

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



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

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

**IDENTIFICACIÓN E INTERACCIÓN DE COMPUESTOS
AROMÁTICOS ESPECÍFICOS DE CACAO CRIOLLO
(*Theobroma cacao* L.) DURANTE LA FERMENTACIÓN
ESPONTÁNEA**

Autor: Bach. Pizarro Diaz Rosa Nardy

Asesor: Ms. Efraín Manuelito Castro Alayo

Co-Asesora: Ms. Aline Camila Caetano

Registro(.....)

CHACHAPOYAS - PERÚ

2022

DEDICATORIA

A DIOS:

Por permitirme ser parte de esta realidad, de una hermosa etapa universitaria y nunca abandonarme aun cuando las circunstancias se muestran difíciles y el tiempo para mí parece terminarse, por llenarme de esperanza y convencerme día a día que solo él tiene el poder de determinar nuestros propósitos, por permitirme compartir mi tiempo con personas de gran saber e imprescindibles.

A M PADRES:

MARÍA IRAELITA DÍAZ DE PIZARRO, desde siempre actuaste con certeza, por tu paciencia y tu amor. **JOSÉ REUDÓRICO PIZARRO COLLANTES** por ser mi mejor maestro, eres ese libro abierto con respuestas a mis dudas sobre esta dura realidad, ¡Sí! Los dedico a ustedes por ayudarme a crecer, porque tuvieron que arrancarse las plumas para que yo pudiese volar.

A MIS HERMANOS:

GERSON PIZARRO DIAZ y **ELIANITH PIZARRO DIAZ**, que con su constancia me han ayudado en cada batalla, para lograr esta victoria.

A MI ABUELITA:

JULIA NÉLIDA, por ser mi inspiración, mujer de garras, mujer de coraje, solo Dios es testigo de las incontables veces que me encomiendas en tus oraciones.

Lo que Dios me dio es demasiado especial y no me alcanzará la vida para expresar mi amor y gratitud a mi Madre, mi Padre, mis 2 hermanos y a ti Abuelita, por llenarme de coraje, principios y valores, por compartir conmigo cada logro y cada aliento en momentos cruciales, pues en estas circunstancias me enseñaron el valor de vivir, no importa el tiempo porque si lo haces bien, vivir una vez es suficiente.

Rosa Nardý Pizarro Diaz

AGRADECIMIENTO

Agradecer a mi Alma Mater **UNTRM-A** que fue durante 5 años mi segunda familia, a mi **FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS (FICA)** y todo su componente de profesionales que aportaron a formarme, profesional y humano dispuesto a solucionar las necesidades de la sociedad.

Un sincero agradecimiento está dirigido a mis asesores al **Ms. EFRAÍN MANUELITO CASTRO ALAYO** y **Ms. ALINE CAMILA CAETANO**, agradecimiento y admiración porque son grandes profesionales, gracias por su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración, lo que permitió el desarrollo de este trabajo de investigación.

Asimismo, quiero agradecer a la Sra. **MARLENY ANGELES TRAUCO** por su constancia y paciencia durante los años de universidad, más que una excelente profesional es una amiga a corazón abierto que sabe aplacar a los conocimientos que uno necesita en el mundo del laboratorio de Tecnología.

A **Yalta Chappa M.; Ortiz Vásquez R.; Rojas Reap Y.; Pilco Acosta M.; Mori Culqui P.; Llanca Jaramillo J.** Esto es el resultado de su incondicional apoyo.

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

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

Rector

Dr. MIGUEL ANGEL BARRENA GURBILLÓN

Vicerrector Académico

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMAN

Vicerrectora de Investigación

Dr. ERICK ALDO AUQUIÑIVIN SILVA

Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

**VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO
PROFESIONAL**

El que suscribe el presente, docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, hace constar que ha asesorado la realización de la tesis titulada “**Identificación e interacción de compuestos aromáticos específicos de cacao criollo (*Theobroma cacao L.*), durante la fermentación espontánea**”; de la Bachiller **Rosa Nardy Pizarro Diaz**, de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, de esta Casa Superior de Estudios.



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

Chachapoyas, 16 de noviembre del 2021

.....
Ms. Efraín Manuelito Castro Alayo

Asesor de Tesis

**VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO
PROFESIONAL**



El que suscribe el presente, docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, hace constar que ha asesorado la realización de la tesis titulada “**Identificación e interacción de compuestos aromáticos específicos de cacao criollo (*Theobroma cacao L.*), durante la fermentación espontánea**”; de la Bachiller **Rosa Nardy Pizarro Diaz**, de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, de esta Casa Superior de Estudios.

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

Chachapoyas, 16 de noviembre del 2021


Aline Camila Caetano

.....

Ms. Aline Camila Caetano

Co-Asesor de Tesis

JURADO EVALUADOR



MgSc. Armstrong Barnard Fernández Jeri

PRESIDENTE



Mg. Grobert Amado Guadalupe Chuqui

SECRETARIO



Ing. Guillermo Idrogo Vásquez

VOCAL

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Yo, **Rosa Nardy Pizarro Diaz**, con **D.N.I. No 70304461**, Domiciliado en Jr. Piura 209 – Chachapoyas, egresado de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, con correo institucional 7030446113@untrm.edu.pe.

Declaro Bajo Juramento

Que:

1. Soy autor de la tesis titulada:

“Identificación e interacción de compuestos aromáticos específicos de cacao criollo (*Theobroma cacao L.*), durante la fermentación espontánea”, que presento para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, y para su realización se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.

4. La tesis presentada no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. La información presentada es real y no ha sido falsificada, ni duplicada, ni copiada.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la Tesis para obtener el Título Profesional, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivos de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumpliendo de lo declarado o las que encontraren causas en el contenido de la tesis. De identificarse fraude, piratería, plagio o falsificación de la tesis para obtener el Título Profesional; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas, 08 de diciembre del 2021


Firma del tesista

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

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

ANEXO 3-O

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

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

"Identificación e Interacción de compuestos aromáticos específicos de cacao
Giollo (Theobroma cacao L.), durante la fermentación espontánea"

presentada por el estudiante ()/egresado (X) Rosa Nardy Pizarro Diaz

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

con correo electrónico institucional 7030446113@untrm.edu.pe

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

- La citada Tesis tiene 18 % 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 2021

SECRETARIO

PRESIDENTE

VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE DEVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL



ANEXO 3-Q

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 22 de diciembre del año 2021 siendo las 18:00 horas, el aspirante: Rosa Nardy Pizarro Díaz, defiende en sesión pública presencial () / a distancia (X) la Tesis titulada: "Identificación e interacción de compuestos aromáticos específicos de cacao Criollo (Theobroma cacao L.), durante la fermentación espontánea", teniendo como asesor a Ing MSc E. Manuelito Castro A.; Aline Camila C., para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: MgSc. Armstrong Barnard Fernández Jeri.
Secretario: Mg. Grobert Amado Guadalupe Chuqui.
Vocal: Ing. Guillermo Idrogo Vásquez.

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

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

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

Aprobado () 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 19:10 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

SECRETARIO

PRESIDENTE

VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	iv
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL.....	v
VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL.....	vi
JURADO EVALUADOR.....	vii
DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL	viii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	ix
ACTA DE DEVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL.....	x
ÍNDICE GENERAL	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	19
II. MATERIAL Y MÉTODOS	21
2.1. Lugar de procedencia	21
2.2. Material de estudio.....	22
2.3. Equipos y reactivos	22
2.4. Diseño experimental.....	23
2.5. Métodos y procedimientos.....	23
2.6. Análisis de datos	25

III. RESULTADOS	26
IV. DISCUSIÓN	36
V. CONCLUSIONES	41
VI. RECOMENDACIONES	42
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
VIII. ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	23
<i>Diseño de estudio</i>	23
Tabla 2.	27
<i>Compuestos volátiles en la pulpa del cacao Criollo en función al tiempo de fermentación espontanea</i>	27
Tabla 3.	28
<i>Compuestos volátiles en el grano del cacao Criollo en función al tiempo de fermentación espontanea.</i>	28
Tabla 4.	28
<i>Compuestos volátiles identificados en granos frescos y durante la fermentación espontánea de muestras de granos de cacao Criollo.</i>	28
Tabla 5.	46
<i>Valores presentados de Oxígeno disuelto (OD), grado de acidez (pH), temperatura, en función al tiempo de fermentación de cacao Criollo.</i>	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	21
<i>Lugar de procedencia del material de estudio del cacao Criollo</i>	21
Figura 2	26
<i>Evolución de los indicadores de fermentación espontánea de granos de cacao Criollo, comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto</i>	26
Figura 3	27
<i>Índice de fermentación</i>	27
Figura 4	31
<i>Mapa de calor de los compuestos volátiles encontrados en la pulpa durante la fermentación espontánea del cacao Criollo</i>	31
Figura 5	32
<i>Mapa de calor de los compuestos volátiles encontrados en el grano durante la fermentación espontánea del cacao Criollo</i>	32
Figura 6	33
<i>Análisis de componentes principales de los compuestos volátiles encontrados en la pulpa (b) durante la fermentación espontánea del cacao Criollo</i>	33
Figura 7	34
<i>Análisis de componentes principales de los compuestos volátiles encontrados en el grano (b) durante la fermentación espontánea del cacao Criollo</i>	34
Figura 8	35
<i>Dinámica de los principales compuestos volátiles encontrados en pulpa y grano durante la fermentación espontánea del cacao Criollo</i>	35
Figura 9	48
<i>Comportamiento estadístico de oxígeno disuelto durante la fermentación espontánea de cacao Criollo</i>	48
Figura 10	48
<i>Comportamiento estadístico de pH. durante la fermentación espontánea de cacao Criollo</i>	48
Figura 11	49
<i>Comportamiento estadístico de temperatura durante la fermentación espontánea de cacao Criollo</i>	49

Figura 12.	49
<i>Extracción de muestras en fermentación para la medición de pH, oxígeno disuelto y temperatura.</i>	49
Figura 13.	50
<i>Volteo de cajones cada 24 horas.</i>	50
Figura 14.	50
<i>Retirada de granos de cacao Criollo del congelador.</i>	50
Figura 15.	51
<i>Granos de cacao Criollo en sus tres repeticiones.</i>	51
Figura 16.	51
<i>Separación la pulpa del grano de cacao Criollo.</i>	51
Figura 17.	52
<i>Trituración de grano de cacao en el mortero.</i>	52
Figura 18.	52
<i>Pesado de la pulpa y del grano triturado en la balanza analítica.</i>	52
Figura 19.	53
<i>Incorporación de la pulpa pesada (5.7g) en el vial.</i>	53
Figura 20.	53
<i>Incorporación del grano triturado pesado (5.7g) en el vial.</i>	53
Figura 21.	54
<i>Asignación de código a cada vial.</i>	54
Figura 22.	54
<i>Midiendo 6 ml de agua ultra pura con la pipeta graduada.</i>	54
Figura 23.	55
<i>Incorporación de a 6 ml de agua ultra pura a los viales con muestra.</i>	55
Figura 24.	55
<i>Estabilizando para el alcance de temperatura a 50 °C.</i>	55
Figura 25.	56
<i>Equilibrio de la muestra y el espacio de cabeza a 50 °C por 15 min y extracción de los compuestos volátiles por SPME por 30 minutos a misma temperatura del equilibrio.</i> ..	56
Figura 26.	56
<i>Retirada de la fibra para la inyección.</i>	56
Figura 27.	57
<i>Inyección la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo.</i>	57

Figura 28.	57
<i>Retirada de la fibra del puerto de inyección después de 5 min de desorción.</i>	57
Figura 29.	58
<i>Visualización de los cromatogramas en el software MassHunter Data Analysis.</i>	58

RESUMEN

El cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) es de alta calidad y reconocido a nivel mundial, se utiliza para elaborar chocolates finos. La mayor cantidad de compuestos aromáticos se forman durante la fermentación; por lo que, es la etapa más importante del proceso. Esta investigación tuvo como objetivo identificar y estudiar la interacción de compuestos aromáticos específicos (CAE) de cacao Criollo en pulpa y grano; generados durante fermentación espontánea. Los granos fueron monitoreados cada 12 horas durante 7 días, obteniendo 16 muestras con tres repeticiones (Tcoco, T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14). Los CAE fueron identificados mediante microextracción en fase sólida–cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (SPME-GCMS). El análisis de componentes principales y mapa de calor permitió agrupar los CAE de acuerdo con el tiempo de fermentación, encontrando que los CAE responsables de los aromas agradables (floral, cítrico, madera, rosas, miel, dulce, chocolate) se generan en los primeros 4 días de fermentación y después de los 5 días predomina la presencia de los compuestos responsables de aromas desagradables para la calidad del grano (rancio, oxido). Se concluye que 4 días de fermentación son suficientes para producir granos de cacao Criollo de calidad aromática adecuada.

Palabras clave: *Cacao Criollo; Compuestos aromáticos específicos; Fermentación espontanea; SPME-GCMS.*

ABSTRACT

Criollo cocoa is of the highest quality and recognized worldwide. It is used to make fine aroma chocolates. This research aimed to identify and study the interaction of specific aromatic compounds of Criollo cacao (*Theobroma cacao* L.) generated during spontaneous fermentation. The cocoa beans were monitored every 12 hours for 7 days, obtaining 16 samples with three repetitions (Tcoco, T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14), to extract the volatile components between pulp and grain for 3 repetitions, the solid phase micro-extraction technique, SPME-HS headspace was used, the determination was made by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC-MS). Data analysis using the method of grouping precursors by families, heat map, principal component analysis (PCA) and aromatic compound dynamics showed 47 aroma precursors, 11 in fresh pulp, 17 in fermented pulp, 14 in fresh grain and 25 in fermented grain, grouped into 7 chemical families: aldehydes, ketones, esters, alcohols, acids, terpenes and terpenoids. Finally, it was concluded that the fermentation time has a significant effect on the volatile components of Criollo cocoa, obtaining pleasant aromas (floral, citrus, wood, roses, honey, sweet, chocolate) in the first 4 days of fermentation and after 5 days predominate the presence of unpleasant compounds (rancid, rust).

Keywords: *Theobroma cacao* L., aromatic compounds, spontaneous fermentation

I. INTRODUCCIÓN

Los dos principales grupos botánicos de cacao son el Criollo y el forastero. El cacao criollo representa solo el 5% de la producción mundial, tiene un aroma agradable y penetrante, por lo tanto, se considera de excelente calidad (Pallares-Pallares et al., 2016). Las semillas de cacao fino se caracterizan por sus notas de aromas peculiares, no detectables en la calidad del cacao a granel (Álvarez et al., 2016). Los aromas finos incluyen fruta (frescas y pardas, fruta madura), floral, herbal y notas a madera, nueces y caramelo así como notas balanceadas de chocolate (Khairy et al., 2018). Además, los compuestos volátiles sirven como indicadores para diferenciar el cacao fino de aroma y determinar su calidad, los compuestos 2-pentanol y β -linalool están relacionados con las notas florales y hierba limón, respectivamente. En el trabajo realizado por (Qin et al., 2017) se evaluó muestras de granos fermentados secos de cacao, encontrando mayor cantidad de 2-pentanol ($49,61 \pm 13,92 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso fresco) y β -linalool (8,21-40,63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso fresco) en Criollo que en Forastero.

Tanto la fermentación como el tostado se consideran las etapas más importantes con respecto a la formación de aroma (Portillo et al., 2009). Durante la fermentación se producen los precursores del aroma, como aminoácidos libres, péptidos de cadena corta y azúcares reductores, a partir de los cuales se sugiere que se genera el aroma típico del cacao durante el proceso de tostado posterior (Frauendorfer & Schieberle, 2008). El tostado es necesario para desarrollar el aroma, color y compuestos volátiles del chocolate (Álvarez et al., 2016).

Sobre las sustancias volátiles específicas del cacao, la evaluación sensorial del cacao tostado reveló notas de aroma a nuez más o menos pronunciadas (Voigt et al., 2018). En las almendras tostadas de cacao Criollo, los compuestos volátiles más relevantes son los que agrupados por familias de compuestos químicos, existiendo los alcoholes, pirazinas, aldehídos, ácidos y los niveles más altos según sus contenido influyen en la calidad sensorial del cacao criollo (Álvarez et al., 2016)

El cacao Criollo contiene linalool y puede aumentar hasta ocho veces más durante la fermentación, este favorece a la calidad aromática y sería responsable de sus notas florales (Afoakwa et al., 2008). (Rottiers et al., 2019) estudiaron la dinámica del sabor fino durante la fermentación mediante el análisis del azúcar, el aminoácido libre y el perfil

volátil, muestreando granos de cacao trinitarios ecuatorianos (Sacha Gold) después de 0, 18, 24, 48 y 66 h de fermentación espontánea, donde se identificaron cuarenta volátiles, incluidos 13 de tipo frutado y 12 de tipo floral, derivados de diversas vías metabólicas y se asumió que algunos volátiles finos son derivados de la pulpa (linalol, β -mirceno, acetato de 2-heptilo) o intrínsecos al grano (2-heptanol, 2-heptanona, 2-pentanol), mientras que otros se generaron durante la fermentación a través de síntesis microbiana (2-feniletanol, alcohol isoamílico). Demostrando que la fermentación del cacao es esencial para la formación de precursores de sabor y el desarrollo o la conservación de importantes compuestos de aroma fino.

II. MATERIAL Y METODOS

2.1. Lugar de procedencia

Los cocos de cacao fueron cosechados de un lote de cacao Criollo del centro poblado de Llunchicate, Distrito de Cajaruro, Provincia de Utcubamba – Región Amazonas.

Figura 1.

Lugar de procedencia del material de estudio del cacao Criollo



2.2. Material de estudio

Los granos de cacao fueron extraídos de los cocos y acondicionados a fermentación con el apoyo del equipo técnico y las instalaciones de la Cooperativa de Servicios Múltiples APROCAM, Bagua, Amazonas, Perú, en lo cual se adquirió 16 muestras de 50 g c/u con 3 repeticiones, siendo 48 unidades de estudio. Estas muestras fueron extraídas con la cooperación técnica del equipo de investigación del Instituto de Investigación, Innovación y Desarrollo para el Sector Agrario y Agroindustrial de la Región Amazonas (IIDAA), y enviadas al laboratorio de Biotecnología, de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias (FICA) de la UNTRM, para congelarlas y conservarlas en su estado de fermentación. Luego fueron llevadas al laboratorio de Investigación Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG), donde se realizaron los análisis de identificación de compuestos aromáticos específicos entre el grano y la pulpa del cacao Criollo.

2.3. Equipos y reactivos

Equipos

- Cromatógrafo de Gases Agilent Technologies 7890B Series GC System, acoplado a Detector de Masas (GC-MS), Agilent Technologies, USA.
- Balanza analítica SARTORIUS
- VWR Digital Heat Block
- Refrigeradora BORD

Solventes

- Agua Ultra Pura (0.054 uS/cm A 25°C)

2.4. Diseño experimental

Tabla 1.

Diseño de estudio

Diseño de estudio																
Muestras	Tcoco	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
t(horas)	-	-	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168

$$UE = T \times R$$

$$UE = 16 \times 3$$

$$UE = 96$$

Donde:

T = muestras

R = repeticiones

UE = unidades de estudio

t = horas de fermentación

coco = mazorca del cacao

2.5. Métodos y procedimientos

2.5.1 Indicadores de fermentación

Las almendras de cacao se colocaron en cajones de madera para iniciar su fermentación, a las 0 horas se recogió 50 g de los granos de cacao criollo colocándole en una bolsa de polipropileno y envasándole al vacío, siendo nuestra primera muestra con sus tres repeticiones respectivas, cada una con su código de identificación. Al mismo tiempo se realizó la medida de pH, cálculo de temperatura y la medición de oxígeno disuelto (OD) usando un medidor digital datalogger (Luttron, WA-2017SD, Taiwan), cuenta con 2

cable-sensores, estos se sumergieron en el cajón de los granos de cacao para determinar los parámetros de fermentación, esta información se almacena en una memoria CD con formato Excel para su posterior análisis de datos. Pasado las 12 primeras horas de fermentación se realizó el primer volteo de cajón, con la finalidad de homogenizar la fermentación con la presencia de oxígeno. Cada 12 horas hasta cumplir las 168 horas repetimos el mismo proceso.

2.5.3. Índice de fermentación

Para la determinación de índice de fermentación se utilizó el método de la Norma Técnica Peruana (NTP 208.040 2008, 2008). Se seleccionó 100 granos de cacao cada 12 horas en su tiempo de fermentación, luego se realizó cortes longitudinales a cada grano utilizando una navaja, en lo cual se hizo un análisis estricto visual de los cotiledones identificando los colores violetas y pizarrosos

$\% \text{ IF} = 100 - \text{Granos Violetas} - \text{Granos Pizarrosos}$

Grano violeta: Grano con colores violeta.

Grano pizarroso: Grano presenta colores a verdoso, crema, amarillento lo cual indica falta de fermentación

2.5.4. Preparación de muestras recolectadas

Se utilizó el método Extracción con SPME (Micro extracción en fase sólida) (Álvarez et al., 2016), modificando las proporciones de acuerdo al tamaño del vial utilizado. Se fragmentaron 5.7 gramos de cacao en grano fermentado en un mortero de porcelana y se depositaron en un vial de 20 ml, más 6 ml de agua ultra pura, los viales se cerraron herméticamente con un tabique de butilo / teflón utilizando un sellador específico.

2.5.3 Micro extracción en fase sólida (SPME), acondicionamiento de las muestras

Para el análisis, se utilizó la fibra de SPME recubierta con una película de Divinilbenceno, Carboxano y Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) con un diámetro exterior de 50/30 μm que fue acondicionada en el inyector del cromatógrafo a 270 °C durante 30 min. La muestra fue sometida a un termo bloque a temperatura de 50 °C por 15 min para el

equilibrio del espacio de cabeza y la muestra en el vial. Luego se expuso la fibra al espacio de cabeza por 30 min a misma temperatura, según (Álvarez et al., 2016) con algunas modificaciones.

2.5.4 Identificación de compuestos aromáticos específicos por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC-MS)

La separación de los compuestos aromáticos específicos se ejecutó con un cromatógrafo de gases Agilent 7890B Serie II acoplado a detector de masas MSD 5977B equipado con una columna capilar DB-5MS UI (60 m x 0.25 mm x 1.0 µm). La temperatura del horno se programó a 50°C/5 min; 4°C/min hasta 250 °C, siendo el tiempo de corrida 55 min. El gas portador fue el helio con velocidad de flujo de 1.1 mL/min. La temperatura del inyector (operado en modo split 1:1) y del detector fue de 250 °C. El tiempo de desorción de la fibra SPME fue de 5 min. El proceso se realizó tres veces por cada tratamiento de pulpa y de grano.

2.6 Análisis de datos

El análisis de datos de la investigación se realizó mediante la utilización de software Minitab versión 17.0 para prueba de comparación de medios en las 3 repeticiones. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor, considerando un 30% de coeficiente de variación solo para 2 repeticiones. El análisis estadístico de la dinámica en todo el proceso de fermentación se realizó mediante el análisis de clúster utilizando el R-Software.

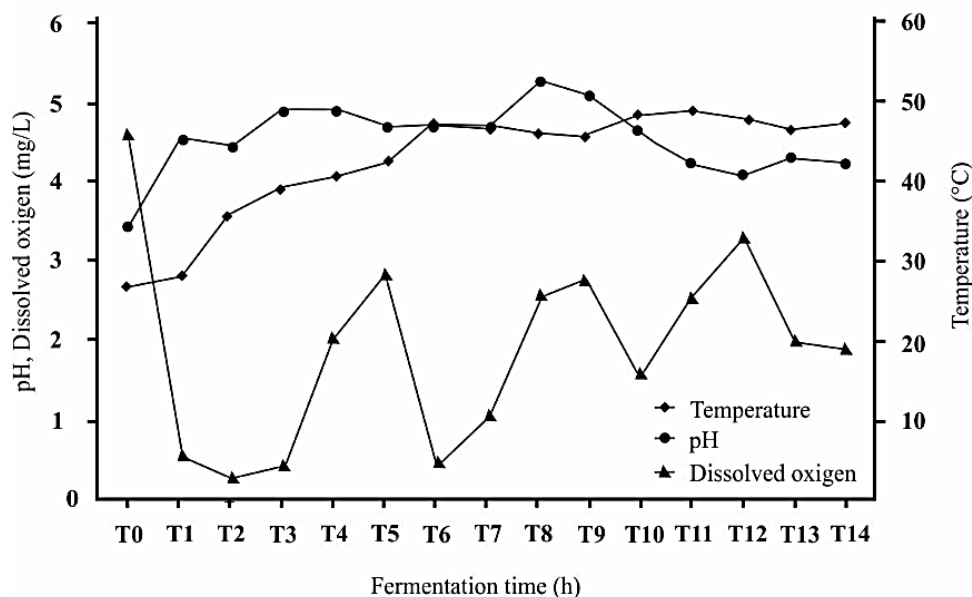
III. RESULTADOS

3.1 Indicadores de Fermentación: Temperatura, pH y Oxígeno disuelto (OD)

De acuerdo con el seguimiento con los indicadores de fermentación, se observa que la temperatura aumentó de manera progresiva desde las 0 horas hasta 84 horas de fermentación, estabilizándose desde este punto a 48°C. El pH aumentó desde 0 horas hasta 96 horas en su punto máximo, alcanzando los 5.2/5.3 pH, posteriormente disminuyó hasta 4.2 en las 168 horas. Por otro lado, el oxígeno disuelto inicio en 4.6 de pH, luego baja próximo de llegar a 0 en las 24 horas de fermentación, lo mismo sucede cada 4 periodos (48 horas), dado que se realizó el volteo de cajón del cacao criollo cada 2 días, entonces significa que hubo presencia de microorganismos anaeróbicos (levaduras) [Figura 2].

Figura 2.

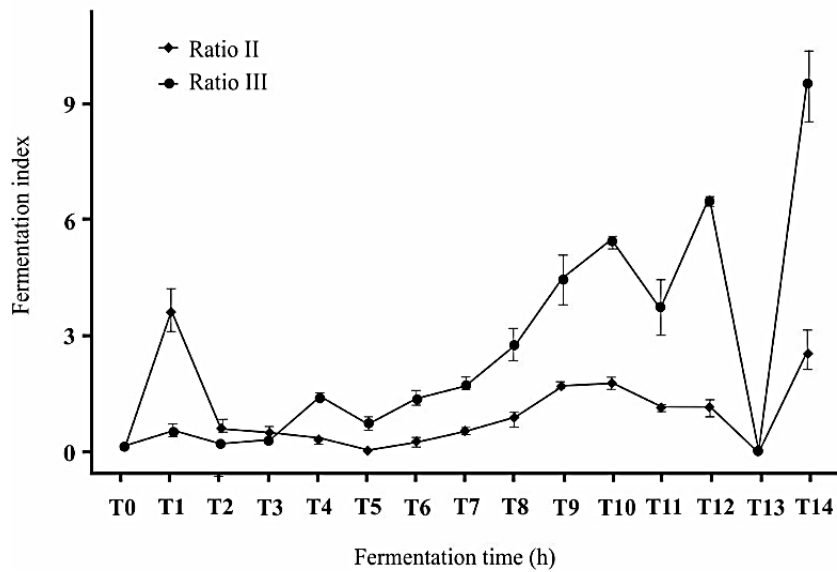
Evolución de los indicadores de fermentación espontánea de granos de cacao Criollo, comportamiento de la temperatura, pH y oxígeno disuelto.



En el índice de fermentación [Figura 3], se observó que la ratio II aumentó hasta el 30% en las primeras 12 horas de fermentación, luego se ocasiona una disminución hasta el 10% en las 24 horas, posteriormente aumenta la fermentación alcanzando el 28% en sus 120 horas, la ratio III aumenta su fermentación alcanzando el 75% en sus 144 horas, luego disminuye a 0 en las 156 horas y posteriormente se da una sobre fermentación.

Figura 3.

Índice de fermentación.



3.2 Identificación de los Componentes Volátiles

Tabla 2.

Compuestos volátiles en la pulpa del cacao Criollo en función al tiempo de fermentación espontanea

Tiempo(h)	Pulpa															
	coco	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168
Grupo																
Aldehídos	1	2		3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3
Ketones	3	2	1	3	3	3	3	3	3	2	2		2	2	2	1
Alcoholes	2	4	5	6	6	5	7	5	7	7	6	4	4	6	5	3
Esteres	2	9	10	12	10	10	9	11	9	10	10	7	7	6	6	6
Acidos			1	1	1			1	1	2	3	4	2	4	3	3
Terpenoides y terpenos	3	2	2	1	4	4	4	4	4	3	2	4	5		5	3

Tabla 3.

Compuestos volátiles en el grano del cacao Criollo en función al tiempo de fermentación espontánea.

Tiempo(h)	Grano															
	coco	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168
Grupo																
Aldehídos	6	3	5	4	5	3	2	2	5	4	4	4	4	3	4	6
Ketones	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2
Alcoholes	3	6	6	5	5	4	5	5	5	6	5	5	3	5	4	6
Esteres		7	7	6	7	8	8	7	9	10	11	10	9	7	7	6
Acidos				1	1			1	1	1	1	3	3	3	3	1
Terpenoid	2	1	2	2	2	2	1	2	1	3	1	2	2	2	3	3
es y																
terpenos																

Al agrupar los compuestos volátiles por su clase química. Se obtuvo 47 volátiles en función al tiempo durante 7 días de fermentación espontánea, 11 en pulpa fresca, 19 en pulpa fermentada [Tabla 2], 14 en grano fresco, y 28 en grano fermentado [Tabla 3].

3.3 Agrupación de Precursores Aromáticos por Familias

Tabla 4.

Compuestos volátiles identificados en granos frescos y durante la fermentación espontánea de muestras de granos de cacao Criollo.

Tiempo de retención	Compuesto	Descriptor de Olor	Fresco		Fermentado	
			Pulpa	Grano	Pulpa	Grano
	Aldehídos					
7.12	Isobutiraldehído	Quemado, caramelo, cacao, verde, malta		X		
10,72	3-metilbutanal	Chocolate				X
11.14	2-metilbutiraldehído	Almendra, cacao, fermentado, avellana, malta				X
17,65	Hexanal	Manzana, grasa, fresca, verde, aceite		X		
23.06	Methional	Papa cocida, soja				X
26.06	Benzaldehído	Almendra amarga, azúcar quemada, cereza, malta, pimienta asado		X	X	X
29,70	Fenilacetaldehído	Baya, geranio, miel, nuez, picante		X	X	X
31,94	Nonanal	Graso, floral, verde, limón		X	X	

36,05	Decanal	Floral, frito, piel de naranja, penetrante, sebo	X				
Cetonas							
11,97	2-pentanona	Fruta, picante	X	X	X	X	
22,06	2-heptanona	Queso, fruta, verde, nueces, especias	X	X	X	X	
30,74	Acetofenona	Almendras, flor, carne, mosto	X	X	X	X	
Alcoholes							
8,85	Metilbutenol			X			
12,56	2-pentanol	Plátano maduro fermentado	X		X	X	
14,30	Alcohol isoamílico	Quemado, cacao, floral, malta			X	X	
14,51	2-metil-1-butanol	Aceite de pescado, verde, malta, cebolla, vino			X	X	
16,57	2,3-butanodiol	Dulce, florido			X		
17,57	2-hexanol			X			
22,55	2-heptanol	Dulce, cítrico	X	X	X	X	
30,32	1-feniletanol	Floral, miel, rosa		X			
32,72	2-feniletanol	Fruta, miel, lila, rosa, vino			X	X	
Ésteres							
8,84	Acetato de etilo	Aromático, brandy, uva	X		X	X	
13,17	Acetato de propilo	Apio, floral, pera, frutos rojos			X	X	
16,17	Acetato de isobutilo	Manzana, plátano, floral, hierba			X	X	
19,89	Acetato de 1-metilbutilo	Fruta			X	X	
21,36	Acetato de isoamilo	Manzana, plátano, pegamento, pera			X	X	
21,46	Acetato de 2-metilbutilo	Manzana, plátano, pera			X	X	
21,74	Acetato de acetoina	Fruta			X	X	
27,11	Hexanoato de etilo	Cáscara de manzana, brandy, goma de mascar, fruta demasiado madura, piña			X	X	
28,80	Acetato de 2-heptilo		X		X	X	
34,98	Benzoato de etilo	Manzanilla, apio, grasa, flor, fruta				X	
35,47	Octanoato de etilo	Albaricoque, brandy, graso, floral, piña			X	X	
37,67	Fenilacetato de etilo	Floral, fruta, miel, rosa			X	X	
38,17	Acetato de fenetilo	Flor, miel, rosa			X	X	
42,79	Decanoato de etilo	Brandy, uva, pera			X		
49,22	Laurato de etilo	Floral, fruta, hoja			X		
61,17	Palmitato de etilo	Cera			X		
Ácidos							
7,65	Ácido acético	Ácido, frutal, picante, agrio, vinagre			X	X	
14,65	Ácido isobutírico	Quemado, mantequilla, queso, sudor, rancio			X	X	
18,77	Ácido isovalérico	Queso, picante, sudoroso, rancio			X		
19,34	Ácido 2-metilbutanoico	Mantequilla, queso, fermentado, agrio			X	X	
Terpenoides y terpenos							
26,93	Mirceno	Balsámico, fruta, geranio, hierba, mosto	X	X	X	X	
29,46	3-carene	Limón	X				
31,77	Formiato de linalilo	Cítricos, cilantro	X	X	X	X	
34,67	Mentón	Menta verde, fresca			X		
34,72	p-menthan-3-uno	Menta verde, fresca			X		
37,95	Pulegone	Menta, genial			X		

Entre los 47 compuestos volátiles [Tabla 4] encontrados se obtuvo 9 terpenos y terpenoides, 9 aldehídos muestra mayor presencia en grano fresco y grano fermentado, 3 cetonas y 16 ésteres, presentes en pulpa y grano fermentado y 9 alcoholes y 4 ácidos que tienen aparición durante toda la fermentación en pulpa y grano.

3.4 Análisis por Mapa de Calor de los Compuestos Volátiles

Mediante el mapa de calor, se observa 2 dimensiones, la primera de menos concentración (intensidad de color más claro), y la segunda de más concentración (intensidad de color más oscuro). En la fermentación de pulpa y grano [Figura 4 y 5] desde las 0 horas hasta las 96 horas se encuentra la presencia de componentes volátiles agradables, y desde las 120 horas las 144 horas hay generación de aromas no agradables como rancio, ácidos malos y otros.

Figura 4.

Mapa de calor de los compuestos volátiles encontrados en la pulpa durante la fermentación espontánea del cacao Criollo.

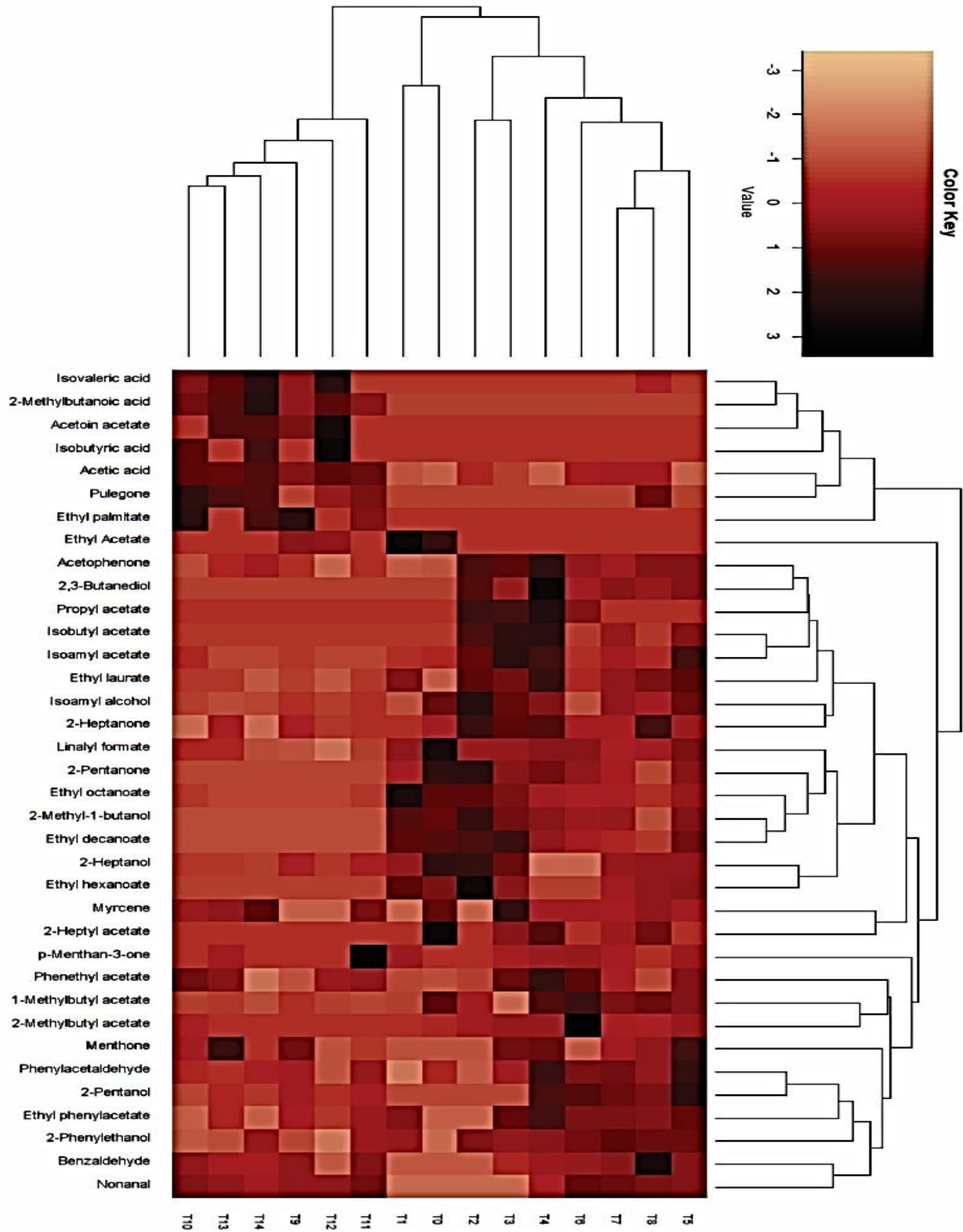
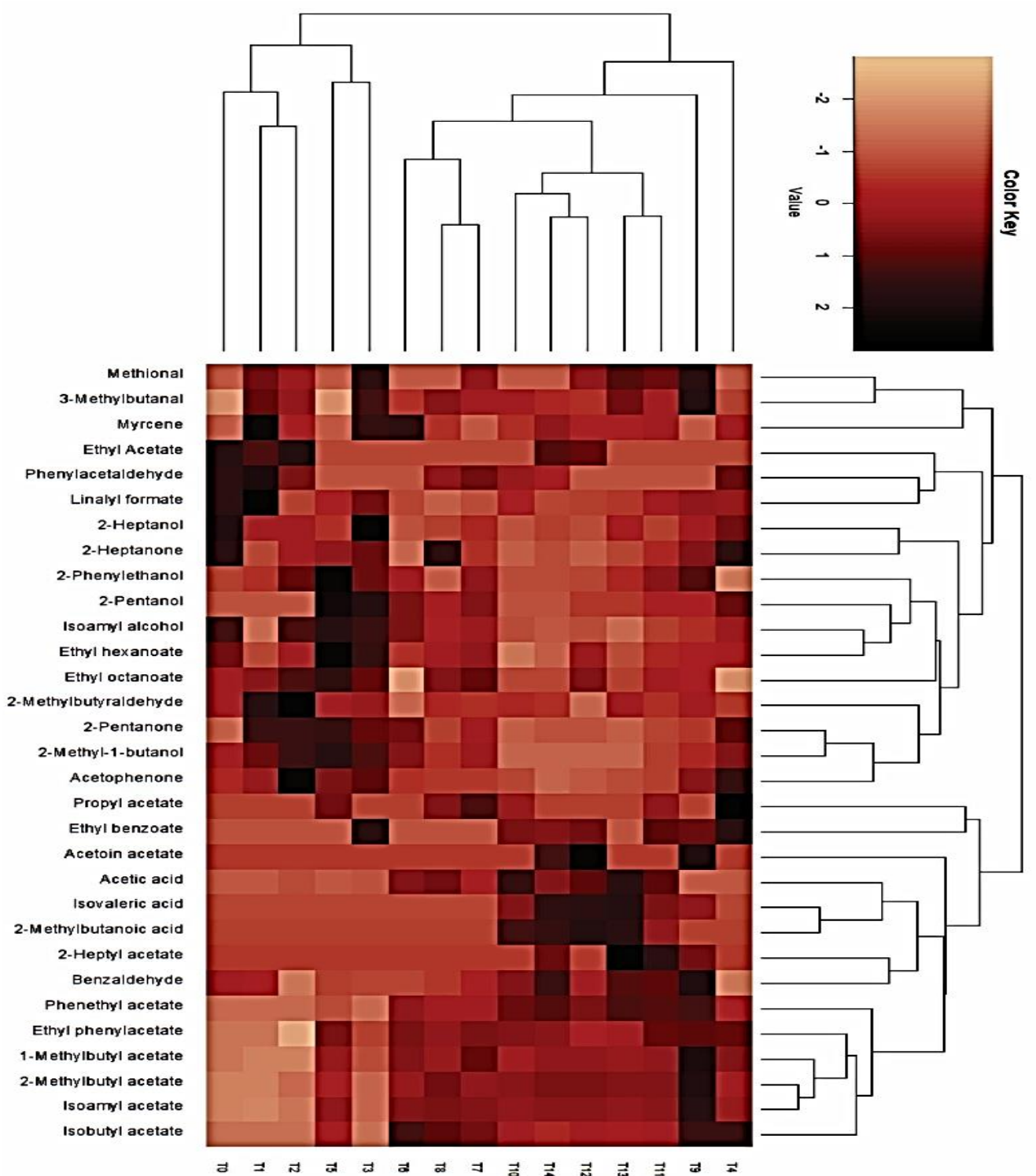


Figura 5.

Mapa de calor de los compuestos volátiles encontrados en el grano durante la fermentación espontánea del cacao Criollo.



3.5 Análisis de Componentes Principales

Figura 6.

Análisis de componentes principales de los compuestos volátiles encontrados en la pulpa (b) durante la fermentación espontánea del cacao Criollo.

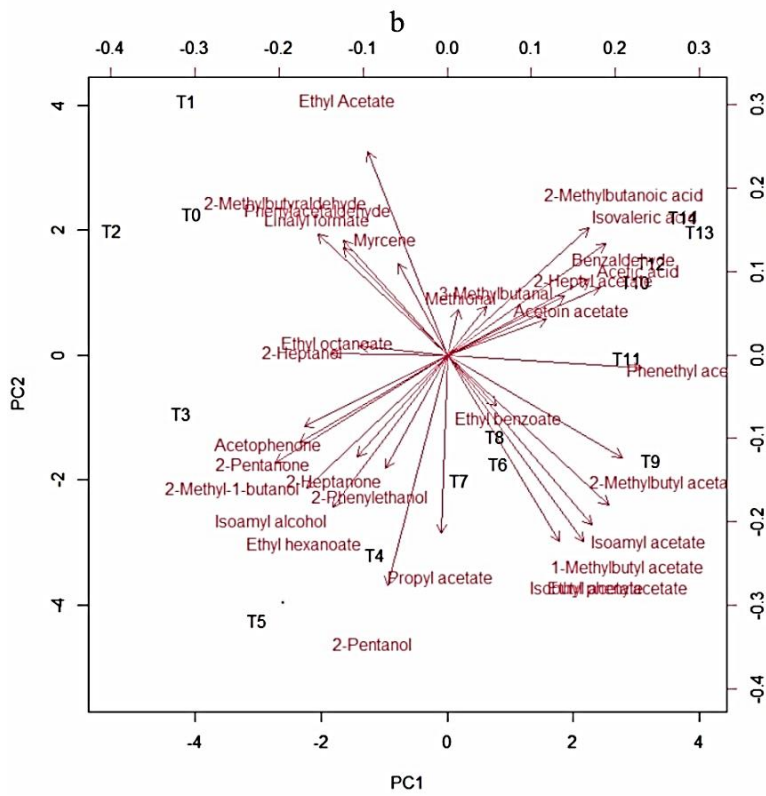
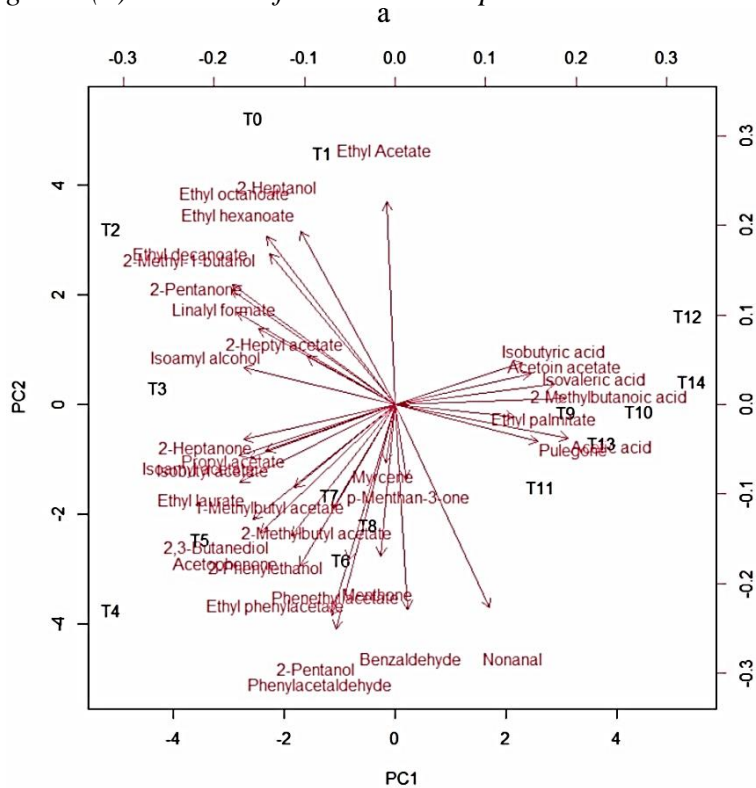


Figura 7.

Análisis de componentes principales de los compuestos volátiles encontrados en el grano (b) durante la fermentación espontánea del cacao Criollo.

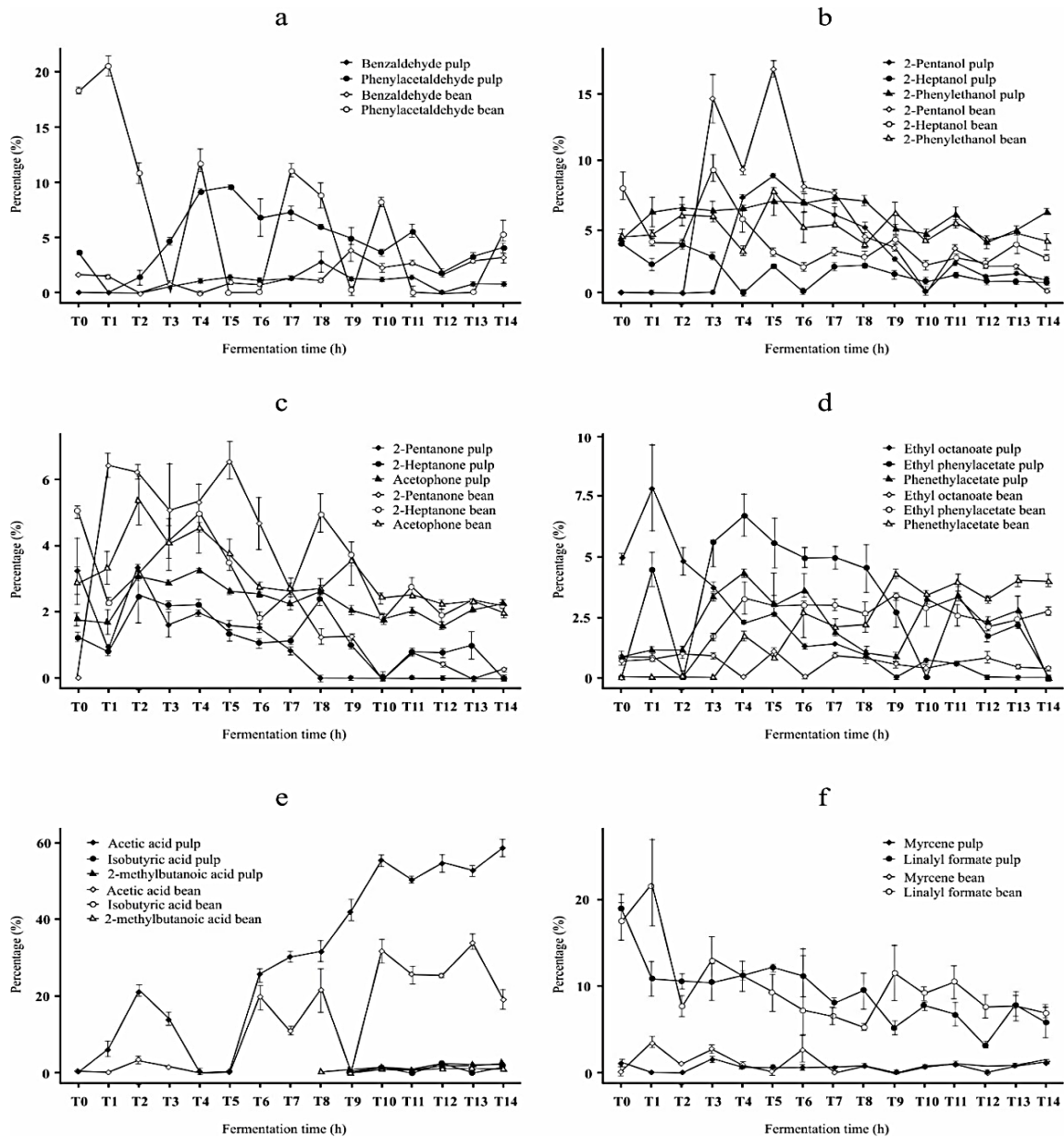


La clasificación en grupos homogéneos de los componentes volátiles mediante el Análisis de Clúster en la determinación de componentes principales en pulpa y grano [Figura 6 y 7] nos muestra que desde las 0 horas hasta las 96 horas se agrupan componentes volátiles agradables, y desde las 108 horas, hasta las 168 horas de fermentación existe la presencia de volátiles no deseables.

3.6 Dinámica de los Principales Compuestos Volátiles

Figura 8.

Dinámica de los principales compuestos volátiles encontrados en pulpa y grano durante la fermentación espontánea del cacao Criollo.



En el análisis de la dinámica de los principales compuestos aromáticos específicos [Figura 8], los ésteres son los que se encuentran en grandes porcentajes a comparación de los demás volátiles tanto en pulpa como en grano durante la fermentación. Los ácidos son los que en menor porcentaje se muestran durante las primeras 120 horas, posteriormente aumentan por efecto de la sobre fermentación de los granos de cacao.

IV. DISCUSIÓN

El proceso de fermentación de los granos de cacao es básico y fundamental, donde sucede una serie de fermentaciones produciendo reacciones bioquímicas, enzimáticas y microbianas (Castro-Alayo et al., 2019). En la fermentación de esta investigación, con la remoción de los granos de cacao cada 12 horas, el oxígeno disuelto es inestable, aumenta y disminuye por la presencia de levaduras, estos microorganismos son los que desintegran la pulpa que rodea a los granos de cacao fresco, despolimerizando la pectina en las condiciones anaeróbicas (sin oxígeno), llevando a cabo la fermentación de los azúcares para producir etanol. (G. V. Pereira et al., 2019).

En la masa de granos, se da una reacción exotérmica, produciendo una elevación de temperatura debido a la presencia de levaduras las cuales producen etanol, se oxidan para formar ácido acético (Counet et al., 2002). Los resultados obtenidos en temperatura tuvieron un aumento desde las 0 horas hasta 84 horas y se estabilizó a 48 °C. En cuanto al pH, muestra un aumento progresivo desde 0 horas hasta 96 horas en su punto máximo hasta 5.3, luego disminuye hasta 4.2 de pH, a las 168 horas. El aumento de pH se debe a la evaporación y oxidación excesiva del ácido acético (Tran et al., 2015). Un pH más alto indica una fermentación insuficiente de los granos de cacao (Rivera Fernández et al., 2012).

El índice de fermentación aumenta desde el primer día de fermentación alcanzando hasta el 60% en las 120 horas de fermentación (Lares Amaiz et al., 2012). En la figura 3, el ratio III fue el más eficiente, iniciando su fermentación progresiva desde las 0 horas, y llegando a una fermentación del 75% en sus 144 horas, posteriormente sufre un declive de fermentación en las 12 horas siguientes para luego aumentar su velocidad de fermentación produciendo una sobre fermentación.

Mediante el análisis de CAE por familias, se identificó 47 volátiles (Tabla 4) agrupados por: ésteres, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, terpenos y terpenoides entre pulpa y grano del cacao Criollo. En los ésteres encontramos aromas a floral, cítrico, nuez, frutas y madera; en alcoholes aromas a verde y uva, y en terpenos se obtuvo con aromas a miel dulce y menta. El aroma floral es proporcional a las de flores, incluyendo, ortiga, jazmín, lila, diente de león y girasol (Farah et al., 2012).

En la pulpa (Tabla 2), los CAE predominantes durante la fermentación son los ésteres, terpenos y alcoholes. Los ésteres y alcoholes muestran una significativa presencia durante las 108 horas de fermentación, después de este tiempo desaparecen. En cambio, en la fermentación del grano (Tabla 3), los ésteres inician con un bajo número de CAE y aumentan en el tiempo de fermentación progresivamente hasta las 132 horas, después de estas horas se observa una leve desaparición de los mismos, mientras que los aldehídos, alcoholes y cetonas presencian una estabilidad desde las 0 horas hasta las 132 horas de fermentación y posteriormente disminuyen.

Con la finalidad de llegar a conclusiones más eficientes, también se realizó un análisis de los volátiles mediante un mapa de calor para determinar los buenos y malos aromas en función al tiempo de fermentación. En la pulpa (Figura 4), desde las 0 horas hasta las 36 horas se obtuvo la presencia de ésteres, terpenos y alcoholes: con aromas a frutales y dulce, también se encontró a la acetofenona, 2.3-butanediol, acetato de propilo, isobutilo, acetato, acetato de isoamilo, laurato de etilo, isoamilo alcohol, 2-heptanona, formiato de linalilo, 2-pentanona, octanoato de etilo, 2-methyl-1-butanol, decanoato de etilo, 2-heptanol, hexanoato de etilo y mircenol. Entre las 48 horas, 120 y 132 horas de fermentación, se obtuvo a terpenos, ésteres y aldehídos: con aromas a chocolate, madera, nuez, floral, frutas, almendra, malta, banana y uva se encontró a acetato de heptilo, p-menthan-3-one, acetato de feniletilo, acetato de 1-metilbutilo, acetato de 2-metilbutilo, mentona, fenil acetalheyde, 2-pentanol, acetato de etil penilo, 2-phenyletanol, benzaldehído, nonanal y acetato de etilo. Todos estos CAE otorgan al cacao Criollo su aroma agradable que lo caracteriza como fino de aroma. Después de las 132 horas (5 días) hasta las 168 horas de fermentación encontramos la presencia de ácidos con aromas a oxido, rancio, madera y astringente, mínimas cantidades de ésteres y terpenos con aromas a frutas y flores como el acetato de etilo, 2-methylbutanoic, ácido isobutírico, ácido acético, acetato de acetoína y pulegona. Por el contrario, estos compuestos volátiles son considerados desagradables para la calidad aromática del cacao Criollo.

En el mapa de calor del grano en fermentación (Figura 5), muestra que desde las 0 horas hasta las 132 horas de fermentación, está influenciado en grandes cantidades por los ésteres con aroma a uva, brandy, frutas y manzana como el acetato de etilo, exanoato de etilo, octanoato de etilo, acetato de propilo, benzoato de etilo, acetato de fenetilo, fenilacetato de etilo, acetato de 1-metilbutilo, acetato de 2-metilbutilo, acetato de isoamilo

y acetato de isobutilo; terpenos con aroma a fruta, geranio y cítrico como el mirceno y formiato de linalilo; aldehídos con aroma a chocolate y miel como el 3-metilbutanal, fenilacetaldehído y 2-metilbutiraldehído; alcoholes con aroma a cítrico, dulce, rosas y malta como el 2-heptanol, 1-feniletanol, 2-pentanol, alcohol isoamílico; cetonas con aroma a fruta, verde y nuez como el 2-heptanona, 2-pentanone. Luego de las 132 horas (5 días) hasta las 168 horas de fermentación, los volátiles más encontrados son los ácidos con aroma a acre, agrio, vinagre, rancio, queso y quemado, mínimos cantidades de ésteres con aromas a frutas y geranio como el acetato de 2-heptilo, acetato de acetoína; aldehídos con aroma a azúcar quemado, malta y almendra amarga como el benzaldehído. En los 2 análisis de mapa de calor, pulpa y grano del cacao Criollo se observa que en las primeras 132 horas de fermentación desde el tiempo 0, se aprecia aromas agradables a miel, frutas, flores, almendra, entre otros. Los aromas más dominantes en el cacao criollo son a dulce, afrutados y maltosos que se presentan en las primeras horas de fermentación, Acierno et al. (2016). Los ácidos isobutírico y ácidos isovalérico confieren un aroma a rancio y jamón, estos se forman enzimáticamente a causa de una sobre fermentación (Ziegler, 1990). En los resultados obtenidos, después de las 132 hasta las 168 horas de fermentación en pulpa y grano, se apreció volátiles desagradables en grandes cantidades como el ácido acético, ácido isovalérico y 2-ácido metilbutanoico con aromas a rancio, acre, quemado, amargo y agrio, los ácidos isobutírico y propiónico resultan ser volátiles no convenientes para un buen cacao con buenos aromas (Serra Bonvehí & Ventura Coll, 2002). Por lo que podemos mencionar que tanto en pulpa como en grano, los aromas desagradables que afectan la calidad aromática del cacao Criollo se generan a partir de los 5 días de fermentación.

De acuerdo con el análisis de componentes principales tanto para pulpa (Figura 6) y grano (Figura 7), el PC1, está constituido por el más alto porcentaje volátiles, el PC2 compone la menor cantidad. Desde las 0 horas, el primer grupo situado en el eje negativo con las primeras 36 horas de fermentación, mostró una gran cantidad de ésteres con aroma a frutas y flores como el octanoato de etilo, hexanoato de etilo, decanoato de etilo, acetato de 2-heptilo, acetato de etilo y 2-pentanona; ácidos volátiles como formiato de linalilo. Entre las 60 y 96 horas de fermentación nos muestra el segundo grupo, con ésteres de aroma a fruta como acetato de propilo, fenilacetato de etilo y laurato de etilo; terpenos con aroma a fruta y menta como el mirceno y p-menthan-3; alcoholes de aroma a miel y dulce como el 1-feniletanol y 2,3-butanodiol. En el eje positivo, encontremos al tercer

grupo de fermentación entre las 108 y 168 horas, influenciado por ácidos con aromas a rancio, queso, quemado, ácido isobutírico, ácido isovalérico y 2- ácido metilbutanoico; ésteres con aroma a cera como palmitato de etilo.

En la Figura 7, el PC1 eje negativo, se encontró al primer grupo de fermentación desde las 0 horas hasta 24 horas, con la presencia de ésteres con aroma a fruta como el acetato de etilo y octanoato de etilo; aldehídos con aromas a miel, fruta y cocoa, como el fenilacetaldehído y 2-metilbutiraldehído; terpenoides de aroma a flores y frutas como el mirceno. En el segundo grupo del eje negativo desde las 36 hasta las 84 horas de fermentación, predominan más los alcoholes, cetonas, y ésteres con aroma a vino, nuez, banana madura, almendra, rosas y malta como el 2-methyl-1-butanol, alcohol isoamílico, el 2-feniletanol, 2-pentanol, 2-heptanone, acetophenona, hexanoato de etilo y acetato de propilo. En el eje positivo, el tercer grupo, entre las 96 - 132 horas encabezan mas los ésteres con armas a floral, cereal, fruta, nuez, manzana y piña como el benzoato de etilo, acetato de fenetilo, acetato de isoamilo, 2- acetato de metilbutilo, acetato de 1-metilbutilo y acetato de isobutilo.

El cacao criollo debe sostenerse en tiempos suficientes de fermentación para evitar la aparición de aromas no deseados ni astringentes, que limiten disfrutar del aroma fino (Rottiers et al. 2019). En el grupo numero 4 del PCI, entre las 132-168 horas de fermentación, el PCA encontró que resaltan los componentes de la familia ácidos, con aromas a rancio, vinagre, oxido y quemado como el 2- ácido metilbutanoico y ácido isovalerico, en muy pocas cantidades encontramos a ésteres florales como el acetato de acetión, terpenos frutales como el mirceno y aldehídos con aroma a chocolatec como el 3-metilbutanal, esos resultaos afirman que en la sobrefermentación se generan aromas no deseados.

Para conocer el desarrollo y comportamiento de los CAE más predominantes durante la fermentación, se analizó la dinámica de generación de los CAE (Figura 8). El fenilacetaldehído (Fig.8.a) aparece desde las 0 horas con un alto porcentaje de 18% en grano, este se reduce aleatoriamente llegando a un 5%, en pulpa inicia con un porcentaje de 4%, luego aumentó progresivamente hasta las 12 horas para luego disminuir lentamente en 4% en sus 168 horas. En cambio, el benzaldehído en pulpa y grano aparecen desde sus 0 horas de fermentación con el 1% mostrando una estabilidad hasta las 108 horas, luego se genera una elevación hasta un máximo del 5% en las 168 horas de

fermentación, este es un alcohol de aromas no deseados: almendra amarga, azúcar quemado, por lo que claramente se debe evitar las fermentaciones prolongadas. Estos hallazgos coinciden con (Rodríguez-Campos et al., 2011) quien afirmó que la fermentación más adecuada se debe dar entre los 5 y 6 días para evadir la formación de alcoholes amílicos que generen defectos astringentes de sabor

Los alcoholes como 2-pentanol en pulpa y grano (Fig. 8.b) revelaron un alto porcentaje entre las 24 y 72 horas de fermentación, en pulpa llegando por encima del 15 %, posterior a las 72 horas disminuyen levemente siendo su cantidad cada vez menor. El heptano y 2-feniletanol tanto en pulpa como en grano mostraron un promedio hasta 8% dentro de las primeras 120 horas de fermentación, posteriormente disminuyeron. Las cetonas (Fig. 8.c) con aromas a dulce, miel, flor y manzana como el 2-pentanone, 2-heptanona y acetofenona, en grano mostraron un porcentaje entre 5 y 6% dentro de las 120 horas de fermentación. Por otro lado en pulpa el 2-heptanona y acetofenona tienen un 3% en las primeras 132 horas, luego su cantidad se redujo hasta 2% al final de la fermentación, en cambio el 2-pentanone manifiesta hasta un 3% dentro de las 96 horas de fermentación, posterior a esta desapareció en la prolongada fermentación hasta las 168 horas. Los ésteres (Fig. 8.d), se encontraron en grandes porcentajes, más en la pulpa que en los granos, en pulpa desde las 0 horas alcanzan el promedio porcentaje de 7% disminuyendo hasta un promedio de 4% en las 102 horas, y en grano hubo un aumento progresivo desde las 0 horas con el 1% hasta las 109 y 10 horas alcanzando el 6%, y posterior a este se estabiliza el porcentaje de volátiles. Los ácidos con aromas no deseados para el cacao Criollo (Fig. 8.e), como el ácido acético, tanto en pulpa como en grano mostraron un aumento progresivo desde las primeras las 0 horas hasta las 168 horas alcanzando un 60%, así mismo el isobutírico y ácido 2-metilbutanoico, aparecieron después de las 96 y 108 horas, con una presencia del 1%. Estos ácidos no deseados son los que alteran los aromas del cacao, la aparición de aromas astringentes es más notorio después de las 120 y 132 horas. Cuando más se prolonga la fermentación, la probabilidad de aparición de volátiles no deseados es mayor, cuando el grano de cacao se expone a más horas de fermentación, los ácidos pueden migrar al grano afectando de manera irreversible su perfil aromático (Chetschik et al. (2018).

V. CONCLUSIONES

El análisis de la fracción volátil mediante SPME-GCMS permitió identificar 47 compuestos aromáticos específicos durante la fermentación espontánea entre pulpa y grano del cacao Criollo, teniendo la presencia de ácidos, cetonas, alcoholes, terpenos, terpenoides, aldehídos y ésteres, siendo los ésteres una de las familias más numerosas encontradas.

Se concluye que el tiempo de fermentación tiene un efecto significativo sobre los compuestos aromáticos específicos del cacao Criollo, debido a que los resultados mostraron una aparición de aromas agradables predominantes de ésteres, terpenos, cetonas, alcoholes y terpenoide, octanoato de etilo, fenilactato de etilo, acetato de fenetilo, 2-pentanone, 2-heptanone, acetofenona, 2-pentanol, 2-heptanol, mirceno (floral, cítrico, madera, rosas, dulce, miel, nuez, chocolate, fruta), desde las 0 horas hasta las 96 horas que conforma un total de 4 días. Posterior a este tiempo existe la formación de compuestos no agradables generados por ácidos como ácido isovalérico, isobutírico y aldehídos como el benzaldehído (rancio, oxidado, almendra amarga, cera, azúcar quemado) desde las 108 horas hasta las 168 horas, lo cual deteriora la calidad aromática del cacao Criollo o fino de aroma.

VI. RECOMENDACIONES

Debido a la creciente demanda del cacao fino de aroma como el cacao Criollo, reducir el tiempo de fermentación es crucial para lograr una mayor productividad, por lo que es recomendable un tiempo de fermentación espontánea de cuatro días. Esta fermentación puede ser comparada con fermentación controlada mediante cultivo iniciador y diferenciar los compuestos aromáticos específicos que produce cada una de ellas y su dinámica durante la elaboración de chocolate.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acierno, V., Yener, S., Alewijn, M., Biasioli, F., & Van Ruth, S. (2016). Factors contributing to the variation in the volatile composition of chocolate: Botanical and geographical origins of the cocoa beans, and brand-related formulation and processing. *Food Research International*, 84, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.022>
- 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>
- Álvarez, C., Pérez, E., Lares, M. del C., Boulanger, R., Davrieux, F., Asseamt, S., & Cros, E. (2016). Identification of the Volatile Compounds in the roasting Venezuela Criollo cocoa beans by Gas Chromatography-Spectrometry Mass. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 5(4). <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2016.05.00178>
- Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., & Cardenas-Toro, F. P. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, 5(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01157>
- Chetschik, I., Kneubühl, M., Chatelain, K., Schlüter, A., Bernath, K., & Hühn, T. (2018). Investigations on the Aroma of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L.) and Its Influence on the Odor of Fermented Cocoa Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(10), 2467–2472. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05008>
- Counet, C., Callemien, D., Ouwerx, C., & Collin, S. (2002). Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2385–2391. <https://doi.org/10.1021/jf0114177>
- Farah, D. M. H., Zaibunnisa, A. H., Misnawi, J., & Zainal, S. (2012). Effect of Roasting Process on the Concentration of Acrylamide and Pyrazines in Roasted Cocoa Beans from Different Origins. *APCBEE Procedia*, 4, 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.11.034>
- Frauendorfer, F., & Schieberle, P. (2008). Changes in key aroma compounds of Criollo

- cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10244–10251. <https://doi.org/10.1021/jf802098f>
- Khairy, H. L., Saadon, A. F., Zzaman, W., Yang, T. A., & Mat Easa, A. (2018). Identification of flavor compounds in rambutan seed fat and its mixture with cocoa butter determined by SPME-GCMS. *Journal of King Saud University - Science*, 30(3), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.001>
- Lares Amaiz, M., Gutiérrez, R., Pérez, E., & Álvarez, C. (2012). Efecto del tostado sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas, composición proximal y perfil de ácidos grasos de la manteca de granos de cacao del estado Miranda, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(2), 439–446.
- NTP 208.040 2008. (2008). *Norma Técnica Peruana. Buenas Practicas para la Cosecha y Beneficio de Cacao NTP208.040 2008* (p. 14).
- Pallares-Pallares, A., Perea-Villamil, J. A., & López-Giraldo, L. J. (2016). Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51. *Respuestas*, 21(1), 120–133. <https://doi.org/10.22463/0122820x.726>
- Pereira, G. V. de M., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Andrade Lara, J. M. R., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188(July), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>
- Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Magalhães Júnior, A. I., Vásquez, Z. S., Medeiros, A. B. P., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2019). Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. *Food Chemistry*, 272(December 2017), 441–452. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.061>
- Portillo, E., Labarca, M., Grazziani, L., Cros, E., Assemat, S., Davrieux, F., Boulanger, R., & Marcano, M. (2009). Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(2), 458–468.
- Qin, X. W., Lai, J. X., Tan, L. H., Hao, C. Y., Li, F. P., He, S. Z., & Song, Y. H. (2017). Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa

- seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. *International Journal of Food Properties*, 20(10), 2261–2275. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1236270>
- Rivera Fernández, R. D., Barrera Álvarez, A. E., Guzmán Cedeño, Á. M., Medina Quinteros, H. N., Casanova Ferrín, L. M., Peña Galeas, M. M., & Nivelá Morante, P. E. (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(1), 7–12. <https://doi.org/10.18779/cyt.v5i1.77>
- Rodríguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44(1), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>
- Rottiers, H., Tzompa Sosa, D. A., De Winne, A., Ruales, J., De Clippeleer, J., De Leersnyder, I., De Wever, J., Everaert, H., Messens, K., & Dewettinck, K. (2019). Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*, 245(9), 1917–1937. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03307-y>
- Serra Bonvehí, J., & Ventura Coll, F. (2002). Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalinized cocoa powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3743–3750. <https://doi.org/10.1021/jf011597k>
- Tran, P. D., Van de Walle, D., De Clercq, N., De Winne, A., Kadow, D., Lieberei, R., Messens, K., Tran, D. N., Dewettinck, K., & Van Durme, J. (2015). Assessing cocoa aroma quality by multiple analytical approaches. *Food Research International*, 77, 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.019>
- Voigt, J., Textoris-Taube, K., & Wöstemeyer, J. (2018). pH-Dependency of the proteolytic formation of cocoa- and nutty-specific aroma precursors. *Food Chemistry*, 255, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.045>
- Ziegleder, G. (1990). Linalool contents as characteristic of some flavor grade cocoas. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 191(4–5), 306–309. <https://doi.org/10.1007/BF01202432>

VIII. ANEXOS

Tabla 5.

Valores presentados de Oxígeno disuelto (OD), grado de acidez (pH), temperatura, en función al tiempo de fermentación de cacao Criollo.

Código	Tiempo	Fecha	Hora	OD (mg/L)	pH	Temperatura
coco R1						
coco R2						
coco R3						
t0 R1	0 horas	8/05/2019	8:30 p.	4.6	3.49	27
t0 R2			m.			
t0 R3						
t1 R1	12 horas	9/05/2019	8:30 a.	0.6	4.57	28.2
t1 R2			m.			
t1 R3						
t2 R1	24 horas	9/05/2019	8:30 p.	0.3	4.44	35.9
t2 R2			m.			
t2 R3						
t3 R1	36 horas	10/05/2019	8:30 a.	0.4	4.86	39.1
t3 R2			m.			
t3 R3						
t4 R1	48 horas	10/05/2019	8:30 p.	2	4.91	40.4
t4 R2			m.			
t4 R3						
t5 R1	60 horas	11/05/2019	8:30 a.	2.9	4.7	42.3
t5 R2			m.			
t5 R3						
t6 R1	72 horas	11/05/2019	8:30 p.	0.4	4.66	47.1
t6 R2			m.			
t6 R3						
t7 R1	84 horas	12/05/2019	8:30 a.	1	4.68	46.9
t7 R2			m.			

t7 R3						
t8 R1	96 horas	12/05/2019	8:30 p.	2.5	5.26	46.1
t8 R2			m.			
t8 R3						
t9 R1	108	13/05/2019	8:30 a.	2.8	5.09	45.7
t9 R2	horas		m.			
t9 R3						
t10 R1	120	13/05/2019	8:30 p.	1.5	4.61	48.1
t10 R2	horas		m.			
t10 R3						
t11 R1	132	14/05/2019	8:30 a.	2.5	4.21	49.1
t11 R2	horas		m.			
t11 R3						
t12 R1	144	14/05/2019	8:30 p.	3.3	4.05	48.3
t12 R2	horas		m.			
t12 R3						
t13 R1	156	15/05/2019	8:30 a.	2	4.28	46.8
t13 R2	horas		m.			
t13 R3						
t14 R1	168	15/05/2019	8:30 p.	1.9	4.28	46.9
t14 R2	horas		m.			
t14 R3						

Figura 9.

Comportamiento estadístico de oxígeno disuelto durante la fermentación espontanea de cacao Criollo.

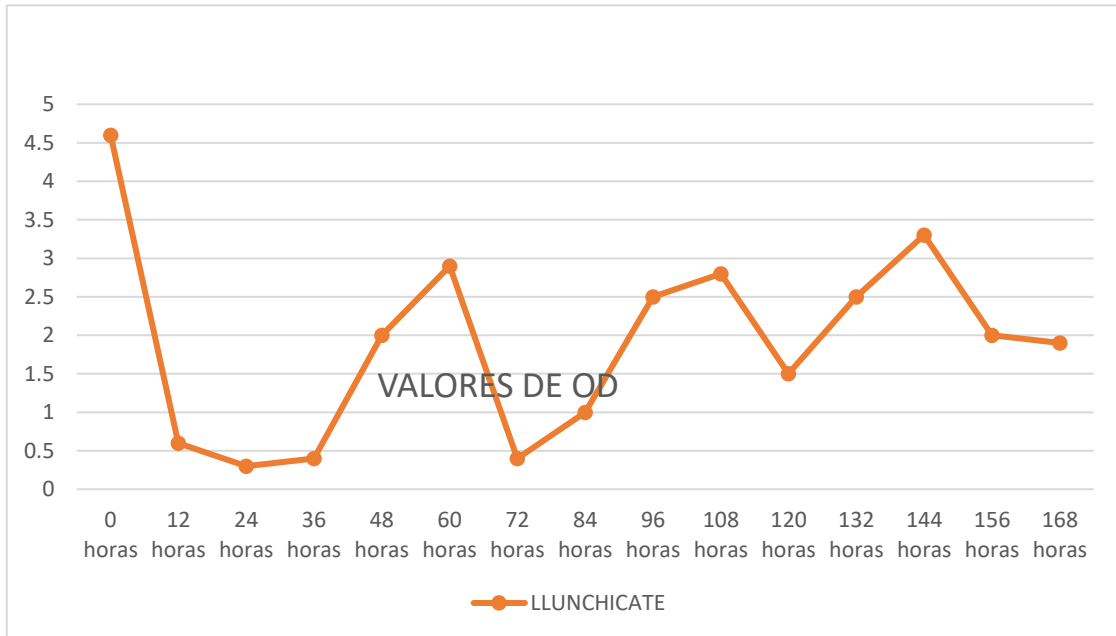


Figura 10.

Comportamiento estadístico de pH durante la fermentación espontanea de cacao Criollo.

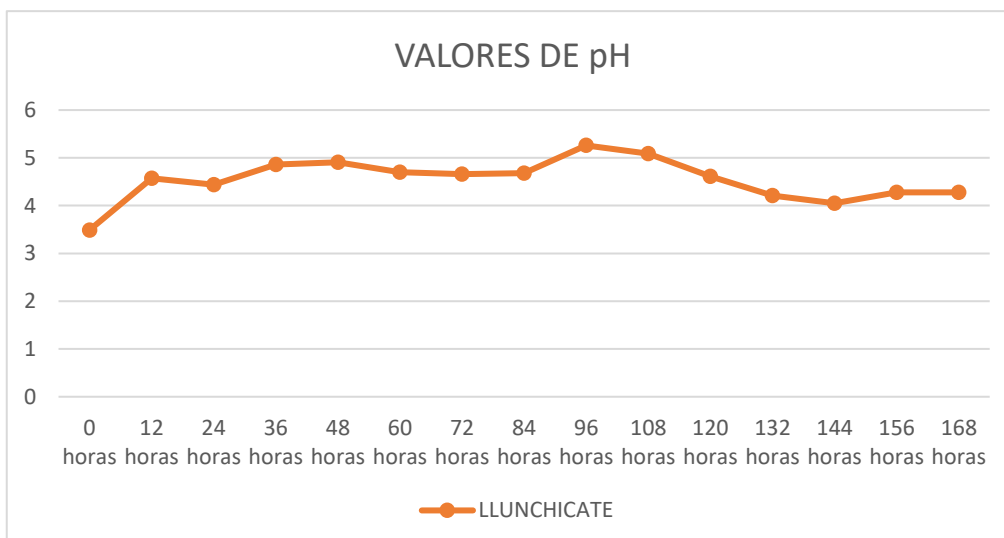


Figura 11.

Comportamiento estadístico de temperatura durante la fermentación espontánea de cacao Criollo.

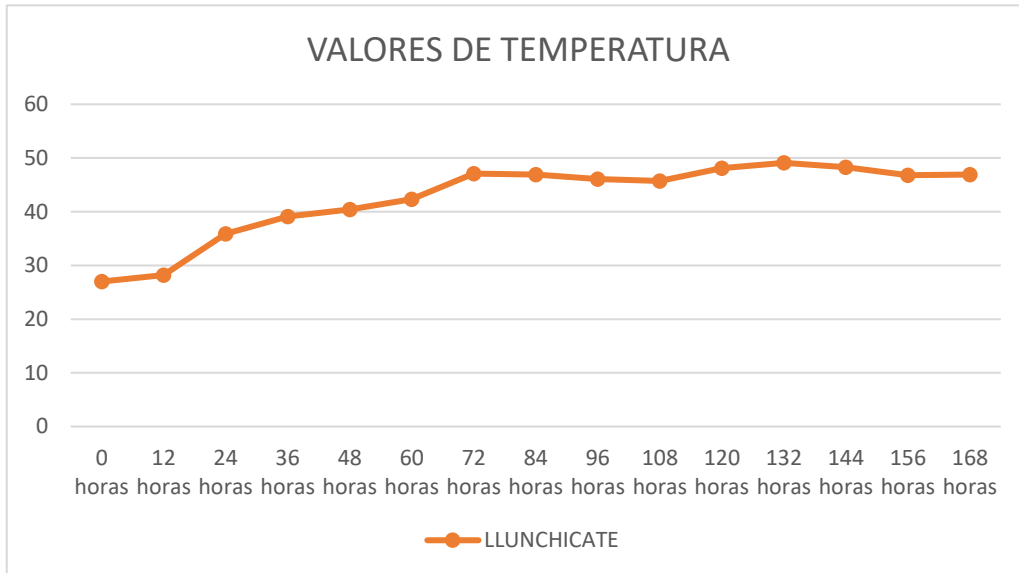


Figura 12.

Extracción de muestras en fermentación para la medición de pH, oxígeno disuelto y temperatura.



Figura 13.

Volteo de cajones cada 24 horas.



Figura 14.

Retirada de granos de cacao Criollo del congelador.



Figura 15.

Granos de cacao Criollo en sus tres repeticiones.



Figura 16.

Separación la pulpa del grano de cacao Criollo



Figura 17.

Trituración de grano de cacao en el mortero.



Figura 18.

Pesado de la pulpa y del grano triturado en la balanza analítica.



Figura 19.

Incorporación de la pulpa pesada (5.7g) en el vial.



Figura 20.

Incorporación del grano triturado pesado (5.7g) en el vial.



Figura 21.

Asignación de código a cada vial.



Figura 22.

Midiendo 6 ml de agua ultra pura con la pipeta graduada.



Figura 23.

Incorporación de a 6 ml de agua ultra pura a los viales con muestra.



Figura 24.

Estabilizando para el alcance de temperatura a 50 °C.



Figura 25.

Equilibrio de la muestra y el espacio de cabeza a 50 °C por 15 min y extracción de los compuestos volátiles por SPME por 30 minutos a misma temperatura del equilibrio.



Figura 26.

Retirada de la fibra para la inyección.

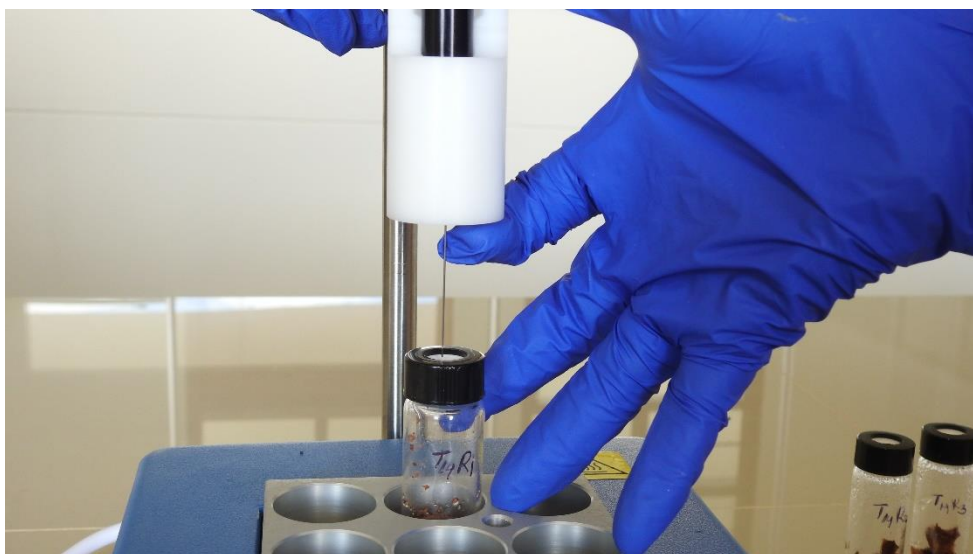


Figura 27.

Inyección la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo.



Figura 28.

Retirada de la fibra del puerto de inyección después de 5 min de desorción.



Figura 29.

Visualización de los cromatogramas en el software MassHunter Data Analysis.

