

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



**ESCUELA DE POSGRADO**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN GESTIÓN PARA EL DESARROLLO  
SUSTENTABLE**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE  
CACAO (*Theobroma cacao*) NATIVO FINO DE AROMA  
PARA LA SOSTENIBILIDAD DE SU PROCESAMIENTO  
EN LA PROVINCIA DE UTCUBAMBA, AMAZONAS**

**Autor: Bach. Diner Mori Mestanza**

**Asesor: Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón**

**Registro N°: 0070**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2021**

## **DEDICATORIA**

### **A mi esposa e hija:**

Cindy Yoplac Collantes y Lucy Sofía Mori Yoplac, por brindarme su amor y espíritu positivo en todo momento y por su apoyo incondicional.

### **A mis padres y hermanos:**

Alinda Mestanza Chavez y Avesil Mori Rodríguez, por brindarme su amor, sus consejos maravillosos y por preocuparse en todo momento para hacer realidad mis sueños.

### **A las Hermanas del Sagrado Corazón de Jesús:**

Por su apoyo incondicional, espíritu de sabiduría, formación profesional y ejemplo de la fe cristiana.

Diner Mori Mestanza

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por darme el privilegio más grande: la vida; que me permitió llegar a este gran paso profesional que es muy importante para mí; por ser Maestro de Maestros, por ser la luz de mi camino, por brindarme su amor y sabiduría, por su infinita bondad y fortaleza.

A mi familia, por su apoyo incondicional, y por haber estado siempre a mi lado y guiarme en cada paso que di, por darme el mejor regalo que son los estudios y por nunca dejar que renuncie a mis sueños.

A mi asesor, Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón, porque gracias a sus conocimientos, apoyo académico y experimental a lo largo de toda la investigación, he logrado culminarla.

Al INDES-CES a través del Proyecto CINCAO / F.N° 026-2016-FONDECYT: “Círculo de investigación para la innovación y el fortalecimiento de la cadena de valor del cacao nativo fino de aroma en la zona nor oriental del Perú”, por hacer posible la ejecución del presente trabajo de investigación a través del soporte científico, metodológico y la provisión de reactivos y materiales necesarios para su realización.

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

**Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI  
RECTOR**

**Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN  
VICERRECTOR ACADÉMICO**

**Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN  
VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

**Dr. RAÚL RABANAL OYARCE  
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO**

## VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



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

### ANEXO 6-K


#### VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X) / DOCTOR ( )

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X) / Profesional externo ( ), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Estandarización de la fermentación de cacao (Theobroma cacao) nativo fino de aroma puro (la sostenibilidad de su procesamiento en la provincia de Utcubamba, Amazonas); cuyo autor Dines Mori Mestanza es estudiante del \_\_\_\_\_ ciclo/egresado (X) de la Escuela de Posgrado, Maestría (X) / Doctorado ( ) en Gestión para el desarrollo sustentable, con correo electrónico institucional dines.mori@untram.edu.pe.

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, 7 de diciembre de 2020



  
Firma y nombre completo del Asesor

Dr. Miguel Angel Barrena Gurbillón

**JURADO EVALUADOR DE LA TESIS**



---

**Dr. CARLOS EDUARDO MILLONES CHANAMÉ**  
**PRESIDENTE**



---

**Mg. EFRAÍN MANUELITO CASTRO ALAYO**  
**SECRETARIO**



---

**Dr. ERICK ALDO AUQUÍNIVIN SILVA**  
**VOCAL**

# CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



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

## ANEXO 6-0

### CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (x) / DOCTOR ( )

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

Estandarización de la fermentación de cacao (Theobroma cacao) nativo fino de aroma para la sostenibilidad de su procesamiento en la pro. Utcubamba, Arequipa

presentada por el estudiante ( )/egresado (x) Diner Mori Mostauza

de la Escuela de Posgrado, Maestría (x) / Doctorado ( ) en Gestión para el Desarrollo Sostenible

con correo electrónico institucional diner.mori@untrm.edu.pe

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

- La citada Tesis tiene 22 % 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, 09 de diciembre del 2020



  
SECRETARIO

  
VOCAL

  
PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....  
.....

# ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



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

## ANEXO 6-Q

### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO ( ) / DOCTOR ( )

En la ciudad de Chachapoyas, el día 22 de diciembre del año 2020 siendo las 16:00 horas, el aspirante Díner Mori Mestanza, defiende en sesión pública presencial ( ) / a distancia ( X ) la Tesis titulada: Estandarización de la fermentación de Cacao (Theobroma cacao) nativo fino de arcuno para la sust. que tiene como asesor a Miguel Angel Barrena Borbillo para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor ( ) en Gestión para el desarrollo sustentable, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, conformado por:

Presidente: Dr. Carlos Eduardo Millones Chancayé

Secretario: Mg. Efraín Manuelito Castro Alayo

Vocal: Dr. Erick Aldo Aquilino Silver

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, 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 de Maestría ( ) / Doctorado ( ), en términos de:

Aprobado ( X )

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 16:30 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor ( ).

SECRETARIO

VOCAL

PRESIDENTE

#### OBSERVACIONES:

El maestrante sustentó el 22 de diciembre de 2020. Sin embargo, por hallarse observaciones por parte del jurado, estas fueron levantadas el 16 de febrero de 2021.



## ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL.

|                                                                                                   |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| AGRADECIMIENTO .....                                                                              | iii  |
| AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO<br>RODRÍGUEZDEMENDOZA DE AMAZONAS .....            | iv   |
| VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....                                                              | v    |
| JURADO EVALUADOR DE LA TESIS .....                                                                | vi   |
| CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....                                                       | vii  |
| ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....                                                             | viii |
| ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL.....                                                                   | ix   |
| ÍNDICE DE TABLAS.....                                                                             | xi   |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                                           | xii  |
| RESUMEN .....                                                                                     | xiv  |
| ABSTRACT.....                                                                                     | xvii |
| I.INTRODUCCIÓN.....                                                                               | 18   |
| II.MATERIAL Y MÉTODOS .....                                                                       | 26   |
| 2.1. Material de estudio.....                                                                     | 26   |
| 2.2. Diseño de la investigación .....                                                             | 26   |
| 2.2.1. Variables de estudio.....                                                                  | 26   |
| 2.3. Proceso de aislamiento y aplicación de microorganismos.....                                  | 28   |
| 2.4. Caracterización química de las almendras de cacao nativo fino de aroma .....                 | 29   |
| 2.4.1. Determinación del índice de fermentación .....                                             | 29   |
| 2.4.2. Determinación del contenido de fenoles totales .....                                       | 30   |
| 2.4.2.1. Pretratamiento de muestras de cacao.....                                                 | 30   |
| 2.4.2.2. Preparación del extracto de cacao .....                                                  | 30   |
| 2.4.2.3. Determinación y cuantificación de polifenoles totales.....                               | 31   |
| 2.4.3. Determinación de las concentraciones de theobromina y cafeína .....                        | 31   |
| 2.4.4. Determinación del pH de las muestras de cacao nativo fino de aroma .....                   | 31   |
| 2.5. Identificación de los compuestos volátiles del cacao nativo fino de aroma .....              | 32   |
| 2.5.1. Preparación de muestras para identificación de compuestos volátiles .....                  | 32   |
| 2.5.2. Acondicionamiento de la temperatura de la muestra para la extracción de<br>compuestos..... | 32   |
| 2.5.3. Identificación de los compuestos en el cromatógrafo de gases .....                         | 33   |
| 2.6. Análisis sensorial del cacao nativo fino de aroma después de la fermentación..               | 33   |

|                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7. Evaluación de la sostenibilidad de la fermentación del cacao nativo fino de aroma .....                      | 33        |
| 2.8. Análisis de datos .....                                                                                      | 36        |
| <b>III. RESULTADOS.....</b>                                                                                       | <b>38</b> |
| 3.1. Optimización de respuesta de las propiedades químicas del cacao nativo fino de aroma (CNFA) fermentado ..... | 38        |
| 3.2. Índice de fermentación (IF) del CNFA de la región Amazonas .....                                             | 38        |
| 3.3. Contenido de fenoles totales de las muestras de CNFA fermentado .....                                        | 39        |
| 3.4. Concentraciones de theobromina y cafeína .....                                                               | 40        |
| 3.5. Determinación del pH de las muestras de CNFA fermentado .....                                                | 42        |
| 3.6. Identificación de los compuestos volátiles del cacao nativo fino de aroma .....                              | 43        |
| 3.7. Análisis sensorial del cacao nativo fino de aroma después de la fermentación..                               | 48        |
| 3.8. Evaluación de la sostenibilidad de la fermentación del cacao nativo fino de aroma .....                      | 52        |
| <b>IV. DISCUSIÓN.....</b>                                                                                         | <b>57</b> |
| 4.1. Índice de fermentación del cacao nativo fino de aroma (CNFA) .....                                           | 57        |
| 4.2. Contenido de polifenoles totales del cacao nativo fino de aroma.....                                         | 57        |
| 4.3. Concentraciones de theobromina y cafeína en el CNFA de la Región Amazonas .....                              | 58        |
| 4.4. pH del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas .....                                                | 59        |
| 4.5. Identificación de los compuestos volátiles del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas .....        | 59        |
| 4.6. Evaluación sensorial del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas ..                                 | 60        |
| 4.7. Sostenibilidad del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas.....         | 60        |
| <b>V. CONCLUSIONES .....</b>                                                                                      | <b>62</b> |
| <b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>                                                                                  | <b>64</b> |
| <b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                      | <b>65</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                                                | <b>71</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS.

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Valores de las variables a evaluar con el diseño estadístico de Box- Behnken. ....                                                                        | 27 |
| Tabla 2. Diseño estadístico de Box-Behnken para optimizar tres variables independientes. ....                                                                      | 28 |
| Tabla 3. Matriz de dimensiones, principios, criterios e indicadores para evaluar la sostenibilidad de la fermentación de cacao en la región Amazonas. ....         | 34 |
| Tabla 4. Escala para determinar la sostenibilidad de un proceso. ....                                                                                              | 36 |
| Tabla 5. Valores de respuesta y optimizados para las propiedades químicas de las muestras de cacao nativo fino de aroma. ....                                      | 38 |
| Tabla 6. Factores establecidos como los óptimos. ....                                                                                                              | 38 |
| Tabla 7. Compuestos volátiles identificados en las muestras fermentadas del cacao nativo fino de aroma a través del cromatógrafo de gases (GC) marca Agilent. .... | 43 |
| Tabla 8. Índice de sostenibilidad ambiental del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas. ....                                 | 52 |
| Tabla 9. Índice de sostenibilidad económica del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas. ....                                 | 53 |
| Tabla 10. Índice de sostenibilidad social del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas. ....                                   | 54 |
| Tabla 11. Índice de sostenibilidad económica, social y ambiental del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas. ....            | 55 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Superficie respuesta del índice de fermentación del CNFA.....                                                                                                                                                                                                                                     | 39 |
| Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para el índice de fermentación del CNFA.<br>.....                                                                                                                                                                                                                | 39 |
| Figura 3. Superficie respuesta para el contenido de polifenoles totales (mg GAE/g cacao) del CNFA. ....                                                                                                                                                                                                     | 40 |
| Figura 4. Contornos de la superficie de respuesta estimada del contenido de theobromina de las muestras de CNFA fermentados. ....                                                                                                                                                                           | 41 |
| Figura 5. Efectos principales para la concentración de cafeína en las muestras de CNFA fermentados. ....                                                                                                                                                                                                    | 41 |
| Figura 6. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T14) fermentada con una concentración de inóculo $2,6 \times 10^3$ UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y fermentados en un tiempo de 7 días. .... | 42 |
| Figura 7. Superficie respuesta del pH de las muestras de cacao nativo fino de aroma. .                                                                                                                                                                                                                      | 43 |
| Figura 8. Cromatogramas de los compuestos volátiles de la muestra (T14) fermentada con una concentración de inóculo $2,6 \times 10^3$ UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y fermentados en un tiempo de 7 días. ....               | 47 |
| Figura 9. Análisis sensorial del atributo de calidad del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. ....                                                                                                                                                              | 48 |
| Figura 10. Análisis sensorial del atributo de aroma del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. ....                                                                                                                                                               | 49 |
| Figura 11. Análisis sensorial del atributo de acidez del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. ....                                                                                                                                                              | 49 |
| Figura 12. Análisis sensorial del atributo de amargor del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. ....                                                                                                                                                             | 50 |
| Figura 13. Análisis sensorial del atributo de astringencia del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. ....                                                                                                                                                        | 50 |
| Figura 14. Análisis sensorial de posibles defectos que presenta el cacao nativo fino de aroma después de la fermentación, aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. ....                                                                                                                        | 51 |

|                                                                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Figura 15. Análisis sensorial del atributo de sabor del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. ....                            | <b>51</b> |
| Figura 17. Representación radial de los indicadores de sostenibilidad ambiental del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas. ....   | <b>53</b> |
| Figura 18. Representación radial de los indicadores de sostenibilidad económica del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas. ....   | <b>54</b> |
| Figura 19. Representación radial de los indicadores de sostenibilidad social del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas. ....      | <b>55</b> |
| Figura 20. Representación radial de las dimensiones económica, social y ambiental del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas. .... | <b>56</b> |

## ÍNDICE DE ANEXOS.

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Anexos 1: Curva de calibración de ácido gálico para determinación de contenido de fenoles totales.....                                                                   | 71 |
| Anexo 2.1. Cuantificación del contenido de theobromina y cafeína de las muestras fermentadas de cacao nativo fino de aroma a través de cromatografía líquida (HPLC)..... | 80 |
| Anexo 2.2. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T1) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                           | 81 |
| Anexo 2.3. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T2) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                           | 82 |
| Anexo 2.4. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T3) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                           | 83 |
| Anexo 2.5. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T4) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                           | 84 |
| Anexo 2.6. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T5) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                           | 85 |
| Anexo 2.7. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T6) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                           | 86 |
| Anexo 2.8. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T7) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                           | 87 |
| Anexo 2.9. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T8) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                           | 88 |
| Anexo 2.10. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T9) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                          | 89 |
| Anexo 2.11. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T10) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                         | 90 |
| Anexo 2.12. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T11) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                         | 91 |
| Anexo 2.13. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeína de la muestra (T12) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).....                         | 93 |

|                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Anexo 2.14. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T13) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC)..... | 93  |
| Anexo 2.15. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T14) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC)..... | 94  |
| Anexo 2.16. Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T15) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC)..... | 95  |
| Anexo 3. Ficha estandarizada para la evaluación sensorial de muestras de cacao. ....                                                             | 96  |
| Anexo 4. Validación del instrumento de evaluación de la sostenibilidad del procesamiento de cacao. ....                                          | 97  |
| Anexo 5. Instrumento de evaluación de la sostenibilidad del proceso pos cosecha. ..                                                              | 99  |
| Anexo 6. Panel fotográfico. ....                                                                                                                 | 103 |

## RESUMEN

En la presente investigación se estandarizó el proceso de fermentación de cacao (*Theobroma cacao*) nativo fino de aroma (CNFA), para la sostenibilidad de su procesamiento en la Provincia de Utcubamba, Amazonas. Las unidades experimentales fueron fermentadores cúbicos de madera de 30 cm de lado para fermentar 20 kg de CNFA. Con el diseño estadístico de Box-Behnken se evaluó la influencia de tres variables (concentración de inóculo, tiempo de fermentación y secuencia de inoculación) en la fermentación de almendras de CNFA; el tratamiento T14 presentó los mejores resultados: polifenoles totales (método de Folin Ciocalteu) cuantificados con estándar de ácido gálico fueron 12,99 mg GAE/g cacao; índice de fermentación 1,05; 4,89 g theobromina/100 g cacao y 1,81 g cafeína/100 g cacao, identificadas por cromatografía líquida (HPLC) y cuantificadas con curvas de calibración con estándares puros de theobromina y cafeína (Sigma-Aldrich). Se identificaron 64 compuestos volátiles: aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos y pirazinas, principalmente. Se empleó micro extracción de compuestos volátiles en fase sólida con modo de espacio de cabeza (SPME-HS) y su identificación fue por el GC-MS. Un panel de nueve catadores certificados y acreditados por APPCACAO, Sineace y el Ministerio de Educación, evaluaron los atributos sensoriales básicos y especiales del cacao fermentado (sabor a cacao, floral, frutal, nuez, dulce, amargo, acidez y astringencia), obteniéndose una puntuación final de calidad máxima de 71,1 para la muestra T14 y mínima de 55,5 para la T8. La sostenibilidad de la actividad tiene factor económico (ISE=0,52), factor social (ISS= 0,56) y factor ambiental (ISA =0,66).

**Palabras claves:** fermentación, cacao (*Theobroma cacao*) nativo fino de aroma.



## ABSTRACT

In this research, the fermentation process of native fine aroma cacao (*Theobroma cacao*) (NFAC) was standardized for the sustainability of its processing in the Province of Utcubamba, Amazonas. The experimental units were 30 cm side wooden cubic fermenters to ferment 20 kg of NFAC. With the statistical design of Box-Behnken, the influence of three variables (inoculum concentration, fermentation time and inoculation sequence) on the fermentation of almonds from NFAC was evaluated; treatment T14 presented the best results: total polyphenols (Folin Ciocalteu method) quantified with gallic acid standard were 12.99 mg GAE/g cocoa; fermentation index 1.05; 4.89 g theobromine/100 g cocoa and 1.81 g caffeine/100 g cocoa, identified by liquid chromatography (HPLC) and quantified with calibration curves with pure theobromine and caffeine standards (Sigma-Aldrich). 64 volatile compounds were identified: aldehydes, ketones, alcohols, esters, acids and pyrazines, mainly. Micro-extraction of volatile compounds in solid phase with headspace mode (SPME-HS) was used and its identification was by GC-MS. A panel of nine tasters certified and accredited by APPCACAQ, Sineace and the Ministry of Education, evaluated the basic and special sensory attributes of fermented cocoa (cocoa flavor, floral, fruity, nutty, sweet, bitter, acidity and astringency), obtaining a final quality score maximum of 71.1 for sample T14 and minimum of 55.5 for T8. The sustainability of the activity has an economic factor (ISE = 0.52), a social factor (ISS = 0.56) and an environmental factor (ISA = 0.66).

Keywords: fermentation, native fine aroma cacao (*Theobroma cacao*).

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú ha sido calificado por la Organización Internacional del Cacao (ICCO) como el país productor y exportador de cacao nativo fino de aroma. Exportó el 36% de lo que se produce a nivel mundial. Siendo de mucha importancia económica para el país por los ingresos de la producción que sobrepasa los 130 millones de soles anuales. La región Amazonas tiene aproximadamente 13 483 ha dedicadas a la producción de cacao, de las cuales más del 75% son de cacao nativo fino de aroma, ubicándola en el quinto lugar como productor de cacao y San Martín como el primer productor de cacao (Instituto Nacional de Estadística e Informática INEI, 2017).

La Organización Internacional del Cacao (ICCO) realizó la clasificación diferencial de cacao fino de aroma, que cuenta con peculiares características de aromas y sabores especiales referentes a frutas, flores, nueces y malta; estos tipos de cacaos son de mucha importancia en el mundo llegando a representar el 8% de la producción. Encontrando una significativa producción en los países de Ecuador, Colombia, Venezuela y Perú que representa el 76% del cacao fino de aroma del mundo. En Amazonas el cacao ha logrado la denominación de origen, siendo destacado por su intenso sabor especial, aroma muy agradable, producto de un conjunto de factores edafoclimáticos: horas de radiación solar que reciben las plantaciones de cacao; suelos alcalinos de textura franco arcilloso con buena conductividad eléctrica y un nivel de salinización, siendo regados con aguas de pH alcalino; Además, la mayor parte de las plantaciones de cacao se producen asociados con especies frutales nativas de la zona y especies forestales, confiriendo importantes características bromatológicas y organolépticas, que se resalta en el cacao fino de aroma (El Peruano, 2015).

En la región Amazonas, el cultivo del cacao representa el soporte de la economía principalmente de todas las familias del ámbito rural, siendo uno de los cultivos de igual importancia que el café, por lo cual son incluidos en las unidades productivas diversificadas permitiendo a las familias poder desarrollarse y tener mejores ingresos. Según la Dirección Regional Agraria, la región Amazonas ha logrado significativos volúmenes de producción a nivel nacional representa el 4% con más de 4 529,20 tm de cacao en grano seco. Contando en la actualidad alrededor de 13 483 ha con cultivo de cacao, de las cuales el 20% es producido bajo riego y el 80% en seco, bajo estas

condiciones se tiene una productividad promedio entre 700 a 900 kg/ha, el cual es superior al promedio nacional. El cultivo del cacao lo realizan más de 5 500 agricultores aproximadamente. Encontrando una mayor producción en los distritos de Aramango, Copallín, La Peca e Imaza en la provincia de Bagua; y los distritos de Cumba, Cajaruro y Lonya Grande en la provincia de Utcubamba y también en la provincia de Condorcanqui, para aprovechar estos volúmenes de producción los productores cacaoteros están asociados con cooperativas para mejorar las técnicas, prácticas de cultivo y controles fitosanitarios, mejorar los procesos de pos cosecha fermentación y secado, para mejorar la economía familiar del ámbito rural (López, Cunias y Carrasco, 2020).

El procesamiento del cacao comprende las operaciones y procesos que se aplican a las almendras de cacao después de la cosecha, siempre cumpliendo con los principios básicos de conservación de la calidad e inocuidad de alimentos para garantizar el óptimo desarrollo de los precursores del sabor y aroma de las almendras. El procesamiento comprende las siguientes etapas: recolecta de las mazorcas, quiebra o partida de mazorca, desgrane, fermentación y secado (Steinau, 2017).

En la región Amazonas es importante generar tecnologías de procesamiento del cacao nativo fino de aroma, que permitan potenciar y conservar sus características bromatológicas y organolépticas que garantice un producto de calidad, a través de un proceso de fermentación estandarizada (Sandhya *et al.*, 2016). La fermentación de las almendras de cacao es la primera etapa en la cadena del chocolate (de Melo Pereira, Magalhães, de Almeida, da Silva Coelho, & Schwan, 2013), este proceso es muy importante y beneficioso porque la actividad microbiana en los granos del cacao elimina el mucílago e induce un conjunto de reacciones químicas en el cotiledón de las almendras del cacao modificando su composición he iniciando la formación de precursores aromáticos. En el proceso de fermentación de las almendras de cacao, tiene intervención una sucesión microbiana que prosperan por el cambio de temperatura en la masa, el pH, la disponibilidad de oxígeno y los compuestos generados (Kongor *et al.*, 2016).

Los productores cacaoteros en las distintas regiones del país tienen que superar dificultades de transporte y comunicación ya que se encuentran alejados de las principales ciudades, donde se cuenta con la tecnología y los medios adecuados para procesar adecuadamente las almendras del cacao nativo fino de aroma, por lo que es importante la intervención de empresas, asociaciones y cooperativas que cumplen un rol determinante

entre los productores y el mercado final (Morales *et al.*, 2015). En la región Amazonas, los productores aún no fermentan adecuadamente las almendras del cacao por desconocimiento de tecnologías apropiadas, falta de capacitación en temas de pos cosecha y también al costo de la implementación de los sistemas de procesamiento, por lo que la Cooperativa Central de Productores Agropecuarios de Amazonas (CEPROAA) constituye un actor clave que acopia las almendras de cacao y se encarga del proceso de fermentación espontánea y secado del cacao, para luego realizar su comercialización como materia prima para la elaboración de chocolates con sabor y aroma agradable de gran demanda por parte de los consumidores; estas características sensoriales del cacao se atribuyen a la variedad del grano de cacao nativo criollo y al tipo de fermentación.

En el proceso pos cosecha del cacao (*Theobroma cacao*), la fermentación y el secado son procesos de gran importancia, en la etapa de fermentación se dan los procesos de transferencia de masa y energía en las almendras de cacao originando un conjunto de reacciones químicas lo que permite disminuir el amargor y la astringencia de las almendras, asimismo dan origen a la formación de los precursores del aroma y sabores especiales a chocolate; el secado permite reducir la humedad hasta un rango de 7% y 7,5% permitiendo conservarlo adecuadamente para no alterar la composición y calidad de las almendras del cacao fino de aroma (Rivera *et al.*, 2012) y facilita el almacenamiento (Zambrano, Romero, Gómez, Ramos, & Lacruz, 2010), manejo y comercialización del cacao.

Según Rivera (2017), la fermentación de las almendras del cacao, es muy indispensable para el desarrollo adecuado de los precursores del aroma y el sabor en las almendras de cacao para obtener productos de calidad, siendo en esta etapa de la fermentación que se metaboliza la pulpa que envuelve las almendras del cacao por los microorganismos endógenos que se desarrollan por las condiciones adecuadas del medio, produciendo compuestos etanolitos y ácidos orgánicos como los acético y láctico, los cuales serán absorbidos por los cotiledones, promoviendo varios cambios fisicoquímicos y enzimáticos que tendrán notable influencia en el sabor final de los chocolates.

Wacher (2011), menciona que las levaduras, bacterias lácticas y acéticas son los responsables del proceso de fermentación del mucílago del cacao ricos en carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa) y que presentan un rango de pH entre 3,3 y 4,0; debido a la presencia de ácidos orgánicos como el cítrico y otros, medio apropiado para el desarrollo

y proliferación de los microorganismos que son esenciales para la transformación química de las almendras de cacao. En este sentido, la fermentación de las almendras del cacao representa una de las etapas de mayor importancia en la formación de los precursores del aroma y sabor, en el cual se dan dos procesos importantes; el primero es una fermentación microbiana donde se metaboliza todo el mucílago de las almendras de cacao; y el segundo es un conjunto de reacciones bioquímicas internas que modifican de la composición fenólica, la actividad antioxidante y los compuestos responsables del amargor del cacao, también dan origen a la formación de los precursores de aroma que se consumirán en el tostado y a la formación de una fracción volátil.

Rivera *et al.* (2012), determinaron que los aminoácidos y azúcares reductores presentes en las almendras del cacao después de la fermentación y al someterse a un tratamiento térmico del tostado liberan la reacción química de Maillard generando la formación de las pirazinas los cuales confieren notas especiales de sabor y aroma. En ese sentido, el contenido total de azúcares reductores es un indicador para evaluar el desarrollo del proceso de fermentación de las almendras de cacao. Además, con la fermentación, los azúcares reductores como la fructosa y la glucosa representan no más del 25% del contenido inicial de sacarosa; el contenido de fructosa (0,2-0,4%) fue superior a la glucosa (0,07-0,1%). Por otra parte, los contenidos de fructosa y glucosa son bajos pero equivalentes para almendras parcialmente fermentadas, mientras que el tostado del cacao bien fermentado produce un consumo prácticamente total de los azúcares reductores y de los aminoácidos (Zambrano *et al.*, 2010).

Por lo tanto, existen varios factores que influyen sobre la fermentación de las almendras del cacao, encontramos a la genética del cacao, tiempo transcurrido antes de la apertura y el desgrane de la mazorca, la tecnología y los medios empleados para fermentar, tiempo del proceso y frecuencia de remoción de la masa fermentante, el volumen del cacao a ser procesado, el índice de madurez (Nogales, Graziani De Fariñas, & Ortiz De Bertorelli, 2004).

Alas y Morales (2015), identificaron los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación de *Theobroma cacao*: encontrando como responsables a las levaduras endógenas, bacterias aerobias, lácticas, acéticas; además, determinaron el pH e índice de fermentación. Para los recuentos utilizaron los medios plate count, papa dextrosa, RAE, carbonato y MRS; presentando su mayor concentración las levaduras en los primeros 3

días de iniciado la fermentación; sin embargo, las bacterias acéticas y lácticas se mostraron mayores concentraciones a los 4 y 5 días de iniciado la fermentación, en el cual también se observó el incremento de la temperatura debido al proceso exotérmico generado por los microorganismos presentes en el medio, el pH disminuye en los días 4 y 5 de fermentación, debido al incremento de las bacterias acéticas y lácticas, que oxidan los alcoholes, generados durante la fermentación, produciendo ácido acético y láctico, respectivamente.

Según Kresnowati, Suryani, & Affifah (2013), las levaduras, las bacterias del ácido láctico y las bacterias del ácido acético son los microorganismos dominantes en la fermentación de las almendras de cacao. Las levaduras y las bacterias del ácido láctico dominan los primeros 2-3 días de fermentación, seguidas por las bacterias del ácido acético que dominan hasta los días 4-5. Posteriormente, pueden aparecer hongos y *Bacillus* que indican sobrefermentación.

Kresnowati *et al.* (2013), determinaron que se mejora el proceso de fermentación de las almendras de cacao con la adición de un cultivo iniciador, determinando que sólo las levaduras y las bacterias lácticas se observaron significativamente al inicio de la fermentación con éxito a una concentración de  $2,7 \times 10^5$  y  $1,4 \times 10^5$  UFC/g de cacao, logrando que la concentración de levaduras incremente y alcance el máximo a los 3-4 días de la fermentación. Se observó que ambas fermentaciones progresaban al mismo ritmo inicialmente, pero más tarde la fermentación con adición del cultivo iniciador LAB avanzó más rápidamente. Al quinto día, el índice de fermentación con el iniciador LAB fue de 0,95 mientras que con fermentación estándar fue de 0,86.

Según Ardhana & Fleet (2003), una cantidad de levadura de  $10^4$ - $10^5$  UFC/g de cacao es capaz de iniciar el proceso de fermentación de las almendras de cacao, la concentración de levadura endógena al principio de la fermentación de las almendras de cacao fue de  $1,3 \times 10^6$  células/g de cacao; la adición de levadura de arranque aumentó la concentración de levadura al inicio de la fermentación a  $2,3 \times 10^6$  células/g de cacao; la concentración de levadura determinada por recuento de células utilizando un hemocitómetro, al inicio de la fermentación del cacao parecía muy alto, más que suficiente para iniciar la fermentación del grano de cacao.

Cempaka *et al.* (2014), observó que la concentración de levadura disminuyó durante la fermentación natural de las almendras de cacao. La concentración de levaduras en la fermentación es el doble dentro de las primeras 24 horas, realizando el proceso de fermentación con un cultivo iniciador de levaduras; posteriormente, se observó un perfil decreciente y a las 96 horas la concentración de levadura fue aproximadamente  $2,9 \times 10^4$  células/g.

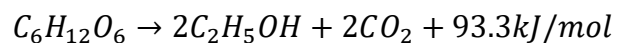
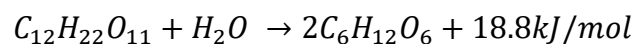
La disminución de la concentración de las levaduras depende de varios factores como temperatura, pH de la fermentación y la alta concentración de los compuestos generados; el aumento de la temperatura en el proceso de fermentación de 30°C a 50°C al final, estas variaciones generan condiciones limitantes para el crecimiento de la levadura, que fue de 30°C; la fermentación con levaduras puede producir diversos ácidos orgánicos, como acetato y citrato, que reducen el pH generando un medio no óptimo para el crecimiento de la levadura, que es 4,5; además, la fermentación con levadura normalmente produce etanol como producto metabólico, cuya concentración también puede detener el crecimiento de la levadura (Cempaka *et al.*, 2014).

El indicador de un óptimo proceso de fermentación es el índice de fermentación que debe ser igual o superior a 1,0. (Cempaka *et al.*, 2014) determinaron el índice de fermentación que aumentó significativamente de 0,84 a 1,13 por adición de la levadura inicial; también que el contenido de polifenoles disminuyó de 1,13 a 0,81 por la fermentación; el pH del grano es 6,2 para la fermentación natural y 5,19 para granos fermentados con levaduras; de la pulpa es de 3,59 y 4,76 respectivamente. En general, el aumento del índice de fermentación y la optimización del tiempo, son parámetros que determinan la calidad en la fermentación de las almendras de cacao.

En el proceso de fermentación por la actividad microbiana metabolizan el mucílago que cubre las almendras de cacao rico en carbohidratos, generando la muerte del embrión y desencadenando un conjunto de reacciones químicas, con lo que se evita la germinación del grano que deterioraría su calidad de las almendras de cacao; Durante este proceso de fermentación se generan las reacciones bioquímicos, microbiológicos y enzimáticas, que reducen el amargor y astringencia del cacao, así como también el desarrollo de las sustancias precursoras del aroma y sabor característico del chocolate. A medida que la aireación aumenta debido al drenaje de la pulpa de cacao, la temperatura en los fermentadores de cacao aumenta por encima de 37°C, logrando el crecimiento de

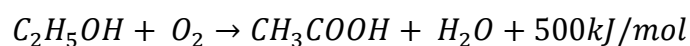
bacterias acéticas que oxidan el etanol hasta ácido acético y otros compuestos (Illegheems, Weckx, & De Vuyst, 2015). Por lo tanto, cuando y cuán rápido se convierte la masa de cacao, es importante para lograr la cantidad deseada de fermentación con ácido acético; la eliminación inadecuada promueve la fermentación del ácido láctico que afecta en última instancia la calidad del cacao comercial (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2008).

La fase anaerobia es la primera etapa de la fermentación, las levaduras actúan sobre los sustratos del mucílago del cacao, principalmente durante las primeras 24 horas generando como principal sustrato el etanol al fermentar los carbohidratos presentes en el mucílago de las almendras del cacao, las levaduras también contribuyen al rompimiento del ácido cítrico, presente en el mucílago, incrementando el pH de 3,5 a 4,2; asimismo, la actividad de las bacterias lácticas permiten metabolizar más rápido al mucílago del cacao generando ácidos orgánicos y ácidos volátiles, algunas cepas de levaduras producen pectinasas, permitiendo la reducción de la viscosidad del mucílago; (Nielsen et al., 2007) indican que las reacciones principales que ocurren durante esta etapa, incluyendo la generación de calor son:



La disminución de levaduras se debe, principalmente, a su intolerancia a las altas concentraciones de alcohol y al gradual incremento de temperatura por las reacciones endotérmicas, que ocurre por acción de bacterias acéticas que, debido a las condiciones de pH, generalmente al cuarto día de la fermentación, las levaduras ya no están presentes en las masas de almendras del cacao (Bravo, 2010).

La fase aerobia inicia con el proceso de remoción que se realiza a las masas de cacao y al descenso de la población de levaduras, el incremento del pH y la disminución de la viscosidad; se forma una masa fermentativa mucho más aireada en la que se crean las condiciones para el desarrollo de las bacterias acéticas, siendo su la función primordial la oxidación del alcohol hasta ácido acético, según la siguiente reacción (Nielsen *et al.*, 2007).





La difusión de estos compuestos (alcoholes, ácido láctico y ácido acético) hacia el cotiledón de las almendras del cacao, dan inicio al conjunto de reacciones bioquímicas, que modifican la composición química de las almendras y forman los precursores del aroma, generados por la actividad microbiológica siendo de gran importancia para la formación de azúcares reductores, pirazinas y aminoácidos libres, que son los precursores del sabor (Nielsen et al., 2007); (Antonio, 2018).

En este sentido, el Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), a través del Círculo de Investigación para la Innovación y el Fortalecimiento de la Cadena de Valor del Cacao Nativo Fino de Aroma en la Zona Nor Oriental del Perú- (CINCACAO), se desarrolló el presente trabajo de investigación, con el objetivo de estandarizar el proceso de fermentación de cacao (*Theobroma cacao*) nativo fino de aroma para la sostenibilidad de su procesamiento en la provincia de Utcubamba, Amazonas; Comparar los tiempos, inóculo y frecuencia de aplicación en la fermentación del cacao para determinar las características químicas de las almendras de cacao, analizar sensorialmente el cacao nativo fino de aroma después de la fermentación y evaluar la sostenibilidad de la fermentación del cacao nativo fino de aroma.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Material de estudio

Las muestras de cacao nativo fino de aroma de la colección INDES 19, fueron adquiridas en baba del sector la Cruz del distrito de Cajaruro, Utcubamba, Amazonas, Perú; de finca cultivadas bajo sistemas agroforestales, con especies frutales (naranja, guanábana, plátanos, mangos y ciruelas) y forestales (guabas, palo blanco, caoba) propios de la zona; las muestras almendras de cacao fueron fermentadas en cajas cúbicas de madera de laurel, de 30 cm de lado, donde se colocó 20 kg de cacao por cada tratamiento. El trabajo experimental se desarrolló en la Cooperativa Central de Productores Agropecuarios de Amazonas (CEPROAA), donde se realizó la fermentación y secado de las unidades experimentales.

### 2.2. Diseño de la investigación

En la presente investigación se empleó el diseño estadístico de Box-Behnken (Krishna, Venkateswarlu, & Rao, 2000), para determinar los mejores valores de las variables indicadas en la Tabla 1, siguiendo la distribución de la Tabla 2; donde cada columna representó una variable y cada fila un experimento. Los elementos +, 0, -, representan los niveles alto, medio y bajo, respectivamente, de cada variable. Las respuestas de interés es el índice de fermentación (IF), características químicas (polifenoles totales, theobromina, cafeína y pH), características sensoriales y compuestos volátiles producidos. El experimento tuvo quince tratamientos, donde cada unidad experimental se realizó en cajas de madera de laurel de 30cm de lado para fermentar el cacao.

#### 2.2.1. Variables de estudio

##### **Variables independientes**

- Concentración del inóculo (UFC/g de cacao).
- Secuencia de inoculación de levaduras y bacterias.
- Tiempo de fermentación.

##### **Variables dependientes**

- Características químicas: theobromina, cafeína, polifenoles totales y pH.
- Índice de fermentación del cacao.
- Características sensoriales del cacao fermentado.
- Compuestos volátiles.

### Variable de sostenibilidad

- Sostenibilidad de la fermentación del cacao nativo fino de aroma.

**Tabla 1.** Valores de las variables a evaluar con el diseño estadístico de Box-Behnken.

| Valor de la variable | X1: Concentración de inóculo (UFC/g cacao) | X2: Secuencia de inoculación (horas)                                       | X3: Tiempo de fermentación (días) |
|----------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Alto (+)             | $2,6 \times 10^3$                          | 3 (0 h todos los microorganismos)                                          | 7                                 |
| Medio (0)            | $1,8 \times 10^3$                          | 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas.<br>48 h bacterias acéticas.)        | 6                                 |
| Bajo (-)             | $10^3$                                     | 1 (0 h levaduras.<br>24 h bacterias lácticas.<br>48 h bacterias acéticas.) | 5                                 |

### Material biológico

Levaduras + bacterias lácticas (LAB) + bacterias acéticas (AAB).

Levaduras: *Saccharomyces spp.*

LAB: *Lactobacillus*

AAB: *Acetobacter*

**Tabla 2.** Diseño estadístico de Box-Behnken para optimizar tres variables independientes.

| Número<br>Experimento | Variables |    |    |
|-----------------------|-----------|----|----|
|                       | X1        | X2 | X3 |
| 1                     | 0         | -  | -  |
| 2                     | +         | -  | 0  |
| 3                     | 0         | 0  | 0  |
| 4                     | 0         | -  | +  |
| 5                     | -         | 0  | +  |
| 6                     | 0         | +  | +  |
| 7                     | -         | 0  | -  |
| 8                     | -         | -  | 0  |
| 9                     | 0         | 0  | 0  |
| 10                    | 0         | 0  | 0  |
| 11                    | +         | +  | 0  |
| 12                    | -         | +  | 0  |
| 13                    | 0         | +  | -  |
| 14                    | +         | 0  | +  |
| 15                    | +         | 0  | -  |

### 2.3. Proceso de aislamiento y aplicación de microorganismos

- **Aislamiento.** Se trabajó con muestras de cacao obtenidas de los cajones del proceso de fermentación en la CEPROAA; mosto de manzana y guarapo obtenido de El Molino, distrito de Chachapoyas. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.
- **Siembra.** El aislamiento se realizó utilizando el método de siembra en superficie por estrías a partir de un cultivo mixto obtenido de las diferentes muestras. Para las levaduras, LAB y AAB se trabajó con los medios de cultivo correspondiente Agar papa dextrosa (PDA), Agar MRS para Lactobacillos y Agar Acetobacter.

- **Identificación.** Las colonias aisladas fueron seleccionadas por sus diferencias morfológicas y se purificaron por repiques sucesivos antes de realizar las diferentes pruebas de identificación, que consistieron en caracterización macroscópica (color, tamaño, superficie, consistencia, etc.), microscópicas como coloración diferencial (coloración Gram, coloración de cápsula, coloración de esporas), que sirvieron para descartar algunas colonias.
- **Obtención de cultivos puros.** Aquellas colonias que se mostraban como levaduras tipo “*Saccharomyces*” libres de contaminantes, se trasladaron a tubos de ensayo con ASS, Agar extracto de levadura y Agar Sabouraud, utilizando la técnica de pico de flauta o inclinado, incubándolo a 37°C por 5 días. Luego de observar el desarrollo microbiano, se les rotuló con su código y se conservaron en refrigeración. De la misma manera se procedió para las LAB y AAB, trabajadas en los medios de cultivo correspondiente Agar MRS para Lactobacillos y Agar Acetobacter.
- **Obtención de biomasa de los cultivos puros.** Teniendo los cultivos puros, se procedió a la obtención de biomasa, logrando un franco desarrollo de las levaduras en frascos de 250 ml con medio de cultivo YPD líquido elaborado a partir de peptona de carne (20g/L), extracto de levadura (10g/L) y glucosa/dextrosa (20g/L) en agua ultra-pura (Ausubel *et al.*, 1987); el medio contenía cloranfenicol para la inhibición de crecimiento bacteriano; para las bacterias lácticas y acéticas se trabajó con los caldos MRS y acetobacter.
- **Aplicación de los tratamientos.** En las cajas de madera se colocaron las almendras de cacao en baba y se inocularon con los microorganismos de acuerdo con el diseño experimental. Se inoculó la masa de cacao con 15 mL de cultivo microbiano a cada unidad experimental dentro de los tratamientos mencionados con una dosis determinada mediante el método de McFarland; Durante la fermentación se realizó la remoción o volteo cada 24 h, hasta completar con el tiempo de fermentación de acuerdo con el diseño de investigación.

## 2.4. Caracterización química de las almendras de cacao nativo fino de aroma.

### 2.4.1. Determinación del índice de fermentación

El índice de fermentación se determinó por el método descrito por Gourieva y Tserevitinov (1979), se pesó una muestra de 0,5 g de cacao crudo en polvo tamizado y se colocó en un matraz, se añadió 50 mL de una mezcla 97:3 de

metanol 99,88%, J.T. Baker-USA:HCl. Luego del homogenizado, se dejó en reposo en el refrigerador (8 °C) durante 16-19 h, después se filtró al vacío con papel de filtro Whatman N°1. El filtrado se analizó en un espectrofotómetro S2100 UVTE-Único-USA, se midió la absorbancia del extracto a 460 y 530 nm. El índice de fermentación de la muestra se obtuvo calculando la relación de absorbancia a 460 y 530 nm.

$$IF = \frac{A_{460}}{A_{530}}$$

Donde:

IF = Índice de fermentación.

$A_{460}$  = absorbancia a 460nm

$A_{530}$  = absorbancia a 530nm

Según (Bariah, Wan, Wan, & Tajul., 2014), las almendras fermentadas tienen un valor  $IF \geq 1$ , las almendras sobrefermentadas tienen un valor de  $IF > 1,6$  y las almendras no fermentadas tienen un valor  $IF < 1$ .

## **2.4.2. Determinación del contenido de fenoles totales**

### **2.4.2.1. Pretratamiento de muestras de cacao**

Se pesó 1g de polvo de cacao y se colocó en un tubo de ensayo de 10 mL, al cual se le adicionó 5 mL de éter de petróleo J.T. Baker-USA y se agitó durante un minuto en el equipo Vortex (Mixer Cole Parmer; S01000A-CP, Japón). La mezcla se centrifugó a 3000 rpm (centrifuga MPW-215, Polonia) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El proceso se repitió cuatro veces y el polvo de cacao desgrasado se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente para eliminar el solvente Hu *et al.*, (2016).

### **2.4.2.2. Preparación del extracto de cacao**

El extracto se preparó siguiendo el método de Jonfía- Essien, West, Alderson y Tucker (2008). Se utilizó 0,5 g de polvo de cacao desgrasado que se mezcló con 24 mL de solución de metanol al 30% y 6 mL de agua ultra pura. Se homogenizó en un agitador magnético durante 30 minutos. Finalmente, el extracto se filtró al vacío (Vacubrand 1C, Alemania).

### **2.4.2.3. Determinación y cuantificación de polifenoles totales**

Se empleó el método de Folin Ciocalteu. Se preparó 9 viales con concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 ppm de solución de ácido gálico, a partir de una solución madre de 100 ppm, para crear una curva de calibración, utilizando ácido gálico como estándar (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999) modificado por (Pantelidis, Vasilakakis, Manganaris, & Diamantidis, 2007). Se mezclaron 0,05 mL de extracto de cacao nativo fino de aroma y 0,45 mL de agua con 2,5 mL de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu Merck diluido 1:10, seguido de 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5% (p/v); los reactivos añadidos se mezclaron completamente agitándose vigorosamente durante 10 segundos en Vortex (Mixer Cole Parmer; S01000A-CP, Japón). La mezcla fue colocada en estufa a 50°C por 5 minutos, luego se midió la absorbancia a 765 nm usando un espectrofotómetro (UV/Visible S2100 UVTE, ÚNICO). Cada extracto de muestra fue analizado por triplicado. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de cacao.

### **2.4.3. Determinación de las concentraciones de theobromina y cafeína**

Se analizó en el HPLC como lo descrito por Brunetto et al. (2007), empleando un cromatógrafo (Shimadzu®, LC-20AD), equipado con un auto inyector SIL-20A/HT, un módulo de comunicación CBM-20A y un detector con arreglo de fotodiodos (PDA) SPD-M20A, la detección ultravioleta se registró a una longitud de onda de 278 nm. La separación de theobromina y cafeína se llevó a cabo en una columna Supelco-LiChrospher RC C-18 de 5 µm (25 cm x 4,6 mm). Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol/agua (30/70% v/v) en modo isocrático a un flujo de 1,0 mL/min. La identificación de los picos se realizó comparando con estándares de theobromina y cafeína (98% Sigma-Aldrich, USA).

### **2.4.4. Determinación del pH de las muestras de cacao nativo fino de aroma**

Para la determinación del pH se empleó la metodología descrita por León-Roque, Abderrahim, Nuñez-Alejos, Arribas, & Condezo-Hoyos (2016). De

las muestras fermentadas del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas, se procedió a triturar 10 g del cotiledón del cacao y se colocó en un vaso de 250 mL, se le adicionó 90 mL de agua ultra pura y se dejó reposar por unos 30 minutos para ser filtrados en un papel filtro. Del extracto se midió el valor del pH con un pH-metro.

## **2.5. Identificación de los compuestos volátiles del cacao nativo fino de aroma**

Se identificaron los compuestos volátiles de las muestras de cacao nativo fino de aroma siguiendo la técnica de Headspace–microextracción en fase sólida (SPME-HS) (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012), empleando una fibra de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), 50/30  $\mu\text{m}$  de espesor. Las condiciones corresponden a 15 minutos de equilibrio a 50 °C, con una exposición de la fibra durante 30 minutos a la misma temperatura. Transcurrido el tiempo de extracción se retrajo la fibra y se insertó inmediatamente en el puerto de inyección del Cromatógrafo de gases – Espectrómetro de masas (GC-MS) donde se mantuvo durante 5 minutos a una temperatura 250°C en el inyector del cromatógrafo de gases. Entre cada extracción se realiza una corrida del blanco de fibra (limpieza térmica) por un tiempo de 55 minutos.

### **2.5.1. Preparación de muestras para identificación de compuestos volátiles**

Las almendras de cacao fueron sometidas a un proceso de descascarillado sin tostar, para ser trituradas homogéneamente hasta obtener unas partículas bien finas; terminado este proceso, se colocó 5,7 g de muestra triturada en viales de vidrio y se adicionó 6 mL de agua ultrapura, tapándolos y sellándolos herméticamente los viales con una tapa metálica y septa de silicón blanco de 20 mm de diámetro.

### **2.5.2. Acondicionamiento de la temperatura de la muestra para la extracción de compuestos**

Los viales con las muestras fueron colocados en el sistema manual para la microextracción en fase sólida (SPME) para acondicionar la temperatura de las muestras a 50°C por 15 minutos, posteriormente la septa se perforó con una aguja estéril, luego se inyectó la fibra en el vial por un tiempo de 30



minutos, logrando absorber todos los compuestos volátiles de la muestra para ser identificados en el GC-MS.

### **2.5.3. Identificación de los compuestos en el cromatógrafo de gases**

Para la separación e identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se utilizó una columna Innowax de 60 m de longitud, 0,25mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película. Se programó una rampa de temperatura del horno del GC de la siguiente forma: 40°C durante 5 minutos, seguida de incrementos de 10°C minuto/minuto hasta alcanzar 250°C manteniéndose así durante 55 minutos. Se utilizó helio de alta pureza como gas de arrastre con un flujo de 0,70 mL/minuto. El inyector se operó en modo splitless a 250°C. Para la identificación de los compuestos volátiles se compararon los espectros de masa con la librería electrónica NIST14.L que se encuentra instalada en el equipo.

## **2.6. Análisis sensorial del cacao nativo fino de aroma después de la fermentación**

Una muestra de 250 g de cacao fermentado y seco (7% humedad), fue tostada a 120 °C x 15 minutos, luego descascarillados y triturados en un conchador por 3 horas hasta obtener pasta de cacao, para amoldarlos en tabletas de 50 g cada una, empacadas con papel aluminio, selladas herméticamente en bolsas de polipropileno y conservadas en congelación para la evaluación sensorial.

El análisis sensorial del cacao nativo fino de aroma se realizó con 9 panelistas certificados y acreditados por APPCACAO, Sineace y el Ministerio de Educación; los cuales evaluaron los atributos sensoriales básicos y especiales (sabor a cacao, floral, frutal, nuez, dulce, amargo, acidez y astringencia) con la escala ordinal de 1 a 100, que se muestra en el Anexo (ficha para evaluación sensorial de cacao). Los datos obtenidos se sometieron a una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

## **2.7. Evaluación de la sostenibilidad de la fermentación del cacao nativo fino de aroma**

La sostenibilidad describe como los sistemas biológicos se mantienen diversos y productivos con el transcurso del tiempo. Se refiere al equilibrio de una especie con los recursos de su entorno (Sarandón, 2002).

Para evaluar el desarrollo sostenible se utilizaron encuestas estructuradas con los indicadores de sostenibilidad complementados con indicadores de mercado (Gallopín, 2003), se usaron los lineamientos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 2003), propuesta por Cantú, Becker, Bedano, & Schiavo (2007), que consiste en una matriz de doble entrada de indicadores Presión (P), Estado (E) y Respuesta (R), donde se calculó los índices de sostenibilidad social, económica y ambiental de la fermentación del cacao nativo fino de aroma.

**Tabla 3.** Matriz de dimensiones, principios, criterios e indicadores para evaluar la sostenibilidad de la fermentación de cacao en la región Amazonas.

| Objetivo                                                                                                                 | Dimensión            | Principio                                                                                | Criterios                                                                                                                                     | Indicadores de sostenibilidad                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Evaluación de la sostenibilidad del proceso de fermentación del Cacao nativo fino de aroma en la región Amazonas.</b> | <b>Económico (K)</b> | Desarrollo económico eficiente y equitativo de los procesadores de cacao                 | Garantía de la renta del proceso.<br>Garantía del volumen de procesamiento.<br>Minimización del impacto de riesgos.                           | A. Rentabilidad<br>B. Volumen de procesamiento<br>C. Rendimiento de calidad de almendra.<br>D. Actividades adicionales<br>E. Riesgo económico.            |
|                                                                                                                          | <b>Ambiental (A)</b> | Conservación de la estructura, funciones y diversidad en el manejo pos cosecha del cacao | Manejo adecuado de la fermentación.<br>Manejo eficiente de los subproductos.<br>Control del proceso de fermentación y co-productos generados. | A. fermentación natural<br>B. utilización de subproductos<br>C. fermentación controlada<br>D. Tratamiento de los residuos.<br>E. Fermentadores orgánicos. |

|                   |                                                                                          |                                                                |                                                        |                            |                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Social (S)</b> | Compromiso y responsabilidad para el desarrollo sostenible del proceso cosecha del cacao | Participación de la mujer en actividades de cosecha del cacao. | Edad, nivel de instrucción y especialización continua. | F. frecuencia de remoción. | A. Distancia entre su vivienda y cooperativa.<br>B. Número de personas dependientes<br>C. ingresos mensuales.<br>D. Integración de la mujer.<br>E. edad del trabajador.<br>F. Instrucción formal del trabajador.<br>G. Capacitación en fermentación. |
|                   |                                                                                          |                                                                |                                                        |                            |                                                                                                                                                                                                                                                      |

Terminado el trabajo de recolección de datos, fueron llevados a una escala numérica de 0 a 100 donde cero equivale a un escenario no adecuado y 100 a un escenario óptimo, expresados los resultados en porcentaje; luego, se sometió a un proceso de normalización, donde los valores se representan en escala de 0 a 1, según la metodología ELANEM (Euro-Latin American Network on Environmental Assessment and Monitoring) ó (Red Euro-Latinoamericana de Monitorización y Evaluación Ambiental) desarrollada por Cendrero *et al.* (2002).

La ecuación de normalización, donde el valor 1 es la situación optimista planteada por Cantú *et al.* (2009), está definida por máximo y mínimos:

$$V_n = \frac{V_{cal} - V_{min}}{V_{max} - V_{min}}$$

Donde:  $V_n$ : Valor normalizado,  $V_{max}$ : Valor máximo en la zona de estudio,  $V_{min}$ : Valor mínimo en la zona de estudio,  $V_{cal}$ : Valor calculado.

Para el caso donde la peor situación son valores mayores, se emplea la ecuación de normalización por máximos y mínimos inverso (Cantú *et al.*, 2009).

$$Vn = 1 - \frac{Vcal - Vmin}{Vmax - Vmin}$$

Finalmente, el índice de sostenibilidad de cada indicador de Presión, Estado y Respuesta es el promedio de los valores normalizados del indicador, del mismo modo el promedio de estos promedios es el índice de sostenibilidad de la dimensión económica, social y ambiental correspondiente. El promedio de los tres es el índice de sostenibilidad general; luego los índices obtenidos se compararon con la escala propuesta por Ramírez -Sulvarán *et al.* (2014).

**Tabla 4.** Escala para determinar la sostenibilidad de un proceso.

|           |           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 0,0 – 0,2 | 0,2 – 0,4 | 0,4 – 0,6 | 0,6 – 0,8 | 0,8 – 1,0 |
| Colapso   | Crítico   | Inestable | Estable   | Óptimo    |

Los datos de las entrevistas a los trabajadores de la CEPROAA, encargados del proceso poscosecha del cacao nativo fino de aroma, fueron plasmados en una plantilla de Excel. Con los resultados absolutos y normalizados, se realizó el cálculo de los índices de sostenibilidad de cada indicador y se construyó diagramas radiales para los índices de los indicadores por dimensión de sostenibilidad.

## 2.8. Análisis de datos

Se realizó el análisis con el Statgraphics versión XVII, para obtener la ecuación que modela la fermentación del cacao a partir de los resultados de las corridas experimentales con el diseño estadístico de Box-Behnken. Con esta ecuación se obtuvo la superficie respuesta para determinar los mejores valores de las variables para lograr la fermentación del cacao, expresada como características químicas, compuestos volátiles y atributos sensoriales.

Las características químicas fueron evaluadas bajo el diseño de Box-Behnken, donde se realizó la optimización de polifenoles totales, índice de fermentación, pH, contenido de theobromina y cafeína.

Los datos obtenidos en la evaluación sensorial se sometieron a una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar los mejores atributos de las muestras y obtener el mejor tratamiento.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Optimización de respuesta de las propiedades químicas del cacao nativo fino de aroma (CNFA) fermentado

En la tabla 5, se presenta los valores optimizados de las variables respuestas obteniendo el contenido de polifenoles totales 12,99 mg GAE/g cacao; índice de fermentación 1,05, pH equivalente a 5.32, contenido de theobromina 4,89 g/100 g cacao y cafeína 1,81 g /100 g cacao. En la tabla 6, presentamos los valores determinados como los óptimos para las variables de concentración del inóculo, secuencia de inoculación y tiempo de fermentación.

**Tabla 5.** Valores de respuesta y optimizados para las propiedades químicas de las muestras de cacao nativo fino de aroma.

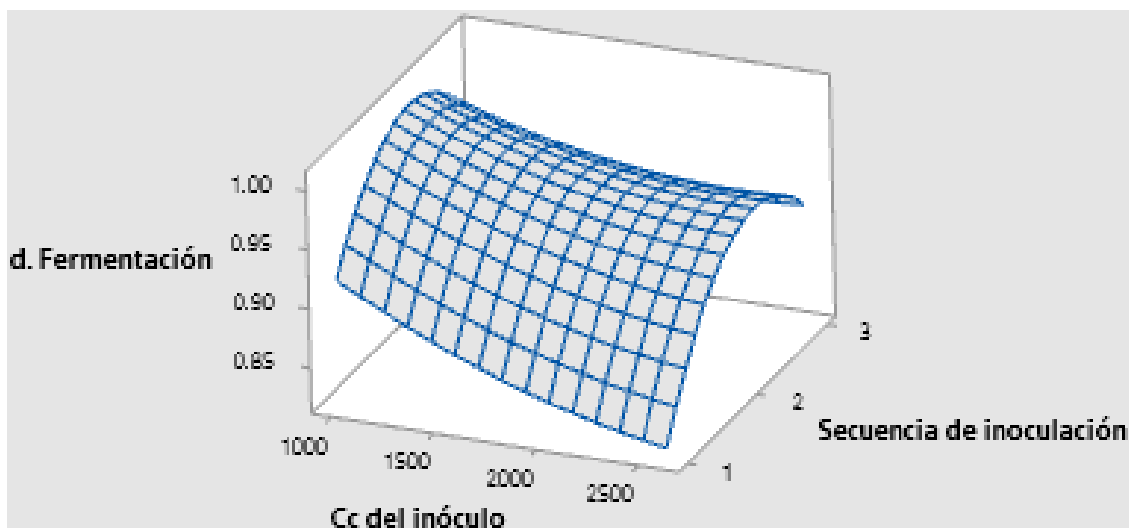
| Respuesta                                    | Optimizado | Predicción | Inferior 95,0% Límite | Superior 95,0% Límite |
|----------------------------------------------|------------|------------|-----------------------|-----------------------|
| Polifenoles totales (mg GAE/g)               | si         | 12.99      | 7.80                  | 18.19                 |
| Índice de fermentación                       | si         | 1.05       | 0.57                  | 1.52                  |
| pH                                           | si         | 5.32       | 4.97                  | 5.67                  |
| Concentración de Theobromina (g/100 g cacao) | si         | 4.89       | 4.44                  | 5.35                  |
| Concentración de Cafeína (g/100 g cacao)     | si         | 1.81       | 1.37                  | 2.25                  |

**Tabla 6.** Factores establecidos como los óptimos.

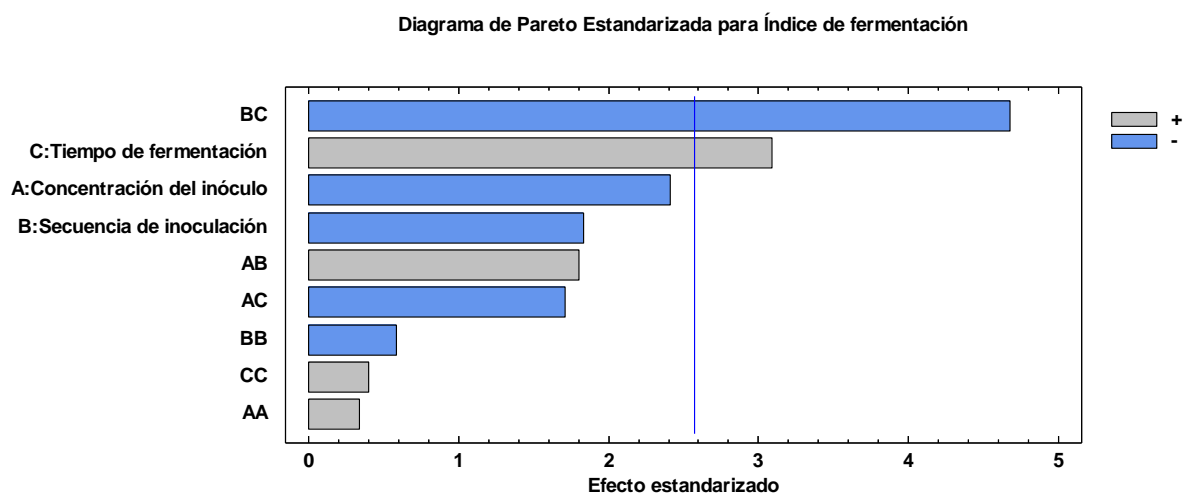
| <i>Factor</i>             | <i>Establecido</i> |
|---------------------------|--------------------|
| Concentración del inóculo | 2600.0             |
| Secuencia de inoculación  | 2.01               |
| Tiempo de fermentación    | 7.0                |

#### 3.2. Índice de fermentación (IF) del CNFA de la región Amazonas

En la Figura 1 y 2 se presenta el índice de fermentación para la muestra de cacao nativo fino de aroma, obteniendo un IF igual a 1,05 indicador que se ha logrado un proceso óptimo de fermentación y que presenta propiedades químicas que van a caracterizar y resaltar sus atributos sensoriales y físicos de un color marrón claro a oscuro, efectos generados por la actividad microbiana del inóculo utilizado  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y fermentados por 7 días.



**Figura 1.** Superficie respuesta del índice de fermentación del CNFA.

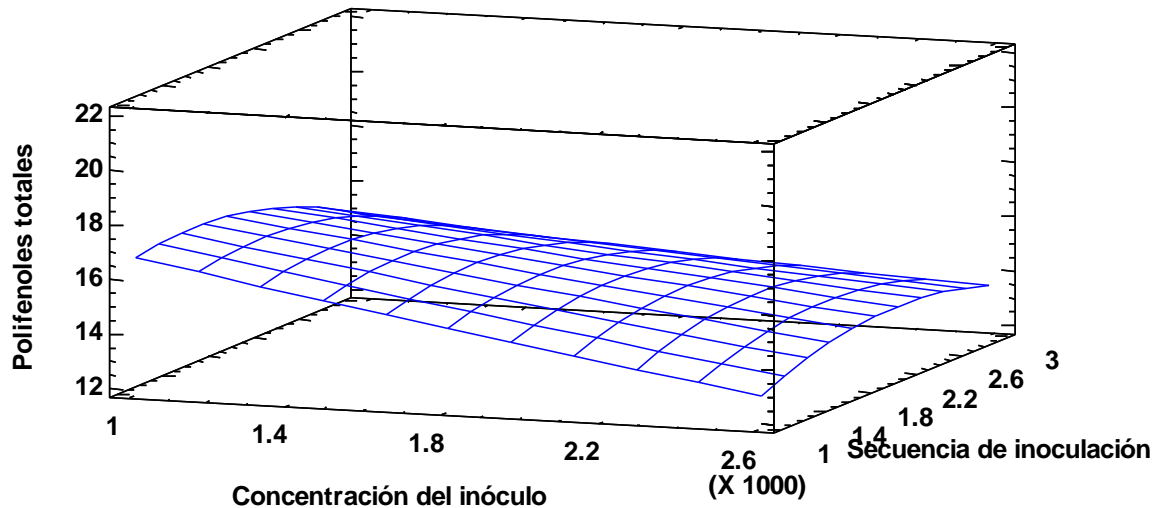


**Figura 2.** Diagrama de Pareto estandarizado para el índice de fermentación del CNFA.

### 3.3. Contenido de fenoles totales de las muestras de CNFA fermentado

En la figura 3 se presenta el contenido de los polifenoles totales de las muestras de cacao nativo fino de aroma, presentando un rango desde 12.17 mg GAE/g cacao hasta 20.08, propiedad que disminuye con el proceso de fermentación por la acción de los microorganismos que fueron aplicados en el proceso de fermentación de las almendras de cacao y el conjunto de reacciones químicas generadas por la transferencia de masa de los compuestos generados como alcoholes, ácidos orgánicos y a través del proceso de lixiviación de los compuestos principalmente fenólicos; encontrando un valor optimizado de 12,99 mg GAE/g cacao, que propicia a las almendras de cacao una menor astringencia, muestra fermentada con una

concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y fermentados en un tiempo de 7 días.

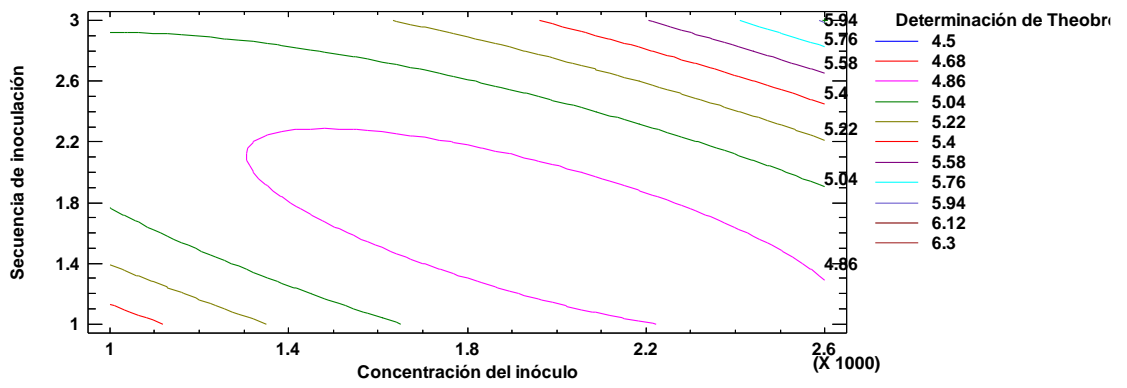


**Figura 3.** Superficie respuesta para el contenido de polifenoles totales (mg GAE/g cacao) del CNFA.

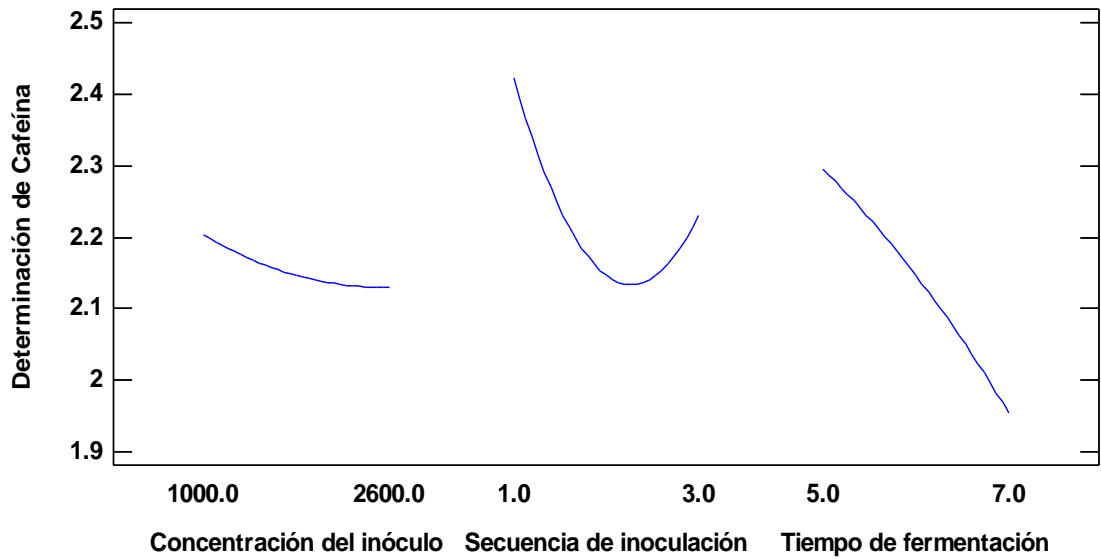
### 3.4. Concentraciones de theobromina y cafeína

En la Figura 4 se presenta los contornos de la superficie respuesta de la concentración de theobromina presente en las muestras de CNFA fermentados, los cuales fueron optimizados encontrando el valor de 4,89 g/100 g cacao. En la Figura 5 se observa los efectos principales para la concentración de cafeína encontrando una concentración óptima de 1,81 g/100 g cacao y en la Figura 6 se muestra el cromatograma de las moléculas de theobromina y cafeína, siendo estos dos compuestos los responsables de la intensidad de amargor de la muestra (T14) fermentada con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y fermentados en un tiempo de 7 días.

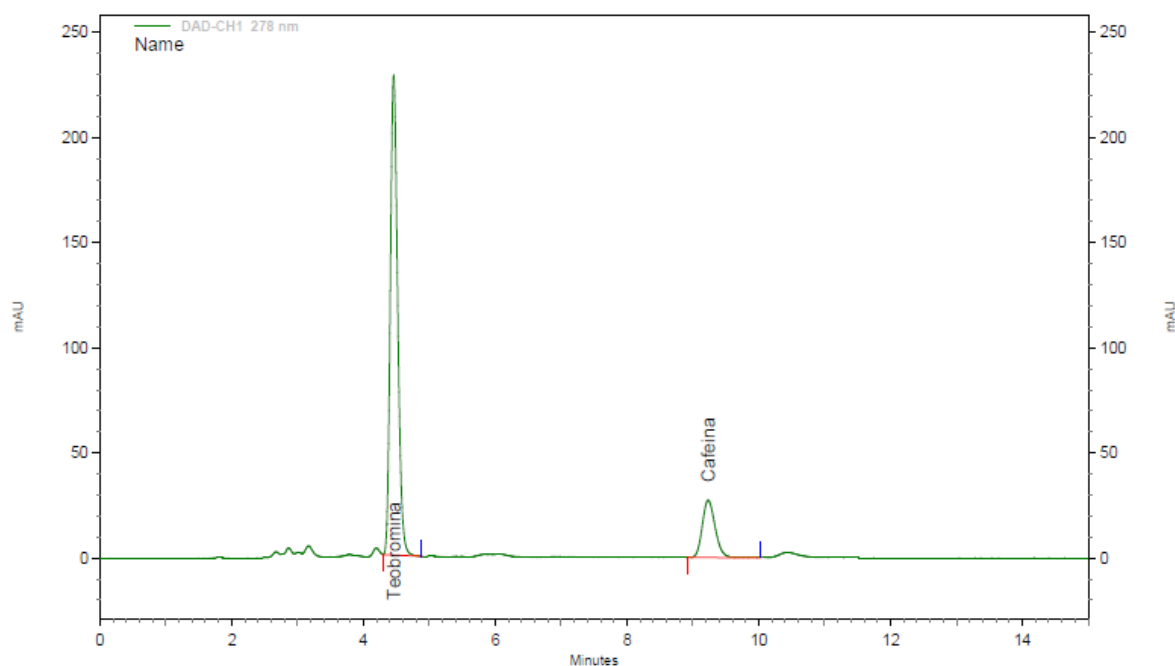




**Figura 4.** Contornos de la superficie de respuesta estimada del contenido de theobromina de las muestras de CNFA fermentados.



**Figura 5.** Efectos principales para la concentración de cafeína en las muestras de CNFA fermentados.



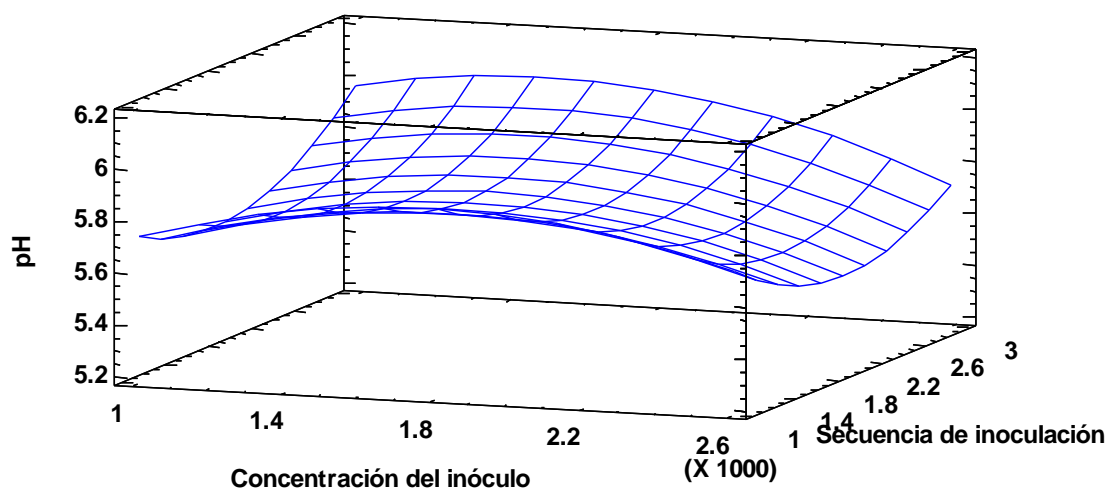
**DAD-CH1 278 nm**

| <b>Results</b> |             |                       |             |                                |  |
|----------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|--|
| <i>Pk #</i>    | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |  |
| 1              | Teobromina  | 4.460                 | 7092027     | <b>4.98</b>                    |  |
| 2              | Cafeina     | 9.233                 | 1475918     | <b>1.78</b>                    |  |
| <b>Totals</b>  |             |                       | 8567945     | <b>6.76</b>                    |  |

**Figura 6.** Cromatogramas de las moléculas de teobromina y cafeína de la muestra (T14) fermentada con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y fermentados en un tiempo de 7 días.

### 3.5. Determinación del pH de las muestras de CNFA fermentado

En la Figura 7 se muestra la superficie respuesta para el pH determinado en las muestras del cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas, después del proceso de fermentación, obteniendo un valor óptimo de 5,32 indicando una fermentación adecuada libre de compuestos o ácidos indeseados en las almendras de cacao para la muestra T14 con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y fermentados en un tiempo de 7 días.



**Figura 7.** Superficie respuesta del pH de las muestras de cacao nativo fino de aroma.

### 3.6. Identificación de los compuestos volátiles del cacao nativo fino de aroma

Se identificó 64 compuestos volátiles pertenecientes a las familias de aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos y pirazinas principalmente, los cuales confieren las propiedades de aromas y sabores especiales a las muestras de cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas, con todos estos compuestos identificados que caracterizan y diferencian a la muestra, lo cual va permitir posicionarlo en nuevos mercados internacionales e incrementar su valor económico del cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas.

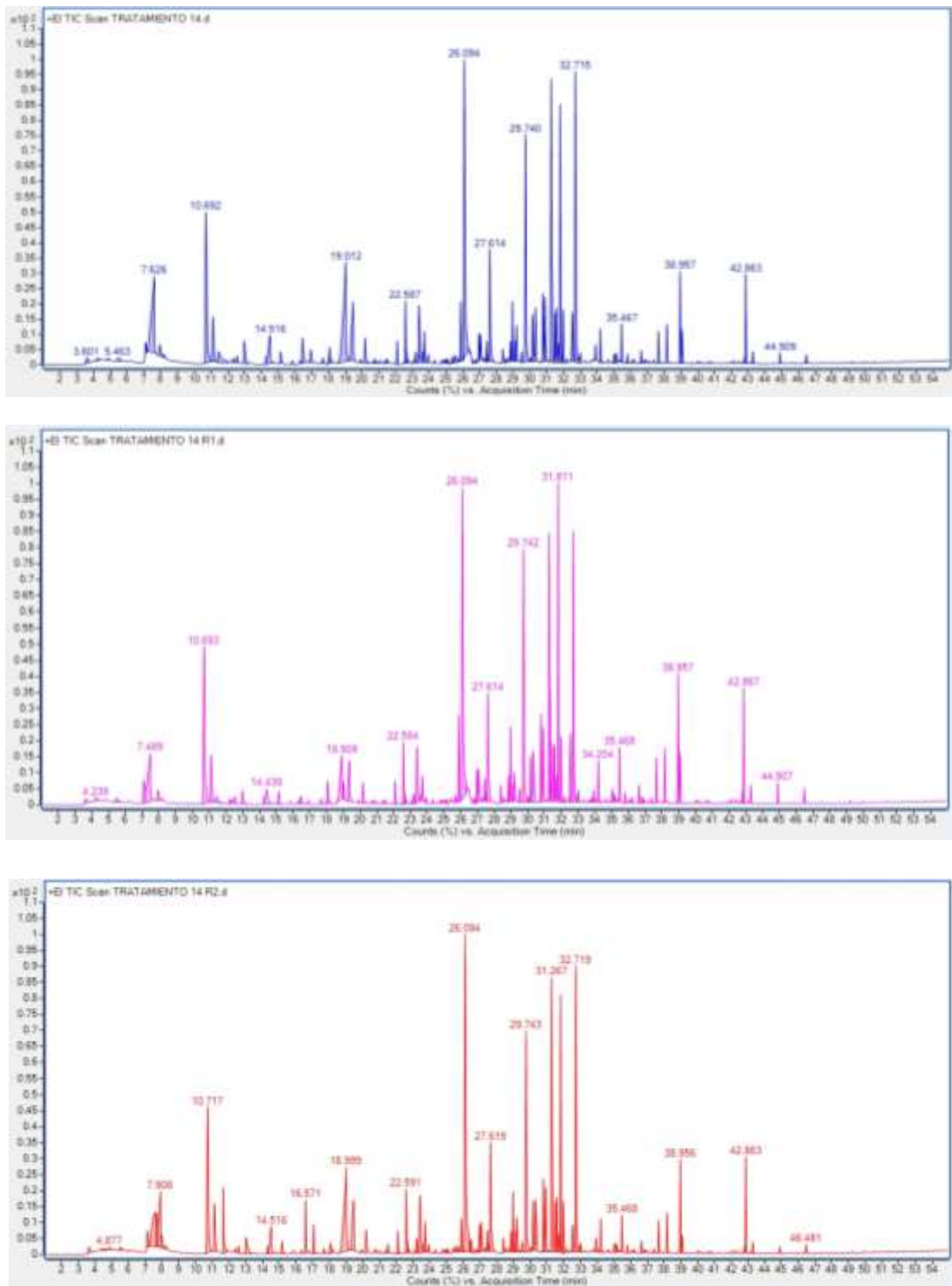
**Tabla 7.** Compuestos volátiles identificados en las muestras fermentadas del cacao nativo fino de aroma a través del cromatógrafo de gases (GC) marca Agilent.

| Nombre compuesto | Grupos compuestos   | Fórmula Química                               | Tiempo de Retención | Score Lib | Library  | Descripción del aroma del compuesto |
|------------------|---------------------|-----------------------------------------------|---------------------|-----------|----------|-------------------------------------|
| Dimetil éter     | Éter                | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O               | 4.855               | 83.24     | NIST14.L | Futas                               |
| Acetona          | Aldehídos y cetonas | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O               | 5.475               | 81.56     | NIST14.L | Frutas                              |
| 2-Metilpropanal  |                     | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O               | 7.096               | 91.31     | NIST14.L | Dulce                               |
| Ácido acético    | Ácido               | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | 7.625               | 97.77     | NIST14.L | Agrio, vinagre                      |
| 2,3-Butanodiona  | Cetonas             | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>  | 7.943               | 85.4      | NIST14.L | Mantecoso                           |
| 2-Butanona       |                     | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O               | 8.194               | 91.66     | NIST14.L | Dulce                               |
| Butanimidamida   |                     | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> | 10.688              | 81.09     | NIST14.L |                                     |
| 2-Metilbutanal   | Aldehídos y cetonas | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O              | 11.108              | 91.61     | NIST14.L | Malta, chocolate                    |

|                                 |                     |                                                               |        |       |          |                                           |
|---------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------|--------|-------|----------|-------------------------------------------|
| 2,3-Pentanediona                | Cetonas             | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                  | 12.345 | 84.85 | NIST14.L | Almendras tostadas, cacao, yogurt, nueces |
| Pentanal                        | Aldehídos y cetonas | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O                              | 12.541 | 88.36 | NIST14.L | Frutas                                    |
| Acetoina                        | Aldehídos y cetonas | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                  | 12.982 | 93.48 | NIST14.L | Mantequilla                               |
| 3-(1-metiletil)oxoetano         |                     | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O                              | 14.283 | 83.52 | NIST14.L |                                           |
| Ácido 2-metilpropanoico         | Ácido               | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                  | 14.515 | 91.21 | NIST14.L |                                           |
| 2,3-Butanediol                  | Alcohol             | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>                 | 16.446 | 93.13 | NIST14.L |                                           |
| Ciclobutanol, 2-etil            |                     | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O                              | 17.664 | 80.91 | NIST14.L |                                           |
| Hexametil Ciclotrisiloxano      |                     | C <sub>6</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> S <sub>i3</sub> | 18.061 | 80.56 | NIST14.L |                                           |
| 3-Furaldehído                   | Aldehídos y cetonas | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                  | 19.34  | 83.79 | NIST14.L | Almendras tostadas                        |
| Ácido butanoico, 2-metil        | Ácido               | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>                 | 19.477 | 82.8  | NIST14.L |                                           |
| 3-Furanmetanol                  | Alcohol             | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>                  | 20.166 | 92.81 | NIST14.L | Menta                                     |
| 2-Heptanona                     | Aldehídos y cetonas | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O                              | 22.094 | 87.59 | NIST14.L | Fruta, plátano                            |
| Estireno                        |                     | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>                                 | 22.656 | 94.96 | NIST14.L | Dulce, canela, granos de café             |
| 1-(2-Furanil)etanona            |                     | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>                  | 23.214 | 91.59 | NIST14.L |                                           |
| 2,5-Dimetilpirazina             | Pirazinas           | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>                  | 23.401 | 84.5  | NIST14.L | Caramelo, cacao                           |
| 2,3-Dimetilpirazina             |                     | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>                  | 23.708 | 91.78 | NIST14.L | Cacao tostado                             |
| Ácido 4-metilpentanoico         |                     | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>                 | 23.95  | 85.47 | NIST14.L | Frutado, piña                             |
| ,2-Furancarboxaldehído, 5-metil |                     | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>                  | 25.692 | 83.18 | NIST14.L |                                           |
| Octametil ciclotetrasiloxano    |                     | C <sub>8</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> S <sub>i4</sub> | 25.884 | 88.12 | NIST14.L |                                           |
| Benzaldehído                    | Aldehídos y cetonas | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O                               | 26.094 | 98.22 | NIST14.L | Almendras agradables                      |
| Beta-Mirceno                    |                     | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                               | 26.965 | 92.84 | NIST14.L | Cítricos                                  |
| Benzonitrilo                    | Nitrilos            | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> N                               | 27.061 | 88.09 | NIST14.L | Almendras                                 |
| 2-Etil-6-metilpirazina,         | Pirazinas           | C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>                 | 27.435 | 93.22 | NIST14.L | caramelo, dulce                           |
| Trimetilpirazina                |                     | C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>                 | 27.617 | 92.06 | NIST14.L | Cacao tostado                             |
| 2-Etenil-6-metilpirazina        |                     | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>                  | 28.385 | 91.79 | NIST14.L | Caramelo dulce                            |

|                                                                                  |                        |          |        |       |          |                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----------|--------|-------|----------|----------------------------------------------|
| Acetato 2-heptanol                                                               |                        | C9H18O2  | 28.845 | 89.52 | NIST14.L |                                              |
| 3,6,6-trimetilbicyclo<br>(3.1.1)hept-2-ene                                       |                        | C10H16   | 28.975 | 93.53 | NIST14.L |                                              |
| Alcohol bencílico                                                                | Alcohol                | C7H8O    | 29.129 | 89.17 | NIST14.L | Dulce,<br>florido                            |
| 1-Metil-5-(1-<br>metiletenil)<br>ciclohexeno                                     |                        | C10H16   | 29.199 | 89.71 | NIST14.L | Aceites<br>esenciales,<br>cítricos           |
| 1,3,3-Trimetil,<br>tricyclo[2.2.1.0(2,6)<br>]heptano                             |                        | C10H16   | 29.509 | 90.72 | NIST14.L | Aceites<br>esenciales,<br>cítricos           |
| Benzeneacetaldehíd<br>o                                                          | Aldehídos<br>y cetonas | C8H8O    | 29.738 | 94.42 | NIST14.L | Almendra,<br>cereza, fresa                   |
| 1-(1h-pirrol-2-yl)<br>etanona,                                                   |                        | C6H7NO   | 30.161 | 95.74 | NIST14.L |                                              |
| 3-Metil 2-<br>ciclohexen-1-one                                                   |                        | C7H10O   | 30.325 | 90    | NIST14.L |                                              |
| Acetofenona                                                                      | Aldehídos<br>y cetonas | C8H8O    | 30.783 | 93.8  | NIST14.L | Dulce                                        |
| 3-Etil-2,5-<br>dimetilpirazina                                                   | Pirazinas              | C8H12N2  | 30.913 | 91.54 | NIST14.L | Cacao<br>tostado                             |
| Tetrametilpirazina                                                               |                        | C8H12N2  | 31.267 | 95.52 | NIST14.L | Tostado,<br>chocolate                        |
| 2-Metoxifenol                                                                    |                        | C7H8O2   | 31.507 | 92.46 | NIST14.L | Dulce                                        |
| Etil 2-(5-metil-5-<br>vinil<br>tetrahydrofuran-2-<br>yl)propan-2-yl<br>carbonato |                        | C13H22O4 | 31.575 | 87.83 | NIST14.L |                                              |
| 2-Nonanol                                                                        | Alcohol                | C9H20O   | 31.715 | 86.65 | NIST14.L | Frutas, rosas                                |
| Linalool                                                                         |                        | C10H18O  | 31.81  | 95.07 | NIST14.L | Floral,<br>mentolado,<br>canela,<br>cítricos |
| Nonanal                                                                          | Aldehído               | C9H18O   | 31.984 | 94.29 | NIST14.L | Rosa,<br>naranja,<br>cítricos                |
| Alcohol feniletíl                                                                | Alcohol                | C8H10O   | 32.718 | 94.18 | NIST14.L | Floral                                       |
| 2,3-Dimetil 2,4,6-<br>Octatrieno                                                 |                        | C10H16   | 33.007 | 92.21 | NIST14.L | Cítricos,<br>aceites<br>esenciales           |
| 4h-Piran-4-one,<br>2,3-dihídoro-3,5-<br>dihidroxi-6-metil                        |                        | C6H8O4   | 33.918 | 92.61 | NIST14.L |                                              |
| 2,3,5- Trimetil-6-<br>etilpirazina                                               | Pirazinas              | C9H14N2  | 34.204 | 92.84 | NIST14.L | Caramelo<br>dulce                            |
| Benzoato de etilo                                                                | Ester                  | C9H10O2  | 35.026 | 92.9  | NIST14.L | Dulce, frutal,<br>cereza, uva.               |

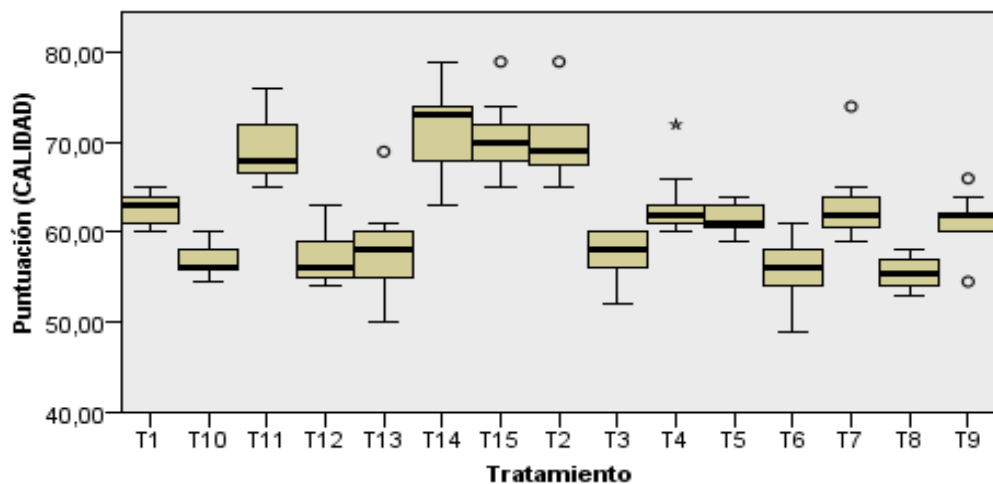
|                                                        |         |          |        |       |          |                         |
|--------------------------------------------------------|---------|----------|--------|-------|----------|-------------------------|
| (3R,6S)-2,2,6-Trimetil-6-viniltetrahidro-2H-piran-3-ol | Alcohol | C10H18O2 | 35.155 | 93.1  | NIST14.L |                         |
| Ácido Octanoico, éster etílico                         | Ester   | C10H20O2 | 35.468 | 93.16 | NIST14.L | Aroma naranja, cítricos |
| Dodecano                                               |         | C12H26   | 35.81  | 91.11 | NIST14.L |                         |
| Ácido Bencenoacético, éster etílico                    |         | C10H12O2 | 37.666 | 88.42 | NIST14.L |                         |
| Ácido acético, éster 2-feniletílico                    |         | C10H12O2 | 38.167 | 93.07 | NIST14.L |                         |
| Bencenoacetaldehído, alfa.- etilideno                  |         | C10H10O  | 38.957 | 96.78 | NIST14.L |                         |
| Ciclotetradecano                                       |         | C14H28   | 42.865 | 96.72 | NIST14.L |                         |
| 1-Butanol, 3-metil-, benzoato                          |         | C12H16O2 | 43.289 | 84.63 | NIST14.L |                         |
| 5-Metil-2-fenil-2-hexenal                              |         | C13H16O  | 46.478 | 83.27 | NIST14.L |                         |
| 1H-2-Benzopiran-1-ona, 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metilo  |         | C10H10O3 | 48.988 | 85.9  | NIST14.L |                         |



**Figura 8.** Cromatogramas de los compuestos volátiles de la muestra (T14) fermentada con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y fermentados en un tiempo de 7 días.

### 3.7. Análisis sensorial del cacao nativo fino de aroma después de la fermentación

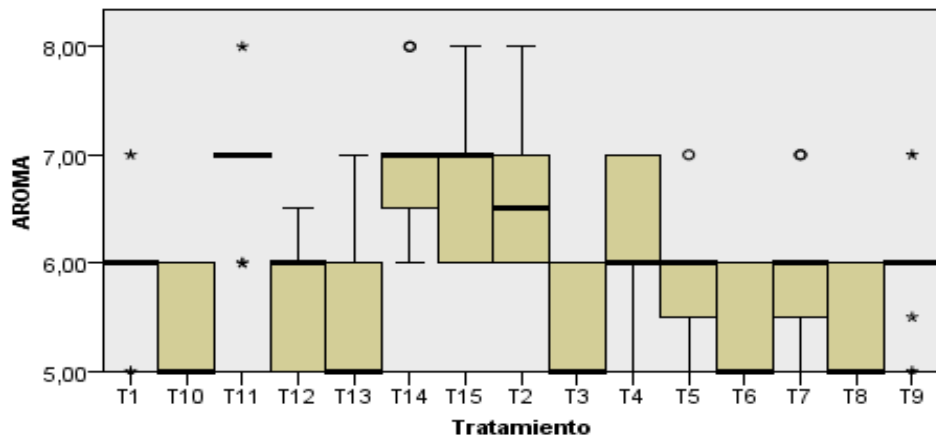
El panel conformado por 9 catadores certificados y acreditados, evaluó los atributos sensoriales básicos y especiales (sabor a cacao, floral, frutal, nuez, dulce, amargo, acidez y astringencia) del cacao nativo fino de aroma después de la fermentación; obteniéndose una puntuación final de calidad máxima de 71,1 se presenta en la Figura 9. El cual es validado con los compuestos volátiles encontrados en la tabla 7, presentando compuestos de las familias aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos y pirazinas que son muy notables estos atributos de aromas y sabores especiales, generados por el metabolismo de los microorganismos aplicados y el conjunto de reacciones generados durante el proceso de fermentación.



**Figura 9.** Análisis sensorial del atributo de calidad del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

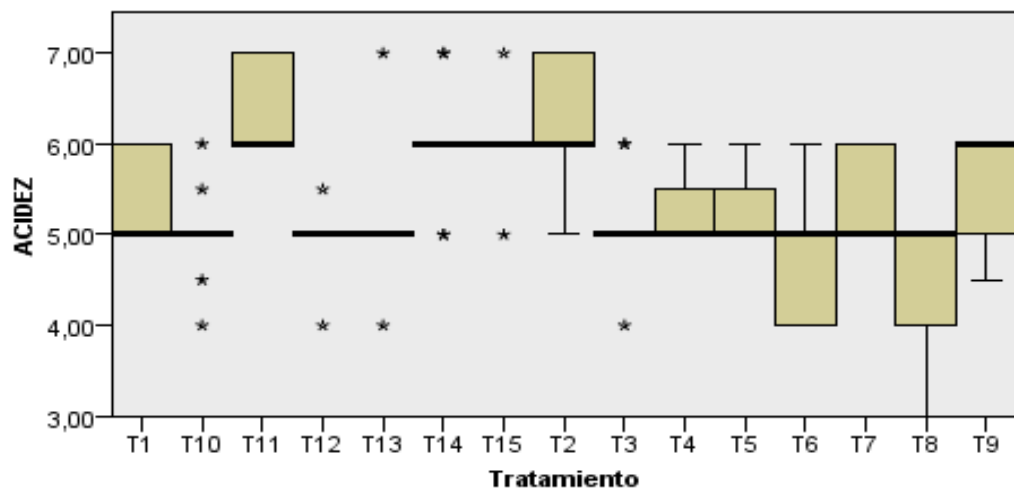
En la Figura 10 se muestra el atributo del aroma donde sobresalen las muestras T14 y T15 que presentan la más alta puntuación por su aroma especial a cacao, chocolate, pasas y maní tostado, por las pirazinas, alcoholes, aldehídos y cetonas presentes, los cuales lograron una puntuación de 7 de la escala hedónica; atributo generado por la actividad microbiana en medio anaeróbico por las levaduras y bacterias lácticas seguido por las bacterias acéticas en medio aeróbicos, variando los parámetros de temperatura y pH del medio durante el proceso de fermentación, así acelerando la generación de un conjunto de reacciones químicas dentro de los cotiledones de las almendras del cacao que permitieron generar los precursores de los atributos especiales que van a caracterizar a las muestra de cacao fermentados.





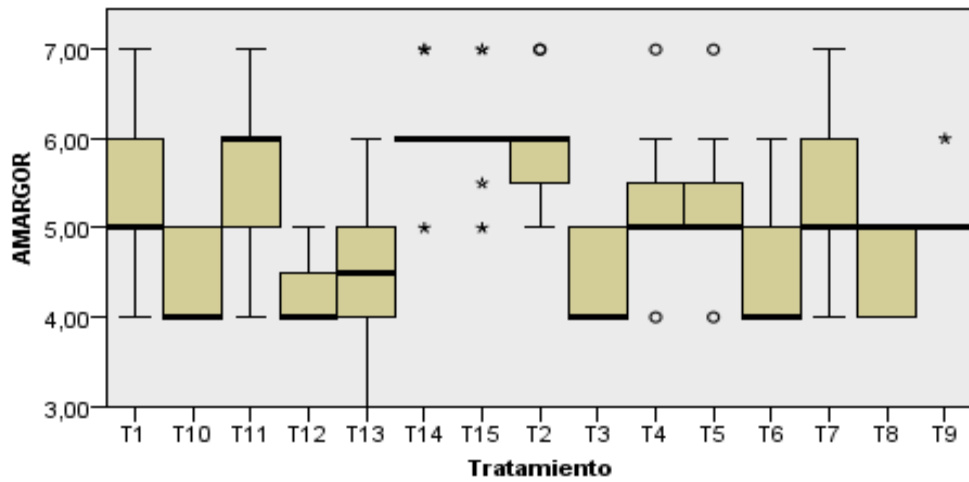
**Figura 10.** Análisis sensorial del atributo de aroma del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

En la Figura 11 se muestra los resultados de la evaluación del atributo de la acidez de las muestras de cacao nativo fino de aroma; presentando muy buenas características la muestra T14 conteniendo una acidez cítrica presente los compuestos Ácido 4-metilpentanoico y Beta-Mirceno los cuales confieren una acidez semejante a una naranja dulce, generada y transferida hacia los cotiledones durante el proceso de la fermentación, siendo este tipo de acidez beneficiosa para muestras especiales de cacao.



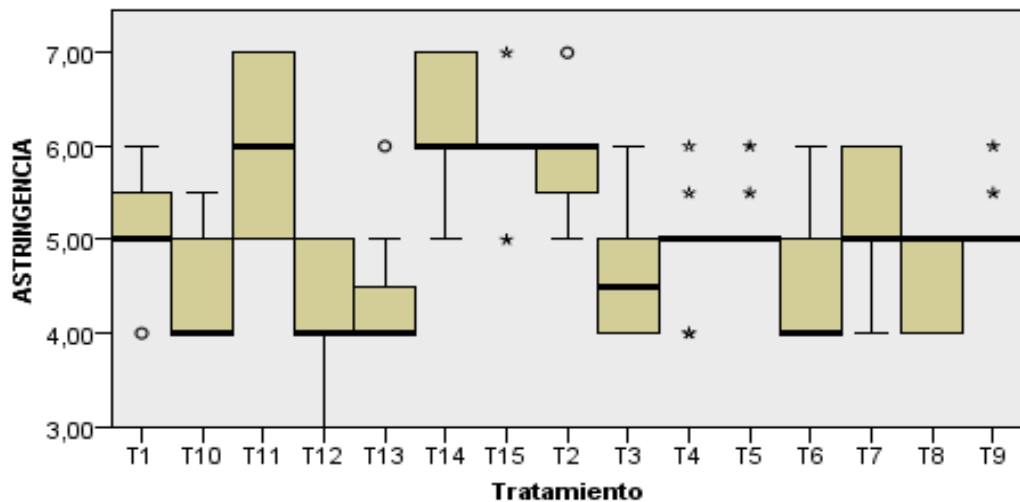
**Figura 11.** Análisis sensorial del atributo de acidez del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

En la Figura 12 se muestra el atributo del amargor evaluados para las muestras de cacao, siendo determinante su intensidad por el contenido de theobromina y cafeína presentes lo cual se muestra en la figura 6, el atributo del amargor característico de la muestra hace referencia al de un café tostado, cáscara de lima muy agradable para los consumidores, observando que también sobresalen las muestras T11, T12, T14 y T15.



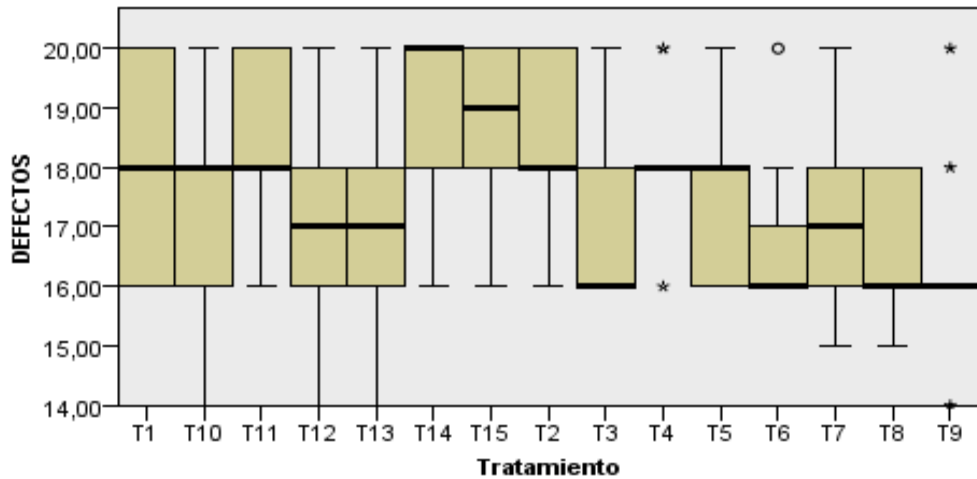
**Figura 12.** Análisis sensorial del atributo de amargor del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

En la Figura 13 se presenta el atributo de la astringencia para las muestras de cacao fermentado, siendo determinante su intensidad por la concentración de los fenoles totales en la muestra, este atributo disminuye su intensidad con el proceso de fermentación, el cual se presentó en la figura 3 resaltando la muestra T14 con una astringencia referencial a una fruta de granada madura, carambola madura, siendo óptimo para una muestra de cacao para la elaboración de chocolates especiales.



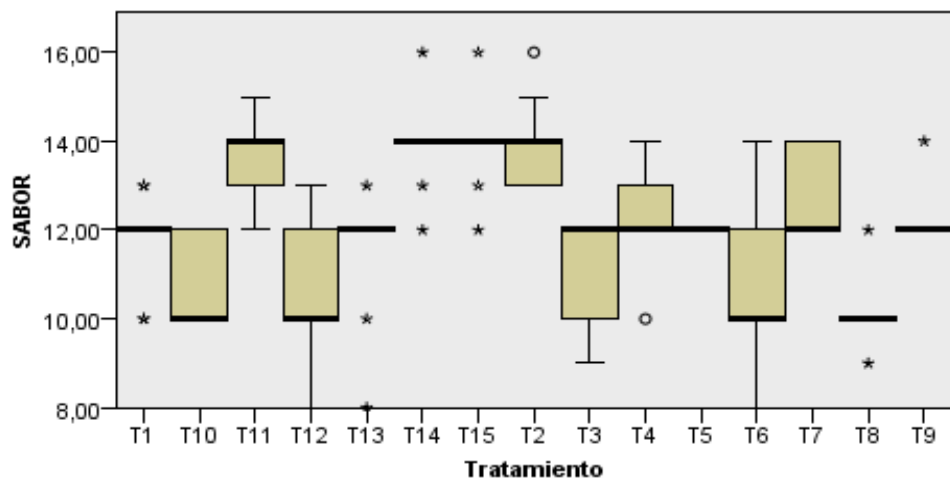
**Figura 13.** Análisis sensorial del atributo de astringencia del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

En la Figura 14 se presentan los resultados de la evaluación de los defectos que presentan las muestras, sobresaliendo la muestra T14 que no tuvo defectos que alteren su calidad.



**Figura 14.** Análisis sensorial de posibles defectos que presenta el cacao nativo fino de aroma después de la fermentación, aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

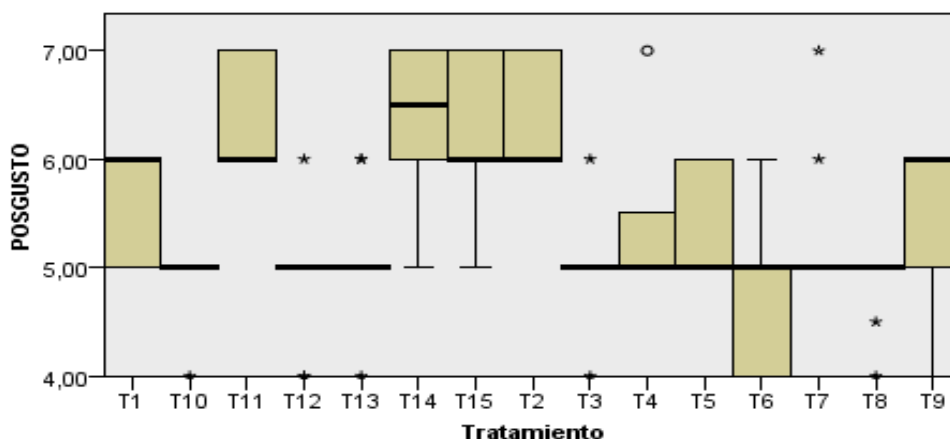
En la Figura 15 se presenta el atributo de sabores especiales, siendo caracterizado por los compuestos volátiles de la tabla 7, encontrando principalmente de las familias aldehidos, cetonas, esterers, pirazinas y alcoholes (linalool), que caracterizan a los sabores especiales de una cocoa, dulce como una panela, caramelo, agradable como la nuez, a unas frutas secas como pasas, frutas frescas, naranja, guanábana, maracuyá, plátano, también a especies aromáticas y floral muy fresco y natural, haciendo una muestra extraordinaria después de la fermentación con los microorganismos aplicados.



**Figura 15.** Análisis sensorial del atributo de sabor del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

En la Figura 16 se presenta el posgusto que genera una muestra evaluada en todos los sabores especiales que tienen las muestras de cacao nativo fino de aroma después

de unos minutos de haber degustado, para determinar la calidad final de una muestra; siendo la T14 la más adecuada según esta sensación del catador.



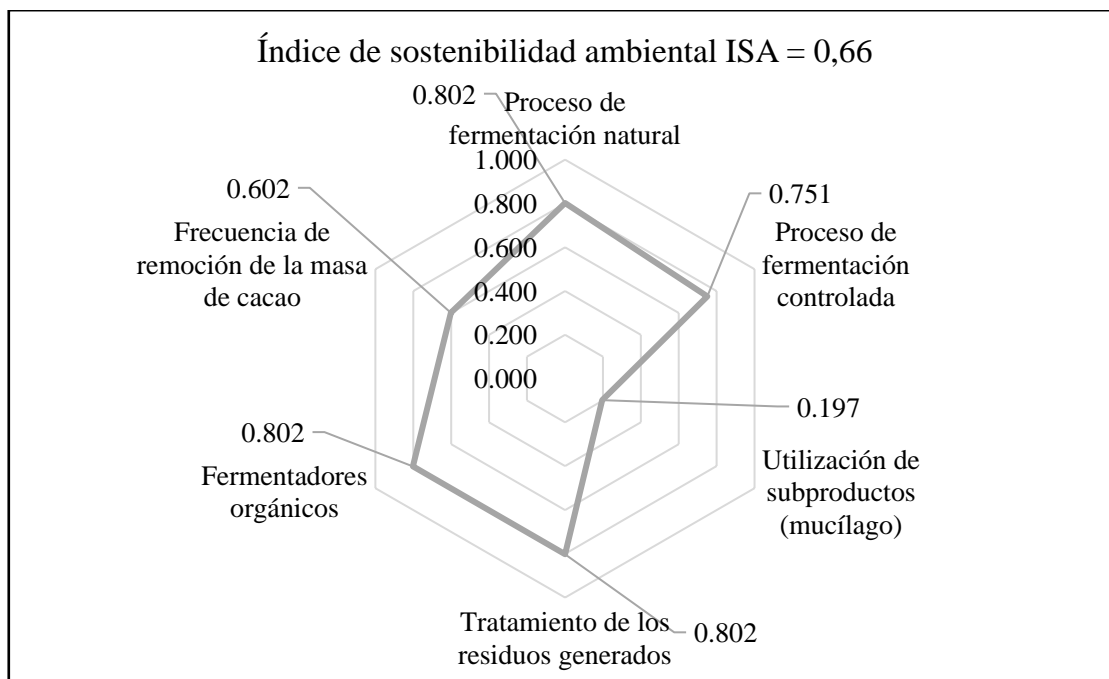
**Figura 16.** Análisis sensorial del atributo de posgusto del cacao nativo fino de aroma aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

### 3.8. Evaluación de la sostenibilidad de la fermentación del cacao nativo fino de aroma

En la Tabla 8 y en la Figura 17 se presenta los indicadores ambientales del proceso de fermentación del CNFA, con los cuales se determinó el índice de sostenibilidad ambiental igual a 0,66; que demuestra una sostenibilidad estable para esta dimensión.

**Tabla 8.** Índice de sostenibilidad ambiental del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas.

| Indicadores ambientales                         | Índice      |
|-------------------------------------------------|-------------|
| Proceso de fermentación natural                 | 0,80        |
| Proceso de fermentación controlada              | 0,75        |
| Utilización de subproductos (mucílago)          | 0,20        |
| Tratamiento de los residuos generados           | 0,80        |
| Fermentadores orgánicos                         | 0,80        |
| Frecuencia de remoción de la masa de cacao      | 0,60        |
| <b>Índice de sostenibilidad ambiental (ISA)</b> | <b>0,66</b> |

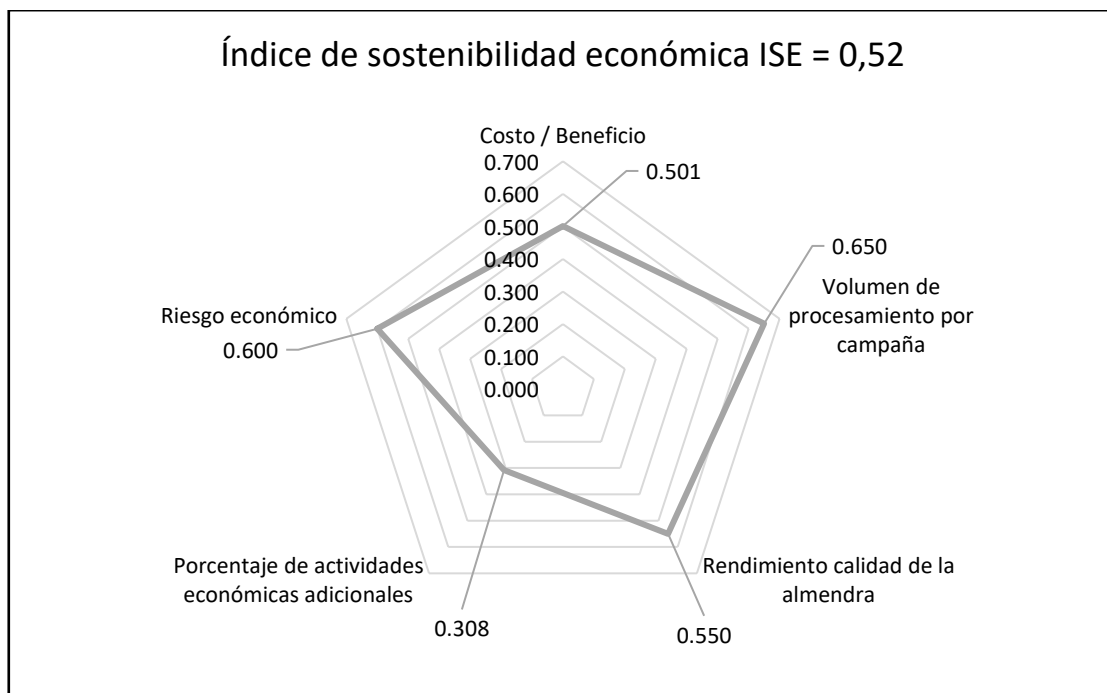


**Figura 17.** Representación radial de los indicadores de sostenibilidad ambiental del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas.

En la Tabla 9 y en la Figura 18 se presenta los indicadores económicos del proceso de fermentación del CNFA, con los cuales se determinó el índice de sostenibilidad económica igual a 0,52; que demuestra una sostenibilidad inestable para esta dimensión.

**Tabla 9.** Índice de sostenibilidad económica del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas.

| <b>Indicadores económicos</b>                    | <b>Índice</b> |
|--------------------------------------------------|---------------|
| Costo / Beneficio                                | 0,50          |
| Volumen de procesamiento por campaña             | 0,65          |
| Rendimiento calidad de la almendra               | 0,55          |
| Porcentaje de actividades económicas adicionales | 0,31          |
| Riesgo económico                                 | 0,60          |
| <b>Índice de sostenibilidad económica (ISE)</b>  | <b>0,52</b>   |

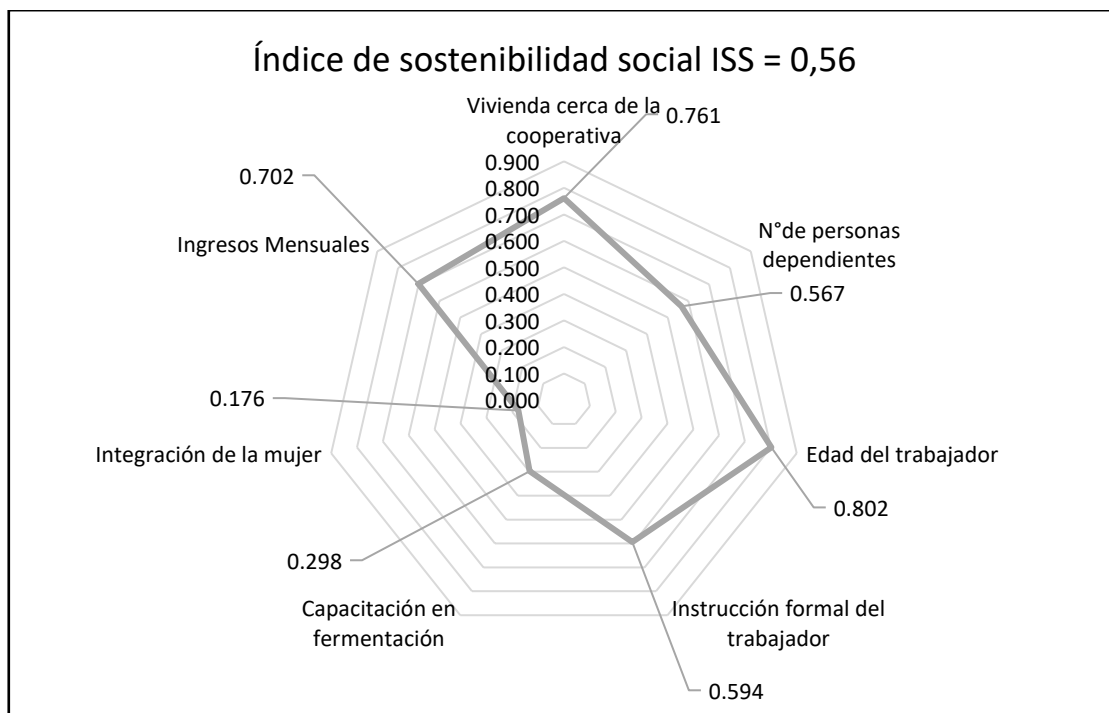


**Figura 18.** Representación radial de los indicadores de sostenibilidad económica del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas.

En la Tabla 10 y en la Figura 19 se presenta los indicadores sociales del proceso de fermentación del CNFA, con los cuales se determinó el índice de sostenibilidad social igual a 0,56; que demuestra una sostenibilidad inestable para esta dimensión.

**Tabla 10.** Índice de sostenibilidad social del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas.

| <b>Indicador</b>                             | <b>Índice</b> |
|----------------------------------------------|---------------|
| Vivienda cerca de la cooperativa             | 0,76          |
| N° de personas dependientes                  | 0,56          |
| Edad del trabajador                          | 0,80          |
| Instrucción formal del trabajador            | 0,59          |
| Capacitación en fermentación                 | 0,30          |
| Integración de la mujer                      | 0,18          |
| Ingresos mensuales                           | 0,70          |
| <b>Índice de sostenibilidad social (ISS)</b> | <b>0,56</b>   |

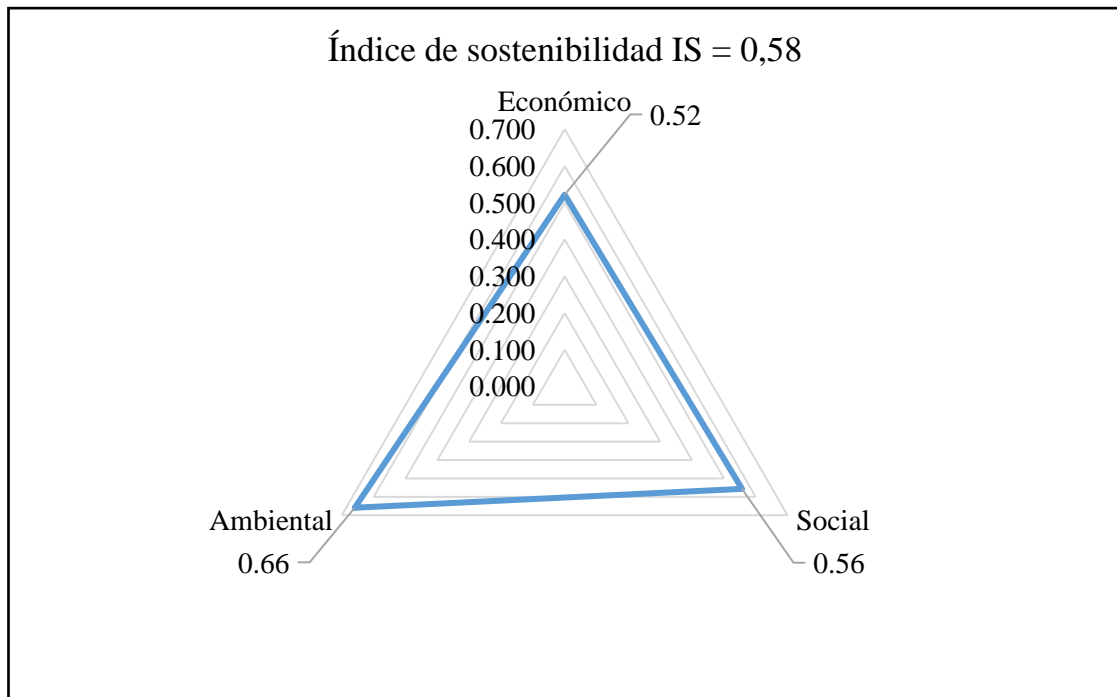


**Figura 19.** Representación radial de los indicadores de sostenibilidad social del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas.

En la Tabla 11 y en la Figura 20 se presenta las tres dimensiones: económica, social y ambiental; para el proceso de fermentación del cacao nativo fino aroma de la Región Amazonas, con los cuales se determinó el índice de sostenibilidad equivalente a 0,58; que demuestra una sostenibilidad inestable para todo el proceso.

**Tabla 11.** Índice de sostenibilidad económica, social y ambiental del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas.

| <b>Dimensión</b>                | <b>Índice de la dimensión</b> |                  |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Económico                       | 0,52                          | Inestable        |
| Social                          | 0,56                          | Inestable        |
| Ambiental                       | 0,66                          | Estable          |
| <b>Índice de sostenibilidad</b> | <b>0,58</b>                   | <b>Inestable</b> |



**Figura 20.** Representación radial de las dimensiones económica, social y ambiental del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas.



## IV. DISCUSIÓN

### 4.1. Índice de fermentación del cacao nativo fino de aroma (CNFA)

El índice de fermentación (IF) mide el grado de fermentación que tienen las almendras de cacao basado en el color marrón. Las almendras sobre fermentadas tienen un índice de fermentación superior a 1,6; mientras que las almendras sub-fermentadas tienen un índice de fermentación menor de 1,0; cuando es superior o equivalente a 1,0 indica una óptima fermentación (Nsor-atindana, Zhong, & Mothibe, 2012). Las almendras del CNFA alcanzaron un IF = 1,05 a los 7 días de fermentación, con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao y una secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas); similares resultados encontró (Ooi, Ting, & Siow, 2019) en su estudio de la influencia de cultivo iniciador de levaduras nativas seleccionadas sobre las actividades antioxidantes, índice de fermentación entre 1,11 y 1,13 y sólidos solubles totales de los granos de cacao de Malasia. Los resultados obtenidos en la presente investigación son consistentes al haber obtenido almendras completamente fermentadas con los microorganismos adicionados; el grado de fermentación de las almendras de cacao se debe a la difusión de polifenoles durante la fermentación seguida de la oxidación y reducción con otros compuestos celulares, que producen un color marrón en las almendras del cacao; la polifenol oxidasa (42 a 45°C) involucrada en la reacción de oxidación al catalizar o-difenol a o-quinona para la formación del color marrón (Hernández, López-andrade, Ramírez-guillermo, Ramírez, & Pérez, 2016).

### 4.2. Contenido de polifenoles totales del cacao nativo fino de aroma

En el presente estudio, los compuestos fenólicos de las almendras del cacao nativo fino de aroma de la colección INDES-19 de la región Amazonas, variaron desde 12,17 a 20,08 mg GAE/g cacao, determinando el valor optimizado 12,99 mg GAE/g cacao. Muy diferente a los resultados presentados por Ooi et al. (2019), que estuvieron entre  $21,82 \pm 6,15$  y  $24,67 \pm 8,23$  mg GAE /g cacao después de 120 h fermentación; siendo marcada la diferencia porque estudiaron el clon CCN51, conociéndose que la concentración de los fenoles totales esta íntegramente relacionada con la genética del cacao.

Durante la fermentación, las levaduras y bacterias son capaces de hidrolizar los complejos fenólicos en fenoles simples, libres, solubles, que se absorben fácilmente,

lo que lleva a una disminución de su contenido en las semillas durante el proceso de fermentación, así disminuyendo su intensidad de astringencia (Haile, Mesfin & Kang, 2019).

La mayoría de las investigaciones sobre el grano de cacao han demostrado que los polifenoles se degradan en el proceso de fermentación de tal manera que las almendras fermentadas tengan un contenido mucho menor de polifenoles en comparación con las almendras frescas (Jalil & Ismail, 2008). Esto ha sido en gran parte atribuido a la oxidación de taninos insolubles y a la lixiviación de polifenoles de las almendras en la pulpa circundante y posterior escurrimiento en la sudoración (Anklam & Commission, 2016). Lo mencionado se logró observar en la presente investigación a partir del tercer día de fermentación, con una transferencia de una masa de un color vino, que colorea toda la testa de un color marrón; la pérdida paulatina de los polifenoles de las almendras del cacao tiene como consecuencia la reducción del atributo de astringencia, siendo más adecuado y apetecible para el consumidor.

#### **4.3. Concentraciones de theobromina y cafeína en el CNFA de la Región Amazonas**

En la presente investigación se encontró una concentración de theobromina de 4,92 hasta 6,14 g/100 g cacao y la cafeína entre 1,78 hasta 2,68 g/100 g cacao y optimizando la variable respuesta se obtuvo los valores de theobromina y cafeína equivalentes a 4,89 g/100 g cacao y 1,81 g/100 g cacao, en la muestra fermentada con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao y una secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) a los 7 días de fermentación; valores similares reporto (Brunetto *et al.*, 2007) comparados con los resultados de theobromina 7,96 y 10,3 g/100 g cacao y cafeína 0,49 hasta 1,03 g/100 g cacao reportados por (Cardoso *et al.*, 2020) presentando diferencias por la variedad genética (forastero, Amazónico de Brasil) y otros parámetros experimentales de fermentación, tales como la pérdida de humedad y lixiviación de los compuestos celulares como la metilxantinas. Estos dos alcaloides son los principales responsables de la intensidad del sabor amargo del cacao, observando que disminuyen en el proceso de fermentación teniendo una correlación con el índice de fermentación evaluados en las muestras de cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas.

#### **4.4. pH del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas**

El pH óptimo para un cacao de calidad debe estar en un rango de 5,1 a 5,4; cualquier cacao con un pH menor a 5,0 indica presencia de ácidos no volátiles indeseables que dan al producto aromas desagradables, que perjudican la producción del chocolate (Armijos citado por Steinau, 2017). En la presente investigación se encontró un valor optimizado de pH de 5,32 en la muestra fermentada con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao y una secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) a los 7 días de fermentación; que indica un proceso de fermentación óptimo, parámetro que se constató con la prueba de corte realizada en las instalaciones de la Cooperativa CEPROAA, donde los granos bien fermentados corresponden a un proceso con fermentación completa, y los cotiledones presentan una coloración marrón a marrón rojiza, y las estrías bien definidas o profundas; internamente los ácidos han matado al embrión, además, son granos muy hinchados y se separan fácilmente del cotiledón. La calidad del sabor y aroma del grano es óptima para elaborar chocolates gourmet (Steinau, 2017).

Una reducción en el pH de las almendras durante la fermentación conduce a la generación de más péptidos y aminoácidos libres, que estarían disponibles para formar la reacción de Maillard durante el tostado, contribuyendo así a notas de aroma y sabor más preferidas (Afoakwa *et al.*, 2008). Por lo tanto, el pH es un factor crucial, no solo por su influencia en la acidez en el producto final, también por su influencia en la transformación del metaboloma de las almendras, afectando así los perfiles de sabor y aroma de varias maneras (John *et al.*, 2018).

#### **4.5. Identificación de los compuestos volátiles del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas**

En la presente investigación se identificaron 64 compuestos volátiles en la muestra fermentada con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao y una secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) a los 7 días de fermentación a diferencia de los 58 compuestos volátiles reportados por Rodríguez-Campos *et al.* (2012), en muestras de cacao de la granja en Cunduacan, Tabasco, México. Los compuestos principales fueron de las familias de aldehídos y cetonas, ésteres, alcoholes, ácidos, pirazinas y otros. Al final de la fermentación, los aldehídos y cetonas representan el mayor porcentaje del contenido total de compuestos volátiles, los cuales confieren las notas agradables a almendras,

mantequilla o floral; las pirazinas y alcoholes están entre los grupos de sabor más importante del cacao ya que confieren notas a chocolate, café tostado, frutal, floral, mentolado, canela, cítricos y en especial el compuesto volátil Linalool presente en las muestras del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas. Compuestos semejantes encontraron en muestras de cacao criollo y trinitario analizados en Rosario Izapa, Chiapas, México (Utrilla-Vázquez, Rodríguez-Campos, Hugo, Gschaedler, & Lugo-Cervantes, 2019).

#### **4.6. Evaluación sensorial del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas**

El panel de catadores expertos determinó los atributos sensoriales básicos y especiales (sabor a cacao, floral, frutal, nuez, dulce, amargo, acidez y astringencia). Obteniéndose una puntuación final de calidad máxima de 71,1 para la muestra T14 fermentada con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y fermentados en un tiempo de 7 días y una mínima de 55,5 para la muestra T8 lo que se muestra en la Figura 9. Se puede afirmar que la calidad está influenciada principalmente por la fermentación, siendo determinante para la formación de los precursores de aroma y sabor, que influyen en las características de calidad denominándolo cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas. Similares características encontró (Porrás *et al.*, 2018). Notas aromáticas olor (yogurt, nuez, afrutado, caña dulce), sabores básicos como (dulce, amargo, ácido), sabores específicos (florales, afrutados, nueces, lácteos) que se atribuyen a la calidad.

La evaluación sensorial del cacao nativo de la región Amazonas se pueden validar con los resultados obtenidos con el cromatógrafo de gases que reportó la presencia de compuestos volátiles pertenecientes a las familias de aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos y pirazinas principalmente, los cuales confieren las propiedades de aromas y sabores especiales, como el Linalool, 2-Nonanol compuesto que hace referencia a un aroma floral, mentolado, canela, cítricos y frutas; las pirazinas: pirazina 3-etil-2,5-dimetilo, pirazina tetrametilo, pirazina 2-etil-6-metilo, pirazina trimetilo, 2,3,5-trimetil-6-etilpirazina, los cuales hacen referencia a los aromas de un cacao tostado, dulce panela, caramelo dulce.

#### **4.7. Sostenibilidad del proceso de fermentación del cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas**

Según los resultados mostrados en la tabla 8, los indicadores ambientales del proceso de fermentación del CNFA, muestran un índice de sostenibilidad ambiental igual a 0,66; que demuestra una sostenibilidad estable para esta dimensión. En la tabla 9 se muestran los indicadores económicos, obteniendo el índice de sostenibilidad económica igual a 0,52; que demuestra una sostenibilidad inestable para esta dimensión. En la tabla 10 se presentan los indicadores sociales que conducen a un índice de sostenibilidad social igual a 0,56; que demuestra una sostenibilidad inestable para esta dimensión. En la tabla 11 se presenta las tres dimensiones: económica, social y ambiental; determinando el índice de sostenibilidad equivalente a 0,58; que demuestra una sostenibilidad inestable para todo el proceso de fermentación del cacao, según los indicadores y escala de evaluación presentado por (Cantú-Martínez, 2017). En la cadena productiva del cacao y en específico en los procesos de pos cosecha, es eminente fortalecer los indicadores sociales y económicos, como una mayor participación de género, óptimas condiciones laborales, capacitación permanente, mejoras salariales, para garantizar una mejor calidad de vida de las familias involucradas y lograr un desarrollo sostenible.

## V. CONCLUSIONES

Este estudio permitió estandarizar el proceso de fermentación del *T. cacao* nativo fino de aroma encontrando el modelo óptimo con una concentración de inóculo  $2,6 \times 10^3$  UFC/g cacao, secuencia de inoculación 2 (0 h levaduras + bacterias lácticas y a las 48 h bacterias acéticas) y un tiempo de 7 días de fermentación. Destacando la importancia del proceso de fermentación presentado en las características particulares de la composición química y compuestos volátiles de cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas.

Optimizando las variables respuesta se encontró los valores para el índice de fermentación  $IF = 1.05$ , y las características particulares de la composición química: polifenoles totales 12.99mg GAE/g cacao, concentración de theobromina y cafeína 4.89g/100g cacao y 1.81 g/100g cacao respectivamente y el pH equivalente a 5.32, datos que demuestran un óptimo proceso de fermentación del *T. cacao* nativo fino de aroma, obteniendo muestras con sabores y aromas especiales.

La fermentación de las almendras de cacao con la adición de los microorganismos permitió desarrollar un conjunto de reacciones químicas generando la aparición de precursores del sabor y la formación de una fracción aromática muy importante encontrando principalmente de la familias aldehídos y cetonas, ésteres, alcoholes, ácidos, pirazinas y otros. Los cuales confieren las notas agradables a almendras, mantequilla o floral; las pirazinas y alcoholes están entre los grupos de sabor más importante del cacao ya que confieren notas a chocolate, café tostado, frutal, floral, mentolado, canela, cítricos y en especial el compuesto volátil Linalool presente en las muestras del cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas.

La evaluación sensorial realizado por el panel de catadores expertos permitió determinar los atributos sensoriales básicos y especiales (sabor a cacao, floral, frutal, nuez, dulce, amargo, acidez y astringencia). Con lo cual se determinó la mejor muestra (T14) de cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas, Obteniéndose una puntuación final de calidad máxima de 71.1 influenciada la astringencia por la concentración de los fenoles totales, el amargor por la theobromina y cafeína, y los sabores y aromas especiales por los compuestos volátiles especialmente de la familia

aldehídos, cetonas, ésteres, pirazinas y alcoholes, los cuales confieren esas notas especiales a los cacaos permitiendo tener muestras extraordinarias.

El estudio de sostenibilidad del proceso de fermentación del *T. cacao* presentó un índice ambiental, económico y social (0,66, 0,52 y 0,56) respectivamente; permitiendo determinar el índice de sostenibilidad equivalente a 0,58; demostrando que falta fortalecer principalmente los indicadores sociales y económicos con una mayor participación e involucramiento de género, óptimas condiciones laborales, capacitación permanente en temas afines de manejo pos cosecha del cacao, mejoras salariales de todos los involucrados en las actividades de beneficio del cacao, para garantizar una mejor calidad de vida de las familias involucradas directa e indirectamente en las actividades pos cosecha que buscan un desarrollo sostenible.

## VI. RECOMENDACIONES

- Desarrollar más trabajos de investigación a partir de los resultados obtenidos en la presente investigación para potenciar y posesionar el cacao nativo de la región Amazonas, a nivel nacional e internacional.
- Considerando que el proceso de fermentación es de suma importancia en el desarrollo de los precursores aromáticos, seguir trabajando temas de investigación para poder obtener productos muy competitivos y apetecibles por los consumidores.
- El tema de caracterización de los compuestos volátiles también son muy importantes, por lo tanto se sugiere trabajar más en ello para poder cuantificarlos y preséntalos como únicos de la variedad de cacao nativo de la Región Amazonas.
- Desarrollar programas para fortalecer las capacidades de las cooperativas en el tema de pos cosecha específicamente en fermentación y secado del cacao, para implementar nuevas tecnologías de procesamiento de tal manera que se logre la sostenibilidad de la actividad, teniendo más participación de la mujer en toda la cadena de producción.
- Plantear tecnologías de producción más amigables con el medio ambiente, y eficientes en el procesamiento del cacao, optimizando la materia prima, recurso genético, tiempo, recursos humanos e infraestructura, en búsqueda de un desarrollo sostenible.



## 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>
- Afoakwa Emmanuel Ohene, A. P. M. F. & A. R. (2008). Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate. *Food Research International*, (November 2008). <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Alas, R. C. A., & Morales, S. A. del S. (2015). *Estandarización del proceso de fermentación de la mezcla de semillas de tres accesiones de Theobroma cacao L.(Cacao) de cultivar San José del Real de la Carrera ubicada en el Departamento de Usulután*. Universidad de El Salvador.
- Anklam, E., & Commission, E. (2016). Polyphenols in chocolate : Is there a contribution to human health? *Food Research International*, 9969(July 2000). [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00069-7)
- Antonio, O. G. (2018). *Efecto de la enzima pectolítica y levadura (Saccharomyces cerevisiae) en la fermentación y calidad del cacao variedad criollo (Theobroma cacao)*. Universidad Nacional Federico Villarreal.
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 87–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. S. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. *Molecular Reproduction Development*, 1(2), 1989. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>
- Bariah, K. S., Wan, A., Wan, I., & Tajul., A. Y. (2014). Effect of Fermentation Duration Using Shallow Box on Ph, Equivalent Percent Fully Brown and Flavour Attributes of Malaysian Cocoa Beans. *Journal of Applied Science and Agriculture*, 9(11), 104–108.
- Bravo, R. D. C. (2010). Evaluación Físicoquímica del comportamiento de las almendras de cacao (*Theobroma cacao* L) de seis clones: ICS-1 (Imperial Collage Selection), ICS-95 (Imperial Collage Selection), UF-613 (United Fruit), IMC-67 (Iquitos Marañon Collection), TSH-565 (Trinidad, 111.

- Brunetto, M. del R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., ... Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, *100*(2), 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.007>
- Cantú, M.P., Becker, A.R., Bedano J.C. Schiavo, H.F., and Parra, B. J. (2009). Evaluación del impacto del cambio de uso y manejo de la tierra mediante indicadores de calidad de suelo , Córdoba , Argentina Evaluation of the impact of land use and management change by means of soil quality indicators , Córdoba , Argentina, *34*, 203–214. Retrieved from [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/8355/CA\\_34\\_2009\\_art\\_13.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/8355/CA_34_2009_art_13.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cantú, M. P., Becker, A., Bedano, J. C., & Schiavo, H. F. (2007). DE INDICADORES E ÍNDICES, *25*(2), 173–178.
- Cantú-Martínez, P. C. (2017). Sustentabilidad Social : Un acercamiento sociolaboral y de ciudadanía a la mujer mexicana. *Revista de Investigación de Ciencias Sociales*, *13*, 112–124. <https://doi.org/10.18004/riics.2017.julio.112-124>
- Cardoso, P., Júnior, G., Bezerra, V., Santos, A., Pio, J., Souza, I. De, ... Pina, S. (2020). Determination of theobromine and caffeine in fermented and unfermented Amazonian cocoa ( *Theobroma cacao* L . ) beans using square wave voltammetry after chromatographic separation. *Food Control*, *108*(August 2019), 106887. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106887>
- Cempaka, L., Aliwarga, L., Purwo, S., & Kresnowati, M. T. A. P. (2014). Dynamics of Cocoa Bean Pulp Degradation during Cocoa Bean Fermentation: Effects of Yeast Starter Culture Addition. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, *46*(1), 14–25. <https://doi.org/10.5614/j.math.fund.sci.2014.46.1.2>
- Cendrero, A. ; Frances, E. ; Latrubesse, E. M. ; Prado, R. ; Fabbri, A. ; Panizza, M. ; Cantu, M. P. ; Hurtado, M. ; Gimenez, J. E. ; Martinez, O. ; Cabral, M. ; Tecchi, R. A., & Hamity, V. ;Ferman, J. L. ; Quintana, C. ; Ceccioni, A. , Recatalá, L. . ; Bayer, M. ; (2002). Projeto Relesa-Elanem : uma Nova Proposta Metodológica de Índices e Indicadores para Avaliação da Qualidade Ambiental. *Revista Brasileira de Geomorfologia*, *1*, 33–47. Retrieved from

<http://lsie.unb.br/rbg/index.php/rbg/article/viewFile/13/11>

- de Melo Pereira, G. V., Magalhães, K. T., de Almeida, E. G., da Silva Coelho, I., & Schwan, R. F. (2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2), 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.018>
- El Peruano. (2015). *Normas legales Declaran de interés regional la obtención de la denominación de origen del “Cacao Amazonas Perú.”* Retrieved from <https://busquedas.elperuano.pe/download/full/0z3sAeyn4T-Afi1sCJ4WYI>
- Gallopín, G. (2003). *Sostenibilidad y desarrollo sostenible: un enfoque sistémico.* Santiago de Chile. Retrieved from <https://www.portalces.org/sites/default/files/migrated/docs/1170.pdf>
- Gourieva MB, T. O. (1979). 646.
- Haile, Mesfin & Kang, W. H. (2019). Antioxidant Activity , Total Polyphenol , Flavonoid and Tannin Contents of Fermented Green Coffee Beans with Selected Yeasts. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010029>
- Hernández, C. H.-, López-andrade, P. A., Ramírez-guillermo, M. A., Ramírez, D. G., & Pérez, J. F. C. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Science & Nutrition*. <https://doi.org/10.1002/fsn3.333>
- 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>
- Illeghems, K., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2015). Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. *Food Microbiology*, 50, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.005>
- INDES-CES, I. de I. para el D. S. de C. de S. (2017). *Círculo de investigación para la innovación y el fortalecimiento de la cadena de valor del cacao nativo fino de aroma*

en la zona nor oriental del Perú-CINCACAO. (pp. 0–32).

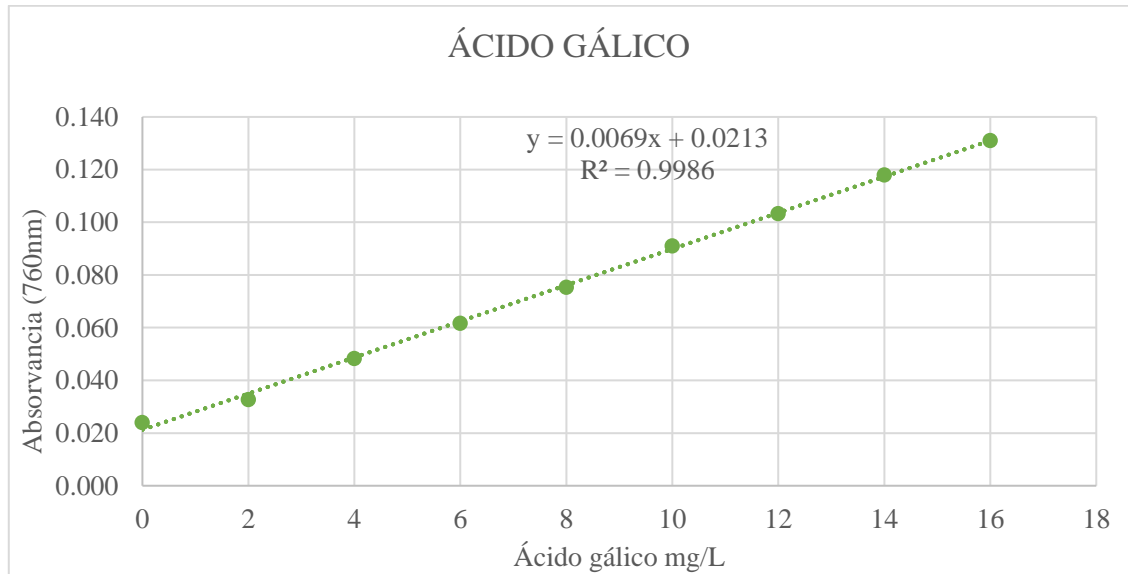
- Jalil, M., & Ismail, A. (2008). Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules*, (February). <https://doi.org/10.3390/molecules13092190>
- John, W. A., Böttcher, N. L., Aßkamp, M., Bergounhou, A., Kumari, N., Ho, P., ... Ullrich, M. S. (2018). Forcing Fermentation : Profiling Proteins , Peptides and Polyphenols in Lab-scale Cocoa Bean Fermentation Department of Life Sciences and Chemistry , Jacobs University Bremen , Campus Ring 1 ,. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.108>
- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Research International*, 82, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kresnowati, M. T. A. P., Suryani, L., & Affifah, M. (2013). Improvement of Cocoa Beans Fermentation by LAB Starter Addition. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2(4), 274–278. <https://doi.org/10.12720/jomb.2.4.274-278>
- Krishna, P. S. M., Venkateswarlu, G., & Rao, L. V. (2000). Effect of uracil on rifamycin SV production by *Amycolatopsis mediterranei* MV35R. *Society*, (1999), 1998–2001.
- León-roque, N., Abderrahim, M., Nuñez-alejos, L., Arribas, S. M., & Condezo-hoyos, L. (2016). Prediction of fermentation index of cocoa beans ( *Theobroma cacao* L .) based on color measurement and arti fi cial neural networks. *Talanta*, 161, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.022>
- López Cuadra, Y. M., Cunias Rodríguez, M. Y., Carrasco Vega, Y. L. (2020). El cacao peruano y su impacto en la economía nacional. *Universidad Y Sociedad*, 12(3), 344–352. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2218-36202020000300344&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2218-36202020000300344&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 168–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>

- Nogales, J., Graziani De Fariñas, L., & Ortiz De Bertorelli, L. (2004). Cambios Físicos Y Químicos Durante El Secado Al Sol Del Grano De Cacao Fermentado En Dos Diseños De Cajones De Madera Physical and Chemical Changes of Sun Dried Cocoa Beans Fermented in Two Designs of Wouden Boxes. *Agronomía Trop*, 21(6), 5–20.
- Nsor-atindana, J., Zhong, F., & Mothibe, K. J. (2012). Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa ( *Theobroma cacao* L .) Bean Shells. *Journal of Nutrition*, 11(7), 574–579.
- OECD. (2003). *Environmental Performance of Agriculture at a Glance*.
- Ooi, T. S., Ting, A. S. Y., & Siow, L. F. (2019). 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 - Food Science and Technology*, 108977. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108977>
- Pantelidis, G., Vasilakakis, M., Manganaris, G., & Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3), 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.021>
- Porras, Barrientos, L. D., Diego, J., Oquendo, T., Andrea, M., Garzón, G., ... Álvarez, M. (2018). Effect of the solar drying process on the sensory and chemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivated in Antioquia, Colombia. *Food Research International*, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.084>
- Ramírez Sulvarán Jesús Arturo, S. R. A. K. and D. V. V. R. A. (2014). Characterization of Cocoa ( *Theobroma cacao* L .) Farming Systems in the Norte de Santander Department and Assessment of Their Sustainability. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 67(1). Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/rt/printerFriendly/42635/46836>
- Rivera, G. A. B. (2017). *ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN HÍBRIDOS DE CACAO (Theobroma cacao L.) MEDIANTE LA ADICIÓN DE MUSÁCEAS*. UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO.
- Rivera, R. D., Mencías, F., Guzmán, Á., Peña, M., Medina, H., Cassanova, L., ... Nivelá, P. (2012). Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química

- del cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo nacional. *Ciencia Y Tecnología*, 5, 7–12. Retrieved from [http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2\\_calidad\\_fisica\\_quimica\\_cacao.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_calidad_fisica_quimica_cacao.pdf)
- 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>
- Sandhya, M. V. S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaik, J., Rao, L. J., Janardhan, P., & Murthy, P. S. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 65(September 2015), 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.002>
- Singleton, V. ., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier.
- Steinau, I. A. D. (2017). *Evaluación de la incidencia de la fermentación en la calidad del grano de cacao trinitario en caluco, sonsonate, el salvador*. Universidad de el Salvador.
- Utrilla-vázquez, M., Rodríguez-campos, J., Hugo, C., Gschaedler, A., & Lugo-cervantes, E. (2019). Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Research International*, 108834. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108834>
- Wacher, R. M. del C. (2011). Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria*, 12(4), 1067–6079.
- Zambrano, A., Romero, C., Gómez, Á., Ramos, G., & Lacruz, C. (2010). Evaluación Química De Precursores De Aroma Y Sabor Del Cacao Criollo Merideño Durante La Fermentación En Dos Condiciones Edafoclimáticas. *Agronomía Trop.*, 60(2), 211–219.

## ANEXOS

**Anexos 1:** Curva de calibración de ácido gálico para determinación de contenido de fenoles totales.



Optimizar las respuestas

Valores de respuesta y Óptimo

| <i>Respuesta</i>             | <i>Optimizado</i> | <i>Predicción</i> | <i>Inferior 95.0% Limite</i> | <i>Superior 95.0% Límite</i> |
|------------------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|------------------------------|
| Polifenoles totales          | si                | 12.9951           | 7.79534                      | 18.1948                      |
| Índice de fermentación       | si                | 1.04755           | 0.571606                     | 1.52349                      |
| pH                           | si                | 5.31919           | 4.96617                      | 5.67221                      |
| Determinación de Theobromina | si                | 4.89726           | 4.44192                      | 5.3526                       |
| Determinación de Cafeína     | si                | 1.80902           | 1.36546                      | 2.25259                      |

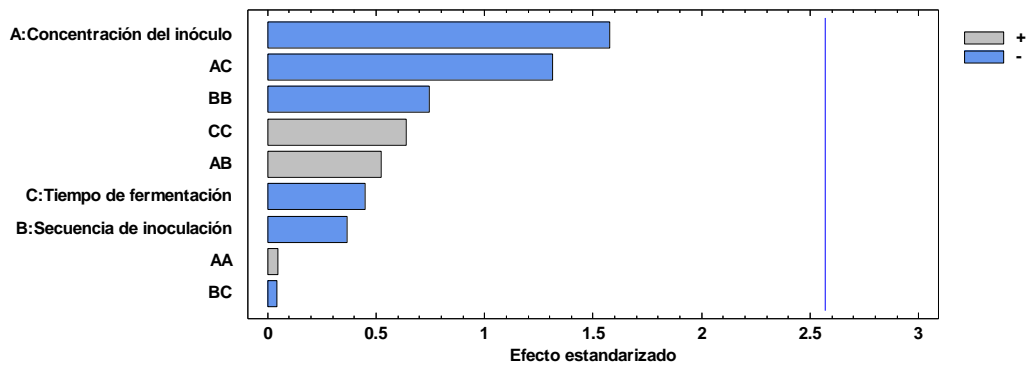
| <i>Deseabilidad</i> |
|---------------------|
| 0.862005            |
| 0.732578            |
| 0.119984            |
| 0.857411            |
| 0.968469            |

Deseabilidad optimizada = 0.575112

Factores establecidos y Óptimo

| <i>Factor</i>             | <i>Establecimiento</i> |
|---------------------------|------------------------|
| Concentración del inóculo | 2600.0                 |
| Secuencia de inoculación  | 2.00829                |
| Tiempo de fermentación    | 7.0                    |

Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles totales

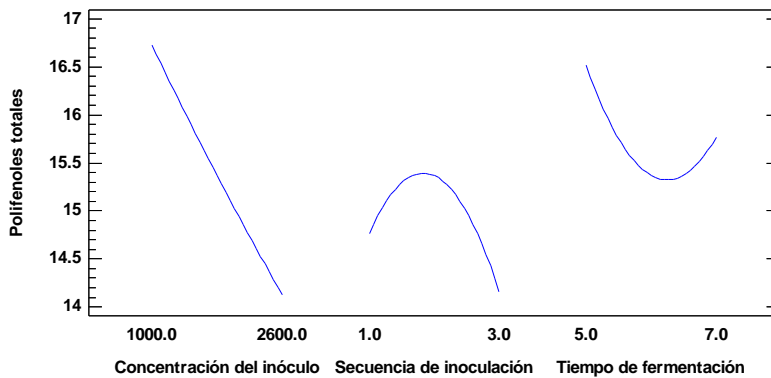


**Efectos estimados para Polifenoles totales (mg GAE/gcacao)**

| Efecto                      | Estimado  | Error Estd. | V.I.F.  |
|-----------------------------|-----------|-------------|---------|
| promedio                    | 15.368    | 1.3485      |         |
| A:Concentración del inóculo | -2.60218  | 1.65157     | 1.0     |
| B:Secuencia de inoculación  | -0.6058   | 1.65157     | 1.0     |
| C:Tiempo de fermentación    | -0.743475 | 1.65157     | 1.0     |
| AA                          | 0.117     | 2.43104     | 1.01111 |
| AB                          | 1.22535   | 2.33567     | 1.0     |
| AC                          | -3.0703   | 2.33567     | 1.0     |
| BB                          | -1.81055  | 2.43104     | 1.01111 |
| BC                          | -0.09645  | 2.33567     | 1.0     |
| CC                          | 1.5489    | 2.43104     | 1.01111 |

Errores estándar basados en el error total con 5 g.l.

Gráfica de Efectos Principales para Polifenoles totales



**Análisis de Varianza para Polifenoles totales**

| Fuente                      | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Concentración del inóculo | 13.5426           | 1  | 13.5426        | 2.48    | 0.1759  |
| B:Secuencia de inoculación  | 0.733987          | 1  | 0.733987       | 0.13    | 0.7288  |
| C:Tiempo de fermentación    | 1.10551           | 1  | 1.10551        | 0.20    | 0.6714  |
| AA                          | 0.012636          | 1  | 0.012636       | 0.00    | 0.9635  |
| AB                          | 1.50148           | 1  | 1.50148        | 0.28    | 0.6223  |
| AC                          | 9.42674           | 1  | 9.42674        | 1.73    | 0.2457  |
| BB                          | 3.02593           | 1  | 3.02593        | 0.55    | 0.4899  |
| BC                          | 0.0093026         | 1  | 0.0093026      | 0.00    | 0.9687  |
| CC                          | 2.21455           | 1  | 2.21455        | 0.41    | 0.5521  |
| Error total                 | 27.2768           | 5  | 5.45535        |         |         |
| Total (corr.)               | 59.2859           | 14 |                |         |         |



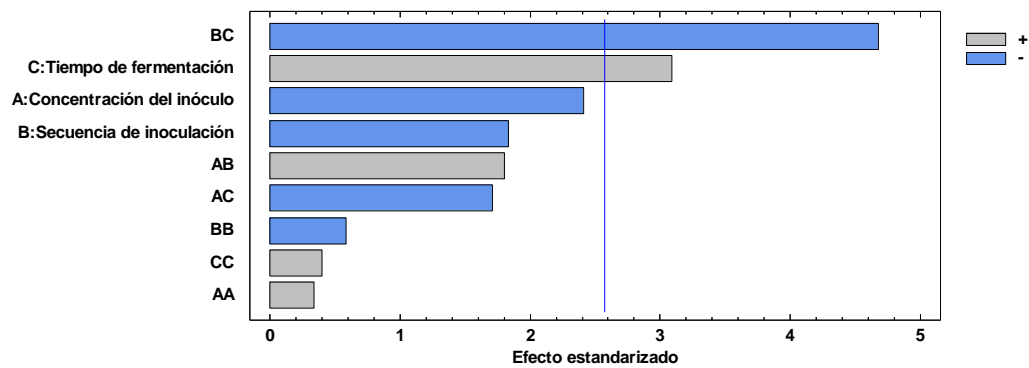
## Índice de fermentación

### Efectos estimados para Índice de fermentación (adimensional)

| Efecto                      | Estimado | Error Estd. | V.I.F.  |
|-----------------------------|----------|-------------|---------|
| promedio                    | 1.1      | 0.12343     |         |
| A:Concentración del inóculo | -0.365   | 0.15117     | 1.0     |
| B:Secuencia de inoculación  | -0.2775  | 0.15117     | 1.0     |
| C:Tiempo de fermentación    | 0.4675   | 0.15117     | 1.0     |
| AA                          | 0.075    | 0.222517    | 1.01111 |
| AB                          | 0.385    | 0.213787    | 1.0     |
| AC                          | -0.365   | 0.213787    | 1.0     |
| BB                          | -0.13    | 0.222517    | 1.01111 |
| BC                          | -1.0     | 0.213787    | 1.0     |
| CC                          | 0.09     | 0.222517    | 1.01111 |

Errores estándar basados en el error total con 5 g.l.

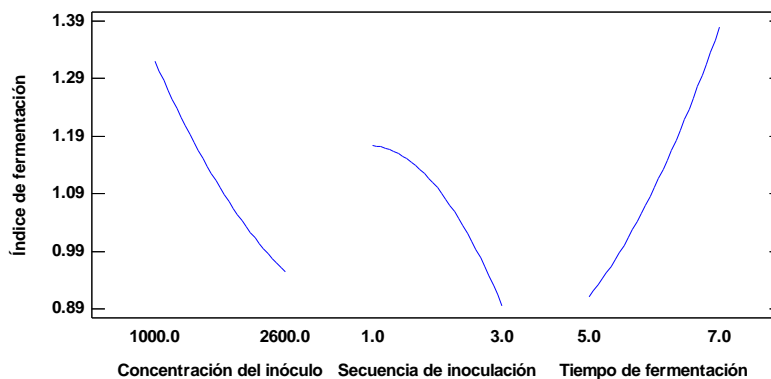
Diagrama de Pareto Estandarizada para Índice de fermentación

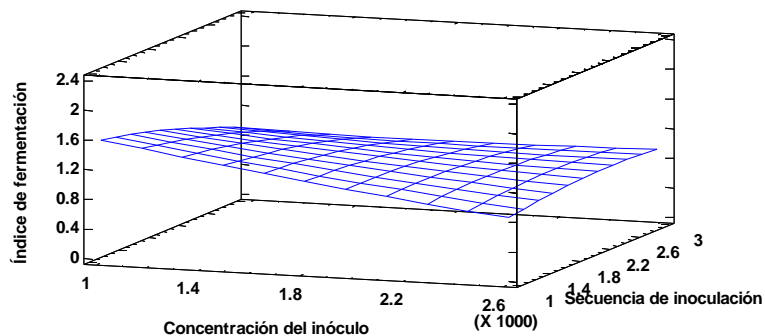


### Análisis de Varianza para Índice de fermentación

| Fuente                      | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Concentración del inóculo | 0.26645           | 1  | 0.26645        | 5.83    | 0.0605  |
| B:Secuencia de inoculación  | 0.154013          | 1  | 0.154013       | 3.37    | 0.1258  |
| C:Tiempo de fermentación    | 0.437113          | 1  | 0.437113       | 9.56    | 0.0271  |
| AA                          | 0.00519231        | 1  | 0.00519231     | 0.11    | 0.7498  |
| AB                          | 0.148225          | 1  | 0.148225       | 3.24    | 0.1316  |
| AC                          | 0.133225          | 1  | 0.133225       | 2.91    | 0.1485  |
| BB                          | 0.0156            | 1  | 0.0156         | 0.34    | 0.5844  |
| BC                          | 1.0               | 1  | 1.0            | 21.88   | 0.0054  |
| CC                          | 0.00747692        | 1  | 0.00747692     | 0.16    | 0.7026  |
| Error total                 | 0.228525          | 5  | 0.045705       |         |         |
| Total (corr.)               | 2.39809           | 14 |                |         |         |

Gráfica de Efectos Principales para Índice de fermentación





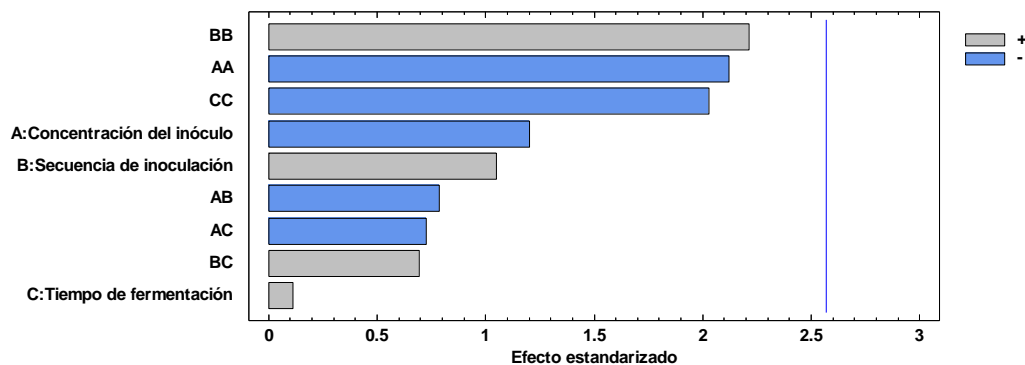
## Ph de las muestras de cacao

### Efectos estimados para pH (Adimensional)

| Efecto                      | Estimado | Error Estd. | V.I.F.  |
|-----------------------------|----------|-------------|---------|
| promedio                    | 5.78     | 0.0915514   |         |
| A:Concentración del inóculo | -0.135   | 0.112127    | 1.0     |
| B:Secuencia de inoculación  | 0.1175   | 0.112127    | 1.0     |
| C:Tiempo de fermentación    | 0.0125   | 0.112127    | 1.0     |
| AA                          | -0.35    | 0.165047    | 1.01111 |
| AB                          | -0.125   | 0.158572    | 1.0     |
| AC                          | -0.115   | 0.158572    | 1.0     |
| BB                          | 0.365    | 0.165047    | 1.01111 |
| BC                          | 0.11     | 0.158572    | 1.0     |
| CC                          | -0.335   | 0.165047    | 1.01111 |

Errores estándar basados en el error total con 5 g.l.

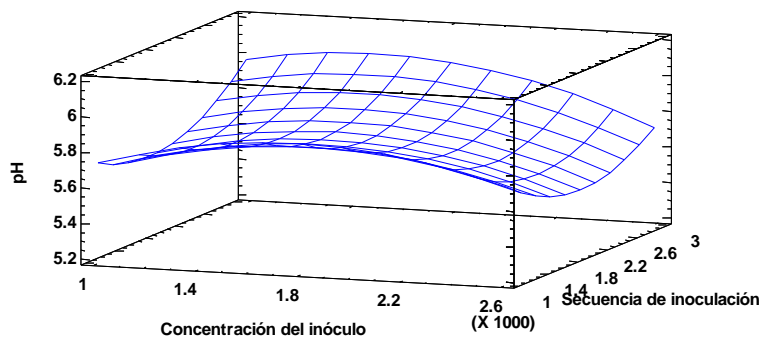
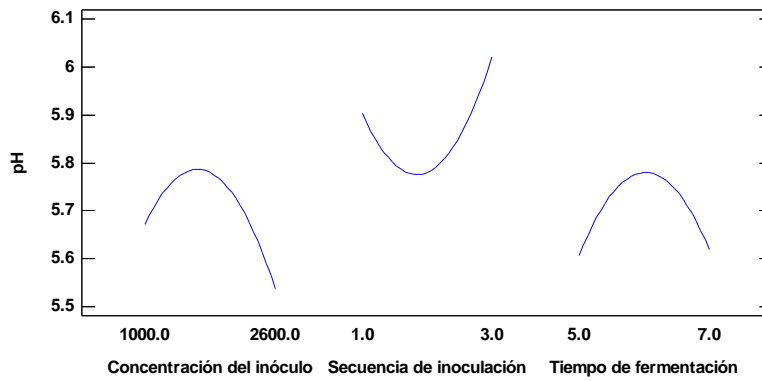
Diagrama de Pareto Estandarizada para pH



### Análisis de Varianza para pH

| Fuente                      | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Concentración del inóculo | 0.03645           | 1  | 0.03645        | 1.45    | 0.2825  |
| B:Secuencia de inoculación  | 0.0276125         | 1  | 0.0276125      | 1.10    | 0.3427  |
| C:Tiempo de fermentación    | 0.0003125         | 1  | 0.0003125      | 0.01    | 0.9156  |
| AA                          | 0.113077          | 1  | 0.113077       | 4.50    | 0.0874  |
| AB                          | 0.015625          | 1  | 0.015625       | 0.62    | 0.4662  |
| AC                          | 0.013225          | 1  | 0.013225       | 0.53    | 0.5008  |
| BB                          | 0.122977          | 1  | 0.122977       | 4.89    | 0.0780  |
| BC                          | 0.0121            | 1  | 0.0121         | 0.48    | 0.5188  |
| CC                          | 0.103592          | 1  | 0.103592       | 4.12    | 0.0981  |
| Error total                 | 0.125725          | 5  | 0.025145       |         |         |
| Total (corr.)               | 0.592173          | 14 |                |         |         |

Gráfica de Efectos Principales para pH



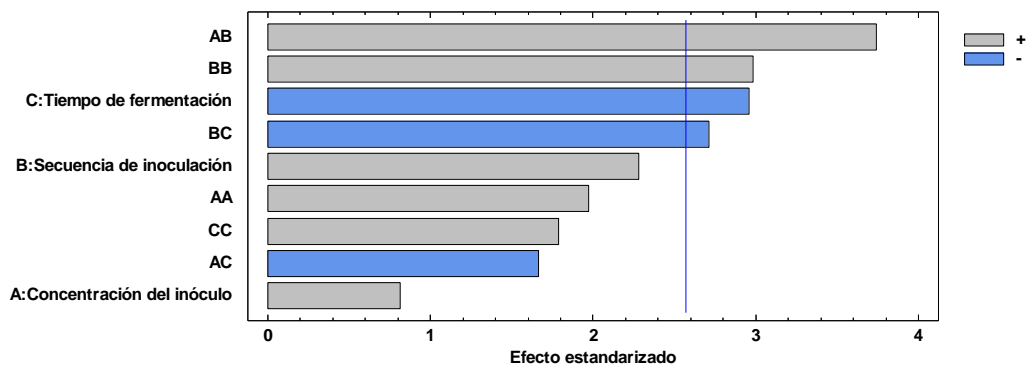
## Componente de theobromina

Efectos estimados para Determinación de Theobromina (g/100g)

| Efecto                      | Estimado | Error Estd. | V.I.F.  |
|-----------------------------|----------|-------------|---------|
| promedio                    | 4.82     | 0.118089    |         |
| A:Concentración del inóculo | 0.1175   | 0.144629    | 1.0     |
| B:Secuencia de inoculación  | 0.33     | 0.144629    | 1.0     |
| C:Tiempo de fermentación    | -0.4275  | 0.144629    | 1.0     |
| AA                          | 0.42     | 0.212888    | 1.01111 |
| AB                          | 0.765    | 0.204536    | 1.0     |
| AC                          | -0.34    | 0.204536    | 1.0     |
| BB                          | 0.635    | 0.212888    | 1.01111 |
| BC                          | -0.555   | 0.204536    | 1.0     |
| CC                          | 0.38     | 0.212888    | 1.01111 |

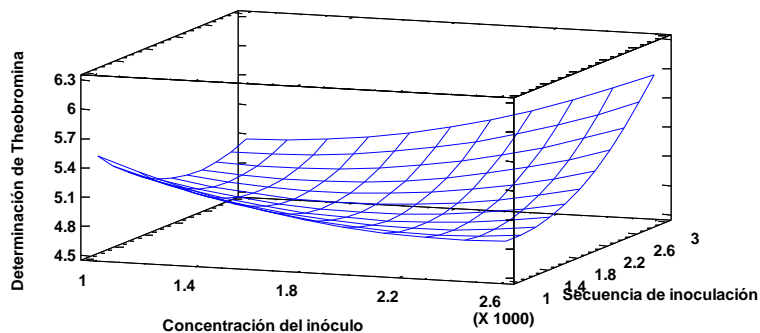
Errores estándar basados en el error total con 5 g.l.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Determinación de Theobromina

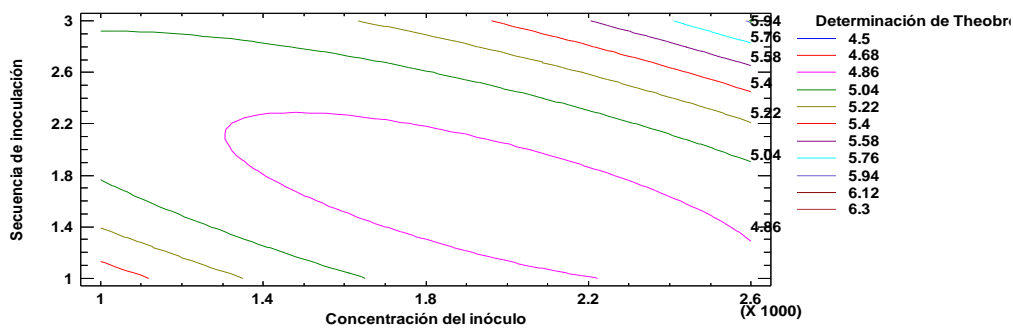
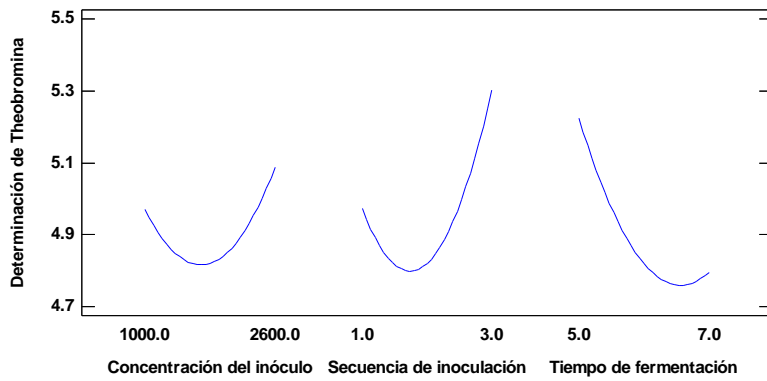


**Análisis de Varianza para Determinación de Theobromina**

| Fuente                      | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Concentración del inóculo | 0.0276125         | 1  | 0.0276125      | 0.66    | 0.4535  |
| B:Secuencia de inoculación  | 0.2178            | 1  | 0.2178         | 5.21    | 0.0714  |
| C:Tiempo de fermentación    | 0.365513          | 1  | 0.365513       | 8.74    | 0.0317  |
| AA                          | 0.162831          | 1  | 0.162831       | 3.89    | 0.1055  |
| AB                          | 0.585225          | 1  | 0.585225       | 13.99   | 0.0134  |
| AC                          | 0.1156            | 1  | 0.1156         | 2.76    | 0.1573  |
| BB                          | 0.372208          | 1  | 0.372208       | 8.90    | 0.0307  |
| BC                          | 0.308025          | 1  | 0.308025       | 7.36    | 0.0421  |
| CC                          | 0.133292          | 1  | 0.133292       | 3.19    | 0.1343  |
| Error total                 | 0.209175          | 5  | 0.041835       |         |         |
| Total (corr.)               | 2.41569           | 14 |                |         |         |



Gráfica de Efectos Principales para Determinación de Theobromina

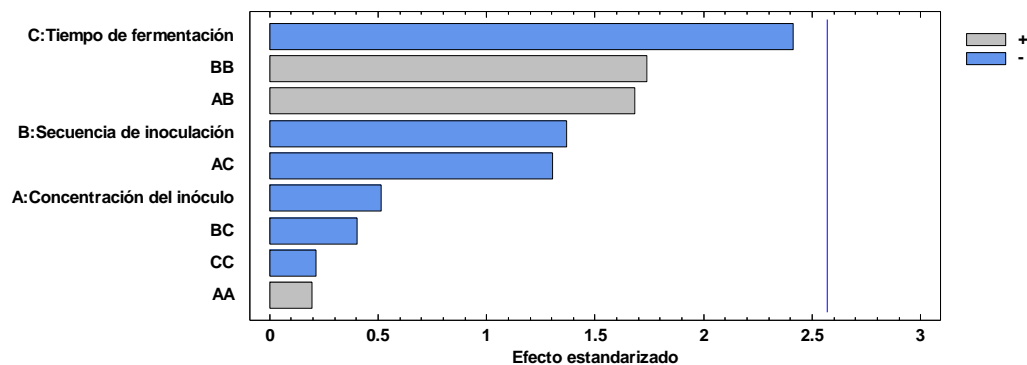


## Concentración de cafeína

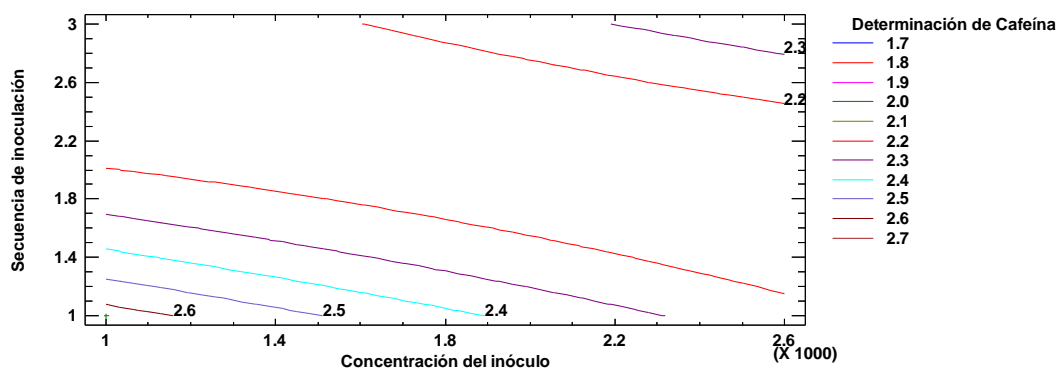
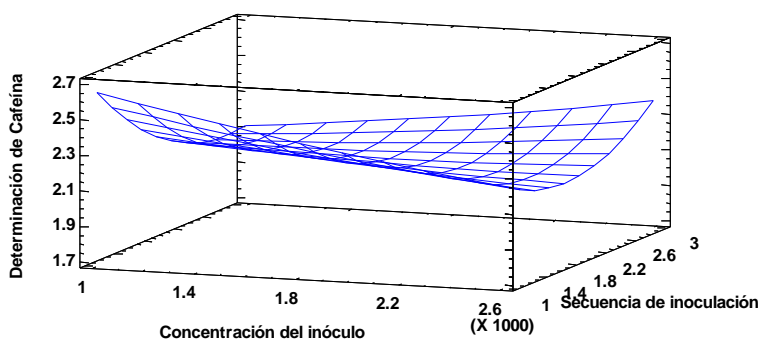
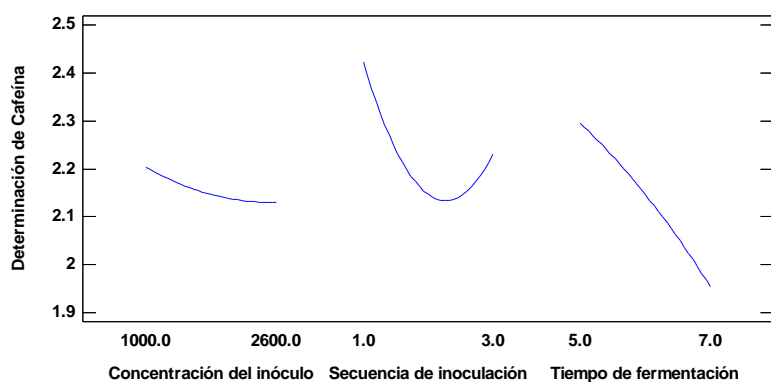
### Análisis de Varianza para Determinación de Cafeína

| Fuente                      | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Concentración del inóculo | 0.0105125         | 1  | 0.0105125      | 0.26    | 0.6288  |
| B:Secuencia de inoculación  | 0.0741125         | 1  | 0.0741125      | 1.87    | 0.2301  |
| C:Tiempo de fermentación    | 0.2312            | 1  | 0.2312         | 5.82    | 0.0606  |
| AA                          | 0.0015391         | 1  | 0.0015391      | 0.04    | 0.8517  |
| AB                          | 0.112225          | 1  | 0.112225       | 2.83    | 0.1535  |
| AC                          | 0.0676            | 1  | 0.0676         | 1.70    | 0.2487  |
| BB                          | 0.120185          | 1  | 0.120185       | 3.03    | 0.1424  |
| BC                          | 0.0064            | 1  | 0.0064         | 0.16    | 0.7046  |
| CC                          | 0.00180064        | 1  | 0.00180064     | 0.05    | 0.8398  |
| Error total                 | 0.198492          | 5  | 0.0396983      |         |         |
| Total (corr.)               | 0.82584           | 14 |                |         |         |

Diagrama de Pareto Estandarizada para Determinación de Cafeína

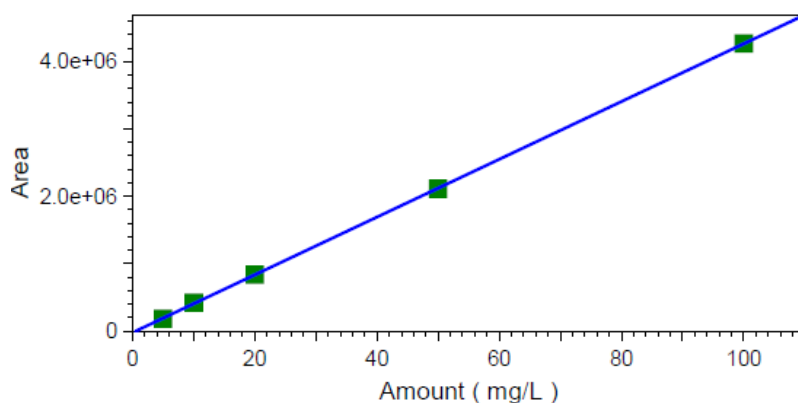


Gráfica de Efectos Principales para Determinación de Cafeína



**Anexo 2.** Curvas de calibración para cuantificar el contenido de theobromina y cafeína de las muestras fermentadas de cacao nativo fino de aroma a través de cromatografía líquida (HPLC).

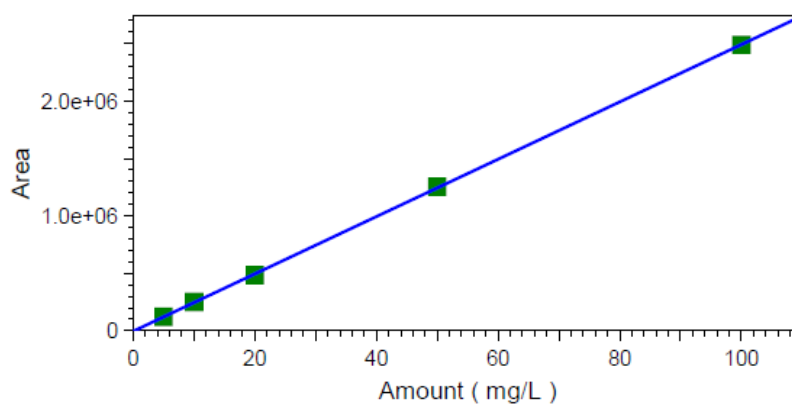
Peak: Teobromina -- ESTD -- DAD-CH1



Teobromina (DAD-CH1)

Average RF: 41103.8    RF StDev: 2507.57    RF %RSD: 6.10058  
Scaling: None    LSQ Weighting: None    Force Through Zero: Off  
Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)  
Fit Type: Linear  
 $y = 42874.0x - 21833.7$   
Goodness of fit ( $r^2$ ): 0.999962

Peak: Cafeina -- ESTD -- DAD-CH1



Cafeina (DAD-CH1)

Average RF: 24688.2    RF StDev: 454.543    RF %RSD: 1.84113  
Scaling: None    LSQ Weighting: None    Force Through Zero: Off  
Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)  
Fit Type: Linear  
 $y = 24962.3x - 3811.87$   
Goodness of fit ( $r^2$ ): 0.999939

**Anexo 2.1.** Cuantificación del contenido de teobromina y cafeina de las muestras fermentadas de cacao nativo fino de aroma a través de cromatografía líquida (HPLC).

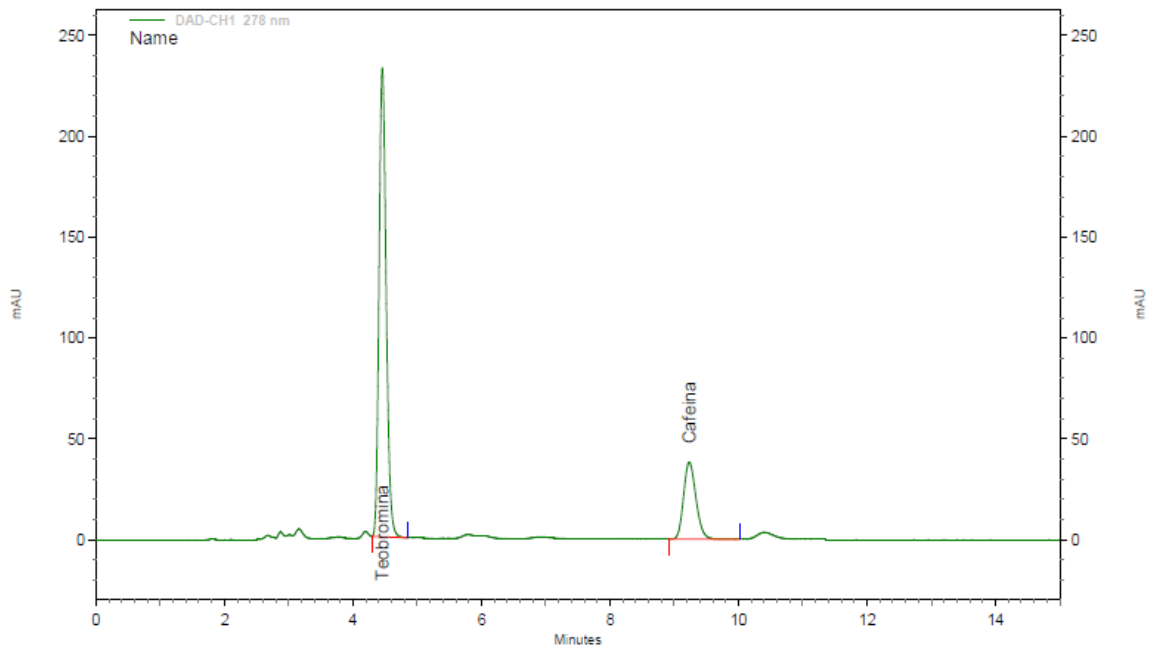
### Determinación de Teobromina y Cafeina en cacao por HPLC

Sequence name: 28-11-2019.seq.rst  
 Analyst: DINER MORI MESTANZA (DINER MORI)

| DAD-CH1 278 nm<br>Sample ID | Teobromina<br>Retention Time | Cafeina<br>Retention Time | Teobromina<br>(g/100g) | Cafeina<br>(g/100g) |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------|
| Muestra-T0                  | 4.45                         | 9.23                      | 5.24                   | 2.46                |
| Muestra-T1                  | 4.45                         | 9.23                      | 5.04                   | 2.47                |
| Muestra-T2                  | 4.45                         | 9.23                      | 4.93                   | 2.31                |
| Muestra-T3                  | 4.45                         | 9.23                      | 4.58                   | 2.04                |
| Muestra-T4                  | 4.45                         | 9.23                      | 5.07                   | 2.23                |
| Muestra-T5                  | 4.45                         | 9.23                      | 5.13                   | 2.15                |
| Muestra-T6                  | 4.45                         | 9.23                      | 5.06                   | 2.06                |
| Muestra-T7                  | 4.45                         | 9.23                      | 5.12                   | 2.25                |
| Muestra-T8                  | 4.45                         | 9.23                      | 5.65                   | 2.68                |
| Muestra-T9                  | 4.45                         | 9.23                      | 4.96                   | 2.48                |
| Muestra-T10                 | 4.45                         | 9.23                      | 4.92                   | 1.92                |
| Muestra-T11                 | 4.45                         | 9.22                      | 5.81                   | 2.35                |
| Muestra-T12                 | 4.45                         | 9.23                      | 5.00                   | 2.05                |
| Muestra-T13                 | 4.45                         | 9.24                      | 6.14                   | 2.46                |
| Muestra-T14                 | 4.46                         | 9.23                      | 4.98                   | 1.78                |
| Muestra-T15                 | 4.45                         | 9.22                      | 5.65                   | 2.40                |



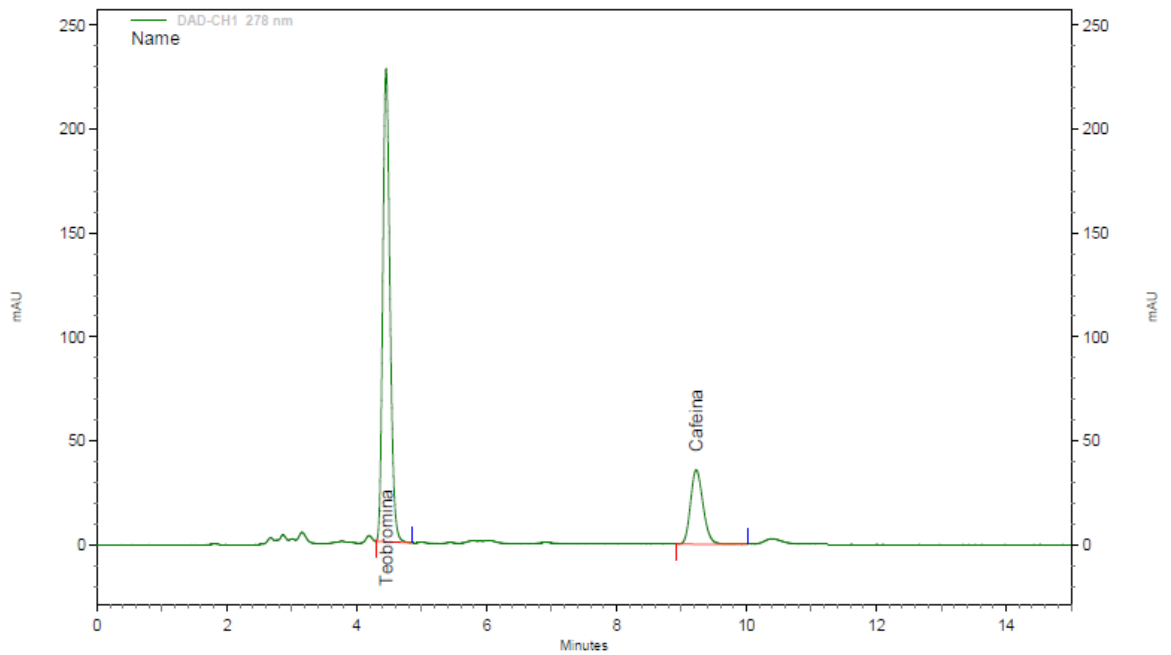
**Anexo 2.2.** Cromatogramas de las moléculas de teobromina y cafeína de la muestra (T1) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).



**DAD-CH1 278 nm  
Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration<br/>(g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|------------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 7179845     | 5.04                               |
| 2             | Cafeina     | 9.233                 | 2052903     | 2.47                               |
| <b>Totals</b> |             |                       | 9232748     | 7.51                               |

**Anexo 2.3.** Cromatogramas de las moléculas de teobromina y cafeína de la muestra (T2) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).

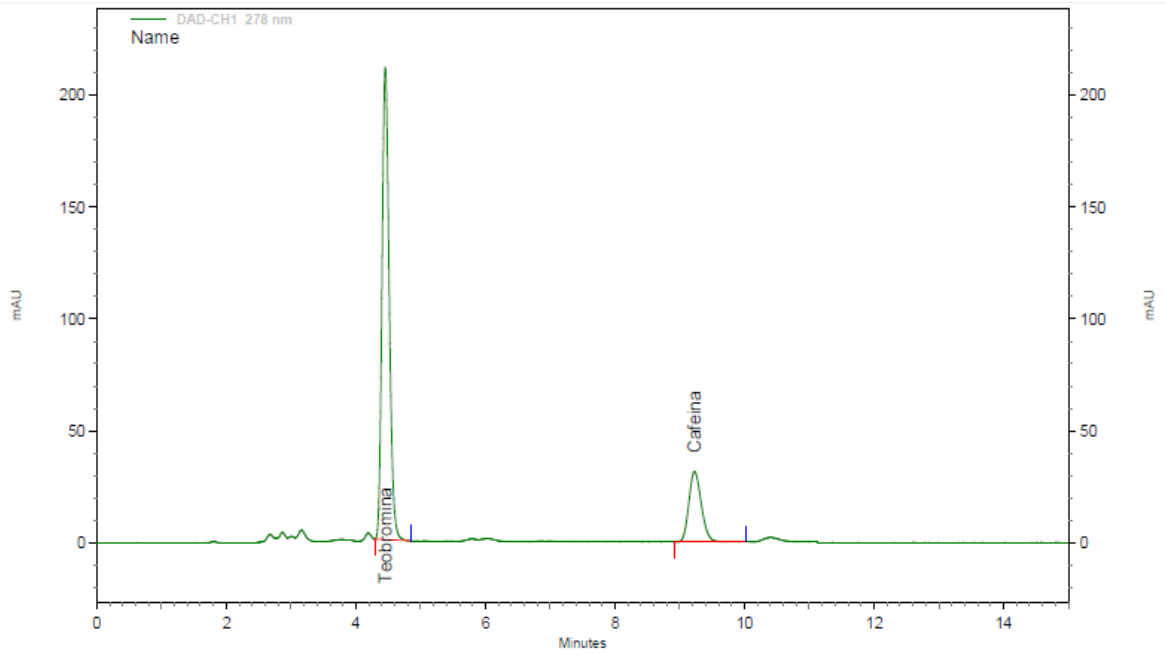


**DAD-CH1 278 nm**

**Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 7024742     | <b>4.93</b>                    |
| 2             | Cafeina     | 9.227                 | 1916620     | <b>2.31</b>                    |
| <b>Totals</b> |             |                       | 8941362     | <b>7.24</b>                    |

**Anexo 2.4.** Cromatogramas de las moléculas de teobromina y cafeína de la muestra (T3) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).

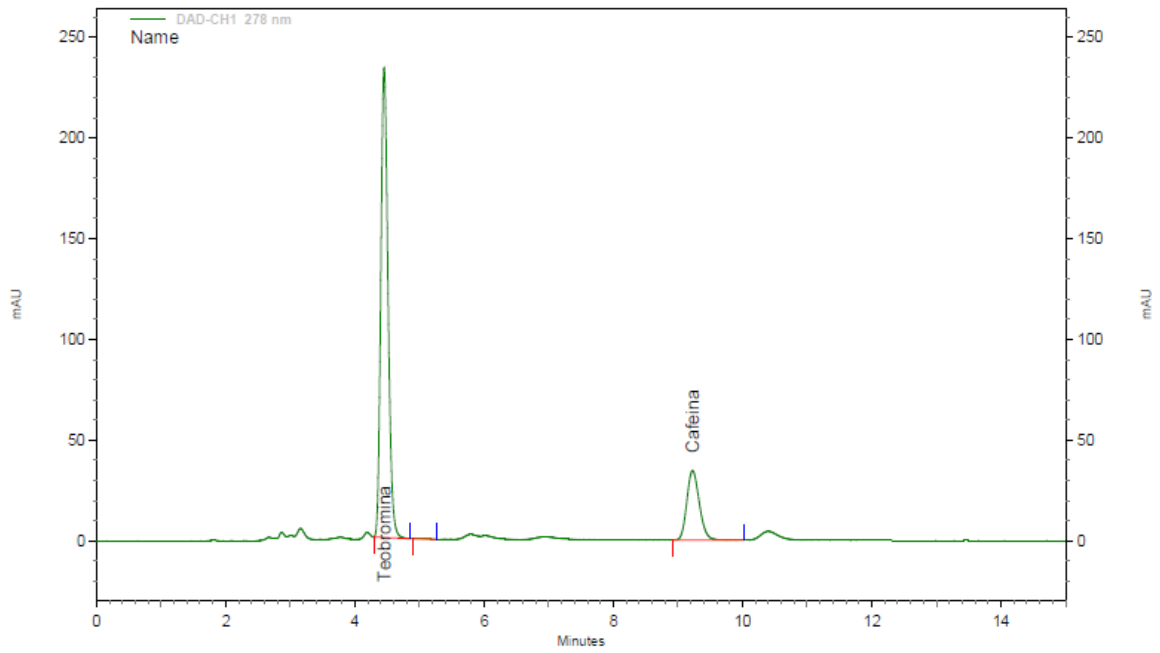


**DAD-CH1 278 nm**

**Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 6519793     | 4.58                           |
| 2             | Cafeina     | 9.227                 | 1696897     | 2.04                           |
| <b>Totals</b> |             |                       | 8216690     | 6.62                           |

**Anexo 2.5.** Cromatogramas de las moléculas de teobromina y cafeina de la muestra (T4) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).

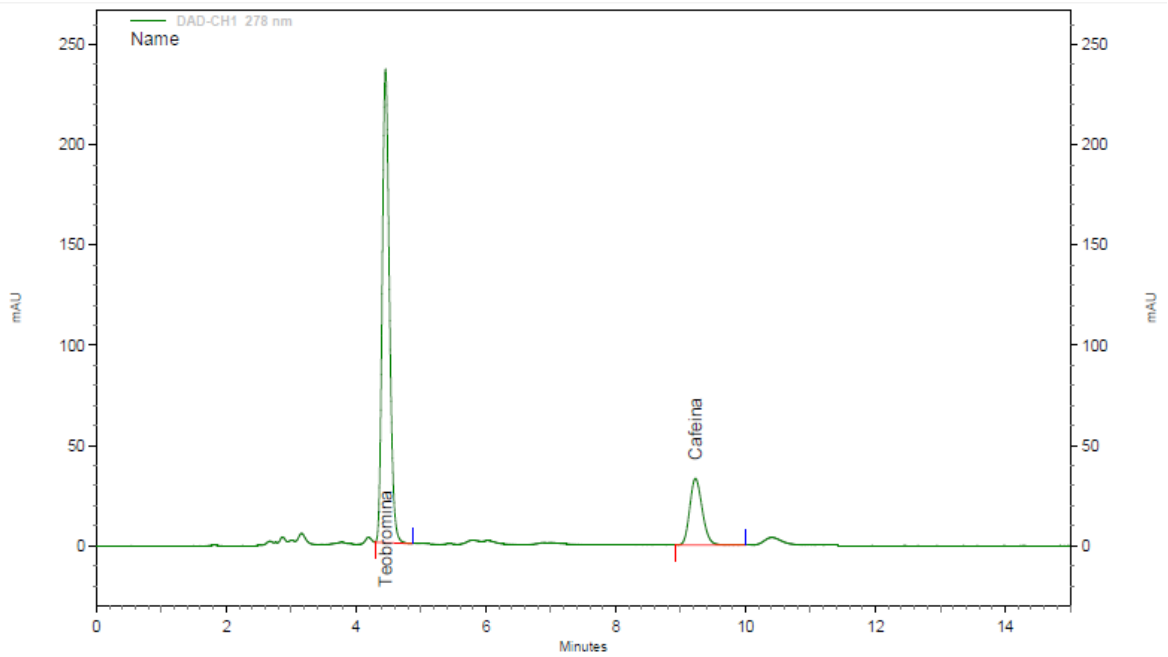


**DAD-CH1 278 nm**

**Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 7226403     | 5.07                           |
| 3             | Cafeina     | 9.227                 | 1852056     | 2.23                           |
| <b>Totals</b> |             |                       | 9078459     | 7.30                           |

**Anexo 2.6.** Cromatogramas de las moléculas de teobromina y cafeína de la muestra (T5) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).

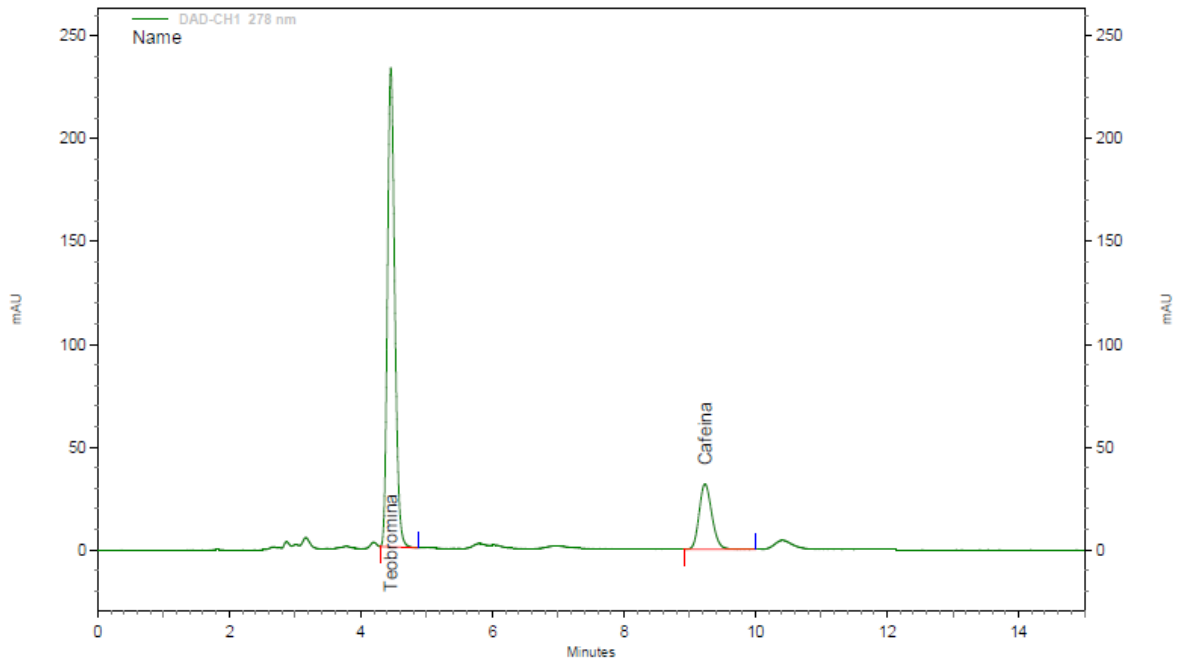


**DAD-CH1 278 nm**

**Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 7305437     | 5.13                           |
| 2             | Cafeina     | 9.227                 | 1784016     | 2.15                           |
| <b>Totals</b> |             |                       | 9089453     | 7.28                           |

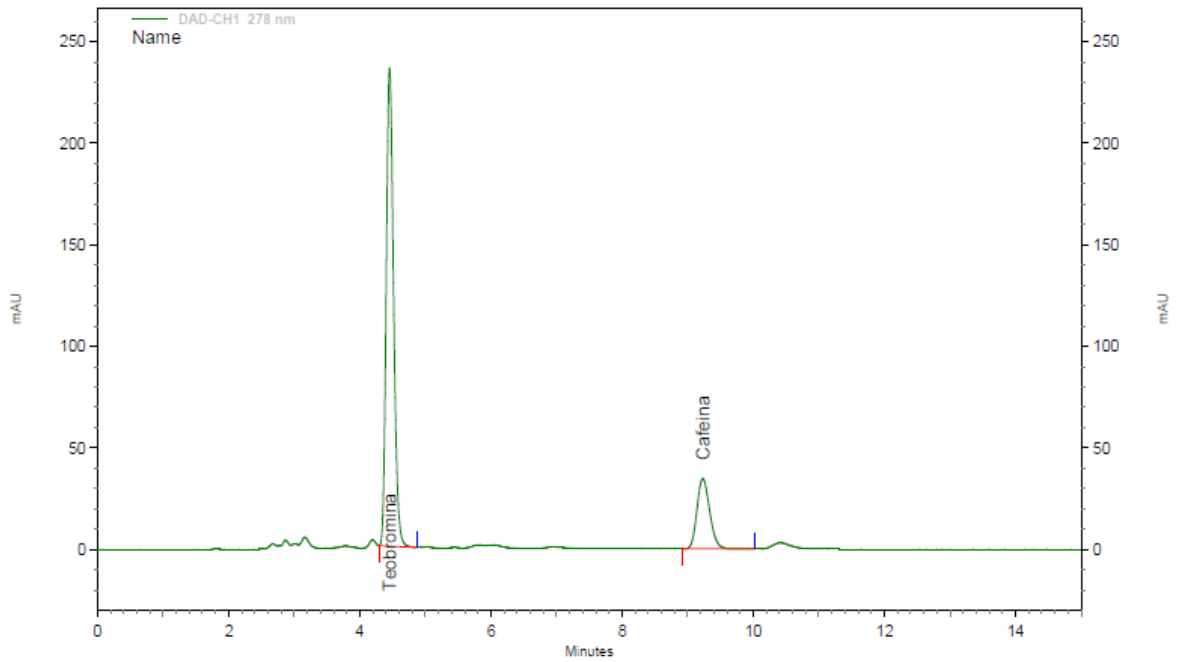
**Anexo 2.7.** Cromatogramas de las moléculas de teobromina y cafeina de la muestra (T6) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).



**DAD-CHI 278 nm  
Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i>    | <i>Concentration<br/>(g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|----------------|------------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 7208814        | 5.06                               |
| 2             | Cafeina     | 9.233                 | 1706460        | 2.06                               |
| <b>Totals</b> |             |                       | <b>8915274</b> | <b>7.11</b>                        |

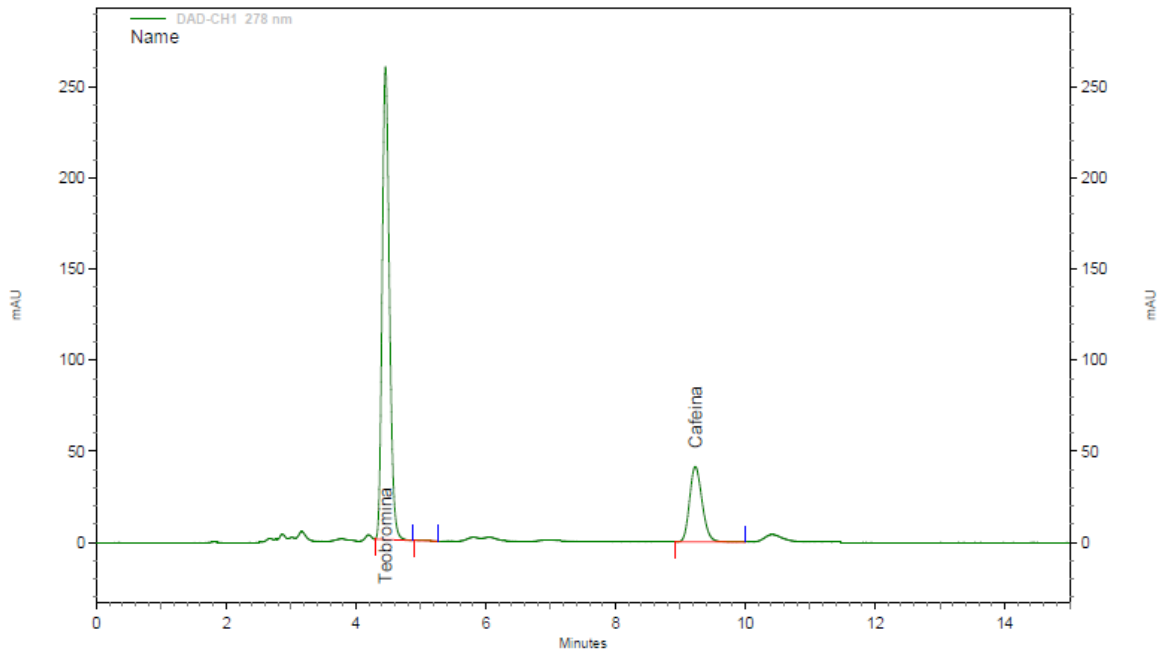
**Anexo 2.8.** Cromatogramas de las moléculas de teobromina y cafeína de la muestra (T7) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).



**DAD-CHI 278 nm  
Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration<br/>(g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|------------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 7294597     | 5.12                               |
| 2             | Cafeína     | 9.233                 | 1870536     | 2.25                               |
| <b>Totals</b> |             |                       | 9165133     | 7.37                               |

**Anexo 2.9.** Cromatogramas de las moléculas de teobromina y cafeina de la muestra (T8) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).



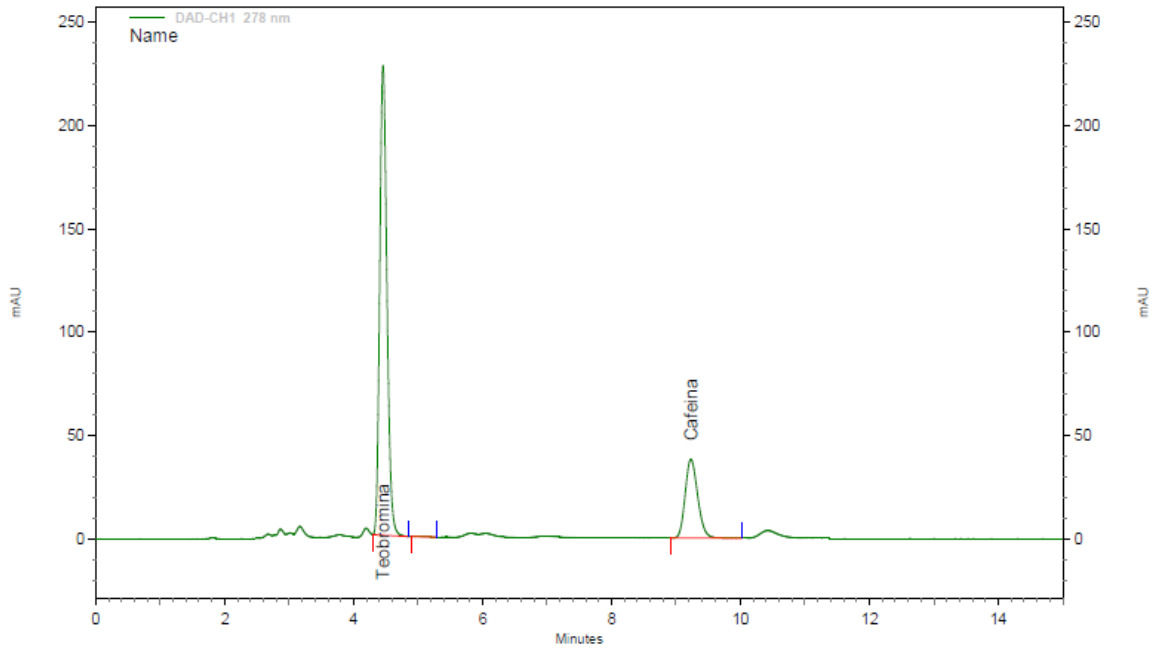
**DAD-CH1 278 nm**

**Results**

| <i>PK #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 8051442     | 5.65                           |
| 3             | Cafeina     | 9.233                 | 2222775     | 2.68                           |
| <b>Totals</b> |             |                       | 10274217    | 8.33                           |



**Anexo 2.10.** Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T9) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).

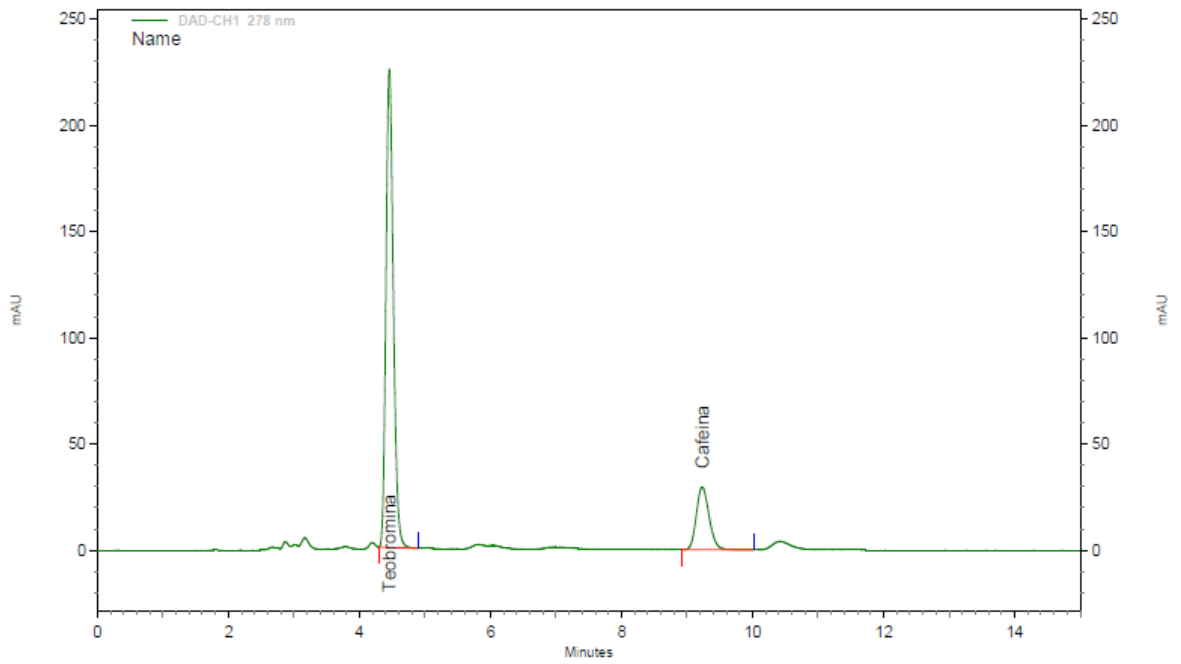


**DAD-CH1 278 nm**

**Results**

| <i>PK #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 7073801     | 4.96                           |
| 3             | Cafeina     | 9.233                 | 2063533     | 2.48                           |
| <b>Totals</b> |             |                       | 9137334     | 7.45                           |

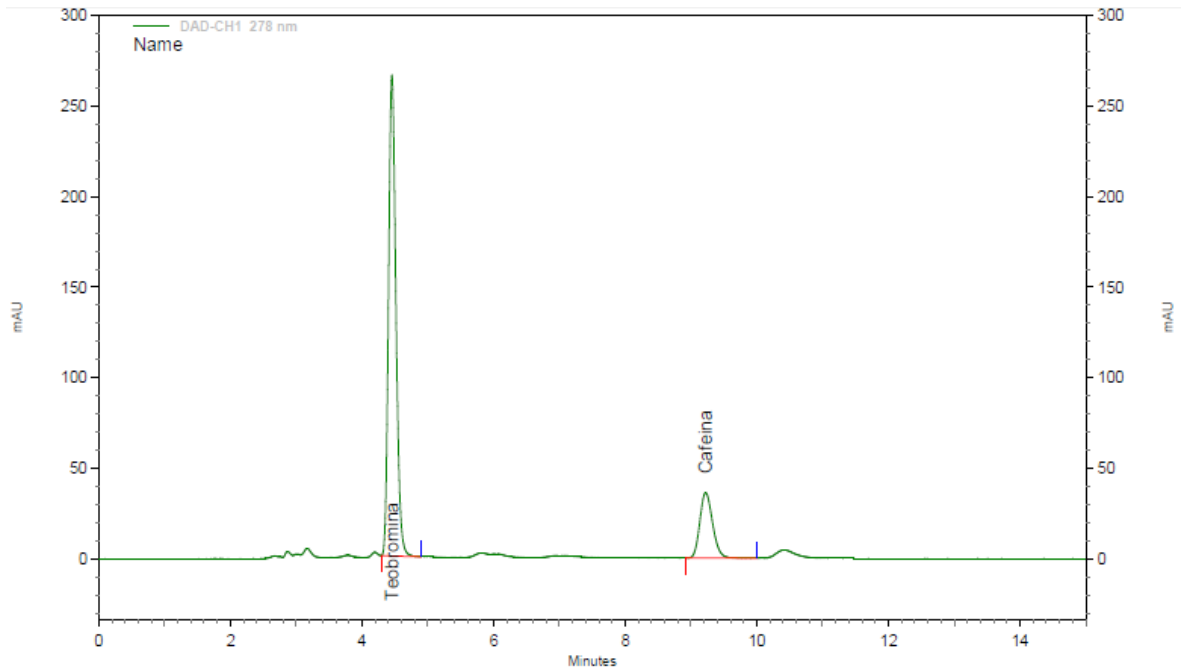
**Anexo 2.11.** Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T10) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).



**DAD-CHI 278 nm  
Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration<br/>(g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|------------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 7011097     | 4.92                               |
| 2             | Cafeina     | 9.233                 | 1597044     | 1.92                               |
| <b>Totals</b> |             |                       | 8608141     | 6.85                               |

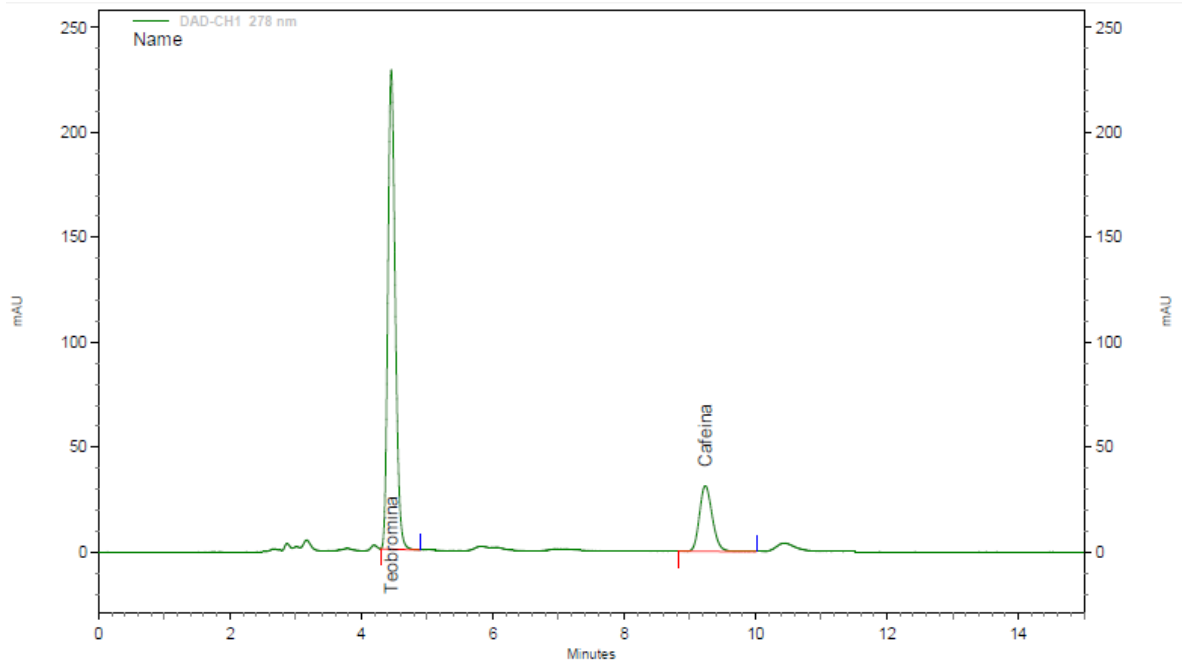
**Anexo 2.12.** Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T11) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).



**DAD-CHI 278 nm  
Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 8280748     | 5.81                           |
| 2             | Cafeina     | 9.220                 | 1952400     | 2.35                           |
| <b>Totals</b> |             |                       | 10233148    | 8.16                           |

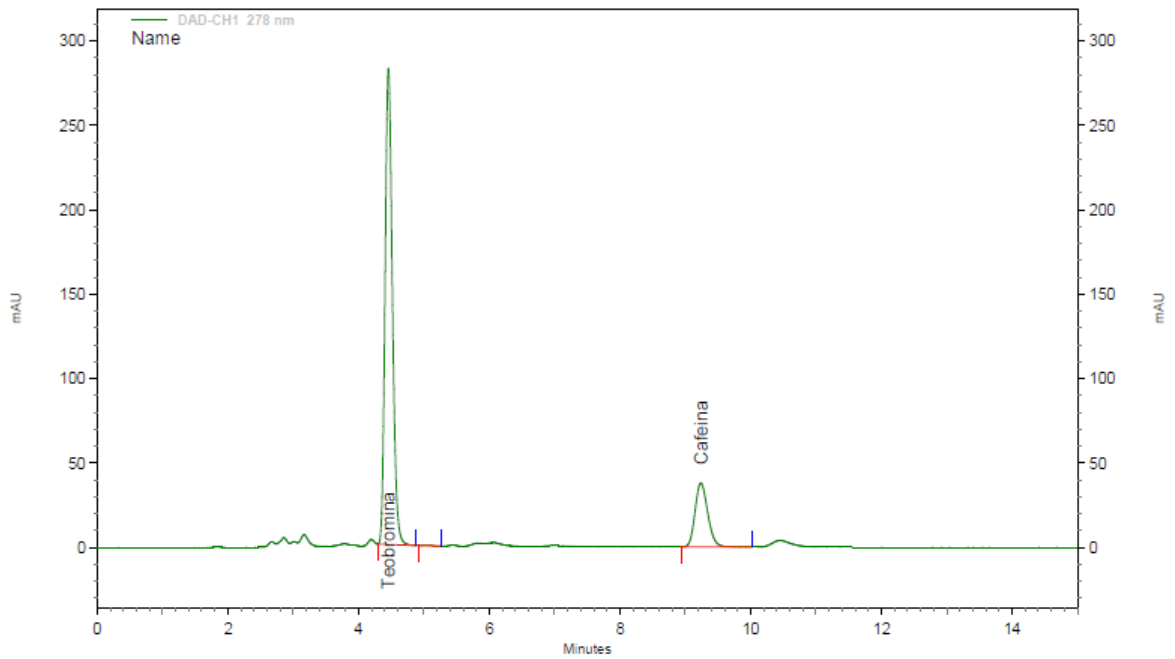
**Anexo 2.13.** Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T12) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).



**DAD-CHI 278 nm  
Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i>    | <i>Concentration<br/>(g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|----------------|------------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 7117979        | 5.00                               |
| 2             | Cafeina     | 9.233                 | 1700672        | 2.05                               |
| <b>Totals</b> |             |                       | <b>8818651</b> | <b>7.04</b>                        |

**Anexo 2.14.** Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T13) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).

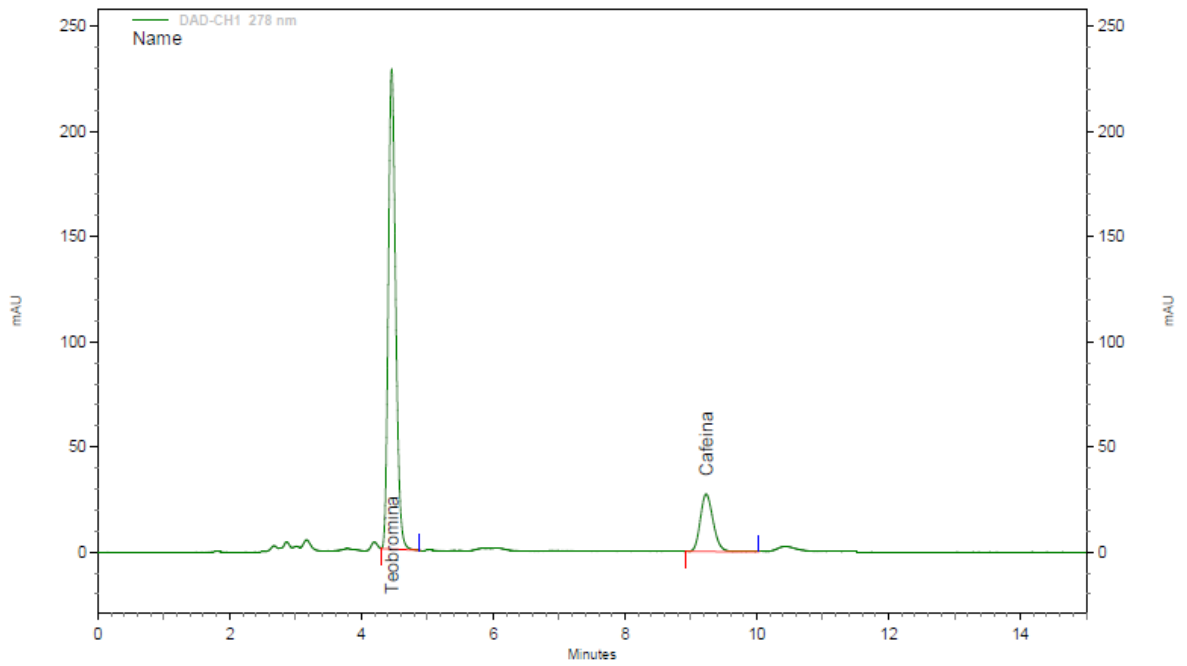


**DAD-CH1 278 nm**

**Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 8755454     | 6.14                           |
| 3             | Cafeina     | 9.240                 | 2040610     | 2.46                           |
| <b>Totals</b> |             |                       | 10796064    | 8.60                           |

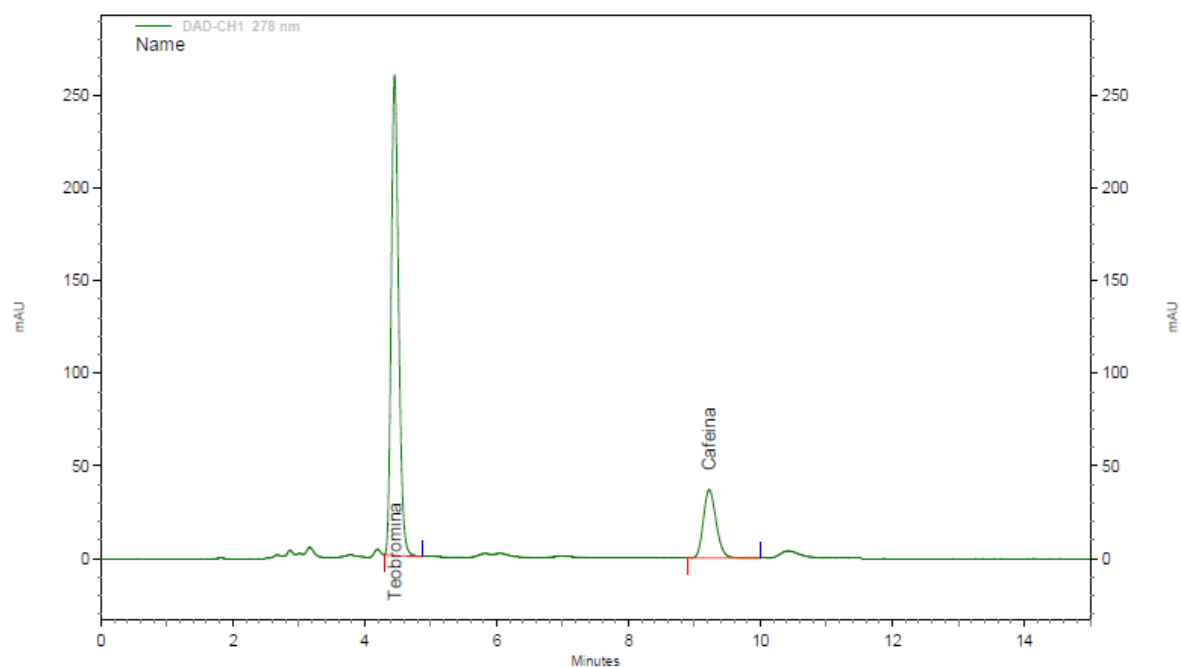
**Anexo 2.15.** Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T14) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).



**DAD-CHI 278 nm  
Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i>    | <i>Concentration<br/>(g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|----------------|------------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.460                 | 7092027        | <b>4.98</b>                        |
| 2             | Cafeina     | 9.233                 | 1475918        | <b>1.78</b>                        |
| <b>Totals</b> |             |                       | <b>8567945</b> | <b>6.76</b>                        |

**Anexo 2.16.** Cromatogramas de las moléculas de theobromina y cafeina de la muestra (T15) del cacao nativo fino de aroma analizados en (HPLC).



**DAD-CH1 278 nm**

**Results**

| <i>Pk #</i>   | <i>Name</i> | <i>Retention Time</i> | <i>Area</i> | <i>Concentration (g/100 g)</i> |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1             | Teobromina  | 4.453                 | 8052047     | 5.65                           |
| 2             | Cafeina     | 9.220                 | 1992425     | 2.40                           |
| <b>Totals</b> |             |                       | 10044472    | 8.05                           |

**Anexo 3.** Ficha estandarizada para la evaluación sensorial de muestras de cacao.



**ANÁLISIS SENSORIAL DE CACAO**

Ficha de Catación

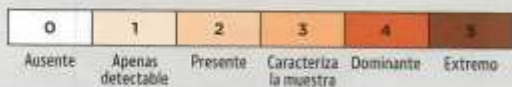
MUESTRA \_\_\_\_\_

CATADOR \_\_\_\_\_

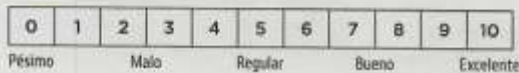
FECHA \_\_\_\_\_

| CATEGORÍAS           |                                                                  | INTENSIDAD | DESCRIPTORES             | CALIDAD (0-10) | PUNTAJE |
|----------------------|------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------|----------------|---------|
| <b>Aroma</b>         |                                                                  |            |                          |                | x1 =    |
| <b>Acidez</b>        |                                                                  |            |                          |                | x1 =    |
| <b>Amargor</b>       | INTENSIDAD<br>0 a 2.5: ≤ 5 en calidad<br>2.5 a 5: ≤ 5 en calidad |            |                          |                | x1 =    |
| <b>Astringencia</b>  |                                                                  |            |                          |                | x1 =    |
| <b>Defectos</b>      |                                                                  |            |                          |                | x2 =    |
| <b>Sabor</b>         | Cocoa/Cacao                                                      |            |                          | x2 =           |         |
|                      | Dulce                                                            |            |                          |                |         |
|                      | Nuez                                                             |            |                          |                |         |
|                      | Frutas secas                                                     |            |                          |                |         |
|                      | Frutas frescas                                                   |            |                          |                |         |
|                      | Floral                                                           |            |                          |                |         |
|                      | Especias                                                         |            |                          |                |         |
|                      | Otros                                                            |            |                          |                |         |
| <b>Pos gusto</b>     |                                                                  |            |                          |                | x1 =    |
| <b>COMENTARIOS:</b>  |                                                                  |            | <b>PUNTOS DE CATADOR</b> |                | x1 =    |
| <b>PUNTAJE FINAL</b> |                                                                  |            |                          |                |         |

**ESCALA DE INTENSIDAD**



**ESCALA DE CALIDAD**



**TIPS PARA EVALUAR CALIDAD EN DEFECTOS**

**Nombrar el defecto:**  
Una reducción de puntos en calidad debe ser justificado en Descriptores.

**Relación inversa:**  
Entre más intenso el sabor defectuoso, se reduce el puntaje en calidad.



Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual. No se permite un uso comercial de la obra ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.



#### Anexo 4. Validación del instrumento de evaluación de la sostenibilidad del procesamiento de cacao.

##### FORMATO DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN.

TITULO DEL PROYECTO: Estandarización de la fermentación de cacao (*Theobroma cacao*) nativo fino de aroma para la sostenibilidad de su procesamiento en la provincia de Utcubamba, Amazonas.

Cuestionario: Encuesta a los trabajadores de CEPROA, encargados del proceso pos cosecha fermentación del cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas.

Nombre del tesista: Ing. Diner Mori Mestanza

Instrucciones: Determinar si el instrumento de medición, reúne los indicadores mencionados y evaluar si ha sido excelente, muy bueno, bueno, regular o deficiente, colocando un aspa (X) en el casillero correspondiente.

| N° | Indicadores          | Definición                                                                                                          | Deficiente<br>00 - 20% | Regular<br>21 - 40% | Buena<br>41 - 60% | Muy buena<br>61 - 80% | Excelente<br>81 - 100% | Observaciones |
|----|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|---------------|
| 1  | Claridad y precisión | Las preguntas están redactadas en forma clara y precisa, sin ambigüedades                                           |                        |                     |                   |                       | X                      |               |
| 2  | Coherencia           | Las preguntas guardan relación con la hipótesis, las variables e indicadores del proyecto.                          |                        |                     |                   |                       | X                      |               |
| 3  | Validez              | Las preguntas han sido redactadas teniendo en cuenta la validez de contenido y criterio.                            |                        |                     |                   |                       | X                      |               |
| 4  | Organización         | La estructura es adecuada. Comprende la presentación, agradecimiento, datos demográficos, instrucciones.            |                        |                     |                   |                       | X                      |               |
| 5  | Confiabilidad        | El instrumento es confiable porque se aplicó el test-retest (piloto)                                                |                        |                     |                   |                       | X                      |               |
| 6  | Control de sesgo     | Presenta algunas preguntas distractoras para controlar la contaminación de las respuestas.                          |                        |                     |                   |                       | X                      |               |
| 7  | Orden                | Las preguntas y reactivos han sido redactadas utilizando la técnica de lo general a lo particular.                  |                        |                     |                   |                       | X                      |               |
| 8  | Marco de referencia  | Las preguntas han sido redactadas de acuerdo al marco de referencia del encuestado: lenguaje, nivel de información. |                        |                     |                   |                       | X                      |               |
| 9  | Extensión            | El número de preguntas no es excesivo y está en relación a las variables, dimensiones e indicadores del problema.   |                        |                     |                   |                       | X                      |               |
| 10 | Inocuidad            | Las preguntas no constituyen riesgo para el encuestado.                                                             |                        |                     |                   |                       | X                      |               |

Observaciones.

En consecuencia el instrumento puede ser aplicado.

  
Ligia Magali García Rosero, PhD

  
Mcs. Segundo Grimaldo Chávez Quintana

Chachapoyas, junio 2018.  
  
Msc. Armstrong Barnard Fernández Jeri

## INFORME DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

- I. **TITULO DEL PROYECTO:** Estandarización de la fermentación de cacao (*Theobroma cacao*) nativo fino de aroma para la sostenibilidad de su procesamiento en la provincia de Utcubamba, Amazonas.
- II. **NOMBRE DEL INSTRUMENTO:** Encuesta a los trabajadores de CEPROA, encargados del proceso pos cosecha fermentación del cacao nativo fino de aroma de la región Amazonas.
- III. **NOMBRE DEL TESISISTA:** Ing. Diner Mori Mestanza
- IV. **DECISIÓN:** Después de haber revisado el instrumento de recolección de datos, los que suscribimos, procedemos a validarlo teniendo en cuenta su forma, estructura y profundidad; por tanto, permitirá recoger información concreta y real de la variable en estudio, coligiendo su pertinencia y utilidad.  
**OBSERVACIONES.** \_\_\_\_\_

**APROBADO:**


SI

NO

Chachapoyas, junio 2018.

  
Ligia Magali García Rosero, PhD

  
Mcs. Segundo Grimaldo Chávez Quintana

  
Msc. Armstrong Barnard Fernández Jeri

**Anexo 5.** Instrumento de evaluación de la sostenibilidad del proceso pos cosecha.

Encuesta sobre indicadores de sostenibilidad a los trabajadores de CEPROA, encargados del proceso pos cosecha fermentación del cacao nativo fino de aroma de la Región Amazonas.

El estudio busca conocer algunos indicadores de sostenibilidad de la etapa pos cosecha del cacao nativo fino de aroma y en forma aleatoria usted ha sido seleccionado para ser entrevistado. Por lo cual le solicito de la manera atenta, su valiosa colaboración para que nos proporcione información confiable respecto a las siguientes preguntas.

Nombre del informante.....DNI.....

Nombre del encuestador.....

Fecha de la encuesta.....

**I. CARACTERÍSTICAS PERSONALES DEL INFORMANTE.**

**1 Edad:**

- 1 <18
- 2 18-24
- 3 25-30
- 4 31-40
- 5 41-50
- 6 51-60
- 7 >60

**2. Sexo**

- 1 masculino
- 2 femenino

**3. Estado civil**

- 1 soltero
- 2 casado
- 3 conviviente
- 4 viudo
- 5 divorciado
- 6 separado

**4. Nivel de educación alcanzado**

- 1 sin nivel
- 2 inicial

- ()3 primaria incompleta
- ()4 primaria completa
- ()5 secundaria incompleta
- ()6 secundaria completa
- ()7 superior no universitario incompleto
- ()8 superior no universitario completo
- ()9 superior universitario incompleto
- ()10 superior universitario completo

**II. CARACTERÍSTICAS SOCIALES, ECONÓMICAS Y AMBIENTALES DE LA COOPERATIVA CEPROA PRODUCTORA DEL CACAO NATIVO FINO DE AROMA.**

**1 proceso de fermentación natural.**

Si (100)

No (10)

**2. proceso de fermentación controlada.**

Si (100)

No (10)

**3. Utilización de subproductos (líquidos y solidos)**

Si (100)

No (10)

**4. Tratamiento de los residuos generados en el manejo pos cosecha.**

Si (100)

No (10)

**5. fermentadores orgánicos**

Si (100)

No (10)

**6. frecuencia de remoción de la masa del cacao.**

Cada 24h (100)

Cada 48h (75)

**7. Costo / Beneficio**

Ratio costos beneficio (mayor a 1=50)

**8. Volumen de procesamiento por campaña**

Superior a 80tn (100)

Entre 70 – 80 tn (75)

Entre 60 – 70 tn (50)

Menor a 60 tn (10)

#### **9. Rendimiento calidad almendra**

Equivalente a 1/3 del peso fresco (100)

Menor a 1/3 del peso fresco (10)

#### **10 Porcentaje de actividades económicas adicionales al manejo pos cosecha en la cooperativa CEPROA.**

Más de 80% (100)

De 60% a 80% (50)

Menos de 40% (25)

#### **11. Número de personas dependientes de la actividad de pos cosecha.**

Más de 4 dependientes (5)

Entre 3 a 2 dependientes (30)

Menos de 2 dependientes (50)

#### **12 Riesgo económico por el manejo pos cosecha.**

Calidad de las almendras superior a 95% (100)

Calidad de las almendras equivalente a 90 a 95% (75)

Calidad de las almendras equivalente a 80 a 90% (50)

Calidad de las almendras equivalente a 70 a 80% (25)

#### **13 Vivienda cerca de la cooperativa CEPROA**

Dentro del casco urbano (100)

Fuera del casco urbano (10)

#### **14. Edad del trabajador.**

Entre 18 – 50 años (100)

Entre 50 – 55 años (75)

Mayores a 55 años (50)

#### **15. Instrucción formal de los trabajadores.**

Grado y posgrado (100)

Secundaria (50)

Primaria (10)

#### **16. Capacitación en fermentación de cacao**

Si (100)

No (10)

**17. Integración de la mujer en el manejo pos cosecha del cacao.**

Mayor al 50% de trabajadores (100)

Equivalente a un 40% a 49% de trabajadores (75)

Equivalente a un 20% a 39% de trabajadores (50)

Menor a un 20% (10)

**18. Ingresos diarios por el manejo pos cosecha del cacao.**

Mayor igual a S/.50.00 (100)

Entre S/.40.00 a S/.50.00 (75)

Menor a S/.40.00 (50)

**Anexo 6. Panel fotográfico.**

