

**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
INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES
AROMÁTICOS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN
ESPONTÁNEA Y CON CULTIVO INICIADOR EN CACAO
NATIVO ORGÁNICO**

Autora: Bach. Deisy Florelia Trigoso Rojas

Asesor: Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo

Coasesor: Dr. Pedro García Alamilla

Registro:

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

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



UNTRM

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

ANEXO 3-H

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

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Deisy Florelia Trigoso Rojas
DNI N°: 71932224
Correo electrónico: 7193222461@untrm.edu.pe
Facultad: Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias
Escuela Profesional: Ingeniería Agroindustrial

Datos de autor 2

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

2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Identificación de biomarcadores aromáticos del proceso de fermentación espontánea y con cultivo iniciador en cacao nativo orgánico

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Dr. Castro Alayo Efrain Manuelito
DNI, Pasaporte, C.E N°: 18204816
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) 0000-0003-4322-8980

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Dr. Garcia Alamilla Pedro
DNI, Pasaporte, C.E N°: G34832037
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) 0000-0002-5325-1327

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

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

5. Originalidad del Trabajo

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

6. Autorización de publicación

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

Chachapoyas, 30 / noviembre / 2022


Firma del autor 1


Firma del Asesor 1


Firma del autor 2


Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

Dedico con todo mi amor y mi corazón esta tesis, a mis padres por el apoyo brindado y ser el pilar principal para la construcción de mi vida personal y profesional, forjando valores y principios que me convirtieron en la persona que soy ahora.

A mi hermana, con mucho amor le dedico esta tesis, mis logros también son los suyos.

A todos mis familiares y amigos que estuvieron motivándome para no rendirme a lo largo de mi formación académica.

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme la capacidad y sabiduría para desempeñarme académicamente dentro la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, misma que me permitió convertirme en una profesional, en especial a la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias.

A mis padres, por brindarme su apoyo incondicional durante mi formación académica y en cada etapa de mi vida; así mismo, por inculcarme los valores y principios básicos como persona.

Al Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo, asesor de la tesis, por su tiempo, dedicación y por sus conocimientos compartidos durante la ejecución de esta investigación; al Dr. Pedro García Alamilla Coasesor de la tesis por el apoyo.

A Ms. César Rafael Balcázar Zumaeta investigador principal “Estudio metabólico del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.) nativo orgánico”, por su tiempo, paciencia y dedicación durante la ejecución de la investigación.

A M.Sc. Ily Marilú Maza Mejía, Bach. Jesús Utano Reyes y Bach. Nadia Rodríguez Hamamura que a través del Laboratorio de Investigación y certificaciones (LABICER) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), me permitió llevar a cabo la pasantía que facilitó la ejecución de los análisis para este trabajo.

A la Cooperativa de servicios múltiples APROCAM de Bagua por facilitar las muestras que permitió realizar esta investigación.

Al proyecto C.U.I. N° 2313205: Creación de los servicios de Investigación, Innovación y Desarrollo de Tecnología para el Sector Agrario y Agroindustrial de la UNTRM y al Proyecto C.U.I. N° 234309: Creación de los Servicios de investigación en ingeniería de alimentos y post cosecha de la UNTRM por hacer posible la realización de esta tesis.

Esta investigación fue financiada por CONCYTEC PROCIENCIA – CONTRATO 056-2021 FONDECYT Proyectos de investigación básica 2021-01-EO-41-2021-01 – “Estudio metabólico del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.) nativo orgánico”.

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

Dr. Jorge Luis Maicelo Quintana

Rector

Dr. Oscar Andrés Gamarra Torres

Vicerrector Académico

Dra. María Nelly Luján Espinoza

Vicerrectora de Investigación

Ms. Sc. Armstrong Barnard Fernandez Jeri

Decano de la Facultad de

Ingeniería y Ciencias Agrarias

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

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

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Identificación de biomarcadores aromáticos del proceso de fermentación espontánea y con cultivo iniciador en cacao nativo orgánico; del egresado Deisy Floreña Trigoso Rojas Deisy de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de esta Casa Superior de Estudios.



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

Chachapoyas, 30 de Noviembre de 2022


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

VISTO BUENO DEL COASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

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

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Identificación de biomarcadores aromáticos del proceso de fermentación espontánea y con cultivo iniciador en cacao nativo orgánico; del egresado Daisy Florelia Trigos Rojas de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrarioindustrial de esta Casa Superior de Estudios.



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

Chachapoyas, 30 de noviembre de 2022

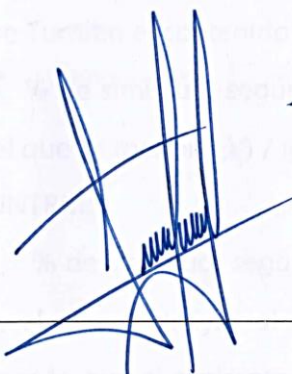
Firma y nombre completo del Asesor
Dr. Pedro García Alamilla

JURADO EVALUADOR DE TESIS



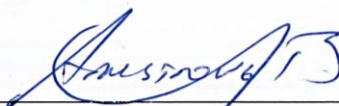
Ms. Grobert Arnado Guadalupe Chuqui

Presidente



Ms. Roberto Carlos Mori Zabarrurú

Secretario



Ms. Sc. Armstrong Barnard Fernandez Jeri

Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

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

ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

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

Identificación de biomarcadores aromáticos del proceso de fermentación espontánea y con cultivo iniciador en cacao nativo orgánico

presentada por el estudiante ()/egresado (x) Bach. Dersy F. Trigos Rojca

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial


con correo electrónico institucional 7193222461@untrm.edu.pe

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

- La citada Tesis tiene 13 % 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, 13 de diciembre del 2022


SECRETARIO


PRESIDENTE


VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



ANEXO 3-5

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 23 de diciembre del año 2022, siendo las 11:15 horas, el aspirante: Deisy Florelia Trigos Rojas, asesorado por Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: Identificación de biomarcadores aromáticos del proceso de fermentación espontánea y con cultivo iniciador en cacao nativo orgánico, para obtener el Título Profesional de Ingeniera Agroindustrial, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Ms. Grobert Amado Guadalupe Chuqui

Secretario: Ms. Roberto Carlos Mori Zabaraní

Vocal: Ms. Sc. Armstrong Barnard Fernandez Teri.

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



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

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

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

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

Siendo las 12:10 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

AUTORIZACION DE PUBLICACIÓN DE TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM	ii
DEDICATORIA	iii
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	vi
VISTO BUENO DEL COASESOR DE TESIS.....	vii
JURADO EVALUADOR DE TESIS.....	viii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TESIS.....	ix
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	x
ÍNDICE GENERAL	xi
INDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1. Material.....	18
2.2. Diseño del estudio	18
2.3. Métodos y técnicas.....	19
2.3.1. Fermentación espontánea	19
2.3.2. Fermentación controlada:.....	19
2.3.3. Análisis de compuestos volátiles por HS-GCMS.....	20
2.4. Análisis de datos.	21
III. RESULTADOS.....	22
3.1. Identificación de biomarcadores aromáticos durante el proceso FC Y FE.....	22
3.2. Identificación del comportamiento de los BA.	34
IV. DISCUSIÓN	44
V. CONCLUSIONES.....	49
VI. RECOMENDACIONES	50
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
VIII. ANEXOS.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Arreglo de datos para la investigación.....	19
Tabla 2. Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Copallín.....	23
Tabla 3. Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Tolopampa.....	27
Tabla 4. Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Guadalupe.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de Copallín, Tolopampa y Guadalupe	18
Figura 2. Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Copallín	35
Figura 3. Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Tolopampa.....	37
Figura 4. Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Guadalupe.....	39
Figura 5. Gráfico de cargas de PCA de biomarcadores aromáticos de granos de cacao fermentados con cultivo iniciador (a, c y e) y espontánea (b, d y f) procedentes de Copallín, Tolopampa y Guadalupe.	40
Figura 6. Gráfica de puntuación de biomarcadores aromáticos en granos de cacao fermentado con cultivo iniciador (a, c y e) y espontánea (b, d y f) procedentes de Copallín Tolopampa y Guadalupe.....	43

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue identificar biomarcadores aromáticos en el proceso de fermentación espontánea (FE) y fermentación con cultivo iniciador (FC) (*Saccharomyces cerevisiae*) en cacao nativo orgánico procedente de tres localidades de la región Amazonas. Ambas fermentaciones se realizaron por un periodo de siete días. La extracción de compuestos volátiles se realizó por microextracción en fase sólida de espacio de cabeza-cromatografía de gases-espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS). Se identificaron biomarcadores aromáticos de las familias de alcoholes, ésteres, cetonas, ácidos, aldehídos, terpenoides y terpenos, furanos, furanonas, piranos, pironas, hidrocarburos y otros. Los biomarcadores aromáticos deseables fueron 3-metilbutanal (58.67 µg/g), 2-metilbutanal (12.07 µg/g), 3-metil-1-butanol (41.99 µg/g), alcohol fenilético (33.91 µg/g), 2-heptanol (152.89 µg/g), bencenoacetaldehído (162.80 µg/g), linalol (107.88 µg/g) encontrados en los granos de cacao nativo fermentado con FC procedente de Tolopampa, teniendo mejores resultados en el quinto día. El uso de cultivo iniciador permitió un mejor resultado en la cantidad de biomarcadores aromáticos que se desarrollaron durante el proceso de fermentación, reduciendo el tiempo de fermentación de siete a cinco días.

Palabras claves: *Saccharomyces cerevisiae*, biomarcadores, GC-MS, fermentación, cacao nativo orgánico.

ABSTRACT

The objective of this work was to identify aromatic biomarkers in the process of spontaneous fermentation (FE) and fermentation with starter culture (FC) (*Saccharomyces cerevisiae*) in organic native cacao from three locations in the Amazonas region. Both fermentations were carried out for a period of seven days. The extraction of volatile compounds was carried out by solid phase microextraction of headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). Aromatic biomarkers from the families of alcohols, esters, ketones, acids, aldehydes, terpenoids and terpenes, furans, furanones, pyrans, pyrones, hydrocarbons and others were identified. Desirable aroma biomarkers were 3-methylbutanal (58.67 $\mu\text{g/g}$), 2-methylbutanal (12.07 $\mu\text{g/g}$), 3-methyl-1-butanol (41.99 $\mu\text{g/g}$), phenylethyl alcohol (33.91 $\mu\text{g/g}$), 2-heptanol (152.89 $\mu\text{g/g}$), benzeneacetaldehyde (162.80 $\mu\text{g/g}$), linalool (107.88 $\mu\text{g/g}$) found in native cocoa beans fermented with FC from Tolopampa, having better results on the fifth day. The use of starter culture allowed a better result in the amount of aromatic biomarkers that developed during the fermentation process, reducing the fermentation time from seven to five days.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, biomarkers, GC-MS, fermentation, organic native cocoa.

I. INTRODUCCIÓN

La fermentación es clave para los granos de cacao debido a que en esta etapa se forman los biomarcadores aromáticos, los sabores positivos y el color deseado, para esto, interfiere la microbiota que se desarrolla en el mucílago formada por levaduras, bacterias de ácido láctico y de ácido acético; paralelamente en el cotiledón la presencia de actividad enzimática, que permite la disminución del amargor y la astringencia (Beg et al., 2017; Cevallos-Cevallos et al., 2018; de C. Lima et al., 2021; do Carmo Brito et al., 2017; García-Ríos et al., 2021; Sarbu & Csutak, 2019).

La fermentación espontanea es más empleada debido a que se adapta a las condiciones ambientales, para ello solo interfieren los microorganismos presentes en el ambiente de la zona de producción, las superficies del fruto, herramientas o manos de los trabajadores y la etapa de la fermentación tiene una duración de 5 a 7 días (Sarbu & Csutak, 2019). El tiempo se considera bastante por lo que para reducirlo, así como también para mejorar la calidad de la fermentación se emplean cultivos iniciadores (Kresnowati & Febriami, 2016). De acuerdo con Chagas et al., (2021) las levaduras que tienen un impacto positivo en los granos de cacao son *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii* ya que son muy adaptables a diversos ambientes así también ayudan a frenar el desarrollo de aquellos microorganismos que proliferan la putrefacción del grano, además ayudan a desarrollar aromas deseables en los granos.

El aroma de los granos de cacao es uno de los indicadores que determinan la calidad y depende de varios factores como el origen, genotipo, condiciones ambientales, prácticas agrícolas. Los granos de cacao criollo se caracterizan por ser altamente aromáticos con aromas florales, caramelo, herbales, frutos secos, frutales (Aprotosoiaie, 2015; Castro-Alayo, 2019; García-Ríos et al., 2021). Se ha logrado identificar un total de 600 compuestos volátiles entre ellos a grupos de familia de alcoholes, aldehídos, cetonas, esterres, ácidos orgánicos, fenoles pirazinas, etc. La calidad volátil de los granos de cacao se definen por la cantidad y tipo de compuestos volátiles que estén presentes en este, el cacao fino tiene un alto porcentaje de pirazinas y estos compuestos se desarrollan en el proceso del tostado (Castro-Alayo, 2019; Cevallos-Cevallos et al., 2018; Mota-Gutierrez et al., 2019; Ordoñez et al., 2020).

En un estudio realizado por Cevallos-Cevallos et al., (2018) encontraron que durante la fermentación de los granos de cacao criollo se desarrollaron biomarcadores aromáticos como linalool, epoxilinalol, bencenoetanol, acetato de pentanol, germacreno, α -copaeno, aromadendreno, 3,6-heptanodiona, butanal, 1-fenil etenona, 2-nonanona y 2-pentanona relacionadas con notas florales, amaderados y frutales.

Tigero-Vaca et al., (2022) en su investigación empleando *Saccharomyces cerevisiae*, en los granos fermentados de manera espontánea identificaron 28 compuestos volátiles y en los granos en las que se empleó la levadura 32 compuestos volátiles entre ellos a 2,3-butanodiol, benzaldehído y ácido acético, éster etílico con aromas a flores, manteca, almendra y frutas en las primeras 72 horas.

En un estudio realizado por Acierno et al.,(2019) en granos de cacao de 23 diferentes orígenes geográficos (África, América, Sudeste de Asia) identificaron en Uganda y Tanzania una mayor concentración de 3-metilbutanal, benzaldehído para muestras pertenecientes a Sudamérica, 2,3-butanodiol se encontraron en una alta concentración en los granos pertenecientes al sudeste asiático, los monoterpenos encontrados como posibles biomarcadores geográficos para las muestras pertenecientes África - Sudeste Asiático; las muestras en las que se encontraron una mayor concentración de compuestos volátiles fue en los granos provenientes del Sudeste de Asia con respecto a los demás.

Existe evidencia que los biomarcadores aromáticos, difieren con el tipo de fermentación y lugar geográfico sin embargo en Amazonas aún no se tiene conocimiento al respecto. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar los biomarcadores aromáticos en el proceso de fermentación espontánea y con cultivo iniciador de *Saccharomyces cerevisiae* en cacao nativo orgánico procedente de tres localidades de Amazonas.

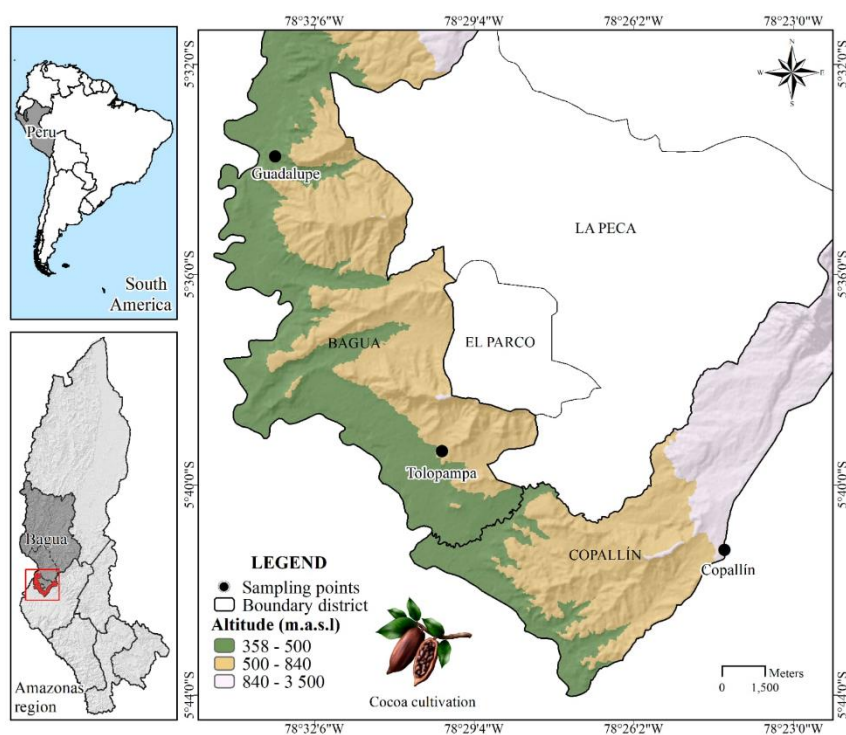
II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material

Para la presente investigación se empleó muestras de granos de cacao orgánico nativo provenientes de las localidades Copallín, Tolopampa y Guadalupe (Figura 1). Estos granos se fermentaron usando los métodos de fermentación con cultivo iniciador (*Saccharomyces cerevisiae*) (FC) y fermentación espontánea (FE) en la Cooperativa de servicios múltiples APROCAM ubicado en la Car. Bagua - Copallín Km. 4 - Provincia de Bagua - Departamento de Amazonas – Perú. Se utilizó 12 kg aproximadamente de los granos. Los granos fueron colocados en bolsas estériles y sometidas a choque térmico en nitrógeno líquido para ser trasladadas al Laboratorio de Investigación y certificaciones (LABICER) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI)-Lima para su posterior análisis.

Figura 1

Mapa de Copallín, Tolopampa y Guadalupe



2.2. Diseño del estudio

La presente investigación fue exploratoria con arreglo de datos, en las que se identificó los biomarcadores aromáticos presentes en los granos de cacao orgánico nativo

fermentado con FC y FE; de tres lugares diferentes por un periodo de siete días (Tabla 1).

Tabla 1

Arreglo de datos para la investigación.

Lugar	Fermentación	Tiempo de fermentación (Días)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
Copallín	Espontánea	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
	Cultivo Iniciador	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Tolopampa	Espontánea	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
	Cultivo Iniciador	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Guadalupe	Espontánea	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
	Cultivo Iniciador	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7

2.3. Métodos y técnicas

2.3.1. Fermentación espontánea

Se colocó 40 kg de granos de cacao fresco en caja fermentadora de madera recubierta con acero inoxidable previamente lavada y durante los primeros dos días se tapó con un saco para abrigar los granos y evitar que la temperatura disminuya. Se realizó volteo al segundo, cuarto y sexto día de fermentación transfiriendo los granos entre cajones para facilitar la aireación de la masa de granos. Las muestras se fueron recolectando cada 24 horas hasta llegar al séptimo día.

2.3.2. Fermentación con cultivo iniciador:

Se activó la cepa de *S. cerevisiae* en placas Petri que contenían agar YPD estéril incubados a 28 °C durante 72 h, las colonias se transfirieron a nuevas placas de las cuales se obtuvieron colonias replicadas; para transferir la levadura de las placas a un medio líquido se utilizó agua peptonada. Se preparó el cultivo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con agua peptonada, para el cual se emplearon 16 placas con *S. cerevisiae*, a cada placa se le agregó 2 mL de agua peptonada y luego con un hisopo estéril se limpiaron todas las placas y el contenido de cada una se traspasó al matraz, todo el proceso de activación de la cepa se realizó en el laboratorio de química de la Universidad Nacional

Toribio Rodríguez de Mendoza. El medio con las cepas de *S. cerevisiae* fue trasladado a la cooperativa APROCAM para llevar a cabo la inoculación (Chagas Junior et al., 2021). El procedimiento de fermentación y recolección de muestras fue el mismo que en la FE.

2.3.3. Análisis de compuestos volátiles por HS-GCMS

Preparación de las muestras

- Se trituró 2.5 g granos de cacao fermentando en un mortero de porcelana y se colocó en viales de 10mL (PTFE/Silicona septa) con 3 mL de agua ultra pura y 50 µL de solución de butanol, con una disolución patrón de 0,5 gL⁻¹.
- Los viales se cerraron herméticamente con un tabique de butilo/teflón utilizando un sellador específico, dejándolo hasta que se alcance el tiempo de equilibrio.
- Para la extracción de los compuestos volátiles se utilizó fibras de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) con un diámetro exterior de 50/30µm. Antes de pasar la primera muestra la fibra se acondicionó en el cromatógrafo inyector a una temperatura de 250°C por un lapso de 5 minutos, después la fibra es expuesta en el espacio de la cabeza del vial a 50 ° C durante 45minutos, en este los compuestos volátiles son absorbidos

Condiciones analíticas del Cromatógrafo de Gases

Se empleó el cromatógrafo de gases Shimadzu modelo GC-2010 Plus con columna capilar Rtx-Wax (30mx0,25mmIDx0,25µmdf, marca Restek). En el horno, la temperatura fue de 40°C durante 5min, luego se incrementó hasta 140°C a una velocidad de 2°C/min y luego se aumentó a una velocidad de 10°C/min a 250 °C por un lapso de 66min, Helio (tasa de flujo de 0.75 mLmin⁻¹) fue el gas acarreador. La temperatura del inyector (operado en modo splitless) y del detector fue de 250°C: la desorción de fibra SPME tiempo 5 min.

Espectrometría de masas (MS)

La identificación de los compuestos volátiles se realizó en un espectrómetro de masas Shimadzu modelo GCMS-QP2010 Ultra. Los espectros de masas de impacto de electrones se registraron a 70 eV (30 a 500 uma (m/z) modo de adquisición de los datos, con velocidad de escaneo de 1666 y tiempo de evento de 0.3s). La temperatura de la fuente fue de 230°C, temperatura de interfase 250°C.

El registro espectral a lo largo de la elución se realizó automáticamente con el software GCMS Real Time Analysis. Los parámetros cromatográficos de MS son los mismos que los mencionados en Cromatografía de gases, modificado del autor Alvarez-Villagomez et al., (2022)

Cuantificación de los compuestos volátiles

La cuantificación de los compuestos volátiles se realizó en comparación con los datos de la biblioteca del National Institute of Standards and Technology-NIST. El contenido de cada compuesto volátil fue calculado empleando la ecuación descrita por Escobar et al. (2021).

$$q_i(\mu g g^{-1}) = \frac{25 * A_i}{A_{but} * m_e * W}$$

Donde:

q_i : cantidad de compuesto i

A_i : área del compuesto i

A_{but} : área de butanol (estándar)

25: contenido de butanol en $mg kg^{-1}$

m_e : masa de muestra introducida en el vial en g

W: agua contenida de la muestra

2.4. Análisis de datos.

Para el análisis de datos se realizó empleando un mapa de calor discriminatorio de metabolitos, que permitió ver el comportamiento de los biomarcadores aromáticos en cada muestra a lo largo del proceso de fermentación, para el cual se empleó el paquete estadístico Rstudio y análisis de compuestos principales (PCA) de acuerdo a la concentración de los compuestos volátiles identificados y poder ver la diferencia que existen en los grupos, para esto se hizo uso del paquete estadístico Statistica.

III. RESULTADOS

3.1. Identificación de biomarcadores aromáticos durante el proceso FC Y FE.

La tabla 2 muestra a los biomarcadores aromáticos (BA) identificados con el HS-SPME-GCMS en los granos de cacao orgánico nativo fermentados con FC y FE procedentes de Copallín. Se identificaron 49 BA que se agruparon de acuerdo a su clase química como alcoholes, ésteres, cetonas, ácidos, aldehídos, terpenoides y terpenos, hidrocarburos y otros. En los granos sin fermentar se identificaron un promedio de 17 BA, en mayor cantidad cetonas, aldehídos y alcoholes, notando la ausencia de ésteres. Los BA que encontrados en ambas fermentaciones con similares concentraciones fueron 2-pentanona, 3-metil-butanal, bencenoacetaldehído, 2-metil-butanal asociados con aromas a almendra, cacao, avellana, malta, chocolate, baya, geranio, miel y nuez; 1-pentanol, ácido dietil-acético, ácido n-hexadecanoico compuestos que solo se encontraron en los granos FC, 1-propanol, 2-heptanol, acetato, etil acetato se identificó solamente en los granos FE. Los BA con una mayor cantidad de $\mu\text{g/g}$ que se identificaron fueron, 3-metil-1-butanol, 1-butanol, 3-metil acetato, linalol y ácido acético en el cuarto día de fermentación y acetoína, 2-nonanona en el séptimo día de fermentación. En el séptimo día de fermentación se identificaron 30 BA para los granos fermentados FC y 29 para FE.

Tabla 2

Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Copallín.

Nombre	Descripción	Copallín (µg/g)															
		Con cultivo iniciador							Espontánea								
		D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Aldehídos																	
2-metil-butanal	Almendra, cacao, fermentada, avellana, malta	10.0 3	5.42	0	0	7.99	3.89	1.06	8.17	1.93	15.13	0.00	0.00	8.03	8	5	9.86
3-metil-butanal	Malta, chocolate	12.8 5	9.97	0	1.35	35.48	4	4.92	6	4	29.56	9.87	0.00	35.34	8	0	53.1
Hexanal	Manzana, grasa, fresco, verde, aceite	22.0 5.94	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.63	9.82	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Benzaldehído	Almendra amarga, azúcar quemado, cereza, malta, pimiento asado	0.00 22.1	0.00 27.8	0.00 123.6	0.00 19.4	8.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.3
Bencenoacetaldehído	Bayas, geranio, miel, nuez, picante	1	6	9	1	85.98	5	0	6	2	35.02	5	53.29	0	0	1	8
Cetonas																	
2-pentanona	Fruta, picante	41.6 4	38.2 8	37.15	11.4 9	26.26	4	3.10	14.2 8	44.5 8	40.0 63.37	9	7.19	0.00	13.5	17.3	13.5
2,3-butanodiona	Mantequilla, pastelería, levadura	0.00 42.4	0.00 84.2	0.00	0.00 24.3	0.00	0.00	0.00	9 10.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.55	0.00	4.87
2-heptanona	Queso azul, fruta, verde, nuez, especias	1	9	49.58	8	68.88	7	4	49	5	54.68	8	24.99	48.66	7	0	3
3-metil-2-butanona	Agentes aromatizantes		24.4		17.1		58.6	11.3	150.		0.00	0.00	0.00	14.46	0.00	0.00	0.00
Acetoína	Mantequilla, cremosa, pimienta verde	0.00	9	92.12	0	59.09	5	6	26	0.00	46.90	4	11.89	91.35	8	4	42.0
2-nonanona	Fragante, fruta, verde, leche caliente	3.61	4.38	0.00	0.00	0.00	3.90	0.00	8.86	2.33	0.00	0.00	0.00	7.81	0.00	0.00	0.00
Acetofenona	Almendras, flor, carne, mosto	6.85	7.35	20.87	0.00	0.00	4.52	0.00	9.09	10.6 7	0.00	2	0.00	0.00	9.48	6.11	0.00
Alcoholes																	
Etanol	Agentes aromatizantes	0.00 16.8	826. 64	3063. 63	325. 96	1897. 66	0.00	0.00	12.8 0	29.8 6	1469. 25	823. 37	1273. 49	763.3 9	3.86	0.00	0.00
2-metil-3-buten-2-ol	Agentes aromatizantes	2	8.28	29.08	3.16	13.14	4.48	0.00	0.00	7	16.45	7	4.63	0.00	0.00	0.00	0.00

2-metil-1-propanol	Manzana, amargo, cacao, vino	0.00	8.15	15.43	2.50	8.34	3.06	0.00	2.72	0.00	12.60	11.4	3	7.07	6.56	1.63	3.18	1.20	
					33.5				30.8										
3-metil-2-butanol	Agentes aromatizantes	0.00	0.00	0.00	1	0.00	0.00	7.49	0	1.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
					60.4	181.7	75.1	32.1	129.				23.3		123.7	45.0	80.9	21.8	
1-butanol, 3-metil-, acetato	Manzana, plátano, pegamento, pera	0.00	0.00	34.49	7	4	1	9	67	0.00	0.00	4	21.59	3	9	9	1		
		197.	77.1	131.7		109.7	45.8			90.8	152.7	89.7			26.6	36.7	14.2		
2-Pentanol	Aceite fusel, verde	42	6	0	0.00	6	2	0.00	0.00	3	1	6	55.96	61.12	7	4	3		
			56.3	137.3	48.9	170.3	50.6	11.0	65.7			81.8		112.6	33.3	56.3	32.5		
3-metil-1-Butanol	Quemado, cacao, floral, malta	0.00	3	5	9	8	9	0	4	0.00	91.91	5	95.04	2	7	9	3		
2-Hexanol		4.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.90	3.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
		102.	168.	116.0	54.2	158.5	74.2	30.9	161.	53.8	227.7	38.4		188.7	69.1	70.2	44.6		
2-Heptanol	Cítricos, tierra, fritos, hongos, aceite	12	26	3	3	9	0	1	91	6	4	7	71.76	7	4	5	7		
2-Nonanol	Pepino	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.81	0.00	8.54	0.00	0.00	11.15	0.00	0.00	0.00		
				119.7		170.2	79.6	12.4	102.					113.6	39.4	36.6	31.4		
2,3-butanodiol	Agentes aromatizantes	0.00	5.58	8	0.00	6	5	4	67	0.00	5.91	5.31	14.62	7	6	3	5		
			14.4		10.5		31.1		66.4			32.8			34.8	46.2	38.8		
alcohol feniletílico	Fruta, miel, lila, rosa, vino	0.00	7	37.46	3	68.75	3	8.93	0	8.37	14.40	9	0.00	89.18	8	0	9		
1-propanol	Alcohol, caramelo, picante									0.00	5.16	5.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
1-Pentanol	Balsámico, frutal, verde, especiado, levadura	0.00	4.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00										
Ésteres																			
Acetato de isobutilo	Manzana, plátano, floral, hierba	0.00	0.00	3.62	5.37	10.68	7.44	1.59	3.79	0.00	0.00	1.97	0.00	10.82	1.44	3.95	0.00		
Ácido acético, éster butílico	Manzana, plátano, pegamento, acre	0.00	0.00	3.91	0.00	6.78	1.73	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.20	0.00	0.00	1.94		
				10.8		15.4			37.2					17.0	23.2				
2-pentanol, acetato	Fruta	0.00	0.00	9.80	1	35.60	0	6.15	4	0.00	0.00	6.52	11.54	17.13	9	9	4.53		
Ácido hexanoico, éster etílico	Cáscara de manzana, brandy, chicle, fruta demasiado madura, piña	0.00	0.00	6.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.25	0.00	0.00	0.00		
Ácido propanoico, 2-hidroxi-, éster etílico	Queso, floral, afrutado, especiado, gomoso	0.00	0.00	0.00	0.00	16.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.45	0.00	0.00	0.00	0.00		
Ácido acético, éster 2-feniletílico	Flor, miel, rosa	0.00	0.00	0.00	3.38	7.91	3.13	3.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.47	0.00		
2-heptanol, acetato	Agentes aromatizantes									0.00	0.00	0.00	5.67	0.00	3.42	0.00	0.00		
Ácido bencenoacético, éster etílico	Floral, fruta, miel, rosa	0.00	0.00	0.00	0.00	6.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.71	0.00	0.00		
Acetato de etilo	Aromático, brandy, uva									0.00	0.00	0.00	98.40	0.00	0.00	0.00	0.00		
Ácidos																			
Ácido acético	Ácido, frutal, picante, agrio, vinagre	6.17	21.3	669.3	180.	1538.	700.	158.	590.			29.8	104.8	1847.	242.	516.	142.		
			7	5	07	79	36	41	99	4.36	24.46	8	9	12	14	43	48		
							33.6		64.3						27.5	32.8	21.3		
Ácido 2-metil-propanoico	Quemado, mantequilla, queso, sudor	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7	8.24	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	6	2		

ácido 3-metil-butanoico	Queso, picante	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	88.2	29.3	178.						73.3	93.2	47.2
							9	7	27	0.00	0.00	0.00	0.00	18.19	0	4	6
ácido octanoico	Queso, grasa, hierba, aceite	0.00	0.00	0.00	1.82	0.00	1.17	0.52	2.55	0.77	0.00	2.19	0.00	3.15	1.29	0.00	1.30
ácido n-hexadecanoico	Agentes aromatizantes	0.00	0.00	10.07	1.20	0.00	0.00	0.52	0.00								
ácido dietil-acético	Fruta	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.93								
Terpenoides y terpenos																	
D-limoneno	Cítricos, menta										0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.12
óxido de trans-linalol	Agente aromatizante	2.96	0.00	14.47	0.00	6.43	4.98	0.00	6.70	5.67	0.00	0.00	0.00	0.00	4.98	6.07	3.57
				223.7	17.0	121.1	17.4	17.1	45.4	177.		26.2			74.9	89.0	97.6
Linalol	Cilantro, floral, lavanda, limón, rosa.	7.20	5.70	8	1	6	9	9	0	73	19.12	6	93.12	30.36	8	9	7
Hydrocarbons																	
Tolueno	Caramelo, sintético (sabor desagradable)	2.21	0.00	0.00	0.00	0.00	1.52	0.00	4.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.81	1.99
															21.5		17.4
beta.-Mirceno	Balsámico, fruta, geranio, hierba, mosto.	0.00	0.00	7.09	0.00	62.98	0.00	0.00	0.00	0.00	5.90	0.00	0.00	0.00	6	4.29	7
Estireno	Bálsamo dulce, plástico floral (sabor desagradable)	0.00	0.00	8.05	0.00	0.00	4.85	0.00	5.55	0.00	0.00	0.00	0.00	7.99	0.00	4.79	5.18
															28.0		22.4
trans-.beta.-ocimeno	Floral	0.00	0.00	0.00	0.00	84.36	0.00	0.93	0.00	0.00	6.40	0.00	0.00	0.00	3	8.09	0
Otros																	
2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano		0.00	0.00	0.00	0.38	0.00	5.23	0.00	3.25	0.00	0.00	4.57	0.00	0.00	3.08	2.47	1.64

Nota: D: días de fermentación.

La Tabla 3 presenta a los BA identificados de los granos de cacao nativo orgánico fermentados FC y FE procedentes de Tolopampa. Se identificaron un total de 53 BA, agrupado en 8 familias químicas alcoholes, esterés, cetonas, ácidos, aldehídos, terpenoides y terpenos, furanos, furanonas, piranos, pironas hidrocarburos y otros. En los granos sin fermentar se identificaron un promedio de 19 BA. En las muestras de los granos fermentados FC se obtuvo un mayor contenido $\mu\text{g/g}$ de los siguientes compuestos: 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, bencenoacetaldehído, 2-nonanona, 2-metil-propanol, 1-butanol-3-metil, acetato, 3-metil-butanol, ácido acético, linalol, benzaldehído, en los últimos días de fermentación. Algunos compuestos se identificaron solamente en granos de cacao nativo orgánico fermentado FC como, 2-octanona, 2-butanol, alcohol bencílico, acetato de 1-metoxi-2-propilo, ácido hexadecanoico, éster etílico, acetato de 2-octanol, 1,2-propanodiol, diacetato, ácido n-hexadecanoico, 1-(2-furanilo)-etanono; y otros compuestos 3-metil-2-butanol, ácido acético - butil éster, 2-heptanol - acetato, ácido pentanoico, 2-hidroxi-4-metil-, metil éster:, D-limoneno en los granos FE. En los granos fermentados FC se identificó una mayor cantidad de BA en el quinto y sexto día, teniendo un total de 32 BA y en los granos FE se tuvo 31 BA en el séptimo día.

Tabla 3

Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Tolopampa.

Nombre	Descripción	Tolopampa (µg/g)																
		Con cultivo iniciador									Espontánea							
		D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	
Aldehídos																		
2-metil-butanal	Almendra, cacao, fermentada, avellana, malta	1.76	9.32	1.04	8.79	5.82	12.07	6.32	17.56	8.84	2.22	6.83	4.01	4.97	0.67	7.13	1.61	
					37.6					10.8						31.7		
3-metil-butanal	Malta, chocolate	2.71	17.36	0.00	0	30.25	58.67	30.77	76.32	9	3.87	23.90	19.65	20.27	5.09	5	5.50	
Hexanal	Manzana, grasa, fresco, verde, aceite	0.00	6.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
					11.6													
Benzaldehído	Almendra amarga, azúcar quemado, cereza, malta, pimiento asado	0.00	0.00	0.00	6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.63	0.00	0.00	2.93	0.00	
		14.3		28.4	112.	139.4	162.8	126.9	275.7	19.3	25.4	145.5			13.8	88.9	25.4	
Bencenoacetaldehído	Baya, geranio, miel, nuez, picante	7	33.87	1	80	3	0	7	5	9	4	7	82.14	90.76	2	5	5	
Cetonas																		
2-pentanona	Fruta, picante	4.95	39.69	6	10.3	8.70	10.77	28.73	24.98	26.58	5	9	37.93	22.52	11.64	4.89	20.6	23.5
					6						86.9	17.9				2	7	
2,3-butanodiona	Mantequilla, pastelería, levadura	0.00	0.00	0.00	3.36	0.00	10.86	0.00	9.79	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.95	9.13	
		137.		38.8	52.9		131.0			41.0	34.4				24.4	76.8	93.4	
2-heptanona	Queso azul, fruta, verde, nuez, especias	43	51.29	6	5	43.73	2	99.47	86.95	0	3	74.69	49.69	43.23	3	4	5	
		43.6		27.1	88.5	147.2	198.5	161.4	180.9	65.5	47.9	208.5	146.0	25.6	164.	181.		
Acetoína	Mantequilla, cremosa, pimienta verde	1	28.42	6	9	3	1	6	5	2	6	7	85.42	6	8	41	61	
											11.2							
2-nonanona	Fragante, fruta, verde, leche caliente	8.95	0.00	9.53	0.00	5.14	34.48	36.25	0.00	0.00	2	0.00	9.71	0.00	3.72	1.75	6.05	
					14.6					29.2								
Acetofenona	Almendras, flor, carne, mosto	3.89	10.28	0.00	1	10.40	9.28	0.00	13.67	2	8.02	14.03	7.96	6.60	0.00	5.53	9.32	
2-octanona	Grasa, fragante, moho	1.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00									
Alcoholes																		
2-Butanol	Agentes aromatizantes	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.37									
		183.	1848.	128.	335.	400.2		220.2		371.	749.	2674.	1633.	537.4				
Etanol	Agentes aromatizantes	35	78	07	17	4	27.97	2	0.00	32	37	54	58	3	3.36	0.00	0.00	
										20.9								
2-metil-3-buten-2-ol	Agentes aromatizantes	5.49	11.64	3.68	5.38	6.83	8.67	12.45	13.74	3	5.28	16.56	9.74	6.04	0.00	2.61	6.19	

2-metil-1-propanol	Manzana, amargo, cacao, vino	0.00	7.70	2.56	3.30	0.00	4.72	6.54	5.60	0.00	6.82	8.89	4.47	0.00	0.00	0.00	3.82
3-metil-2-butanol	Agentes aromatizantes									0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.83	0.00	0.00
1-butanol, 3-metil-, acetato	Manzana, plátano, pegamento, pera	0.00	2.95	50.3	86.0	125.8	111.8	144.9	143.2	0.00	2.84	31.74	55.33	123.4	25.4	72.4	73.5
		38.6		6	5	6	9	9	3	0.00	131.	64.5	118.6	9	5	3	2
2-Pentanol	Aceite fusel, verde	6	95.19	34.2	45.5	41.55	59.68	72.65	75.01	36	3	4	66.27	50.66	0.00	0	1
		12.8		29.2	44.0					12.4	44.1	114.3				20.0	54.6
3-metil-1-Butanol	Quemado, cacao, floral, malta	6	66.92	9	5	43.47	41.99	55.66	45.65	5	7	5	65.54	53.79	7.91	5	4
2-Hexanol		1.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.20	2.30	0.00	1.58	0.00	0.00	0.00	0.00
		198.		68.4	78.8					67.5	75.1	128.3			24.2	55.2	122.
2-Heptanol	Cítricos, tierra, fritos, hongos, aceite	35	56.19	2	7	62.14	9	7	95.64	1	4	4	91.27	86.12	3	6	72
2-Nonanol	Pepino	2.40	0.00	5.82	0.00	0.00	18.36	20.53	0.00	0.00	3.92	0.00	3.84	0.00	1.95	0.00	4.90
					48.1			158.4	229.6			315.1				51.4	94.6
2,3-butanodiol	Agentes aromatizantes	0.00	19.09	0.00	8	44.03	91.17	9	4	0.00	0.00	8	36.67	42.31	0.00	5	9
Alcohol de bencilo	Cerezas hervidas, musgo, tostadas, rosas	0.00	10.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00								
				10.0	38.2						15.2					23.2	50.1
alcohol feniletílico	Fruta, miel, lila, rosa, vino	3.47	16.89	0	4	33.11	33.91	48.92	50.94	0.00	2	80.94	29.04	39.24	6.14	2	1
Ésteres																	
Acetato de isobutilo	Manzana, plátano, floral, hierba	0.00	0.00	5.92	4.36	11.72	7.05	14.34	12.85	0.00	0.00	3.69	6.41	9.55	2.12	3.36	4.56
Ácido acético, éster butílico	Manzana, plátano, pegamento, acre			14.5	34.4					0.00	0.00	4.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
				6	7	36.73	72.59	58.40	71.14	0.00	1.89	12.10	16.36	33.04	8.35	7	0
2-pentanol, acetato	Fruta	0.00	2.04														
Ácido hexanoico, éster etílico	Cáscara de manzana, brandy, chicle, fruta demasiado madura, piña	0.00	0.00	0.00	5.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.71	5.25	0.00	0.00	0.00
Ácido propanoico, 2-hidroxi-, éster etílico	Queso, floral, afrutado, especiado, gomoso	0.00	0.00	0.00	3.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.44	0.00	0.00	0.00	0.00
acetato de acetoína	Fruta	0.00	0.00	0.00	4.77	6.45	11.09	7.84	11.46	0.00	0.00	0.00	0.00	4.76	1.61	3.31	1
Acetato de 1-metoxi-2-propilo		0.00	0.00	0.00	0.00	3.47	0.00	8.31	6.27								
Ácido acético, éster 2-feniletílico	Flor, miel, rosa	0.00	0.00	4.32	6	14.53	6.37	18.89	12.80	0.00	0.00	0.00	4.78	13.14	2.75	6.88	4.64
Ácido hexadecanoico, éster etílico	Cera	0.00	0.00	0.00	0.81	1.14	0.00	0.00	0.00								
Acetato de 2-octanol	Cítricos (naranja)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.30								
1,2-propanodiol, diacetato	Fruta	0.00	0.00	0.00	2.48	0.00	0.00	0.00	0.00								
2-heptanol, acetato	2-heptanol, acetato									0.00	2.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ácido pentanoico, 2-hidroxi-4-metil-, éster metílico	Fruta									0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.09	0.00

Ácido bencenoacético, éster etílico	Floral, fruta, miel, rosa	0.00	0.00	0.00	4.41	5.00	0.00	4.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.18	0.00	0.00	0.00	
Ácidos																		
ácido acético	Ácido, frutal, picante, agrio, vinagre	0.00	52.48	301.77	774.89	1360.35	1676.70	2723.66	2452.17	26.27	0.00	1318.29	570.06	1241.96	172.02	386.14	894.38	
Ácido 2-metil-propanoico	Quemado, mantequilla, queso, sudor	0.00	0.00	0.00	2.66	4.02	34.23	19.18	48.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.45	9	1	
Ácido 3-metil-butanoico	Queso, picante	0.00	0.00	0.00	5.63	6.22	56.95	33.76	101.65	0.00	0.00	0.00	0.00	7.79	11.4	65.8	68.4	
Ácido n-hexadecanoico	Agentes aromatizantes	0.00	0.00	2.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00									
Terpenoides y terpenos																		
D-limoneno	Cítricos, menta									0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.15	
óxido de trans-linalol	Agente aromatizante	5.33	0.00	0.00	7.50	4.55	6.36	9.33	8.36	4.14	1.88	17.33	5.27	5.72	1.03	3.31	8.21	
Linalol	Cilantro, floral, lavanda, limón, rosa.	31.2	3.85	16.1	32.6	42.64	107.8	67.75	24.61	26.6	19.3	62.76	16.61	26.13	7.00	23.9	34.9	
Furanos, furanonas, piranos, pironas																		
1-(2-furanyl)-etanona	Balsámico, cacao, café	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.75	0.00	0.00									
Hidrocarburos																		
Tolueno	Caramelo, sintético (sabor desagradable)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.18	0.00	4.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.60	
beta.-Mirceno	Balsámico, fruta, geranio, hierba, mosto.	0.00	0.00	0.00	0.00	16.22	15.01	5.03	0.00	0.00	3.52	0.00	0.00	0.00	0.00	6.26	0.00	
Estireno	Bálsamo dulce, plástico floral (sabor desagradable)	2.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.50	11.77	5.55	0.00	9.72	0.00	0.00	0.00	0.00	8.89	
trans-.beta.-ocimeno	Floral	0.00	0.00	0.00	0.00	23.22	13.29	0.00	0.00	0.00	3.43	0.00	0.00	0.00	0.00	8.74	0.00	
Otros																		
2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.67	3.89	4.61	0.00	0.00	0.00	126.9	9	0.00	0.00	2.41	4.09

Nota: D: días de fermentación

La Tabla 4 nos muestra el total de BA que se pudieron identificar en el HS-SPME-GCMS de las muestras de los granos de cacao nativo orgánico fermentados FC y FE procedentes de Guadalupe. En total se identificaron 51 BA entre ellas se tiene a alcoholes, esterés, cetonas, ácidos, aldehídos, terpenoides y terpenos, hidrocarburos y otros. En los granos sin fermentar se tiene un aproximado de 15 BA y al final de la fermentación se tuvo 35 BA en los granos fermentados FC y 31 en los granos FE. Los BA que solo se encontraron en los granos fermentados con FC fueron 3-metil-2-butanol, acetato de 1-metoxi-2-propilo, ácido n-hexadecanoico, d-limoneno, y solo se encontraron en los granos FE nonanal, 2 butanol, ácido octanoico - éster etílico, oleato de etilo.

Tabla 4

Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Guadalupe.

Nombre	Descripción	Guadalupe (µg/g)															
		Con cultivo iniciador								Espontánea							
		D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Aldehídos																	
2-metil-butanal	Almendra, cacao, fermentada, avellana, malta	3.33	5.00	0.00	3.90	7.30	1.63	7.58	6.39	4.37	5.52	11.25	5.81	8.75	7.73	8.74	3.76
3-metil-butanal	Malta, chocolate	0.00	5.71	0.95	0.00	34.20	7.10	14.2	21.72	8.10	0.00	22.21	22.47	33.61	29.86	32.1	11.7
Hexanal	Manzana, grasa, fresco, verde, aceite	0.00	4.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	3.82	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Nonanal	Grasa, floral, verde, limón									0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.96
Benzaldehído	Almendra amarga, azúcar quemado, cereza, malta, pimiento asado	0.00	0.00	0.00	34.42	0.00	0.00	0.00	20.95	0.00	0.00	0.00	8.64	7.89	0.00	7.06	0.00
Bencenoacetaldehído	Baya, geranio, miel, nuez, picante	6.61	4	8.87	66.91	4	1	8	64.71	9.67	49.77	98.66	99.29	9	6	7	1
Cetonas																	
2-pentanona	Fruta, picante	24.5	31.0									33.5					
2,3-butanodiona	Mantequilla, pastelería, levadura	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.90	2.30	4.50
2-heptanona	Queso azul, fruta, verde, nuez, especias	16.2	208.	42.9		106.2	30.4	69.8	115.9	176.	186.1					107.	64.1
Acetoína	Mantequilla, cremosa, pimienta verde	1	90	1	91.56	8	8	1	5	06	1	63.34	92.70	91.17	80.53	61	3
2-nonanona	Fragante, fruta, verde, leche caliente	0.00	9	7.95	59.01	4	5	5	4	0.00	0.00	12.88	24.46	34.94	82.65	2	23
acetofenona	Almendras, flor, carne, mosto	5.57	9	0.00	0.00	16.04	0.00	6.25	14.59	2	27.53	30.75	15.32	12.46	9.62	8.13	8.52
Alcohols																	
2-Butanol	Agentes aromatizantes	21.3	926.	231.	2628.	778.7	12.3				1.59	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Etanol	Agentes aromatizantes	0	86	75	31	4	1	0.00	0.00	2	63	98	21	04	6.11	4.99	0.00

2-metil-3-buten-2-ol	Agentes aromatizantes	7.90	6.97	0.00	9.87	9.76	0.00	0.00	2.71	10.2	7	17.74	14.42	12.03	4.28	5.02	0.00	0.00	
2-metil-1-propanol	Manzana, amargo, cacao, vino	0.00	1.91	2.70	12.30	11.99	1.54	2.78	2.56	0.00	10.38	18.19	12.18	4.39	4.55	0.00	1.29		
3-metil-2-butanol	Agentes aromatizantes	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5	0.00										
1-butanol, 3-metil-, acetato	Manzana, plátano, pegamento, pera	0.00	0.00	2	54.78	5	5	8	69.21	0.00	0.00	0.00	79.85	44.96	8	5	6		
2-Pentanol	Aceite fusel, verde	99.1	111.	21.0	127.1	104.0	13.8		149.	238.4	192.4	128.6				26.0	29.5		
3-metil-1-Butanol	Quemado, cacao, floral, malta	4	81	9	8	0	7	0.00	43.25	42	8	6	2	86.63	59.59	7	0		
2-Hexanol		47.3	52.7	199.2	224.8	23.4	79.7			154.3	227.8	170.7	159.8			31.9	28.9		
2-Heptanol	Cítricos, tierra, fritos, hongos, aceite	0.00	7	6	5	6	3	1	73.07	0.00	3	3	8	4	64.17	2	0		
2-Octanol	Grasa, hongo	2.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.08	5.23	4.75	3.55	3.50	0.00	0.00	0.00		
2-Nonanol	Pepino	34.9	359.	95.9	622.0	280.7	40.2	144.	168.5	362.	553.6	177.0	307.7	248.4	149.6	106.	104.		
2,3-butanodiol	Agentes aromatizantes	3	09	1	9	1	8	32	2	73	5	4	2	6	5	67	51		
Alcohol de bencilo	Cerezas hervidas, musgo, tostadas, rosas	0.00	0.00	0.00	10.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
alcohol feniletílico	Fruta, miel, lila, rosa, vino	0.00	0	2.01	2	5.55	0.00	4.57	5.41	3	60.85	6.15	19.12	2.90	16.14	7.95	3.97		
Ácidos		16.8			112.6		25.1	27.8	149.2				208.0	115.7	48.1	73.6			
Alcohol de bencilo	Cerezas hervidas, musgo, tostadas, rosas	0.00	3	4.53	4	53.51	8	8	1	0.00	17.20	8.76	19.84	7	6	6	3		
alcohol feniletílico	Fruta, miel, lila, rosa, vino	0.00	13.0							47.1									
Alcohol de bencilo	Cerezas hervidas, musgo, tostadas, rosas	0.00	5	0.00	59.19	0.00	0.00	0.00	0.00	9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
alcohol feniletílico	Fruta, miel, lila, rosa, vino	0.00	16.9	14.3			17.4	101.					106.8		32.8	37.1			
Ácidos		0.00	2	3	68.93	99.64	7	29	88.76	0.00	45.94	46.53	43.74	5	73.61	2	8		
Ésteres																			
Acetato de isobutilo	Manzana, plátano, floral, hierba	0.00	0.00	2.08	0.00	5.12	2.41	3.49	2.15	0.00	0.00	0.00	5.14	2.54	5.37	0.00	1.09		
Ácido acético, éster butílico	Manzana, plátano, pegamento, acre	0.00	0.00	0.00	0.00	4.44	0.00	0.00	4.62	0.00	0.00	0.00	1.23	3.26	0.00	1.57	1.70		
2-pentanol, acetato	Fruta	0.00	0.00	2.88	8.16	27.37	7	5	13.27	0.00	0.00	0.00	14.97	16.05	28.66	5.39	3		
Ácido hexanoico, éster etílico	Cáscara de manzana, brandy, chicle, fruta demasiado madura, piña	0.00	0.00	0.00	0.00	13.43	3.37	0.00	7.06	0.00	0.00	0.00	14.91	4.98	4.33	0.00	1.91		
Ácido propanoico, 2-hidroxi-, éster etílico	Queso, floral, afrutado, especiado, gomoso	0.00	0.00	0.00	41.37	15.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	14.17	0.00	24.01	0.00	0.00	0.00		
acetato de acetoína	Fruta	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.26		
Acetato de 1-metoxi-2-propilo		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.78	5.68										
Ácido octanoico, éster etílico	Albaricoque, brandy, grasa, floral, piña									0.00	0.00	3.95	0.00	7.79	0.00	0.00	0.00		
Ácido acético, éster 2-feniletílico	Flor, miel, rosa	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.56	0.00	8.52		
Ácido hexadecanoico, éster etílico	Cera	0.00	0.00	0.00	2.10	0.00	0.00	2.66	0.00	0.00	0.00	0.00	1.46	1.65	0.00	0.00	0.55		

Oleato de etilo	Productos lácteos									0.00	0.00	0.00	0.00	1.07	0.00	0.00	0.00
Ácidos																	
ácido acético	Ácido, frutal, picante, agrio, vinagre	0.00	27.6	167.	628.1	1703.	390.	754.	1394.				217.8	971.3	1699.	472.	715.
			2	67	5	46	73	13	50	0.00	31.13	28.85	2	0	42	17	37
							10.7	45.3								42.0	39.5
Ácido 2-metil-propanoico	Quemado, mantequilla, queso, sudor	0.00	0.00	0.00	0.00	4.43	0	9	60.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	45.87	0	4
							39.2	126.	200.9						135.0	110.	114.
Ácido 3-metil-butanoico	Queso, picante	0.00	0.00	0.00	0.00	26.03	6	96	5	0.00	0.00	0.00	0.00	9.51	6	94	55
ácido octanoico	Queso, grasa, hierba, aceite	0.00	0.00	0.00	4.43	0.00	0.95	2.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.58	0.00	0.00
Ácido n-hexadecanoico	Agentes aromatizantes	0.92	1.99	0.70	0.00	0.00	1.32	0.00	0.00								
Terpenoides y terpenos																	
D-limoneno	Cítricos, menta	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.20								
óxido de trans-linalol	Agente aromatizante	0.00	0.00	0.00	0.00	6.66	0.00	3.96	5.98	0.00	6.75	0.00	4.11	4.54	0.00	0.00	3.32
		24.1		11.5	289.7			25.4									13.7
Linalol	Cilantro, floral, lavanda, limón, rosa.	5	4.64	2	2	31.74	6.63	6	45.02	8.36	39.99	7.20	27.25	27.11	11.90	9.94	4
Hidrocarburos																	
Tolueno	Caramelo, sintético (sabor desagradable)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.79	3.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.63	0.00	0.00
beta.-Mirceno	Balsámico, fruta, geranio, hierba, mosto.	3.97	8.73	0.00	146.5	12.25	0.00	0.00	2.45	0.00	9.03	0.00	12.03	0.00	0.00	2.87	0.00
					7												
Estireno	Bálsamo dulce, plástico floral (sabor desagradable)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	13.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.09	0.00	0.00
trans-.beta.-ocimeno	Floral	4.22	4.13	0.00	194.0	6	0.00	0.00	4	0.00	6.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
					6												
Otros																	
2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano		0.00	0.00	0.00	0.00	4.17	0.00	1.97	1.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.05	2.57	1.98

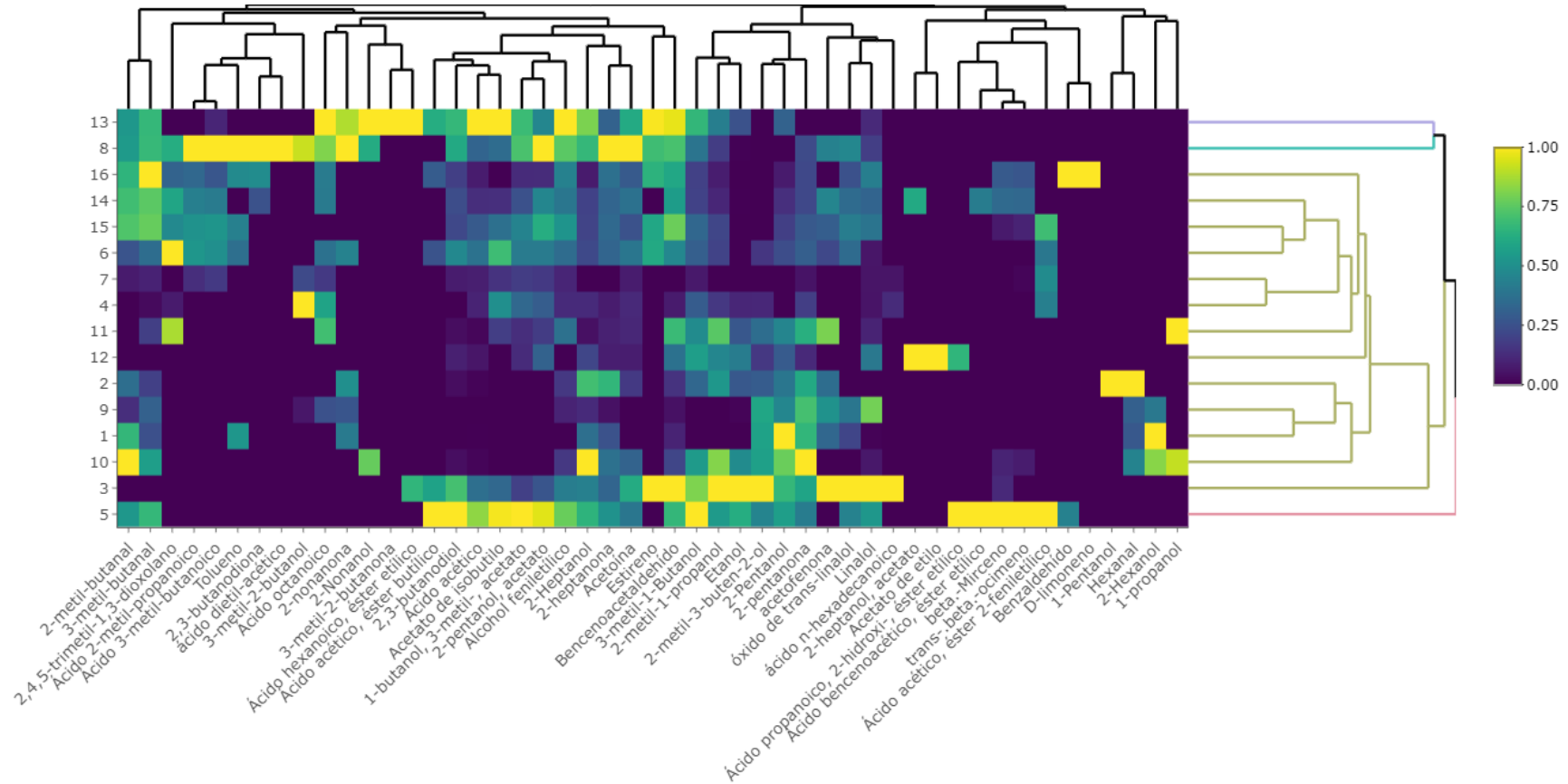
Nota: D: días de fermentación.

3.2. Identificación del comportamiento de los BA.

Las muestras que tienen mayor concentración de BA se muestran en color amarillo y la ausencia de estas en color azul. En la figura 2 se puede visualizar el comportamiento que tiene los BA a lo largo del proceso de fermentación tanto en los granos fermentados FC y FE, ácido acético, éster butílico, 2,3-butanodiol, 1-butanol-3-metil-acetato, 3-metil-1-butanol y linalol se tiene en mayor concentración en los granos fermentados con FC en el día 4 de fermentación; 2-metilbutanal y 3-metilbutanal tiene un comportamiento ascendente en ambas fermentaciones y se encuentra en mayor cantidad en el día 6 y 7 de FE, ácido 2-metil-propanoico, ácido-3-metil-butanoico, tolueno se tiene mayor concentración en los granos fermentados FC en el día 7, siendo estos BA desagradables si se encuentra en alta concentración y el ácido octanoico, estireno (con aromas desagradables) y 2-heptanol en el cuarto día de fermentación de los granos FE.

Figura 2

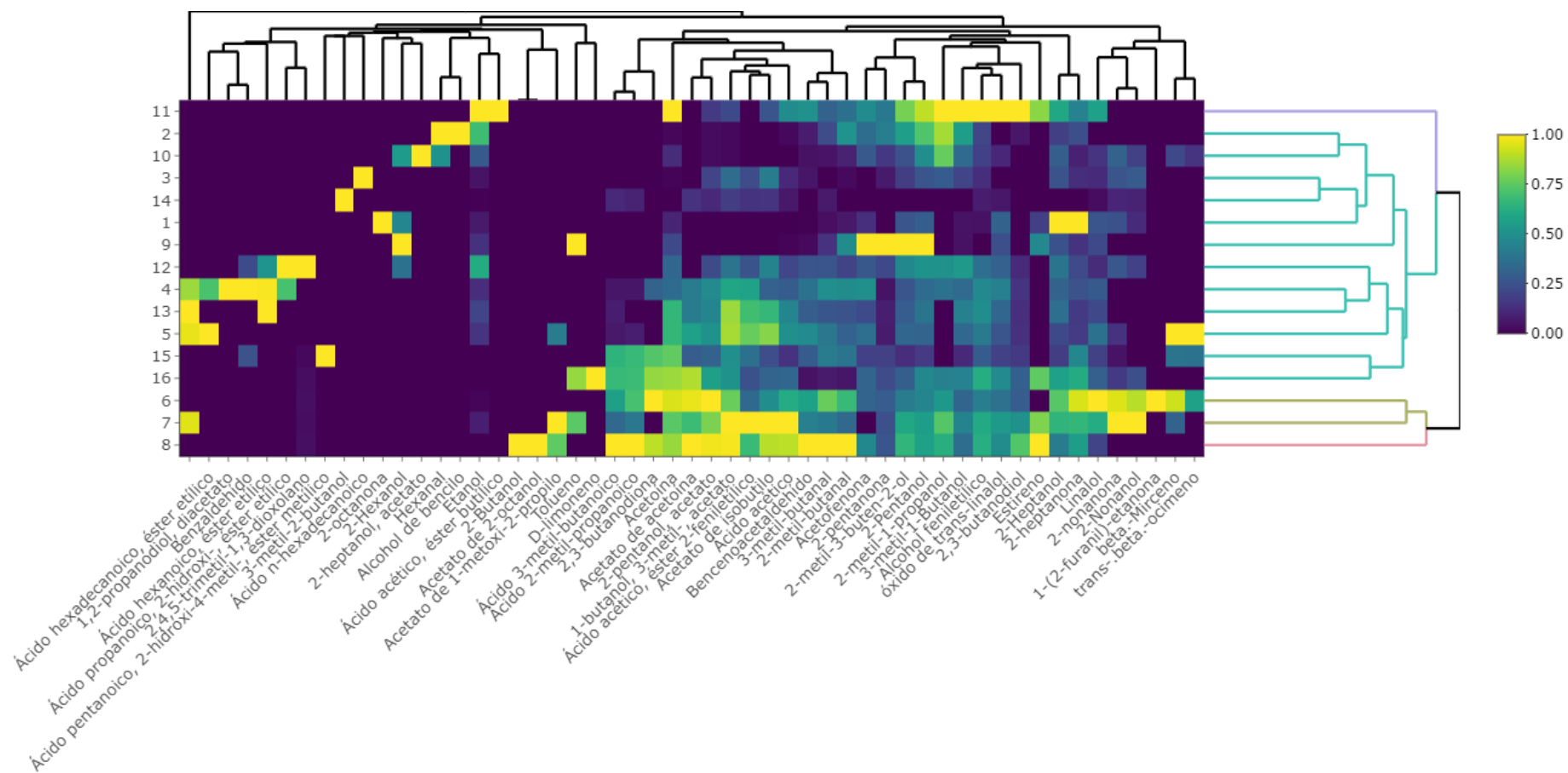
Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Copallín



En la Figura 3 se tiene el comportamiento de los BA en los granos de cacao nativo orgánico procedente de Guadalupe durante el proceso de fermentación FC y FE. Se tiene BA como 2-butanol, acetato de 2-octanol, 2,3-butadiona, acetoína, acetato de acetoína, 2-pentanol-acetato, bencenoacetaldehído, ácido acético, linalol, estireno, ácido 3-metil butanoico, ácido 2-metil propanoico siendo los tres últimos con olores desagradables en mayor concentración en el día 7 de los granos fermentados FC en comparación con los granos FE, sin embargo se tienen resultados similares en el día 5 de fermentación FC y se tiene una menor concentración de compuestos como ácido 3-metil butanoico, ácido 2-metil propanoico y ausencia de estireno y tolueno.

Figura 3

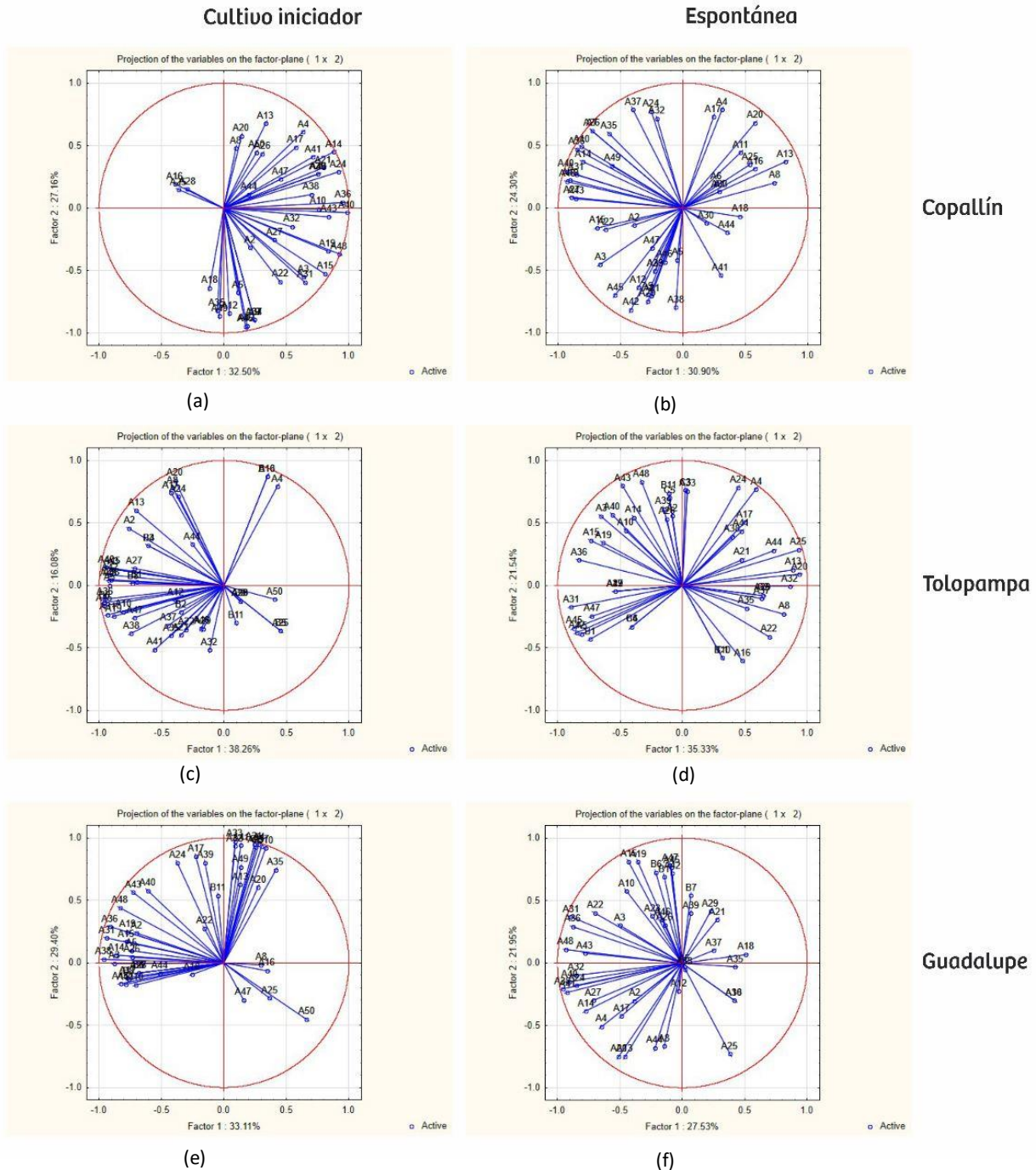
Biomarcadores aromáticos del grano de cacao orgánico fermentado con cultivo iniciador y espontánea procedente de Tolopampa



En la figura 4 se tiene el comportamiento de los BA en los granos de cacao fermentado FC y FE procedente de Copallín. En los primeros días de fermentación se tiene ausencia de nonanal, 2,3-butanodiona, acetoína, ácido 3-metil-butanoico, d-limoneno, alcohol de bencilo, 2 butanol, ácido acético en ambas fermentaciones, compuestos que están presentes en mayor concentración son nonanal, acetato de acetoína, 2,3-butanodiona en los granos FE, acetoína, d-limoneno, 3-metil-2-butanol, tolueno, estireno, ácido 3-metil-butanoico, ácido 2-metil-propanoico, siendo estos últimos cuatro compuestos desagradables, en los días 6 y 7 en los granos fermentados FC y ausencia de los compuestos anteriores en el día 4 pero se tiene en mayor concentración 3-metil-1-butanol, bencenoacetaldehido, alcohol feniletílico, ácido acético, 1-butanol, 3-metil-, acetato, compuestos que son favorables para el grano.

Figura 5

Gráfico de cargas de PCA de biomarcadores aromáticos de granos de cacao fermentados con cultivo iniciador (a, c y e) y espontánea (b, d y f) procedentes de Copallín, Tolopampa



y Guadalupe.

Nota: Donde A1:acetato de etilo, A2:metil-butanal, A3:3-metil-butanal, A4:etanol, A5:2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano, A6:ácido propanoico, 2-metil-, éster etílico, A7:3-metil-2-butanona, A8:2-pentanona, A9:2,3-butanodiona, A10:acetato de isobutilo, A11:1-propanol, A12:tolueno, A13:2-metil-3-buten-2-ol, A14:ácido acético, éster butílico, A15:2-pentanol, acetato, A16:hexanal, A17:2-metil-1-propanol, A18:3-metil-2-butanol, A19:1-butanol, 3-metil-, acetato, A20:2-pentanol, A21:beta.-mirreno, A22:2-heptanona, A23:d-limoneno, A24: 3-metil-1-butanol, A25:2-hexanol, A26:ácido hexanoico, éster etílico, A27:estireno, A28: 1-pentanol, A29:trans-beta.-ocimeno, A30:2-heptanol, acetato, A31:acetoina, A32:2-heptanol, A33:propanoico ácido, 2-hidroxi-, éster etílico,

A34:ácido dietilacético, A35:2-nonanona, A36:ácido acético, A37:2-nonanol, A38:óxido de trans-linalol, A39:benzaldehído, A40:2,3-butanodiol, A41:linalol, A42:ácido 2-metil-propanoico, A43:bencenoacetaldehído, A44:acetofenona, A45:ácido 3-metil-butanoico, A46:bencenoacet Ácido ic, éster etílico, A47: ácido acético, éster 2-feniletílico, A48: alcohol feniletílico, A49: ácido octanoico, A50: ácido n-hexadecanoico, B1: 2,3-butanodiona, B2: 1-(2-furanilo) -Etanona, B3: 2-butanol, B4: acetato de 2-octanol, B5: 2-octanona, B6: acetato de acetofina, B7: ácido pentanoico, 2-hidroxi-4-metil-, éster metílico, B8: 1-metoxi- Acetato de 2-propilo, B9: 1,2-Propanediol, diacetato, B10: Alcohol bencílico, B11: Ácido hexadecanoico, éster etílico, C1: 2-Butanol, C2:2-Octanol, C3: 2-Octanol, C4: Nonanal, C5: Oleato de etilo.

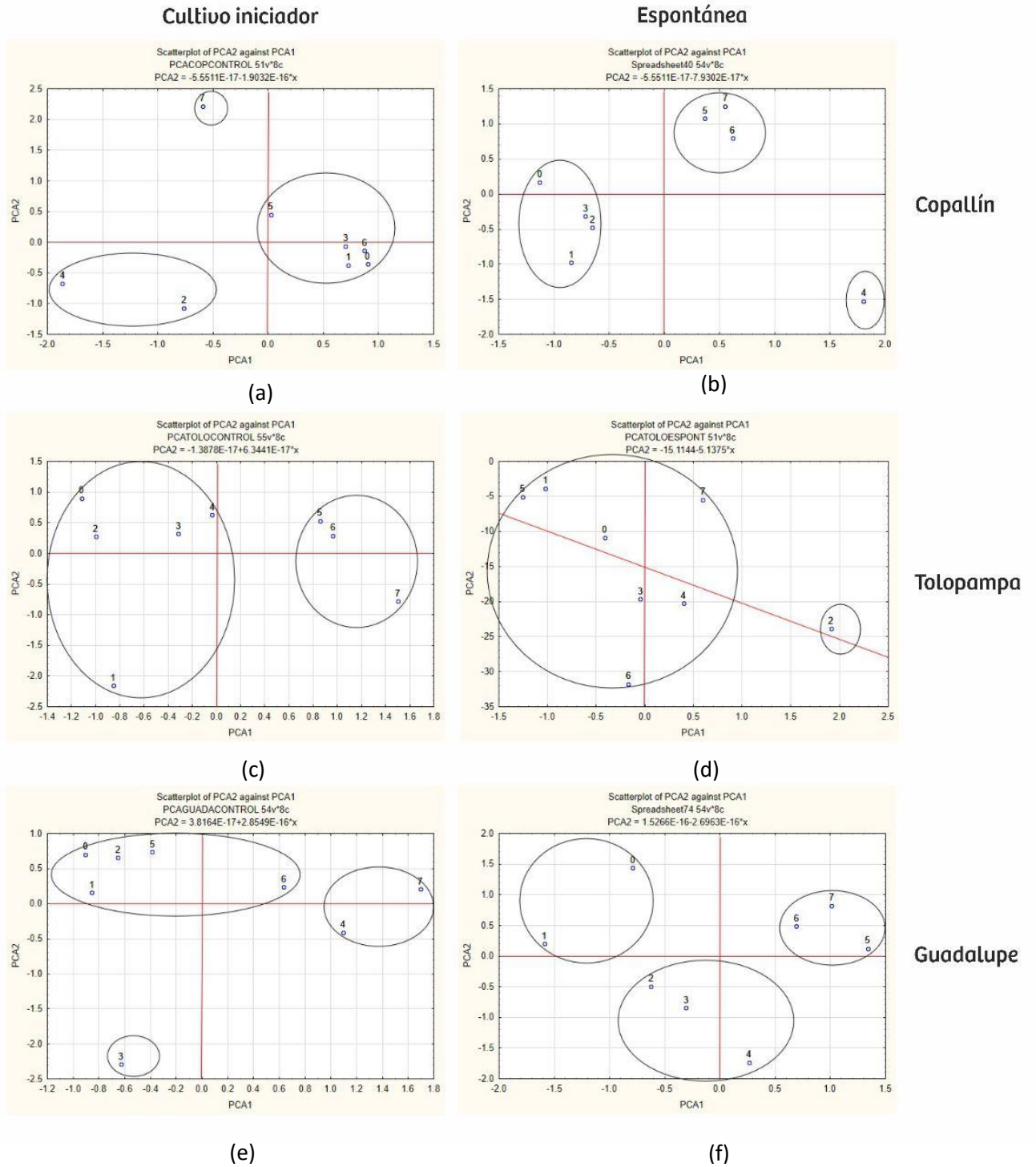
Se realizó un análisis de componentes principales (PCA), con una gráfica de cargas (Figura 5) y la gráfica de puntuación con datos que se obtuvieron de los granos de cacao orgánico nativo fermentado FC y FE de Copallín Tolopampa y Guadalupe. En la Figura 6(a) la gráfica de puntuación PCA, en las muestras de los granos de cacao fermentado FC procedente de Copallín se separó en 3 grupos; el primero en los días 0, 1, 3, 5 y 6 se tienen BA en mayor cantidad como 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, etanol, 2-pentanona, 2,3-butanodiona, acetato de isobutilo, tolueno, 2-pentanol, estireno, ácido acético, linalol, bencenoacetaldehído, alcohol feniletílico, el segundo en los días 2 y 4 se ve ausencia de compuestos volátiles como 3-metil-2-butanol, 2-nonanona, ácido octanoico y estos compuestos están presentes en el tercer grupo (día 7) y hay ausencia de 2-hexanol, 1-pentanol. En los granos FE de Copallín Figura 6 (b) se tienen 3 grupos; en el primero en el día 0 al día 3 de fermentación se tienen compuestos, ausencia de tolueno, d-limoneno, benzaldehído, 3-metil-2-butanona en menor cantidad 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, hexanal, 2-heptanona, acetato de isobutilo; en el segundo formado por el día 4 se tienen los compuestos anteriores que se tuvieron en poca cantidad en este día se tiene en mayor cantidad, en menor cantidad, 2-heptanol-acetato en menor cantidad, linanol, ausencia de 3-metil-2-butanol, acetofenona, mientras que en el tercero formado por los días 5, 6 y 7 ausencia de acetato de etilo, etanol, en menor cantidad 2-pentanona, 2-pentanol.

En las muestras de los granos de cacao procedentes de Tolopampa, en ambas fermentaciones se agruparon en dos grupos; Figura 6 (c) con FC un grupo del día 0 al día 4 de fermentación en las cuales se ve ausencia de isobutil, acetato, 1-(2-furanil)-etanona en una cantidad mínima presencia de 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, 2-pentanona y del día 5 al día 7 en las cuales se tienen los compuestos que se encontraron en poca cantidad en los días anteriores mucho más incrementados y ausencia de 2-hexanol, 2-octanona y benzaldehído. Figura 6 (d) en los granos FE se tiene un grupo que consta con los días 0,1,3,4,5,6 y 7 de fermentación se encontraron compuestos como hexanal, 2-hexanol, 2-heptanol-acetato, 2-nonanona, 3-metil-2-butanol, beta.-mirceno, trans-.beta.- ocimeno, 2-metil-butanal, etanol, 2-pentanona, tolueno 2-pentanol, estireno, linalol, acetoin, ácido acético, bencenoacetaldehído, alcohol feniletílico y otro con el día 2 de fermentación se ve ausencia de 3-methyl-2-butanol, .beta.-mircene trans-.beta.-Ocimene, benzaldehído.

En la Figura 6 (e) En las muestras de los granos procedentes de Guadalupe fermentadas FC se agruparon en 3 grupos del día 0, 1,2,5 y 6 presencia de 2-metil-butanal, ácido acético, éster butílico, 2-heptanona, 3-metil-1-butanol, acetoína, benzaldehído, ácido acético en el día 6 hay ausencia de 2-nonanona, alcohol de bencilo, en el día 3 de fermentación hay ausencia de 3-metil-butanal, isobutil acetato, d-limoneno, 2,3-butanodiona y en los días 4 y 7 de fermentación se tiene BA 2-pentanona, etanol, 2-pentanol, 2-heptanol. Figura 6 (f) en los granos FE se obtuvo 3 grupos divididos por los días 0,1 de fermentación en las cuales se tiene presencia de 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, ácido acético, linalol, bencenoacetaldehído en los días 2,3, 4 de fermentación ausencia de 2,3-butanodiona, tolueno, estireno ninguno, 2-butanol, hexanal, 2-heptanona y en los días 5,6 y 7 ausencia de etanol y 2-hexanol.

Figura 6

Gráfica de puntuación de biomarcadores aromáticos en granos de cacao fermentado con cultivo iniciador (a, c y e) y espontánea (b, d y f) procedentes de Copallín Tolopampa y Guadalupe.



IV. DISCUSIÓN

Durante el proceso fermentación de los granos de cacao se forman compuestos volátiles que ayudan a disminuir sabores o aromas indeseables, así como también se desarrollan aromas típicos del cacao (Taylor et al., 2022). En una investigación realizada por Delgado-Ospina et al., (2021) en granos de cacao fermentado criollo tuvieron como resultado un mayor número de alcoholes y ésteres; el grupo de las cetonas fue aumentando conforme el tiempo de fermentación iba avanzando. En la tabla 2, 3 y 4 se puede ver que se tienen resultados similares en las muestras de cacao que se emplea cultivo iniciador, teniendo una mayor cantidad de ésteres en granos procedentes de Tolopampa (tabla 3) los ésteres tienen notas frutales y florales (Kongor et al., 2016). En los granos de cacao no fermentados de los tres lugares predominan compuestos como 2-heptanona, 2-heptanol, 2-pentanol 2-hexanol, 2-pentanona con aromas cítricos, tierra, frito, hongo, aceite, queso azul, fruta, verde, especias, fruta, picante; en los granos procedentes de Copallin se tiene 77.99 $\mu\text{g/g}$ de 2-heptanol y 144.13 $\mu\text{g/g}$ 2-pentanol en los granos de Tolopampa 132.76 $\mu\text{g/g}$ 2-heptanol y 85.01 $\mu\text{g/g}$ 2-pentanol y en los de Guadalupe 198.83 $\mu\text{g/g}$ 2-heptanol y 124.46 $\mu\text{g/g}$ 2-pentanol. Compuestos que aportan notas frutales, florales, limón al cacao fino o de aroma son 2-heptanol y el 2-pentanol (Qin et al., 2017). Por lo tanto, se puede afirmar que el 2-heptanol y el 2-pentanol no son formados durante la fermentación.

De acuerdo a Escobar et al., (2021) ciertos compuestos volátiles son considerados biomarcadores aromáticos debido a que son fundamentales para dar el típico aroma a chocolate, compuestos como 3-metilbutanal, 2-metilbutanal son compuestos con aromas a malta, cacao y mantecosas, estos compuestos estuvieron presentes en todas las muestras de cacao tanto en los granos fermentados FC y FE, teniendo en mayor concentración en la muestras de Tolopampa en el día 7 de FC donde se tiene 3-metilbutanal (76,32 $\mu\text{g/g}$), 2-metilbutanal (17,56 $\mu\text{g/g}$) así como se observa en la tabla 3, estos compuestos son formados como resultado de la degradación Strecker y son derivados de valina y leucina (Tran et al., 2015; Tuentner et al., 2020).

Otro de los BA que influyen de manera positiva en las notas aromáticas del cacao es el linalol debido a que tiene aromas frutales y se encuentran en altas concentraciones en los granos de cacao criollo debido a que es un componente clave (Crafack et al., 2014; Escobar et al., 2021). Se encontró en mayor cantidad de linalol en los granos FC

procedentes de Guadalupe y Tolopampa en los días 3 y 5 con 289.72 $\mu\text{g/g}$ y 107.88 $\mu\text{g/g}$ respectivamente, como se observa en la tabla 3 y 4.

Compuestos que se consideran claves son 3-metil-1-butanol, alcohol feniletílico, 2-heptanol, acetoína, 2-fenil etanol, etilfenil acetato, 2-feniletil acetato, benzaldehído y fenilacetaldehído (derivado de la 1 - fenilalanina) aportan notas frutales, chocolate, caramelo, nuez, floral y sabor azucarado que mejora las propiedades aromáticas de los granos (Álvarez et al., 2012; Marseglia et al., 2020; Pallares-Pallares et al., 2016; Rodriguez-Campos et al., 2011). En la figura 2, se observa que 3-metil-1-butanol, benzaldehído, alcohol feniletílico y 2-heptanol, el mapa de calor discriminante hay un mayor contenido de 3-metil-1-butanol (quemado, cacao, floral y malta) en el día 4 en los granos procedentes de Copallín fermentadas con FC y benzaldehído, alcohol feniletílico y 2-heptanol se tiene en mayor cantidad en los granos FE, en los granos procedentes de Tolopampa estos compuestos se encuentran en mayor cantidad en el séptimo día de fermentación con FC, en la FE estos compuestos se tienen en una menor concentración, excepto el benzaldehído que en la FC en los últimos días de fermentación se nota una ausencia y en la espontánea hay presencia de este en el sexto día como se ve en la figura 3; en los granos de Guadalupe se observa mayor presencia de estos compuestos en los granos FC (figura 3).

Según Balcázar-Zumaeta et al., (2023) mencionan que en los primeros días de fermentación se tiene una mayor concentración de 2-metil-3-buten-2ol y conforme la fermentación aumenta esta va disminuyendo posiblemente se deba a la volatilización o esterificación; lo cual coincide con los resultados que se obtuvieron de las muestras de cacao FC y FE de Copallín y Guadalupe como se muestran en la figura 2 y 4 al culminar la fermentación se ve ausencia de este compuesto, sin embargo en la muestra de los granos de cacao FC procedente de Guadalupe ocurre lo contrario, teniendo un comportamiento ascendente en el día 7 se tiene 13,74 $\mu\text{g/g}$ y en los granos FE 6,19 $\mu\text{g/g}$.

También se tienen compuestos que si se encuentran en altas concentraciones en el producto final puede conllevar a un mal sabor tales son ácido acético, ácido butanoico, ácido 2-metilpropanoico y ácido 3-metilbutanoico debido a sus aromas a rancio, ácido y sudoroso(Cordero et al., 2019). En esta investigación se identificaron ácido acético, ácido 2-metilpropanoico y ácido 3-metilbutanoico en todas las muestras de los 3 lugares como se observa en las tablas 2,3 y 4 teniendo en mayor concentración en los granos FC, en los

granos procedentes de Tolopampa se tiene 2723.66µg/g de ácido acético en el sexto día de fermentación, ácido 2-metilpropanoico 64.30 µg/g en los granos procedentes de Copallín en el séptimo día de fermentación y en los granos procedentes de Guadalupe se tiene mayor concentración de ácido 3-butanoico en el séptimo día de fermentación con 200.95 µg/g, estos compuestos se eliminan en su mayoría en el proceso de tostado(Escobar et al., 2021).

El uso levaduras como cultivos iniciadores en el proceso de fermentación para los granos de cacao influye de forma positiva en el producto en comparación con los granos que se fermentan de forma convencional, se ha demostrado en estudios anteriores que el empleo de *S. cerevisiae* como cultivo iniciador acelera la fermentación, además de que ocasiona una mayor producción de etanol lo cual previene el desarrollo de microorganismos que no son deseables (Menezes et al., 2016; Sandhya et al., 2016). Se pudo identificar una mayor cantidad de compuestos volátiles y una mayor concentración en un menor tiempo de fermentación en los granos que fueron fermentados empleando la levadura *S. cerevisiae* como se observa en las figuras 2, 3 y 4, BA con aromas agradables aparecen en los días 4 y 5 de fermentación y los desagradables aparecen en los últimos días, así como ácido 3-metil butanoico, ácido 2-metil butanoico, tolueno y estireno.

Alvarez-Villagomez et al., (2022) identificaron que las muestras en las cuales se utilizaron inóculos tienen un mayor contenido de alcoholes, cetonas y aldehídos. En muestras de cacao provenientes de Copallín empleando cultivo iniciador *Saccharomyces cerevisiae* controlada se tiene mayor número de cetonas y una mayor estabilidad en la presencia de alcoholes (tabla 2) a diferencia de la FE que a medida que aumenta el tiempo de fermentación disminuye la cantidad de alcoholes, esto pasa también con Tolopampa, Se obtuvo un mayor número de alcoholes en los granos de cacao procedentes de Guadalupe con FC (tabla 4).

En una investigación realizada por Delgado-Ospina et al., (2021) en muestras de cacao criollo fermentado empleando levaduras identificaron que la producción de etanol presentó el pico más alto a las 24 horas comparado contra la fermentación que no utilizó inóculo, donde el pico más alto fue a las 48 horas en los tres lotes que emplearon y al concluir la fermentación no se encontró etanol en ambas muestras. En esta investigación la producción de etanol se obtuvo el pico más alto con 3063.63 µg/g a las 48 horas en los granos FC y a las 24 horas en menor concentración con 1469.25 µg/g en los granos FE

procedentes de Copallín (figura 2), en los granos procedentes de Tolopampa en las que se empleó cultivo iniciador se tuvo el pico más alto 1848.78 $\mu\text{g/g}$ a las 24 horas de fermentación y en FE a las 48 horas con una mayor concentración 2674.54 $\mu\text{g/g}$ y en los granos procedentes de Guadalupe con cultivo iniciador en mayor concentración 2628.31 $\mu\text{g/g}$ a las 72 horas y en menor concentración 2231.98 $\mu\text{g/g}$ en los granos FE con el pico más alto a las 48 horas; al final de la fermentación se ve la ausencia de etanol excepto por los granos procedentes de Copallín FC que en el último día se ve presencia y ausencia en los días 5 y 6 de fermentación.

La calidad de los granos depende del genotipo, origen, variedad y condiciones climáticas en las que se desarrolla el cacao, estas dan lugar a diferentes aromas, Moreira et al., (2018), tomaron 22 muestras de cacao de diferentes puntos geográficos (América, África, Sudeste Asiático), encontraron una mayor cantidad de compuestos volátiles en los granos procedentes de México, Perú, Santo Domingo, Papúa Nueva Guinea y México variedad Criollo, en los granos de Costa Marfil encontraron ésteres a una concentración de 0,13 mg/kg y 13,01 mg/kg para una muestra de Perú, 2,3-butanodiol con una concentración de 0,15 mg/kg en los granos de Sierra Leona y 4,46 mg/kg en granos de Papúa Nueva Guinea (Marseglia et al., 2020). En la Tabla 2, 3 y 4 se puede visualizar que se tiene mayor cantidad de compuestos volátiles al comienzo de la fermentación en los granos procedentes de Tolopampa (19), seguido de Copallín (17) y en menor cantidad en Guadalupe (15), al finalizar la fermentación (7 días) se tuvo mayor cantidad de compuestos volátiles en los granos procedentes de Guadalupe fermentados con cultivo iniciador siendo un total de 35 compuestos y en menor cantidad en los granos de Copallín, se tuvo una concentración mínima de ésteres de encontraron ésteres a una concentración de 37.24 $\mu\text{g/g}$, 72.59 $\mu\text{g/g}$, 41.37 $\mu\text{g/g}$ en los granos fermentados con cultivo iniciador procedentes de Copallín, Tolopampa y Guadalupe respectivamente; 2,3-butanodiol 170.26 $\mu\text{g/g}$, 229.64 $\mu\text{g/g}$ y 149 $\mu\text{g/g}$.

En la investigación realizada por Rodríguez-Campos et al., (2011) en la cual emplearon PCA ver las relaciones que hay en los compuestos y los días de fermentación obtuvieron como resultados, la variabilidad fue del 38,8% y el 22,2% para PC1 Y PC2 respectivamente. En el eje positivo del PC1 obtuvieron compuestos volátiles en concentraciones más altas como acetato de metilo, acetoína, 2,3-butanodiona, acetato de feniletilo y acetato de 3-metil-1butanol, en el eje negativo PC1 se agrupó los compuestos que se identificaron en el tiempo cero, con una concentración elevada como

dodecanónico, 2-pentanol, fenilacetaldehído y estos fueron disminuyendo conforme la fermentación aumenta; en el PC2 los volátiles que se agruparon en el eje positivo fueron ácido isobutírico, isovalérico y propanoico y fueron aumentando en los últimos días de fermentación y en el eje negativo tuvieron a lactato de etilo, ácido nonanoico, acetato de etilo, 3-metil-1-butanol y 2,3-butanodiol. En la figura 6a del gráfico de puntuación se tiene una variabilidad de 59,66% (32,50% PC1 Y 27,16% PC2) y figura 6b 55,70% (pc1 30,90%, PC2 24,80%) en el PC1 se nota presencia de 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, 2,3-butanodiona, 2-heptanona, acetoína y con aromas a almendra, cacao, fermentada, avellana, malta, chocolate, mantequilla, en el PC2 se tiene compuestos como hexanal, 1-pentanol con aromas a manzana, fresco, verde, balsámico, frutal, especiado, levadura, en los granos FC y en los granos FE en el PC1 3-metil-2-butanol, linalol, bencenoacetaldehído con aromas a baya, geranio, miel, nuez, picante, floral, lavanda, limón, rosa; en la figura 6c y 6d con una variabilidad de 56.34 % y 49.48 %, en el PC1 se tiene compuestos como benzaldehído, ácido n-hexadecanoico, ácido hexadecanoico, éster etílico con aromas a cera, almendra amarga, azúcar quemado, malta y en el PC2 de 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, 3-metil-1-butanol con aromas a almendra, cacao, fermentada, avellana, malta, chocolate, floral para los granos FC y para los granos FE en el PC1 2-nonanona, hexanal, 2-hexanol, con aromas a fragante, fruta, verde, leche caliente, manzana, verde y en el PC2 3metil-butanal, dlimonene, 2-heptanona con aromas a malta, chocolate, verde, fruta, nuez, cítricos y menta.

V. CONCLUSIONES

Se identificó un total de 66 biomarcadores aromáticos en los granos de cacao nativo orgánico, teniendo una mayor cantidad en los granos fermentados con cultivo iniciador procedentes de Tolopampa pertenecientes a las familias químicas: alcoholes, ésteres, cetonas, ácidos, aldehídos, terpenoides y terpenos, furanos, furanonas, piranos, pironas hidrocarburos y otros.

Se identificó una mayor cantidad de compuestos de los grupos de alcoholes, ésteres en los granos fermentados con cultivo iniciador. Se encontró que en los granos sin fermentar procedentes de Tolopampa se tiene un mayor número de biomarcadores aromáticos y al final de la fermentación se identificó más biomarcadores aromáticos en los granos procedentes de Guadalupe con cultivo iniciador.

El análisis discriminante en el mapa de calor indicó que los biomarcadores como 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, bencenoacetaldehído, 2-pentanol con aromas baya, malta, verde se identificaron con mayor concentración en el séptimo día de fermentación, acetoína, ácido acético con aromas a mantequilla, floral en el quinto y sexto día de fermentación los granos fermentados con cultivo iniciador procedentes de Tolopampa, linalol, 3-metil-1-butanol, 2-heptanol con aromas a cacao, floral, malta, limón en el tercer y cuarto día de fermentación de los granos fermentados con cultivo iniciador procedentes de Guadalupe, también se formaron aromas indeseables en el proceso de fermentación de los granos, apareciendo en los últimos días de fermentación compuestos como ácido 2-metil-propanoico, ácido 3-metil-butanoico, tolueno y estireno. Se concluye que el mejor cacao se obtiene de los granos procedentes de Tolopampa al quinto día de fermentación con cultivo iniciador.

VI. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se recomienda, continuar esta investigación en productos de chocolates a base de granos de cacao nativo orgánico fermentado con cultivo iniciador, realizar un análisis sensorial e identificar los biomarcadores presentes en el producto final.

A lo largo del proceso de fermentación se recomienda verificar que la levadura se encuentre activa.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acierno, V., Fasciani, G., Kiani, S., Caligiani, A., & van Ruth, S. (2019). PTR-QiToF-MS and HSI for the characterization of fermented cocoa beans from different origins. *Food Chemistry*, 289, 591-602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.095>
- Álvarez, C., Pérez, E., Boulanger, R., Lares, M., Ssemat, As., Davrieux, F., & Cros, E. (2012). Identificación De Los Compuestos Aromáticos En El Cacao Criollo De Venezuela Usando Microextracción En Fase Sólida Y Cromatografía De Gases. *Vitae*, 19(1), S370-S372.
- Alvarez-Villagomez, K. G., Ledesma-Escobar, C. A., Priego-Capote, F., Robles-Olvera, V. J., & García-Alamilla, P. (2022). Influence of the starter culture on the volatile profile of processed cocoa beans by gas chromatography–mass spectrometry in high resolution mode. *Food Bioscience*, 47, 101669. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101669>
- Aprotosoai, A. C. (2015). *Química del sabor del cacao y el cacao. Productos: Una descripción general*. 19.
- Balcázar-Zumaeta, C. R., Castro-Alayo, E. M., Cayo-Colca, I. S., Idrogo-Vásquez, G., & Muñoz-Astecker, L. D. (2023). Metabolomics during the spontaneous fermentation in cocoa (*Theobroma cacao* L.): An exploraty review. *Food Research International*, 163, 112190. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112190>
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007>
- 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), e01157. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01157>
- Cevallos-Cevallos, J. M., Gysel, L., Maridueña-Zavala, M. G., & Molina-Miranda, M. J. (2018). Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *Journal of Food Quality*, 2018, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2018/1758381>

- Chagas Junior, G. C. A., Ferreira, N. R., Gloria, M. B. A., Martins, L. H. da S., & Lopes, A. S. (2021b). Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. *Food Chemistry*, 338, 127834. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127834>
- Cordero, C., Guglielmetti, A., Sgorbini, B., Bicchi, C., Allegrucci, E., Gobino, G., Baroux, L., & Merle, P. (2019). Odorants quantitation in high-quality cocoa by multiple headspace solid phase micro-extraction: Adoption of FID-predicted response factors to extend method capabilities and information potential. *Analytica Chimica Acta*, 1052, 190-201. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.11.043>
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand-Larsen, M., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H., & Nielsen, D. S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63, 306-316. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.032>
- de C. Lima, C. O., Vaz, A. B. M., De Castro, G. M., Lobo, F., Solar, R., Rodrigues, C., Martins Pinto, L. R., Vandenberghe, L., Pereira, G., Miúra da Costa, A., Benevides, R. G., Azevedo, V., Trovatti Uetanabaro, A. P., Soccol, C. R., & Góes-Neto, A. (2021). Integrating microbial metagenomics and physicochemical parameters and a new perspective on starter culture for fine cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 93, 103608. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103608>
- Delgado-Ospina, J., Acquaticci, L., Molina-Hernandez, J. B., Rantsiou, K., Martuscelli, M., Kamgang-Nzekoue, A. F., Vittori, S., Paparella, A., & Chaves-López, C. (2021). Exploring the Capability of Yeasts Isolated from Colombian Fermented Cocoa Beans to Form and Degrade Biogenic Amines in a Lab-Scale Model System for Cocoa Fermentation. *Microorganisms*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010028>
- do Carmo Brito, B. de N., Campos Chisté, R., da Silva Pena, R., Abreu Gloria, M. B., & Santos Lopes, A. (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, 228, 484-490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>
- Escobar, S., Santander, M., Zuluaga, M., Chacón, I., Rodríguez, J., & Vaillant, F. (2021). Fine cocoa beans production: Tracking aroma precursors through a

- comprehensive analysis of flavor attributes formation. *Food Chemistry*, 365, 130627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130627>
- García-Ríos, E., Lairón-Peris, M., Muñiz-Calvo, S., Heras, J. M., Ortiz-Julien, A., Poirot, P., Rozès, N., Querol, A., & Guillamón, J. M. (2021). Thermo-adaptive evolution to generate improved *Saccharomyces cerevisiae* strains for cocoa pulp fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 342, 109077. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109077>
- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. V., 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., & Febriami, H. (2016). Mapping the effects of starter culture addition on cocoa bean fermentation. *ASEAN Engineering Journal*, 5(1), Art. 1. <https://doi.org/10.11113/aej.v5.15465>
- Marseglia, A., Musci, M., Rinaldi, M., Palla, G., & Caligiani, A. (2020). Volatile fingerprint of unroasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from different geographical origins. *Food Research International*, 132, 109101. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109101>
- Menezes, A. G. T., Batista, N. N., Ramos, C. L., Silva, A. R. de A. e, Efraim, P., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2016). Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 81, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.036>
- Moreira, I. M. da V., Vilela, L. de F., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2018). Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. *Food Research International*, 109, 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.012>
- Mota-Gutierrez, Barbosa-Pereira, Ferrocino, & Cocolin. (2019). Traceability of Functional Volatile Compounds Generated on Inoculated Cocoa Fermentation and Its Potential Health Benefits. *Nutrients*, 11(4), 884. <https://doi.org/10.3390/nu11040884>
- Ordoñez, E. S., Quispe C., Y., & García C., L. F. (2020). Quantification of phenols, anthocyanins and sensory characterization of nibs and liquor of five cocoa

- varieties, in two fermentation systems. *Scientia Agropecuaria*, *11*(4), 473-481.
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.02>
- 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>
- 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>
- Rodriguez-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>
- 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*, 731-738.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.002>
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The Microbiology of Cocoa Fermentation. En *Caffeinated and Cocoa Based Beverages* (pp. 423-446). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>
- Taylor, A. J., Cardenas-Torres, E., Miller, M. J., Zhao, S. D., & Engeseth, N. J. (2022). Microbes associated with spontaneous cacao fermentations—A systematic review and meta-analysis. *Current Research in Food Science*, *5*, 1452-1464.
<https://doi.org/10.1016/j.crf.2022.08.008>
- Tigero-Vaca, J., Maridueña-Zavala, M. G., Liao, H.-L., Prado-Lince, M., Zambrano-Vera, C. S., Monserrate-Maggi, B., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2022). Microbial Diversity and Contribution to the Formation of Volatile Compounds during Fine-Flavor Cacao Bean Fermentation. *Foods*, *11*(7), Art. 7.
<https://doi.org/10.3390/foods11070915>
- 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>

Tuenter, E., Delbaere, C., De Winne, A., Bijttebier, S., Custers, D., Foubert, K., Van Durme, J., Messens, K., Dewettinck, K., & Pieters, L. (2020). Non-volatile and volatile composition of West African bulk and Ecuadorian fine-flavor cocoa liquor and chocolate. *Food Research International*, 130, 108943. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108943>

VIII. ANEXOS



Fotografía 1: Granos de cacao en fermentación



Fotografía 2: Muestras de cacao ultracongeladas



Fotografía 3: preparación de las muestras



Fotografía 4: Acondicionamiento del cromatógrafo para el análisis de los biomarcadores aromáticos.