posteriormente mediante la acción de baterías ácido acéticas y una reacción de oxidación en ácido acético (John et al., 2019; Viesser et al., 2021) esta última al ser una reacción exotérmica genera cambios en el medio de cultivo como el aumento de la temperatura y disminución del pH estos fenómenos activan enzimas presentes en los granos y que juegan un papel muy importante en la formación de precursores aromáticos (Domínguez-Pérez et al., 2020; John et al., 2020)

Los aminoácidos son producto de la degradación de las proteínas presentes en el cacao (D'Souza et al., 2018; Voigt et al., 2018). Durante el segundo y tercer día de fermentación (Domínguez-Pérez et al., 2020) estas proteínas son hidrolizadas por las enzimas presentes en el grano en cadenas más cortas de aminoácidos (Deus et al., 2018; Domínguez-Pérez et al., 2020; John et al., 2020) teniendo como predominantes al finalizar la fermentación

a la leucina, fenilalanina, alanina e isoleucina (Brunetto et al., 2020; Fang et al., 2020). Tanto a los aminoácidos como a los azúcares reductores se les conoce como precursores del flavor, esto debido a que en presencia de temperaturas que superan los 100 °C, son los responsables de la reacción de Maillard la misma que genera el flavor característico y agradable del chocolate (Hinneh et al., 2018)

La cantidad de componentes volátiles formados durante el tostado depende directamente de la cantidad de amino ácidos y azúcares formados durante la fermentación, es por ello de gran importancia que este proceso se realice de forma adecuada si se desea obtener granos de alta calidad (Apriyanto, 2017; D'Souza et al., 2018; Rawel et al., 2019) ; sin embargo aún existen deficiencias al realizar este proceso porque no se conocen los parámetros bajo los que ocurren el mayor número de reacciones que desencadenan la aparición de precursores. Además, se debe considerar que existen una relación entre el lugar donde se cultivan los granos y el método de fermentación (Kumari et al., 2018)

Existen diferentes métodos para determinar aminoácidos entre ellos: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida-detección espectrométrica de masas en tándem (LC-MS / MS), cromatografía de gases-detección espectrométrica de masas (GC-MS) y espectroscopia de reflectancia del infrarrojo cercano (NIRS) e infrarrojo medio (MIR) (Lihao et al., 2019; Qiu et al., 2020) La Espectroscopía Raman es una técnicas no destructiva y mucho más confiables y sencilla de realizar que los demás métodos estándares para el análisis de aminoácidos (Nekvapil et al., 2018); esta técnica permite realizar estudios cualitativos y cuantitativos en cantidades pequeñas de muestras (Bumrah & Sharma, 2016)

De esta forma el objetivo del presente trabajo fue cuantificar los precursores aromáticos en fermentación cultivo-dependiente de cacao criollo orgánico (*Theobroma cacao* L.)”

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

La investigación se desarrolló en la Cooperativa de servicios múltiples APROCAM ubicado en la Car. Bagua - Copallín Km. 4 - Provincia de Bagua - Región Amazonas - Perú, donde por medio de sus productores de la zona alta, media y baja siendo estas: Copallín, Tolopampa y Guadalupe respectivamente.

2.2. Material

Se trabajó con cacao criollo orgánico procedente de los productores de la Cooperativa de servicios múltiples APROCAM ubicado en la Car. Bagua - Copallín Km. 4 - Provincia de Bagua – Región Amazonas – Perú. Considerante tres zonas altitudinales: zona baja a Guadalupe, zona media Tolopampa y zona alta a Copallín; el cacao fue sometido a fermentación por 7 días durante los cuales se muestreó cada 12 horas.

Los granos fueron separados de la pulpa y colocados en tubos falcon de 50 ml y almacenadas en nitrógeno líquido para su posterior traslado al laboratorio de post cosecha de la UNTRM donde fueron ultra congeladas hasta el siguiente procedimiento.

2.3. Diseño del estudio

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
1	Espontanea (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	Espontanea (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
3	Espontanea (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

Se realizó dos tipos de fermentación, la espontánea y con cultivo iniciador (*Saccharomyces cerevisiae*), el proceso duró 7 días durante los cuales se

muestrearon y controlando pH, temperatura y oxígeno disuelto cada 12 horas.

Para ambas fermentaciones se utilizó el método de cajones, para lo cual se emplearon cajones de madera de aproximadamente 40 kg cada uno recubiertos con aluminio, los cajones se taparon con sacos para concentrar la temperatura en el interior; se hizo el “volteo” de cajones cada 48 horas excepto el séptimo día en el cual se finalizó la fermentación y se retiró el cacao de los cajones a las 24 horas.

Para el acondicionar el cultivo iniciador se siguió el método descrito por Chagas Junior et al (2021) con algunas modificaciones; la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* se activó en placas Petri que contenían Agar YPD y se incubó por 72 horas a 25 °C, para luego ser transferidas a nuevas placas y repitiendo el proceso hasta obtener la cantidad necesaria del cultivo. Las levaduras activadas se enriquecieron con Buffered Peptone Water y se añadió a los cajones de cacao uniformemente.

2.4.2. Liofilización

Las muestras de cacao se liofilizaron a -84 °C y 0.008 bar de presión durante 18 horas, tiempo en el que el grano alcanzó un porcentaje de humedad entre 0-2% el cual se midió usando una balanza de humedad de alta precisión.

2.4.3. Desgrasado

Los granos liofilizados fueron molidos con la ayuda de un mortero para luego ser desgrasadas con éter de petróleo por el método Soxhlet. Para lo cual se pesó 7 g de muestra y se llevó al equipo que contenía en 110 ml de éter de petróleo, se controlaron 8 sifoneadas por cada muestra. Luego se dejaron reposar al ambiente para eliminar los restos del solvente (Ribeiro et al., 2022).

2.4.4. Eliminación de polifenoles

Se empleó 0.5 g de cacao desgrasado con 5 ml de acetona, se llevó al vortex por 5 min y luego a la centrifuga a 10 000 RPM por 10 min a 4 °C. Luego se eliminó el sobrenadante y se dejó reposar a temperatura ambiente para eliminar los restos de acetona de las muestras (Li et al., 2021).

2.4.5. Análisis de aminoácidos y azúcares reductores

Se analizaron las muestras por Microscopía con Focal Raman, para lo cual se tomó 250 mg de muestra y se mezcló con 125 mg de óxido de titanio, se formó una masa añadiéndolo agua y se llevó al equipo para obtener los espectros (Sebben et al., 2018).

2.5. Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) usando el paquete estadístico R studio; así mismo se realizó un análisis multivariado, empleando análisis de componentes principales (PCA) en software solomillo.

III. RESULTADOS

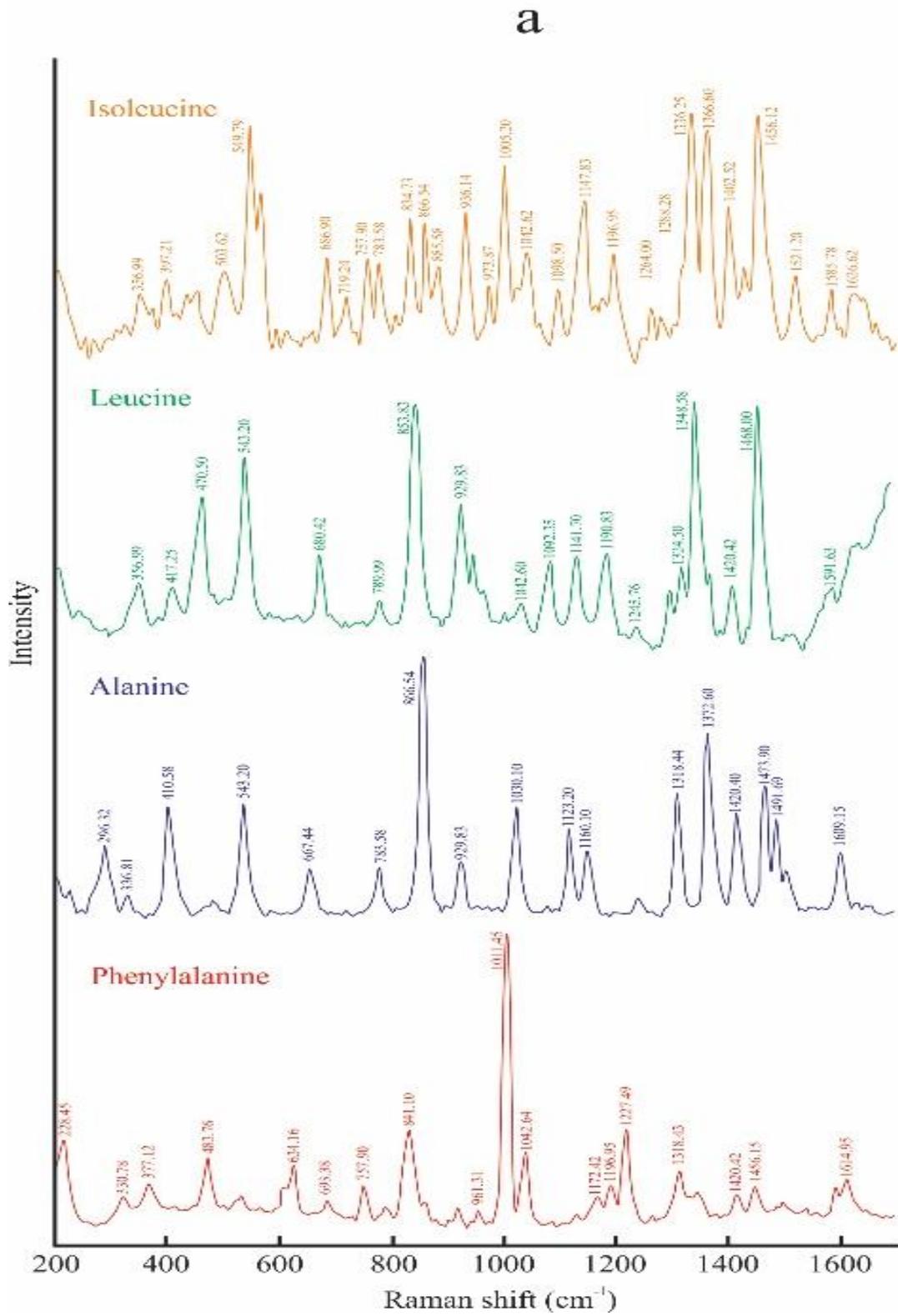
3.1. Identificación de estándares de precursores del flavor

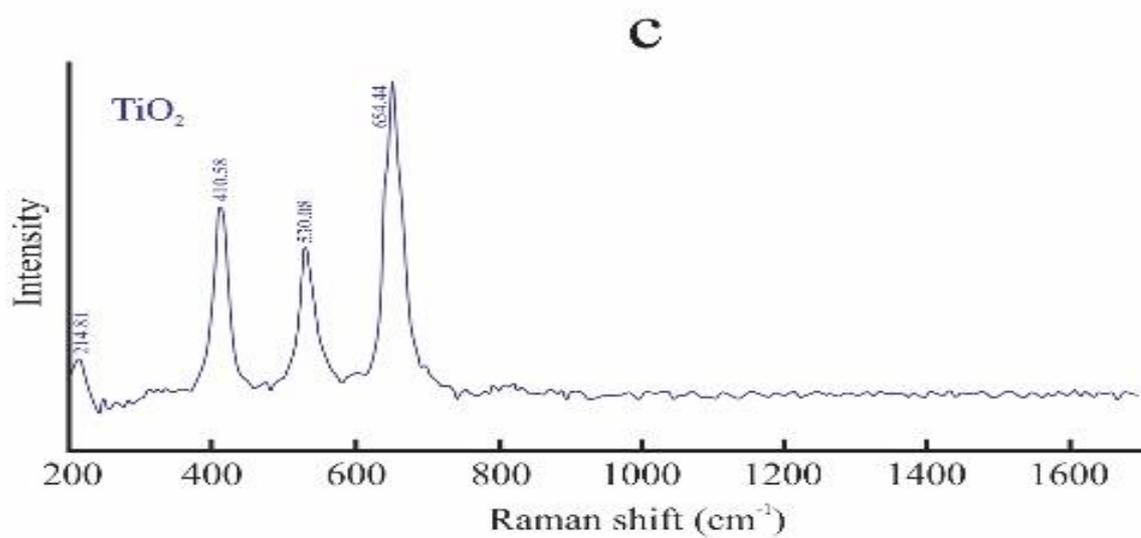
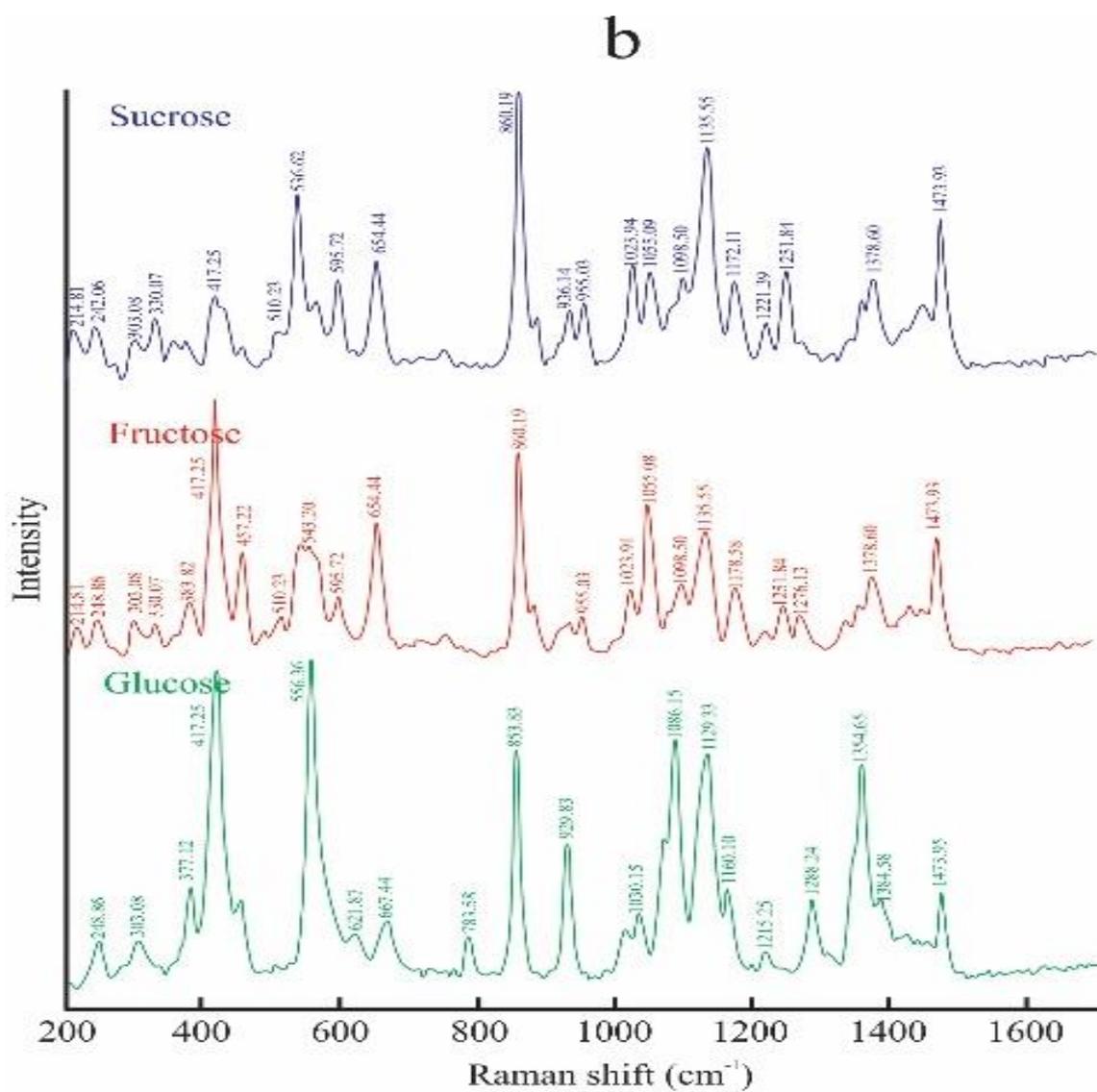
En la figura 1 se muestran los espectros Raman de los estándares de aminoácidos y azúcares reductores, como también del estándar interno usado óxido de titanio, como se puede observar en la isoleucina se muestra la mayor intensidad de banda a los 560 cm^{-1} mientras que la leucina a los 853.83 cm^{-1} y 1348.58 cm^{-1} , por su lado la alanina presenta la mayor intensidad de banda a los 866.54 cm^{-1} y finalmente la fenilalanina 1011.45 cm^{-1} .

En el caso de los azúcares la sacarosa muestra la mayor amplitud de banda a los 860.19 y 1135.55 cm^{-1} , la fructosa a los 417.25 ; 860.19 y 1055.08 cm^{-1} y la glucosa a los 556.36 ; 417.25 y 1086.15 cm^{-1} . El estándar interno óxido de titanio solo muestra tres picos representativos mostrándose el empleado para calcular la concentración en ratios de los metabolitos a los 533.71 cm^{-1} .

Figura 1

Espectros de los estándares de aminoácidos y azúcares reductores.



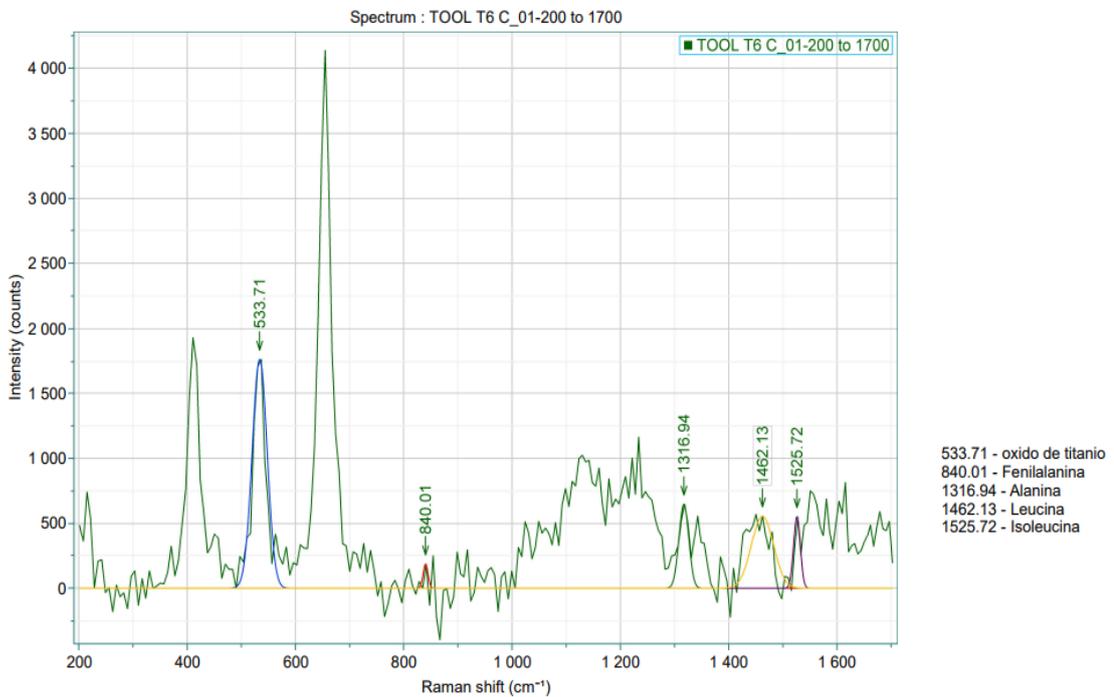


3.2. Identificación de los precursores aromáticos en la muestra de cacao

En la figura 2 se muestra el espectro de una muestra de cacao y las amplitudes de onda identificativas de los 4 aminoácidos estudiados y el estándar interno óxido de titanio, siendo para la fenilalanina a los 840.04 cm^{-1} ; para la alanina 1316.94 ; la leucina a los 1462.13 ; la isoleucina a los 1525.72 y para el óxido de titanio a los 533.71 cm^{-1} , se debe considera que existen pequeñas variaciones en las longitudes de onda de cada muestra.

Figura 2

Identificación de aminoácidos en la muestra de cacao



Date	10.09.2022 1...	Acq. time (s)	0.5	Accumulations	2	Laser	532nm_Edge
Spectro (cm ⁻¹)	3000.27	Hole (μm)	100	Slit (μm)	50	Grating	600 (750nm)
Filter	1%	Objective	x50_VIS_LWD	ICS correction	On	Range (cm ⁻¹)	

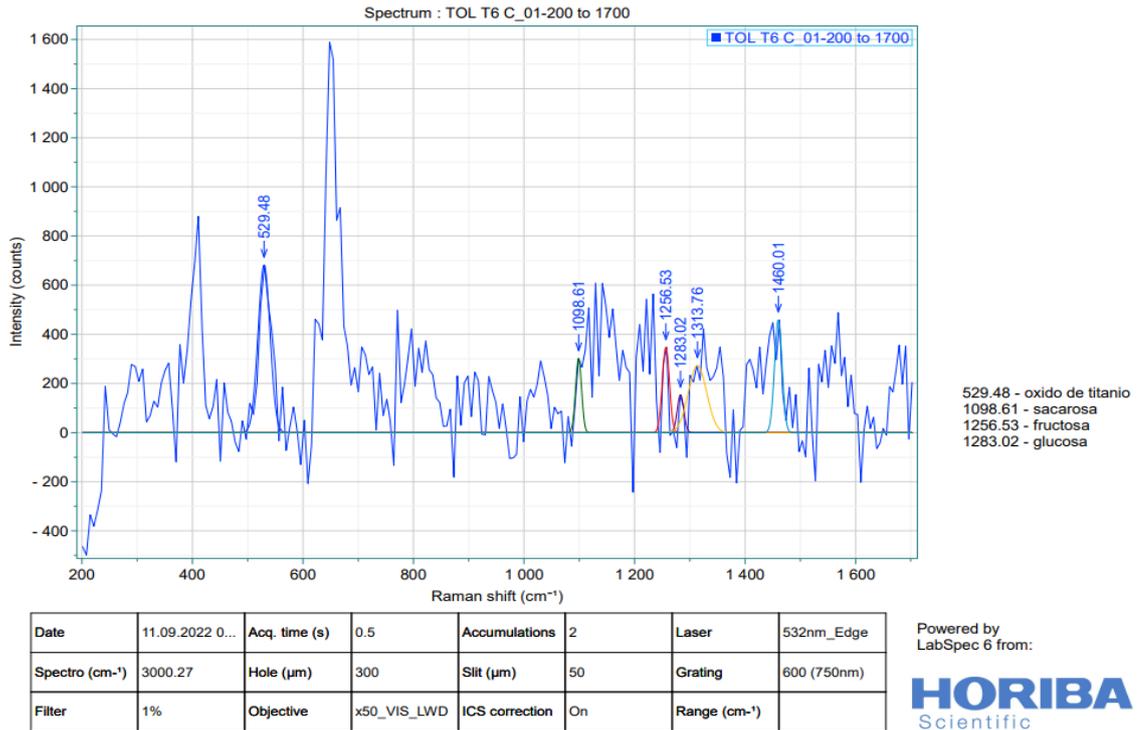
Powered by
LabSpec 6 from:

HORIBA
Scientific

En la figura 3 se muestra el espectro de una muestra de cacao y las longitudes de onda en identificativas de los 3 azúcares estudiados, siendo esta para la sacarosa a los 1098.61 cm^{-1} ; para la fructosa a los 1256.53 cm^{-1} y para la glucosa a los 1283.02 cm^{-1} .

Figura 3

Identificación de azúcares en la muestra de cacao



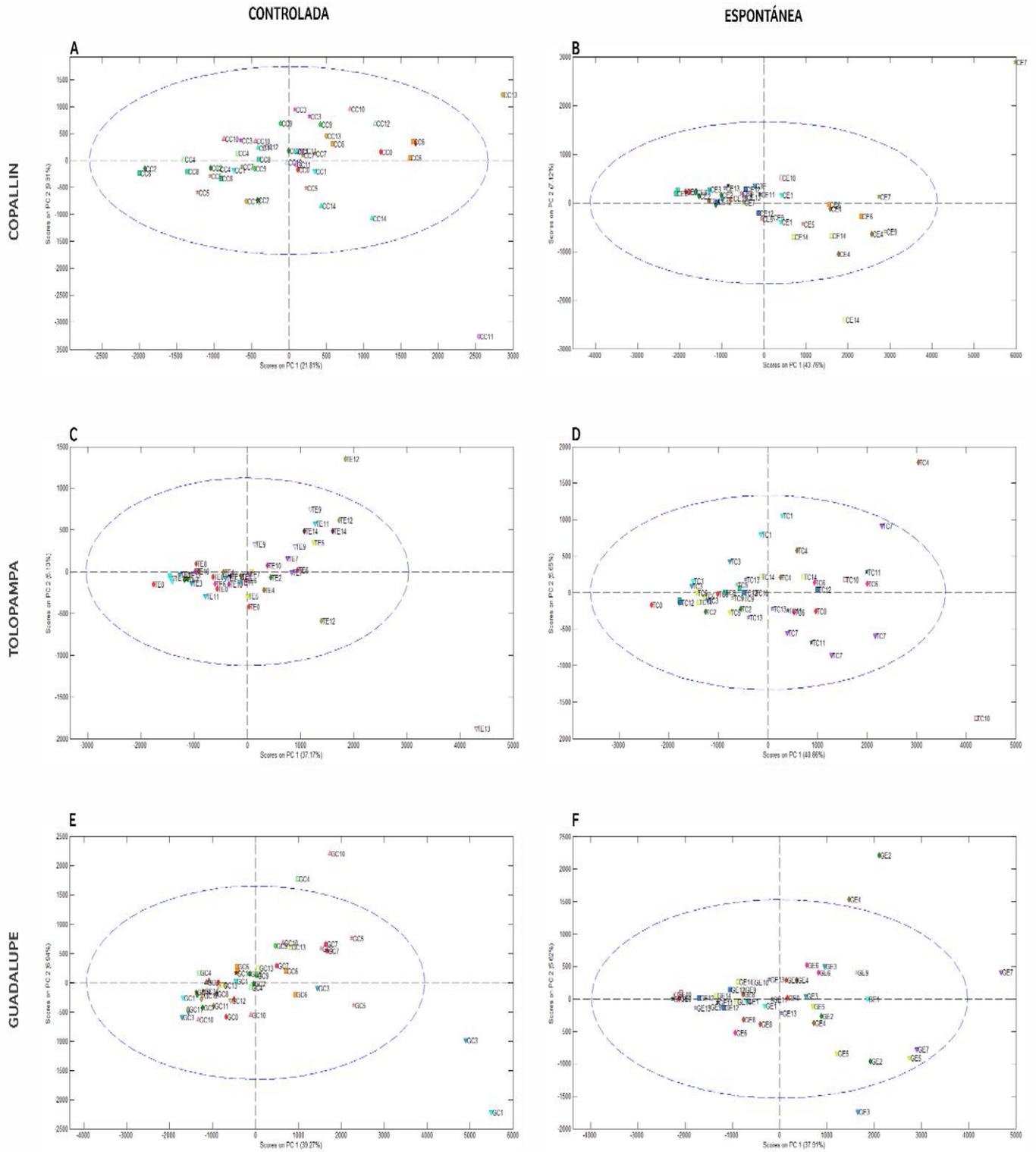
3.3. Análisis de componentes principales (PCA)

En la figura 4 se observa el análisis de componentes principales (PCA) para cada tipo de fermentación y tres lugares de procedencia en el caso de Copallin fermentación cultivo dependiente (fig. 4A) existen grupos entre los tiempos de fermentación: 1; 3; 4; 8; 9; 10 y 12 (12, 3, 48, 96, 108 y 120 horas) otro en los tiempos: 3; 6; 9 y 12 (36, 72 y 144 horas) y en los tiempos 11 y 7 (132 y 204 horas) en la fermentación espontánea (fig. 4B) en cambio, se observa una única agrupación en los tiempos: 2, 3, 4, 8, 11, 12 y 13 (24, 36, 48, 96, 132, 144 y 156 horas). Por su lado en Tolopampa fermentación cultivo dependiente (fig. 4C) se observan agrupaciones entre los tiempos 6, 7, 8 y 10 (72, 84, 96 y 120 horas) y otro grupo en los tiempos: 9, 11, 12 y 14 (108, 132, 144 y 168 horas); mientras que en la fermentación espontánea (fig. 4D) se observan grupos en los tiempos 1, 2, 5 (12, 24 y 60 horas) y otro en los tiempos 8, 9 y 13 (96, 108 y 156 horas).

En el caso de las muestras procedentes de Guadalupe en la fermentación cultivo dependiente se puede ver (fig. 4E) agrupaciones en los tiempos: 1,2,4,6,9 y 13 (12, 24, 48, 72, 108 y 156 horas) y en los tiempos: 8; 10; 11 y 12 (96, 120, 132 y 144 horas), por su lado en la fermentación espontánea (fig. 4F) se formaron grupos en los tiempos: 8; 9; 11; 12 y 14 (96, 108, 144 y 168 horas) también en los tiempos: 2; 3; 4 y 5 (24, 36, 48 y 60 horas) y en los tiempos 6 y 3 (72 y 36 horas).

Figura 4

Análisis de componentes principales de los tres lugares de procedencia y fermentación espontánea y controlada



3.4. Precursores del flavor por tipo de fermentación y lugar de procedencia

En la figura 5 se puede observar el comportamiento de los precursores aromáticos para las muestras procedentes de Tolopampa y fermentación cultivo dependiente: la alanina, fenilalanina y fructosa mostraron un aumento al final el proceso respecto al inicio, sin embargo, los puntos más altos de concentración se encuentran a las 96 y 48 para la alanina y fenilalanina respectivamente y la fructosa mostro mayor concentración en ratios a al final del proceso. Por su lado la isoleucina, leucina, sacarosa y glucosa mostraron una disminución de sus concentraciones del final respecto al inicio mostrando concentraciones elevadas durante el proceso: 144, 132, 132 y 156 horas respectivamente.

En el caso de la fermentación espontánea se puede observar en la figura 6 que la alanina, fenilalanina, fructosa muestran un aumento en su contenido después de la fermentación; sin embargo, sus puntos más altos se observan durante el proceso: 96, 48 y 168 horas respectivamente. En cambio, los precursores: isoleucina, leucina sacarosa y glucosa muestras una disminución en sus concentraciones al final de la fermentación respecto al inicio del proceso teniendo sus puntos más altos a las 144, 132, 156 0 horas de fermentación

Figura 5

Precursores aromáticos de muestras procedentes de Tolopampa y fermentación cultivo dependiente

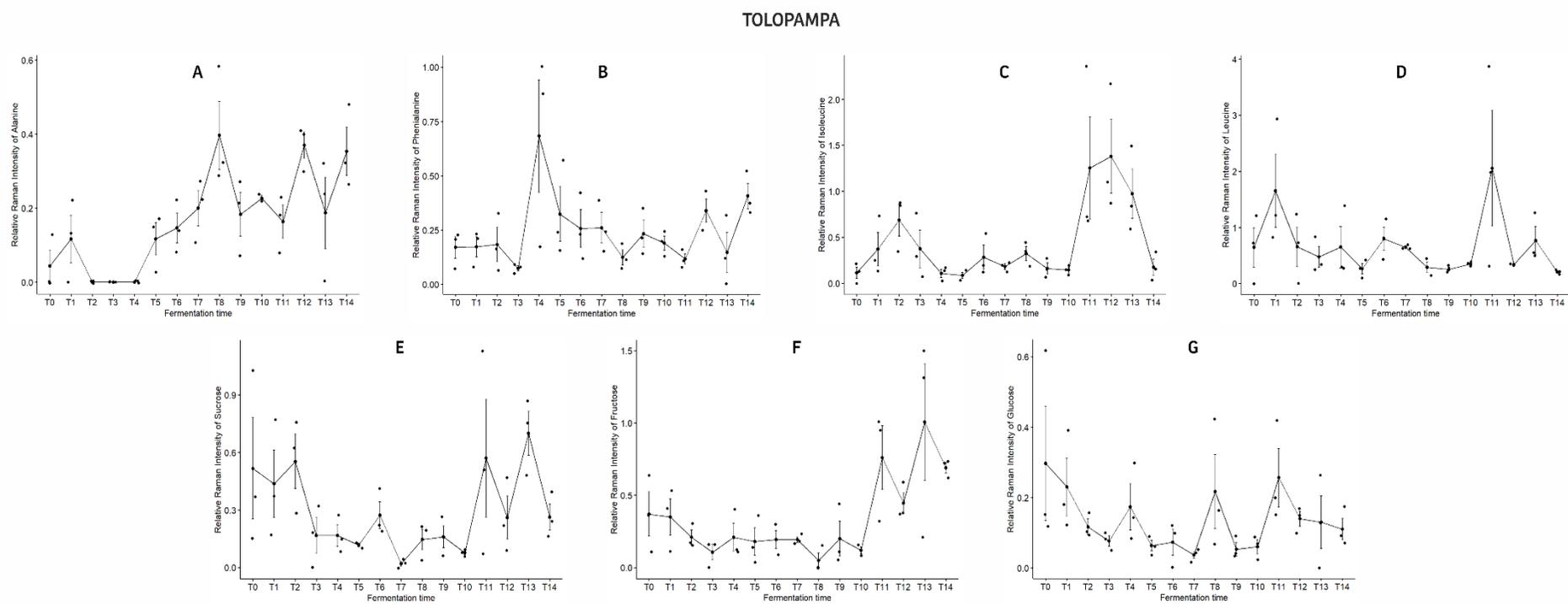
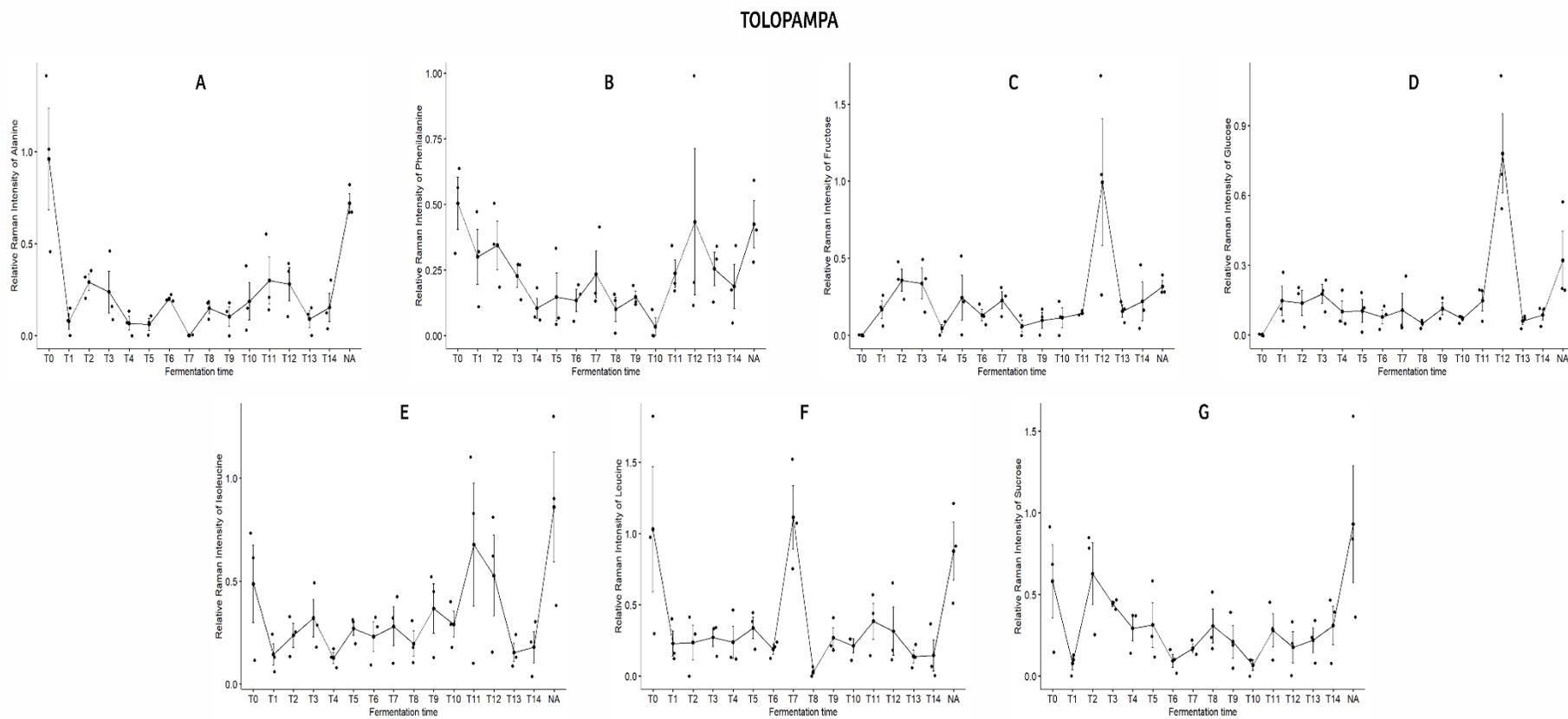


Figura 6

precursores aromáticos de muestras procedentes de Tolopampa y fermentación cultivo dependiente



IV. DISCUSIÓN

4.1. Identificación Raman de espectros de los precursores aromático

La espectroscopía Raman permite obtener espectros de las vibraciones dadas por la fuerza y el tipo de enlaces químicos que existen entre las moléculas (Güven et al., 2019) es altamente efectiva para caracterizar estructuralmente proteínas y sus unidades como los aminoácidos debido a su insensibilidad a la adsorción del agua; es decir que se puede caracterizar con la misma precisión independientemente de su estado (Schmidt et al., 2015). En los aminoácidos estudiados (fig. 1, 2 y 3) la isoleucina (fig. 1) muestra la mayor intensidad de banda en el espectro a los $549,79\text{ cm}^{-1}$; mientras que en la literatura revisada estos valores se encontraron a los 540 cm^{-1} en estado sólido (Zhu et al., 2011), el pico ubicado a los $1525,72\text{ cm}^{-1}$ (fig. 2) permitió identificar la presencia de isoleucina en la muestra de cacao.

La leucina tiene mayor intensidad a los $853,83$; $1348,58$ y 1468 cm^{-1} valores similares se observaron en la literatura revisada en donde la isoleucina muestra mayor intensidad de onda a los 1455 cm^{-1} (Pazderka & Kopecký, 2017), se debe considerar que pueden existir variaciones en el momento en que aparecen las vibraciones de los espectros según la marca del Espectroscopio Raman empleado para el análisis (Sebben et al., 2018) la presencia de leucina en la muestra de cacao (fig. 2) estuvo dada por el pico identificado a los $1462,13\text{ cm}^{-1}$.

Para la alanina (fig. 1) el pico representativo se muestra a las $866,54\text{ cm}^{-1}$, también se muestran altas intensidades a las $410,58$; $543,20$; $1030,10$; $1318,44$; $1372,60$ y $1472,60\text{ cm}^{-1}$; mientras que en investigaciones anteriores las intensidades más altas se mostraron a 806 y 852 cm^{-1} (Aubrey & Thomas, 1991; Zhu et al., 2011). Las vibraciones obtenidas en el espectro Raman de la alanina cambian con la temperatura al llegar a los $-193,15\text{ °C}$ cuando comienza a sufrir una transición de fase de segundo orden lenta desde la estructura tetragonal con el grupo de factores C4 a una estructura presumiblemente monoclinica con el grupo de factores C2 (Silva et al., 2015); mientras que a los $292,5 \pm 1,5\text{ °C}$ la señal de este aminoácido desaparece. En la muestra de cacao se identificó a través del pico ubicado a $1316,94\text{ cm}^{-1}$ (fig 2).

La fenilalanina como se muestra en la figura 1 solo tiene un pico elevado y representativo a los $1011,45\text{ cm}^{-1}$, resultados que coinciden con los obtenidos por

Freire et al (2017) los cuales observaron la mayor intensidad y muy notable a los 1003 cm^{-1} , en la muestra de cacao se identificó la fenilalanina en el pico $840,01\text{ cm}^{-1}$ (fig.2).

En el caso de los azúcares la sacarosa presenta mayor intensidad de banda en el espectro a los $402\text{ y }850\text{ cm}^{-1}$ (Güven et al., 2019) en nuestro caso estos valores se mostraron a los $860,19\text{ y }1135,55\text{ cm}^{-1}$ (fig. 1) y en la muestra de cacao se identificó la sacarosa en el pico ubicado a los 1099 cm^{-1} (fig. 3) . La fructosa según investigaciones previas muestra mayor intensidad de banda a los 627 cm^{-1} (Güven et al., 2019); $314\text{ y }353\text{ cm}^{-1}$ (Özbalci et al., 2013) en este caso hay algunas diferencias con los tiempos en los que se observan las mayores intensidades de banda en nuestros resultados (figura 1) presentándose a los $417,25; 860,19\text{ y }1055,08\text{ cm}^{-1}$ (fig. 1) la diferencia se presenta generalmente por el tipo de equipo empleado para los análisis, en la muestra de cacao se identificó la fructosa en el pico 1252 cm^{-1} (fig. 3). En la glucosa se puede observar la mayor intensidad a los $406\text{ y }542\text{ cm}^{-1}$ (Güven et al., 2019) acuerdo a nuestro resultados obtenidos se muestra en la figura 1 las mayores intensidades de bandas para la glucosa a los $556,36; 417,25; 1086,15\text{ cm}^{-1}$ y en la muestra se identifica la glucosa en el pico ubicado a las 1283 cm^{-1} (fig. 3).

4.2.Análisis multivariado

El espectro Raman de una de las muestras analizadas con el estándar interno usado óxido de titanio (TIO) se muestra en la fig. 4. La intensidad Raman relativa estuvo dada por la división entre el área de los picos característicos identificados de cada uno de los precursores aromáticos y el área del pico característico del estándar interno usado (TIO) en cada espectro. En la fig. 4 se muestra el análisis de componentes principales (PCA) para tres componentes; en el caso de Copallin y fermentación cultivo dependiente (fig. 4A) se representa en total el 31.12 % de la variabilidad de los espectros Raman los cuales explican la variación total, se puede observar dos agrupaciones las cuales indican diferencias generales entre los diferentes tiempos de fermentación y la composición de la muestra. Se debe considerar que en los espectros obtenidos por espectroscopia Raman existe desviaciones estándar altas debido a la naturaleza del mismo análisis, como también al mismo estado de la muestra, debido a su mezcla en sólido con el estándar interno se puede tener puntos con mayor concentración y por lo tanto la luz emitida será mayor (Sebben et al., 2018). En

cambio, en la fermentación espontánea (fig. 4B) se muestra un solo grupo y una representatividad del 50.88% lo cual indicaría que no hay una mayor diferencia en la composición de la muestra durante la fermentación.

En el caso de Tolopampa y fermentación cultivo dependiente (fig. 4C) se formaron dos grupos con una representatividad 42.27% en el caso de la fermentación espontánea (fig. 4D) también se formaron dos grupos que explican el 46.51% de la variación total. Para Guadalupe en la fermentación cultivo dependiente (fig. 4E) se formaron dos grupos con 46.21% de variación total; en cambio, en la fermentación espontánea (fig. 4F) se formaron tres grupos con 46.56% de representatividad del total. Como se observa el nivel de representatividad es bajo sin embargo se debe considerar que el método empleado es altamente sensible y que toma mediciones a nivel microscópico y por lo tanto se pueden mostrar diferencias incluso en las mediciones hechas en diferentes puntos de la misma muestra, además en el estudio de Díaz-Muñoz et al (2023) se obtuvieron niveles de representatividad de PCA similares para aminoácidos.

4.3. Cuantificación Raman de precursores del aroma del cacao

Las proteínas presentes en el cacao se hidrolizan por la acción de las enzimas en cadenas más cortas de aminoácidos (Deus et al., 2018; Domínguez-Pérez et al., 2020; John et al., 2020) teniendo como predominantes al finalizar la fermentación a la leucina, fenilalanina, alanina e isoleucina (Brunetto et al., 2020; Fang et al., 2020) En las figuras 3, 4, A1, A2, A3 y A4 se muestran los resultados de la cuantificación de precursores aromáticos tanto para la fermentación espontánea como para la cultivo dependiente y las tres zonas de procedencia del cacao: Tolopampa, Copallin y Guadalupe. Existe una tendencia creciente de la cantidad de alanina y fenilalanina durante la fermentación controlada en Tolopampa (fig 5A y 5B); por el contrario, la leucina e isoleucina tienen una tendencia decreciente (fig. 5C y 5D). Con respecto a los azúcares la sacarosa y la glucosa (fig. 5E y 5G) tienden a disminuir en su intensidad contrariamente a la fructosa (fig. 5F) la cual muestra un aumento en su concentración al final del proceso. Ocurre lo contrario en fermentación espontánea (fig. 6) en donde se puede observar que la alanina y fenilalanina tienden a disminuir durante la fermentación (fig. 6A y 6B); en cambio la isoleucina y leucina (fig. 6C y 6D) muestran un aumento de concentración al final de la fermentación. Los tres

azúcares estudiados mostraron una tendencia a creciente en este tipo de fermentación (fig. 6E, 6F y 6G) como ya se ha demostrado en investigaciones anteriores el uso de cultivos iniciadores como levaduras ayuda a aumentar el nivel de degradación de los azúcares presentes (Ooi et al., 2020).

En el caso de Copallin se puede observar que tanto la alanina, fenilalanina, isoleucina y leucina (fig. A1) en la fermentación cultivo dependiente presentan menor concentración al final de la fermentación que al inicio; sin embargo, durante el proceso se obtuvieron concentraciones elevadas en el caso de la alanina y la leucina (fig. A1A Y A1D) se observa un aumento considerable en sus concentraciones a las 24 horas, mientras que la fenilalanina (fig. A1B) a las 12 y 156 horas y la isoleucina (fig. A1C) a las 156 horas de fermentación. En el caso de los azúcares al finalizar el proceso los tres azúcares mostraron una disminución respecto al inicio del proceso y puede observar la mayor degradación de la sacarosa y glucosa a las 48 horas de iniciada la fermentación (fig. A1E Y A1F), mientras que la fructosa muestra menor concentración a las 36 horas de fermentación, coincidiendo con la literatura que indica que los azúcares se degradan entre las 0 y 72 horas de fermentación (Magalhães et al., 2017). En la fermentación espontánea (fig. 2A) en cambio se observa una disminución en los cuatro aminoácidos estudiados al final del proceso, sin embargo, la alanina e isoleucina (fig. A2A y A2C) mostraron un aumento de sus concentraciones a las 24 y 156 horas de fermentación respectivamente. Se debe considerar que la cantidad de aminoácidos presentes en los granos de cacao fermentados están directamente vinculados al proceso de fermentación (Hue et al., 2016) de esta manera el uso de levaduras como cultivo iniciador favorece el desarrollo de aminoácidos de forma significativa (Santos et al., 2020); sin embargo no siempre el uso de levaduras garantiza mejoras en la eficiencia del proceso tal como se observó en la investigación de John et al (2019) quienes observaron que el uso de *Saccharomyces cerevisiae* favorece el crecimiento de las mismas en el medio de fermentación, pero limita el de las bacterias como las bacterias ácido lácticas que también juegan un papel importante durante la formación de precursores del aroma; en el caso de los tres azúcares estudiados, estos mostraron una tendencia disminuir durante el proceso.

En las muestras procedentes de Guadalupe y fermentación cultivo dependiente (fig. A3) se observó una tendencia a mantener concentraciones similares tanto al inicio

como al final de la fermentación para la alanina, isoleucina y leucina (fig. A3A, A3C y A3D); las cuales mostraron sus puntos más altos de concentración a las: 24, 132 y 60 horas respectivamente, por su lado la fenilalanina (fig. A3B) presentó una tendencia a disminuir durante el proceso; en los azúcares se puede observar una disminución en la sacarosa (fig. A3E) y aumento de la fructosa y glucosa (fig. A3F y A3G). En la fermentación espontánea se puede observar una tendencia a disminuir de alanina, fenilalanina y leucina (fig. A4A, A4B Y A4D) sin embargo durante el proceso de fermentación mostraron aumentos en sus concentraciones a las: 132, 108 y 12 horas de fermentación, en cambio la isoleucina mostró una tendencia a aumentar durante el proceso. Por su lado los azúcares mostraron una disminución en la cantidad de sacarosa y glucosa mostrándose una mayor degradación de este último a las 48 horas lo cual coincide con la investigación realizada por Viesser et al (2021) los cuales determinaron que la glucosa tiende a degradarse entre las 48 a 72 horas del inicio de la fermentación. La fructosa en cambio mostró una tendencia a aumentar al final de la fermentación respecto al inicio mostrando su punto más bajo a las 96 horas, un tanto temprano considerando que la fructosa tiende a degradarse después de las 120 horas de fermentación (Viesser et al., 2021)

En la fermentación cultivo dependiente no se han observado diferencias entre el contenido de alanina en los tres lugares de procedencia al finalizar la fermentación, pero si durante el proceso donde las muestras procedentes de Guadalupe mostraron un mayor contenido de este aminoácido con un promedio de 1.5 ratios, seguido por Copallin y finalmente Tolopampa, la fenilalanina en cambio mostró resultados similares tanto es su punto más alto como al final del proceso. Por su lado la isoleucina mostro mayor concentración en las muestras procedentes de Tolopampa, seguido por Copallin y finalmente Guadalupe y la leucina se puede observar el mismo fenómeno El contenido de aminoácidos presentes en los granos de cacao fermentados están directamente vinculados al proceso de fermentación así se demostró en el estudio realizado por Hue et al (2016) los cuales estudiaron el contenido de aminoácidos y proteínas antes y después de la fermentación de diferentes variedades de cacao de 7 países y lo que encontraron es que existían diferencias significativas entre el contenido de proteínas, más no en el de aminoácidos después de la fermentación esto debido a que la este proceso se realizó bajo las mismas condiciones. Por su lado Kumari et al (2018) estudiaron cacao provenientes de 5 continentes (fermentado y sin

fermentar) y no se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas en las muestras sin fermentar; sin embargo, se encontraron diferencias marcadas en el contenido de aminoácidos en las muestras de cacao fermentado; esto debido a que fueron fermentadas en su lugar de origen y por ende bajo diferentes condiciones.

V. CONCLUSIONES

El uso del cultivo iniciador *Saccharomyces cerevisiae* favorece la aparición de precursores aromáticos durante la fermentación del cacao criollo orgánico, favoreciendo la aparición de aminoácidos antes de los siete días de fermentación y la degradación de los azúcares como la sacarosa y glucosa y un aumento de la fructosa; mismos al ser sometidos a altas temperaturas durante el secado y tostado desencadenan la reacción de Maillard y el aroma y sabor característico del chocolate.

VI. RECOMENDACIONES

Profundizar en el estudio de los precursores aromáticos durante la fermentación del cacao criollo; puesto que según nuestros resultados obtenidos estos presentan mayores concentraciones antes de los 7 días de fermentación de esta manera se puede optimizar el proceso.

Realizar un estudio microbiológico como seguimiento al comportamiento del cultivo

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeigbe, O. O., Adewale, B. D., & Muyiwa, A. A. (2021). Variability and character association of bean biochemical traits of cocoa (*Theobroma cacao*) genotypes in four Nigerian field banks: Providing a platform for nutrition-based selection. *Journal of Agriculture and Food Research*, 3, 100115. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100115>
- Apriyanto, M. (2017). Analysis of Amino Acids in Cocoa Beans Produced during Fermentation by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 7(1), 25. <https://doi.org/10.5958/2277-9396.2017.00003.4>
- Aubrey, K. L., & Thomas, G. J. (1991). Raman spectroscopy of filamentous bacteriophage Ff (fd, M13, f1) incorporating specifically-deuterated alanine and tryptophan side chains. Assignments and structural interpretation. *Biophysical Journal*, 60(6), 1337-1349. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82171-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82171-3)
- Brunetto, M. del R., Galignani, M., Orozco, W., Clavijo, S., Delgado, Y., Ayala, C., & Zambrano, A. (s. f.). The effect of fermentation and roasting on free amino acids profile in Criollo cocoa (*Theobroma cacao* L.) grown in Venezuela. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23, e2019150. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.15019>
- Brunetto, M. del R., Galignani, M., Orozco, W., Clavijo, S., Delgado, Y., Ayala, C., & Zambrano, A. (2020). The effect of fermentation and roasting on free amino acids profile in Criollo cocoa (*Theobroma cacao* L.) grown in Venezuela. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23, e2019150. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.15019>
- Bumrah, G. S., & Sharma, R. M. (2016). Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001>

- 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>
- Cuadra, Y. M. L. (2020). *Y SU IMPACTO EN LA ECONOMÍA NACIONAL*. 9.
- Delgado-Ospina, J., Di Mattia, C. D., Paparella, A., Mastrocola, D., Martuscelli, M., & Chaves-Lopez, C. (2020). Effect of Fermentation, Drying and Roasting on Biogenic Amines and Other Biocompounds in Colombian Criollo Cocoa Beans and Shells. *Foods*, 9(4), 520. <https://doi.org/10.3390/foods9040520>
- Deus, V. L., Cerqueira E Silva, M. B. de, Maciel, L. F., Miranda, L. C. R., Hirooka, E. Y., Soares, S. E., Ferreira, E. de S., Bispo, E. da S., Deus, V. L., Cerqueira E Silva, M. B. de, Maciel, L. F., Miranda, L. C. R., Hirooka, E. Y., Soares, S. E., Ferreira, E. de S., & Bispo, E. da S. (2018). Influence of drying methods on cocoa (*Theobroma cacao* L.): Antioxidant activity and presence of ochratoxin A. *Food Science and Technology*, 38, 278-285. <https://doi.org/10.1590/fst.09917>
- Díaz-Muñoz, C., Van de Voorde, D., Tuenter, E., Lemarcq, V., Van de Walle, D., Soares Maio, J. P., Mencía, A., Hernandez, C. E., Comasio, A., Sioriki, E., Weckx, S., Pieters, L., Dewettinck, K., & De Vuyst, L. (2023). An in-depth multiphase analysis of the chocolate production chain, from bean to bar, demonstrates the superiority of *Saccharomyces cerevisiae* over *Hanseniaspora opuntiae* as functional starter culture during cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 109, 104115. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104115>
- Domínguez-Pérez, L. A., Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2020a). Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 73, 104134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104134>

- Domínguez-Pérez, L. A., Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2020b). Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 73, 104134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104134>
- Domínguez-Pérez, L. A., Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2020c). Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 73, 104134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104134>
- D'Souza, R. N., Grimbs, A., Grimbs, S., Behrends, B., Corno, M., Ullrich, M. S., & Kuhnert, N. (2018a). Degradation of cocoa proteins into oligopeptides during spontaneous fermentation of cocoa beans. *Food Research International*, 109, 506-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.068>
- D'Souza, R. N., Grimbs, A., Grimbs, S., Behrends, B., Corno, M., Ullrich, M. S., & Kuhnert, N. (2018b). Degradation of cocoa proteins into oligopeptides during spontaneous fermentation of cocoa beans. *Food Research International*, 109, 506-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.068>
- Fang, Y., Li, R., Chu, Z., Zhu, K., Gu, F., & Zhang, Y. (2020). Chemical and flavor profile changes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) during primary fermentation. *Food Science & Nutrition*, 8(8), 4121-4133. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1701>
- Freire, P. T. C., Barboza, F. M., Lima, J. A., Melo, F. E. A., & Filho, J. M. (2017). Raman Spectroscopy of Amino Acid Crystals. En K. Maaz (Ed.), *Raman Spectroscopy and Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/65480>
- Guven, B., Durakli-Velioglu, S., & Boyaci, I. H. (2019). BAZI TATLANDIRICI VE ŞEKERLERİN ZAYIFLATILMIŞ TOPLAM YANSIMA-FOURIER

DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ (ATR-FTIR), YAKIN KIZILÖTESİ (NIR) VE RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE HIZLI TANIMLANMASI. *GIDA / THE JOURNAL OF FOOD*, 274-290. <https://doi.org/10.15237/gida.GD18119>

Hinneh, M., Semanhyia, E., Van de Walle, D., De Winne, A., Tzompa-Sosa, D. A., Scalone, G. L. L., De Meulenaer, B., Messens, K., Van Durme, J., Afoakwa, E. O., De Cooman, L., & Dewettinck, K. (2018). Assessing the influence of pod storage on sugar and free amino acid profiles and the implications on some Maillard reaction related flavor volatiles in Forastero cocoa beans. *Food Research International*, 111, 607-620. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.064>

Hue, C., Gunata, Z., Breysse, A., Davrieux, F., Boulanger, R., & Sauvage, F. X. (2016a). Impact of fermentation on nitrogenous compounds of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from various origins. *Food Chemistry*, 192, 958-964. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.115>

Hue, C., Gunata, Z., Breysse, A., Davrieux, F., Boulanger, R., & Sauvage, F. X. (2016b). Impact of fermentation on nitrogenous compounds of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from various origins. *Food Chemistry*, 192, 958-964. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.115>

Jagoret, P., Michel, I., Ngnogu , H. T., Lachenaud, P., Snoeck, D., & Malézieux, E. (2017). Structural characteristics determine productivity in complex cocoa agroforestry systems. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(6), 60. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0468-0>

John, W. A., Böttcher, N. L., Abkamp, M., Bergounhou, A., Kumari, N., Ho, P.-W., D'Souza, R. N., Nevoigt, E., & Ullrich, M. S. (2019). Forcing fermentation: Profiling proteins, peptides and polyphenols in lab-scale cocoa bean fermentation. *Food Chemistry*, 278, 786-794. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.108>

John, W. A., Böttcher, N. L., Behrends, B., Corno, M., D'souza, R. N., Kuhnert, N., & Ullrich, M. S. (2020a). Experimentally modelling cocoa bean fermentation

reveals key factors and their influences. *Food Chemistry*, 302, 125335.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125335>

John, W. A., Böttcher, N. L., Behrends, B., Corno, M., D'souza, R. N., Kuhnert, N., & Ullrich, M. S. (2020b). Experimentally modelling cocoa bean fermentation reveals key factors and their influences. *Food Chemistry*, 302, 125335.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125335>

Kouamé, C., Loiseau, G., Grabulos, J., Boulanger, R., & Mestres, C. (2021). Development of a model for the alcoholic fermentation of cocoa beans by a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108917. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108917>

Kumari, N., Grimbs, A., D'Souza, R. N., Verma, S. K., Corno, M., Kuhnert, N., & Ullrich, M. S. (2018). Origin and varietal based proteomic and peptidomic fingerprinting of *Theobroma cacao* in non-fermented and fermented cocoa beans. *Food Research International*, 111, 137-147.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.010>

Li, S., Tian, Y., Jiang, P., Lin, Y., Liu, X., & Yang, H. (2021). Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(9), 1448-1469.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761287>

Lihao, W., Jialin, W., & Guifen, J. (2019). Biosensors and Nanodevices Based on DNAzymes. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Methods*, 1(1).
<https://doi.org/10.35840/ijabm/2407>

Magalhães da Veiga Moreira, I., de Figueiredo Vilela, L., da Cruz Pedroso Miguel, M., Santos, C., Lima, N., & Freitas Schwan, R. (2017). Impact of a Microbial Cocktail Used as a Starter Culture on Cocoa Fermentation and Chocolate Flavor. *Molecules*, 22(5), 766. <https://doi.org/10.3390/molecules22050766>

- Nekvapil, F., Brezestean, I., Barchewitz, D., Glamuzina, B., Chiş, V., & Cintă Pinzaru, S. (2018). Citrus fruits freshness assessment using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, *242*, 560-567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.105>
- Ooi, T. S., Ting, A. S. Y., & Siow, L. F. (2020). Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *LWT*, *122*, 108977. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108977>
- Özbalci, B., Boyaci, İ. H., Topcu, A., Kadılar, C., & Tamer, U. (2013). Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks. *Food Chemistry*, *136*(3-4), 1444-1452. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.064>
- Pazderka, T., & Kopecký, V. (2017). Drop coating deposition Raman spectroscopy of proteinogenic amino acids compared with their solution and crystalline state. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *185*, 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.043>
- Qiu, X., Reynolds, R., Johanningsmeier, S., & Truong, V.-D. (2020). Determination of free amino acids in five commercial sweetpotato cultivars by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, *92*, 103522. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103522>
- Rawel, H., Huschek, G., Sagu, S., & Homann, T. (2019). Cocoa Bean Proteins—Characterization, Changes and Modifications due to Ripening and Post-Harvest Processing. *Nutrients*, *11*(2), 428. <https://doi.org/10.3390/nu11020428>
- Ribeiro, J. C., Santos, C., Lima, R. C., Pintado, M. E., & Cunha, L. M. (2022). Impact of defatting and drying methods on the overall liking and sensory profile of a cereal bar incorporating edible insect species. *Future Foods*, *6*, 100190. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100190>

- Santos, D. S., Rezende, R. P., Santos, T. F. dos, Marques, E. de L. S., Ferreira, A. C. R., Silva, A. B. de C. e, Romano, C. C., Santos, D. W. da C., Dias, J. C. T., & Tavares Bisneto, J. D. (2020). Fermentation in fine cocoa type Scavina: Change in standard quality as the effect of use of starters yeast in fermentation. *Food Chemistry*, 328, 127110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127110>
- Schmidt, W. F., Kim, M. S., Nguyen, J. K., Qin, J., Chao, K., Broadhurst, C. L., & Shelton, D. R. (2015). Continuous gradient temperature Raman Spectroscopy identifies flexible sites in proline and alanine peptides. *Vibrational Spectroscopy*, 80, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2015.07.003>
- Sebben, J. A., da Silveira Espindola, J., Ranzan, L., Fernandes de Moura, N., Trierweiler, L. F., & Trierweiler, J. O. (2018). Development of a quantitative approach using Raman spectroscopy for carotenoids determination in processed sweet potato. *Food Chemistry*, 245, 1224-1231. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.086>
- Silva, J. G., Arruda, L. M., Pinheiro, G. S., Lima, C. L., Melo, F. E. A., Ayala, A. P., Filho, J. M., & Freire, P. T. C. (2015). The temperature-dependent single-crystal Raman spectroscopy of a model dipeptide: L-Alanyl-L-alanine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 148, 244-249. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.04.010>
- Tardzenyuy, M. E., Jianguo, Z., Akyene, T., & Mbuwel, M. P. (2020). Improving cocoa beans value chain using a local convection dryer: A case study of Fako division Cameroon. *Scientific African*, 8, e00343. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00343>
- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Rogez, H., Góes-Neto, A., Azevedo, V., Brenig, B., Aburjaile, F., & Soccol, C. R. (2021). Co-culturing fructophilic lactic acid bacteria and yeast enhanced sugar metabolism and aroma formation during cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109015>

Voigt, J., Textoris-Taube, K., & Wöstemeyer, J. (2018). PH-Dependency of the proteolytic formation of cocoa- and nutty-specific aroma precursors. *Food Chemistry*, 255, 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.045>

Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., & Wan, X. (2011). Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(3), 1187-1195. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.12.079>

ANEXOS

Anexo 1. Comportamiento del cacao durante la fermentación espontánea y controlada

Figura A1

precursores aromáticos de muestras procedentes de Copallin y fermentación cultivo dependiente

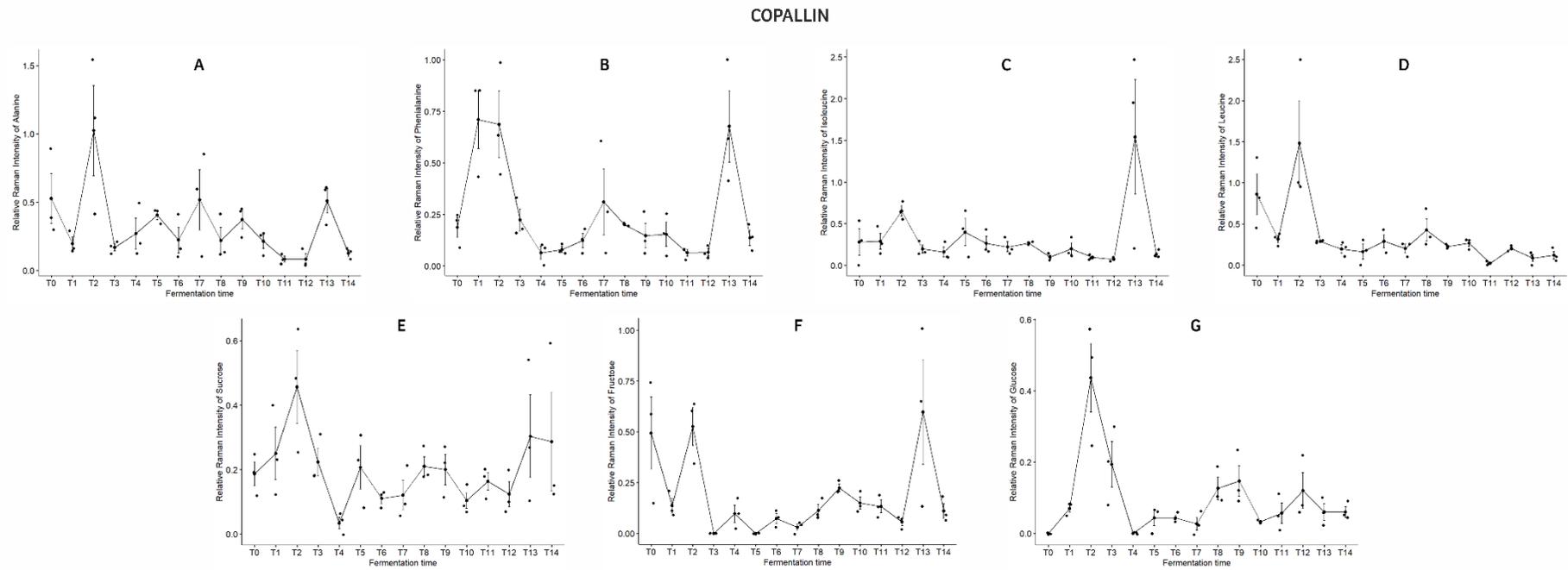


Figura A2

precursores aromáticos de muestras procedentes de Copallin y fermentación espontánea

COPALLIN

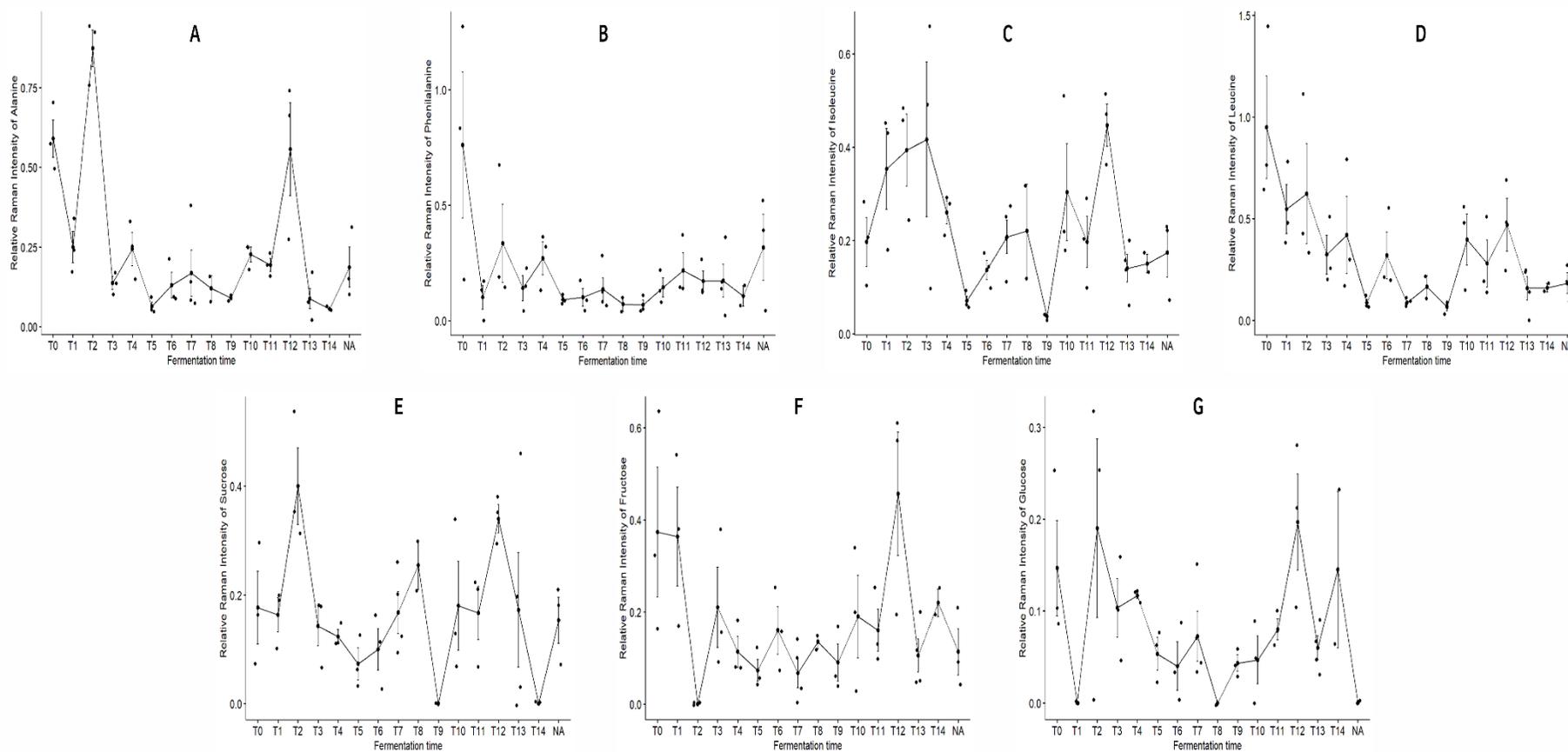


Figura A3

precursores aromáticos de muestras procedentes de Guadalupe y fermentación cultivo dependiente

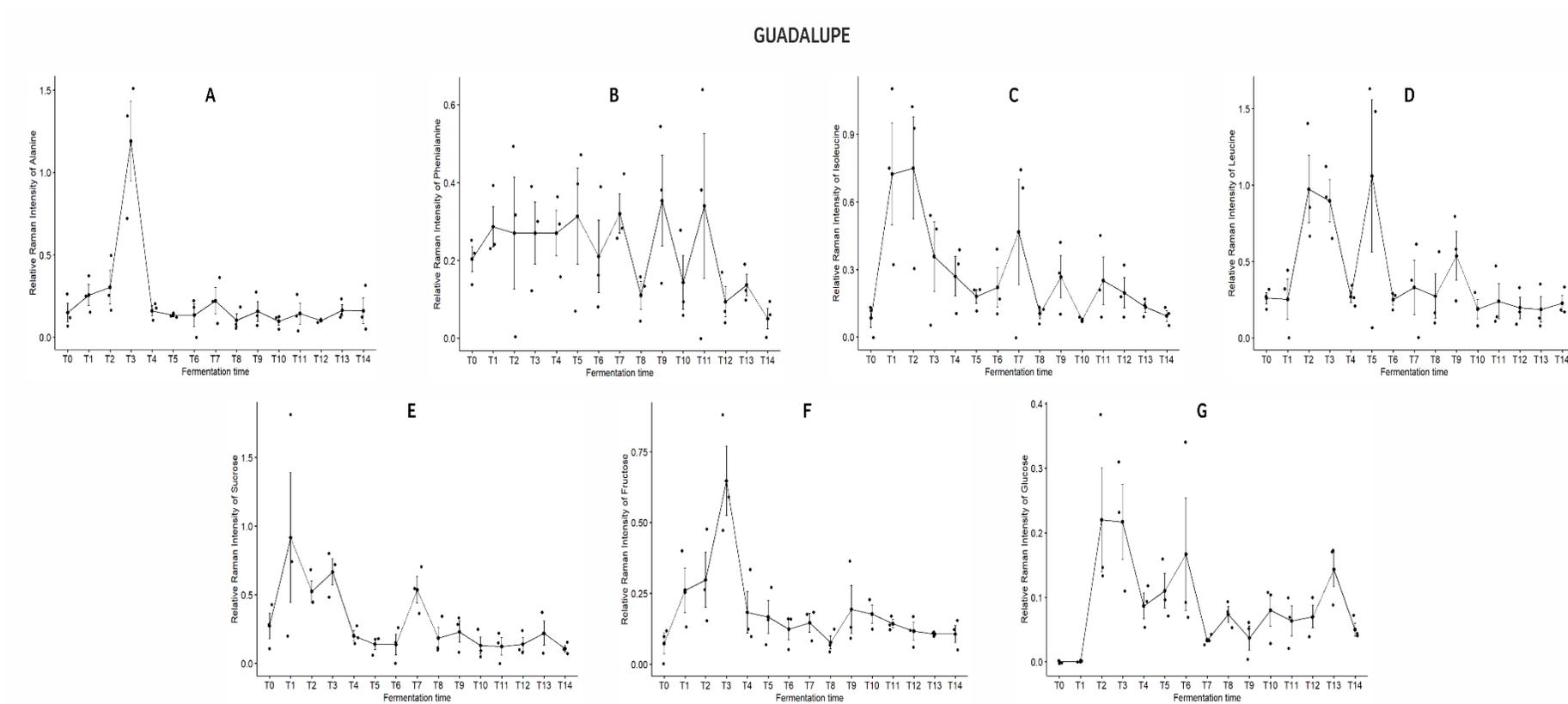


Figura A4

precursores aromáticos de muestras procedentes de Guadalupe y fermentación espontánea

GUADALUPE

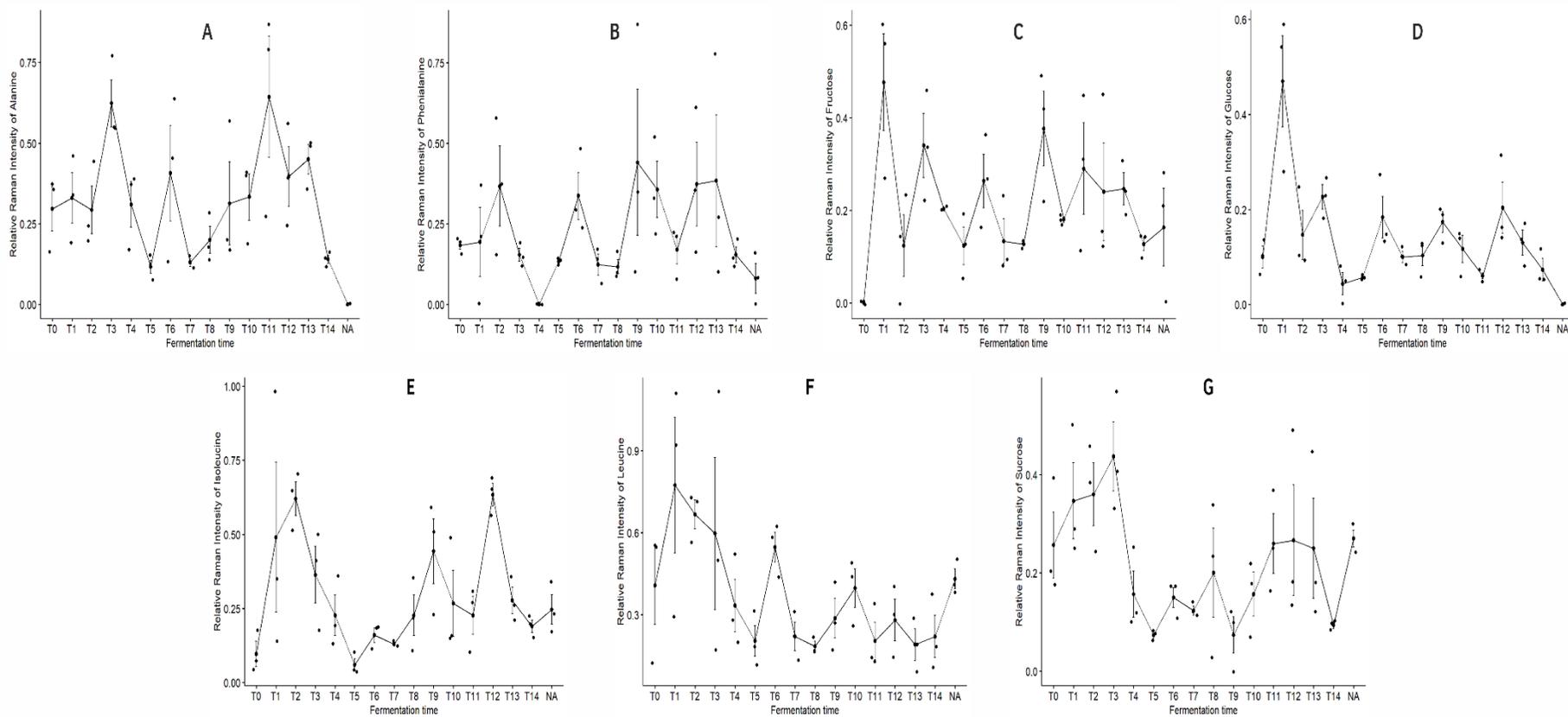


Figura A5

*Siembra del cultivo iniciador (*Saccharomyces cerevisiae*)*



Figura A6

Fermentación de los granos de cacao y almacenamiento de muestras



Figura A7

Liofilización de las muestras de cacao



Figura A8

Desgrasado y eliminación de polifenoles de las muestras



Figura A9

Análisis de las muestras por Espectroscopía Raman

