

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



Dinámica de los compuestos volátiles en el cacao nativo fino de aroma y el clon comercial CCN-51 durante el proceso de fermentación espontánea

Autora

Bach. Lorena Lizbeth Cruz Rojas
Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Asesor

MSc. León Faustino Villegas Vilchez

Co asesora

MSc. Aline Camila Caetano

Lima – Perú
2023

Dedicatoria

Le dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme guiado y ayudado en todas las etapas de mi vida.

A mis padres, Franklin y Lorena, por demostrarme siempre su amor y apoyo incondicional ante las situaciones que deba enfrentar y por darme sus sabios consejos.

A mis hermanos, Jhonny y Alison, con quienes he compartido penas y alegrías en nuestro hogar y por siempre darme ánimos de seguir adelante.

A mi mejor amiga Dayanara y a mi novio Wilian, quienes son de gran bendición para mí y para las personas que los rodean, con ellos la vida se vuelve armoniosa y divertida.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por este logro más en mi vida profesional.

A mi co asesora MSc. Aline Caetano, que estando en la misma ciudad que yo, en Chachapoyas, me ha apoyado desde el primer día en este trabajo, además de co asesora fue mi maestra, me enseñó a manipular equipos del laboratorio de cromatografía de gases y a manejar sus respectivos softwares para poder cumplir con los objetivos de la presente tesis. Ella siempre está dispuesta a ayudar y a resolver problemas para que las investigaciones sean de calidad, por eso le agradezco mucho MSc. Aline.

A mi asesor MSc. León Villegas, quien, virtualmente, se ha tomado su tiempo para leer, corregir, sugerir y darme su retroalimentación para mejorar el presente trabajo.

A la Dra. Natalie Rondinel por haberme orientado con los análisis estadísticos, que ha sido de gran importancia para manipular la gran cantidad de datos resultantes de la experimentación.

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en donde me formé como profesional y me otorgó los conocimientos y las herramientas necesaria para hacer investigación con ética y de calidad.

Al proyecto METACACAO, contrato N° 008-2020-FONDECYT-BM, con el cual se ejecutó el subproyecto “Análisis metagenómico y técnicas cromatográficas para la obtención de un cultivo iniciador que mejore la calidad del chocolate a partir del cacao nativo fino de aroma en la zona Nor Oriental del Perú” por el financiamiento de la tesis, así como el incentivo recibido durante 9 meses. Así mismo, agradezco al Dr. Segundo Oliva, quien es el investigador principal del proyecto METACACAO, por lo tanto, hizo posible el apoyo logístico y financiero.

Finalmente, a mis amigos del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la UNTRM-A y del INDES-CES, por su compañía y consejos para hacer que la investigación sea interesante, divertida y a la vez productiva para el desarrollo del país.

Dinámica de los compuestos volátiles en el cacao nativo fino de aroma y el clon comercial CCN-51 durante el proceso de fermentación espontánea

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%	10%	7%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	convibra.org Fuente de Internet	2%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	repositorio.untrm.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1%
5	Barrón Sandoval Alberto. "Diversidad y funcionalidad de las comunidades diazotróficas de las costras biológicas del suelo en dos ecosistemas áridos, Cuatro Ciénegas, Coahuila y el Valle de Guadalupe, Baja California, México", TESIUNAM, 2015 Publicación	<1%
6	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1%

Índice de contenido

Resumen	11
Abstract	11
I. Introducción	12
II. Marco teórico	14
1. Variedades comerciales de cacao.....	14
2. Proceso de fermentación espontánea de los granos de cacao	19
3. COV generados en la fermentación de los granos de cacao	21
4. Técnicas para el análisis de COV	22
4.1. Microextracción en fase sólida.....	22
4.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas	23
III. Pregunta de investigación, hipótesis y objetivos	24
1. Pregunta de investigación	24
2. Hipótesis	24
3. Objetivos	24
3.1) Objetivo general:	24
3.2) Objetivos específicos:	24
IV. Materiales y métodos	25
1. Material biológico de estudio	25
2. Lugar de muestreo	25
3. Toma de muestra	25
4. Medición del pH y la temperatura.....	26
4.1. Medición del pH de la pulpa y del cotiledón.....	26
4.2. Registro de la temperatura	27
5. Análisis de COV por SPME/HS/GC-MS.....	27
6. Semicuantificación de los COV identificados.....	28
7. Análisis de datos	29
8. Local de ejecución:.....	30
V. Resultados	30

1.	Cambios de pH y temperatura durante el proceso de fermentación espontánea ..	30
2.	COV identificados durante la fermentación espontánea	36
3.	Dinámica de los COV en las variedades CFA y CCN-51	44
4.	Análisis de componentes principales (ACP).....	51
5.	Gráfica de calor de los COV	62
VI.	Discusión	64
1.	Cambios de pH y temperatura durante el proceso de fermentación espontánea de las variedades CFA y CCN-51.....	65
2.	Dinámica de los COV producidos durante la fermentación espontánea de las variedades CFA y CCN-51	66
3.	Análisis de componentes principales y gráfica de calor	72
VII.	Conclusiones	74
VIII.	Referencias bibliográficas	75
IX.	Anexos	85

Índice de figuras

Figura 1. Gráfico de caja-bigote que muestra el rango y distribución de los compuestos volátiles totales entre tres grupos morfogénéticos del cacao.	18
Figura 2: Esquema de la sucesión y predominancia de microorganismos en distintos tiempos durante la fermentación de los granos de cacao.	20
Figura 3: Resumen de cambios químicos provocados por los microorganismos durante el proceso de fermentación dentro de los granos de cacao	21
Figura 4. Comportamiento de la temperatura durante la fermentación espontánea	32
Figura 5. Comportamiento del pH de la pulpa durante la fermentación espontánea.....	33
Figura 6. Comportamiento del pH del cotiledón durante la fermentación espontánea	34
Figura 7. Correlación del pH de la pulpa y la temperatura, por variedad.....	35
Figura 8. Correlación del pH del cotiledón y la temperatura.....	36
Figura 9. Cromatograma general de la variedad CCN-51, desde las 0 a las 156 horas de fermentación	40
Figura 10. Cromatograma general de la variedad CFA, desde las 0 a las 156 horas de fermentación	41
Figura 11. Diagrama de caja-bigote de la concentración relativa en función a la variedad.	43
Figura 12. Distribución de la concentración relativa en función al tiempo (en horas) y agrupado por variedad	43
Figura 13. Dinámica de los alcoholes generados en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea	45
Figura 14. Dinámica de los ésteres generados en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea	46
Figura 15. Dinámica de los aldehídos generados en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea	47
Figura 16. Dinámica de las cetonas generadas en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea	49
Figura 17. Dinámica de los terpenos generados en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea	50
Figura 18: Dinámica del éter dimetílico generado en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea	50
Figura 19. Diagrama de caja-bigote de la concentración relativa en función a los 22 compuestos volátiles seleccionados.....	52
Figura 20. Gráfica de dispersión de las concentraciones relativas entre variedades sin discriminar los COV.....	53
Figura 21. Gráfico de sedimentación de los componentes principales.	55
Figura 22. Contribución de los COV en el componente principal 1.	57

Figura 23. Contribución de los COV en el componente principal 2.	57
Figura 24. Contribución de los COV en el componente principal 3.	58
Figura 25. Contribución de los COV en el componente principal 4.	59
Figura 26. Análisis de componentes principales para los COV y tiempos observados, agrupados por variedades considerando componentes principales 1 y 2.	60
Figura 27. Análisis de componentes principales para los COV y tiempos observados, agrupados por variedades considerando componentes principales 2 y 3.	61
Figura 28. Análisis de componentes principales para los COV y tiempos observados, agrupados por variedades considerando componentes principales 3 y 4.	62
Figura 29. Gráfica de calor de los COV cada 12 horas, desde las 0 a las 156 h.	63

Índice de tablas

Tabla 1. Cambios fisicoquímicos de los granos de cacao de la variedad CFA en las 156 h de fermentación	31
Tabla 2. Cambios fisicoquímicos de los granos de cacao de la variedad CCN-51 en las 156 h de fermentación	31
Tabla 3. Valores de las correlaciones, modelo de regresión lineal simple y coeficiente de determinación de las relaciones entre pH y temperatura de fermentación.	35
Tabla 4. COV identificados durante la fermentación espontánea de las variedades: CFA y CCN-51.	36
Tabla 5. Nombre de los picos de los COV con mayor abundancia identificados en los cromatogramas de las figuras 9 y 10.	42
Tabla 6. COV que se consideraron en los ACP por su número de incidencia en las muestras.	51
Tabla 7. Valores de la matriz de correlación.	54
Tabla 8. Contribución de las variables sobre los componentes principales	55

Glosario de términos

ACP: Análisis de componentes principales

CAR: Carboxano

CCN-51: Colección Castro Naranjal 51

CEPROA-A: Cooperativa Central de Productores Agropecuarios de Amazonas

CFA: Cacao fino de aroma

COV: Compuestos orgánicos volátiles

DVB: Divinilbenceno

FISIOBVEG: Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas

INDES – CES: Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva

INIA: Instituto Nacional de Innovación Agraria

IR: Índice de retención

NIST 2017: National Institute of Standards and Technology

PDMS: Polidimetilsiloxano

SPME: Microextracción en fase sólida

TR: Tiempo de retención

UPCH: Universidad Peruana Cayetano Heredia

VRAEM: Valle de los ríos Apurímac, Ene y Mantaro

Resumen

Los granos de cacao son altamente comercializados a nivel mundial, ya que es la materia prima en la industria del chocolate. Uno de los procesos más importantes por los que pasan los granos de cacao es la fermentación. En este proceso las levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas son introducidas espontáneamente o no en la pulpa de cacao y son responsables de un conjunto de cambios fisicoquímicos que ocurre en los granos, generando compuestos orgánicos volátiles (COV) y no volátiles que confieren aromas y sabores característicos al chocolate. En la presente tesis de investigación se identificó y analizó la dinámica de los COV de dos variedades de granos de cacao, el cacao nativo fino de aroma (CFA) y el clon comercial Colección Castro Naranjal 51 (CCN-51), durante las 156 horas de fermentación espontánea. Las técnicas utilizadas para extraer, separar e identificar a los COV fueron: microextracción en fase sólida (SPME), cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS) y la base de datos de la biblioteca NIST 2017 (National Institute of Standards and Technology). Se identificó y semicuantificó a 122 COV entre ambas variedades durante la fermentación espontánea, se compararon las dinámicas de 20 COV con mayor presencia entre ambas variedades y se realizó análisis de componentes principales. Se concluyó que la variedad CFA contiene mayores concentraciones relativas de los compuestos aromáticos: afrutados, florales y dulces (2-heptanol, éster etílico del ácido benzoico, acetato de 2-heptanol, bencenoacetaldehído, 2-heptanona, acetofenona, 2-nonanona y trans-.beta.-ocimeno) que cumplen un rol importante en la calidad del chocolate.

Palabras clave

Cacao, fermentación espontánea, COV, SPME, GC-MS.

Abstract

Cocoa is highly traded and consumed worldwide as the essential raw material for chocolate. One of the most important processes that cocoa beans go through is

fermentation. In this process, yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria are introduced spontaneously or not in the cocoa pulp and are responsible for a set of physicochemical changes that occur in the beans, generating volatile organic compounds (VOC) and non-volatile organic compounds that confer characteristic aromas and flavors to chocolate. In the present research project, the dynamics of the VOCs of fine aroma cocoa (CFA) and the commercial clone CCN-51 were analyzed during the entire spontaneous fermentation process, which lasted 156 hours, and the VOCs were analyzed using solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS) techniques. A total of 122 VOCs were identified and semi-quantified between both varieties during spontaneous fermentation, the dynamics of 20 VOCs with the highest presence were compared between the two varieties and principal component analysis was performed. It was concluded that the CFA variety contains higher relative concentrations of the aromatic compounds: fruity, floral and sweet (2-heptanol, benzoic acid ethyl ester, 2-heptanol acetate, benzeneacetaldehyde, 2-heptanone, acetophenone, 2-nonanone and trans-.beta.ocimen) that play an important role in the quality of chocolate.

Keywords

Cocoa, spontaneous fermentation, VOC, SPME, GC-MS

I. Introducción

El cacao (*Theobroma cacao*) es un fruto de alto interés económico, agronómico y comercial a nivel internacional. Desde la década de los 60 hasta el 2016, anualmente se comercializó un promedio de 3,17 millones de toneladas a nivel mundial, además, la exportación en el Perú se ha incrementado desde el año 2000 (1). En el 2020, la producción de cacao en el Perú fue de 160 289 toneladas, ubicándose en el noveno lugar dentro de los 20 países más productores de cacao, y a nivel internacional se produjo un total de 5,67 millones de toneladas (2), siendo los más cotizados los cacaos finos de aroma de los países latinoamericanos debido a sus mejores características organolépticas.

Las variedades de cacao son investigadas desde su origen geográfico, su composición fisicoquímica y genética (3), además hay interés por el perfil de compuestos volátiles que se generan durante los procesos post cosecha de los granos de cacao (4–6) como son los granos de cacao frescos, fermentados (6–8), secos (7,8), tostados (9) y en pasta; incluso se estudia el perfil de compuestos volátiles para determinar la calidad del producto final y el origen geográfico de los granos de cacao después de adicionar otros ingredientes para la preparación de chocolates (3).

En el Perú se producen variedades nativas y extranjeras de cacao. Según el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego del Perú (2020), el país cuenta con el 60% de la biodiversidad de cacao a nivel mundial. En Amazonas, San Martín y Cajamarca se cultiva el 9,4% de cacao nativo fino de aroma (también llamado cacao Criollo), el 53.3% de Trinitario en Junín y el 37.3% de Forastero en Cusco y Ayacucho. Sin embargo, estos últimos departamentos también producen variedades de cacaos finos de aroma, como por ejemplo la variedad de cacao nativo Chunchu de Cusco, cuya variedad presenta diferentes características agromorfológicas y cuentan con buenos perfiles de aromas y sabores (10). Así mismo, en una investigación del 2020 en Perú, realizado en el Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), ubicado en la ciudad de Chachapoyas, capital del departamento de Amazonas, se identificó a 146 ecotipos de CFA en 3 departamentos: Amazonas, San Martín y Cajamarca, siendo Amazonas el departamento en donde se identificó a 139 ecotipos (11), los cuales fueron caracterizados genética y morfológicamente, concluyendo que pertenecen a 5 grupos genéticos diferentes, es decir, la población de CFA no es homogénea (12,13), pero no se estudió su perfil de compuestos volátiles. Conocer la dinámica de los compuestos volátiles generados en la fermentación espontánea de los granos de cacao del departamento de Amazonas, puede proporcionar técnicas para evaluar la calidad de los granos de cacao (7) y darle un valor agregado a este producto.

En estudios de Latinoamérica se evaluaron los COV producidos durante la etapa de fermentación de cacao, que es una etapa post cosecha inicial y una de las que más influye en la calidad del producto final (7,8,14,15). Las siguientes etapas post cosecha

de importancia son el secado y tostado (16), en las cuales se forman las mayores concentraciones de COV y no volátiles que confieren directamente aromas y sabores agradables, esto debido a la deshidratación durante el secado, por ende, a la concentración de COV, no volátil y a las reacciones de Maillard durante el tostado. Es por ello que las clases y concentraciones de COV generados en los granos de cacao son importantes indicadores de calidad (17).

En ese sentido, la presente investigación, realizada en el INDES-CES, tuvo el objetivo principal de diferenciar la dinámica de los COV generados durante el proceso de fermentación espontánea de las variedades de cacao nativo fino de aroma y del clon comercial CCN-51 del departamento de Amazonas, comparando sus perfiles cromatográficos con el fin de identificar compuestos o cambios en sus concentraciones que indiquen mejores características en el producto final.

II. Marco teórico

1. Variedades comerciales de cacao

Existen 3 variedades genéticas principales de la especie *Theobroma cacao* producidas a nivel mundial: Criollo, Forastero y Trinitario (18). Según la definición de variedad en botánica, una variedad incluye muchas poblaciones con características únicas y no tiene necesariamente un origen genético común, sino que incluye un grupo de características en común, como es el caso de las variedades de cacao. Por otro lado, según el Código Internacional de Nomenclatura para Plantas Cultivadas, los cultivares son un grupo de plantas seleccionadas artificialmente a partir de un cultivo más variable con el objetivo de fijar caracteres de interés (19), además, estos cultivares pueden ser clonados para su producción a gran escala, como por ejemplo el CCN-51.

1.1. Cacao nativo fino de aroma

La variedad de cacao nativo fino de aroma de diferentes países de Sudamérica, como de Perú, Brasil, Ecuador, Venezuela y Colombia, son los más cotizados debido a sus mejores propiedades organolépticas, con respecto a las demás variedades. Sin embargo, los árboles de cacao nativos finos de aroma, suelen tener menor rendimiento y son más susceptibles a plagas y enfermedades, por ello, su producción representa solo el 3% de la cantidad total de cacao en el mundo (20).

En el Perú, los cacao nativos finos de aroma son cotizados basados principalmente en su calidad sensorial, sus descriptores morfológico y su denominación de origen (21), pero poco se ha estudiado la ascendencia y la estructura genética de los cacao que se produce en los diferentes departamentos del Perú. En esta última década se están realizando investigaciones con el objetivo de identificar el material genético de los cacao de alta calidad y con vista a realizar actividades de mejoramiento genético. El Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) cuenta con una colección que agrupa cacao finos de aroma, como el cacao con denominación de origen de Amazonas (CFA), cacao Blanco-porcelana de Piura, cacao del Valle de los ríos Apurímac, Ene y Mantaro (VRAEM), cacao Chuncho de Cusco y los cacao nativos de Ucayali, Loreto y Satipo; colección que representa un esfuerzo para el desarrollo de actividades de caracterización del germoplasma (1).

Los avances para la caracterización genética ya se han comenzado en el departamento de Amazonas. En el INDES-CES se publicó un estudio de genotipificación de cacao de 3 provincias del departamento de Amazonas: Bagua, Condorcanqui y Utcubamba, en donde se concluyó que la variedad de cacao nativo fino de Amazonas tiene ascendencias de cacao Nacional, Iquitos,

Amelonado y Criollo (12). En otro proyecto de investigación, desarrollado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), se caracterizó a 11 cultivares de cacao Chuncho de Cusco (cacao nativo con buen perfil de aroma y sabor) mediante análisis genéticos, morfológicos, sensoriales, fisicoquímicos en pulpa y pasta e incluso se realizaron análisis microbiológico durante la fermentación de un cultivar llamado “Cáscara de huevo” (10). Con respecto a los análisis genéticos, se concluyó que la diferenciación genética entre estos cultivares podría estar relacionado con su ubicación geográfica, es decir, mientras más cercanos estén geográficamente, más parecidos son genéticamente (10).

Por otro lado, se han realizado diferentes estudios para identificar los COV y compuestos orgánicos no volátiles, como por ejemplo en los estudios de COV de granos (tostados y en pasta) de cacao nativos finos de aroma de Amazonas (CFA) y Cusco (Chuncho), se identificaron 2 COV en común: 2,3-Butanediol y 3-hidroxi-2-Butanona, los cuales confieren aromas afrutados, dulces y florales (10,22). Se han identificado COV en las diferentes etapas post cosecha de cacao nativo fino de aroma: fermentado, seco y tostado. En un estudio de COV del cacao fino de aroma de Venezuela, se llegaron a identificar 69 compuestos volátiles mediante la técnica de SPME-GC-MS, de los cuales los compuestos más relevantes fueron: 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 2,3,5,6-tetrametilpirazina, ácido acético y 2-heptanol (23), estos compuestos se evidencian después del tostado de los granos de cacao, pero los precursores de tales compuestos se producen desde el proceso de fermentación. El 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y el 2-metilpropanal son algunos de los COV que confieren al chocolate sabores afrutados y dulces (24,25). Por otro lado, la acidez de los granos del cacao fino de aroma está ligado al proceso de fermentación y los compuestos habituales son el ácido acético y el 3-metilbutanoico (26); en cuyo proceso las bacterias aerobias oxidan el etanol, produciendo así, ácido acético.

1.2. Forastero

La variedad de cacao Forastero, se caracteriza por tener un sabor amargo fuerte y ácido, pero es el más utilizado en la producción de chocolate, es menos costoso y “representa el 80% del total de producción mundial debido a su mayor rendimiento y a su mayor resistencia a las enfermedades” (20). En una investigación se reportó que las concentraciones más altas de compuestos volátiles en la variedad Forastero son los siguientes: ácido 3-metilbutanoico, 2-(2-butoxi) etanol, anetol y 2,4-pentanodiol y contiene pocas concentraciones de COV que confieren características organolépticas positivas a los granos de cacao (5).

1.3. Trinitario

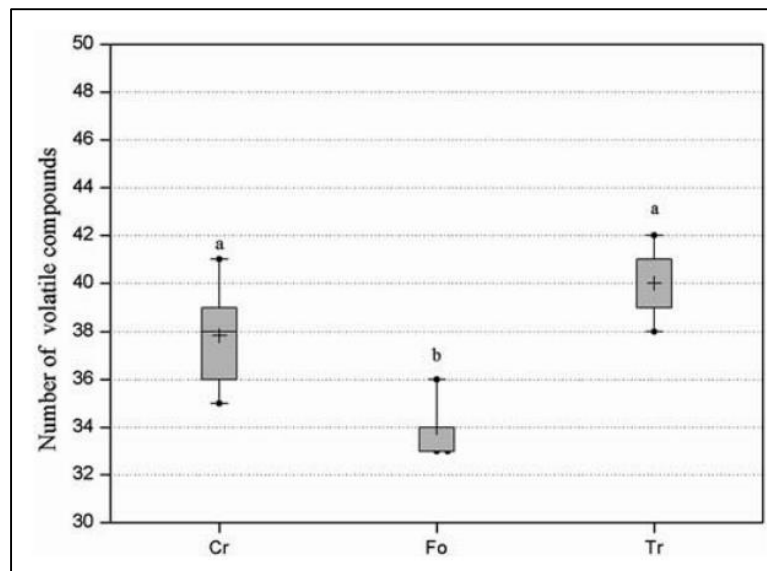
Trinitario es una variedad híbrida de Criollo y Forastero. En un estudio filogenético se identificaron polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs, Single Nucleotide Polymorphism) y secuencias simples repetidas (STR, short tandem repeats) para conocer el origen genético de la variedad Trinitario, comparando patrones de polimorfismo con un conjunto de referencia de diez genomas de cloroplasto completamente secuenciados (nueve fueron de *T. cacao* y un grupo externo, *T. grandiflorum*), de los cuales solo tres haplotipos SNP estuvieron presentes en los cultivares Trinitario muestreados y fueron los siguientes: Criollo, Forastero del alto y bajo Amazonas, por lo cual, el estudio concluye que la variedad Trinitario tiene un origen híbrido complejo de las variedades Criollo y Forastero (27).

Los compuestos volátiles generados durante los procesos post cosecha, de secado y tostado en Trinitario fueron, principalmente, el 3-metilbutanal y el

feniletanol, los cuales contribuyen al sabor de chocolate con leche y al sabor relativamente dulce en el licor de cacao (28).

En un estudio comparativo entre las variedades de cacao Trinitario, Criollo y Forastero, se demostró que la variedad Trinitario exhibió la mayor diversidad de compuestos volátiles (media = 39.32 ± 0.63), en segundo lugar, estuvo la variedad Criollo (media = 37.67 ± 0.87) y, por último, la variedad Forastero mostró la menor diversidad de compuestos volátiles (media = 33.75 ± 0.71) (Figura 1) (5). En cuyo estudio hay evidencia de que la composición y concentración de compuestos volátiles dependen de la genética de cada variedad de cacao.

Figura 1. Gráfico de caja-bigote que muestra el rango y distribución de los compuestos volátiles totales entre tres grupos morfogénéticos del cacao. Cr: Criollo, Fo: Forastero y Tr: Trinitario (5).



1.4. CCN-51

La variedad CCN-51, es descendiente de un clon de cacao llamado “Colección Castro Naranjal 51”, cuya variedad fue desarrollada cruzando los siguientes

genotipos de cacao (ICS95 × IMC 67) × Oriente 1, por el ecuatoriano Homero Castro, en donde ICS95 es un cruce de genotipos de los cacaos Amelonado y Criollo, mientras que IMC 67 es un genotipo de cacao de la provincia de Iquitos del alto Amazonas (29,30). La variedad CCN-51 contiene altas concentraciones de aromas y sabores amargos y astringentes (30,31) pero una de sus ventajas es que es resistente a plagas, enfermedades y a climas que varían constantemente (16), por ende, hay menos pérdida de mazorcas de cacao con respecto a variedades de cacaos finos de aroma.

En Amazonas-Perú se producen principalmente 2 variedades, la variedad de cacao nativo fino de aroma y el CCN-51, ambas variedades siguen los mismos procesos post cosecha pero se diferencian por su calidad (18).

2. Proceso de fermentación espontánea de los granos de cacao

La fermentación es una etapa de post cosecha que se desarrolla a partir de la pulpa del cacao cuando los granos son extraídos. La pulpa, que contiene de 10-15% de azúcares, actuará como sustrato para los microorganismos naturalmente presentes en la muestra y en el ambiente. Esta etapa es importante para la formación de COV que confieren aromas agradables y los precursores de aromas y sabores en los granos de cacao (32).

En la fermentación influyen factores biológicos debido al metabolismo de los microorganismos (33), como las levaduras, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas, bacterias aeróbicas formadoras de esporas (34,35), las cuales lideran este proceso y con ello influyen en los factores físicos y químicos (36). Las levaduras predominan entre las 24 a 36 h de fermentación, éstas convierten los azúcares en alcoholes en condiciones anaeróbicas; las bacterias ácido lácticas también están presentes desde el comienzo de la fermentación, con la

diferencia que estas están presentes abundantemente entre las 48 y 96 h, y son responsables por convertir azúcares y ácidos orgánicos en ácido láctico; las bacterias ácido acéticas también están presentes durante la fermentación pero predominan hacia el final, cuando aumenta la aireación (debido a la remoción de cacao después de las 60 h aprox. y cada 24 h hasta el final de la fermentación), éstas bacterias convierten los alcoholes en ácido acético y el aumento de ácidos es lo que causa la muerte del cotiledón de los granos de cacao (37). En las últimas horas de fermentación las bacterias aeróbicas formadoras de esporas están presentes porque toleran las altas temperaturas y producen compuestos químicos que favorecen la acidificación de los granos de cacao (34) (Figura 2).

Los compuestos orgánicos metabolizados y generados por los microorganismos influyen en los granos de cacao durante todo el proceso de fermentación (Figura 3), es por ello que también se estudia el tiempo de fermentación de cacao de cada variedad (8) ya que puede contribuir positiva o negativamente a las características sensoriales de los chocolates.

Figura 2: Esquema de la sucesión y predominancia de microorganismos en distintos tiempos durante la fermentación de los granos de cacao. Las estrellas indican en qué días de fermentación fueron más abundantes los metabolitos y temperatura (38).

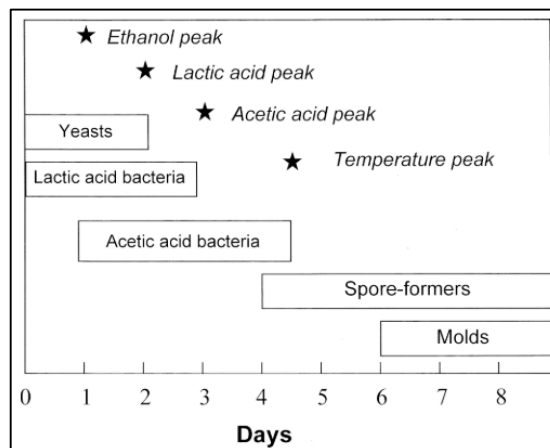
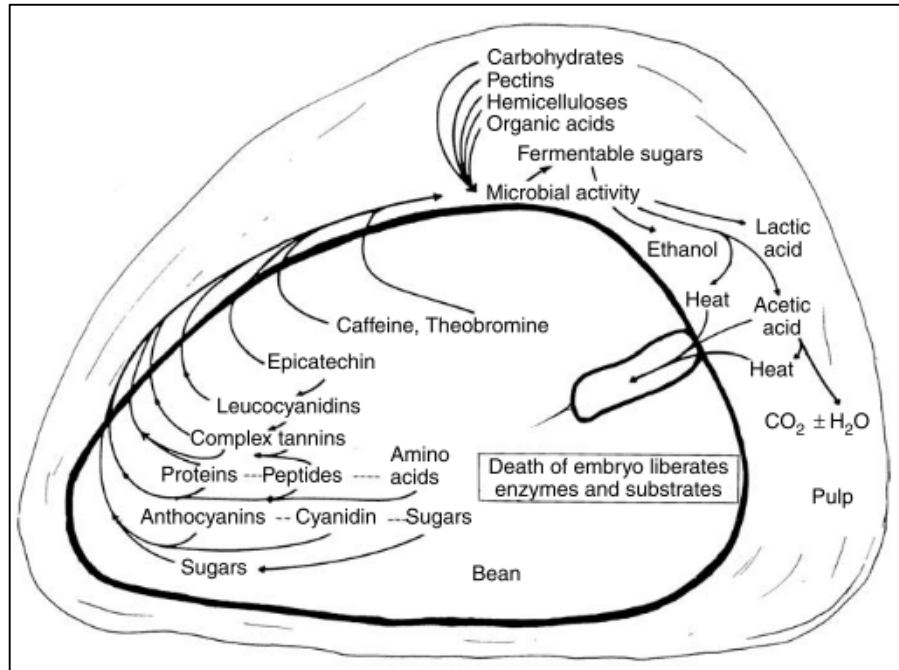


Figura 3: Resumen de cambios químicos provocados por los microorganismos durante el proceso de fermentación dentro de los granos de cacao (37).



3. COV generados en la fermentación de los granos de cacao

Los compuestos orgánicos volátiles y no volátiles del chocolate son generados durante el proceso de fermentación (6–8), el tiempo de secado (7,8), ya sea el secado expuesto al sol o en ambientes acondicionados, y durante el proceso de tostado de los granos de cacao (9). Estos son los procesos más importantes a los que necesariamente deben someterse los granos, ya que son los que confieren características de sabores y aromas agradables y/o desagradables de las diferentes variedades de cacao al chocolate.

Una de las características más estudiadas son los compuestos volátiles que se obtienen durante la fermentación de diferentes variedades de cacao, y en la literatura científica se encuentran diferencias significativas de estos compuestos entre distintas variedades de cacao. Por ejemplo, existen diferencias significativas

de compuestos volátiles encontrados en el cacao híbrido CEPEC2004 y el PS1319. En el primero, fueron detectados 2,3-butanediol y 2-metil-1-butanol, los cuales les confiere sabor agradable y, en el segundo, las altas concentraciones de ácidos confieren características sensoriales desagradables (4). En otra investigación se ha concluido que algunos compuestos volátiles que otorgan un aroma desagradable fueron formados durante el proceso de fermentación, sin embargo, su impacto en el aroma final de los granos fermentados es bajo (14). Además, variedades de cacao conocidos como finos de aroma fueron caracterizados por la presencia de hidrocarburos que proporcionan aroma de madera o aceite verde, mientras que el cacao Forastero presentaba bajas cantidades de estos compuestos (14). En un estudio realizado en Ecuador, el licor de cacao de la variedad CCN-51 se caracterizó por contener altas concentraciones de compuestos volátiles indeseables, clasificados como ácidos, como el ácido 2-metil propanoico, ácido propiónico, ácido 3-metilbutanoico y ácido acético, en comparación con las variedades de cacao Nacional de Ecuador (16).

4. Técnicas para el análisis de COV

Las técnicas usualmente utilizadas para evaluar los compuestos volátiles del cacao son la microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas (GC-MS).

4.1. Microextracción en fase sólida

La SPME es una técnica para extraer compuestos volátiles de una muestra, ya sea una muestra sólida o líquida, haciendo uso del espacio vacío (más conocido por el término en inglés, *headspace*) del vial, y para aumentar su efectividad, la fibra de SPME está cubierta con una serie de capas poliméricas, que pueden ser de los siguientes materiales: Poliacrilato, Divinilbenceno, Polidimetilsiloxano, Carboxano, entre otros. La SPME se basa, según su polímero de recubrimiento,

en la absorción y/o adsorción de analitos (en este caso, compuestos volátiles) y los polímeros en las diferentes fibras suelen tener distintos niveles de grosor y porosidad (39). Con la técnica SPME, se realizan estudios comparando distintas combinaciones de recubrimientos de la fibra de SPME para la extracción de compuestos volátiles o semivolátiles, polares o apolares, de distintos alimentos, cuyos compuestos aromáticos son de interés. Por ejemplo, la combinación de Divinilbenceno, Carboxano y Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) permite extraer un alto número de compuestos volátiles de una muestra de café, en comparación con la fibra SPME solo recubierta con Polidimetilsiloxano y Divinilbenceno (PDMS/ DVB) o solo recubierta con Polidimetilsiloxano (PDMS) (40).

4.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas

La GC-MS es la técnica que comúnmente es utilizada después de la SPME. El cromatógrafo de gases se encarga de separar los compuestos volátiles que se encuentran absorbidos o adsorbidos en la fibra de SPME. Para ello, primero se realiza la inyección de la fibra SPME en el cromatógrafo de gases y mediante un gas de arrastre inerte junto con una alta y adecuada temperatura, estos compuestos son desorbidos y pasan a la columna capilar, lugar en donde ocurre la separación de los compuestos. Esta separación depende de las temperaturas de ebullición de cada compuesto, ya que se programa al cromatógrafo de gases para que aumente la temperatura de una forma gradual. El detector de masas se encarga de acusar la presencia de los compuestos generando una señal que es captada por softwares adecuados y convertida en un cromatograma. Con la ayuda de softwares específicos, los compuestos detectados a partir de una muestra pueden ser identificados y/o cuantificados con alta sensibilidad (41).

III. Pregunta de investigación, hipótesis y objetivos

1. Pregunta de investigación

¿Existen diferencias en la dinámica de los compuestos volátiles durante la fermentación espontánea, que confieren características sensoriales relevantes al chocolate, entre el clon comercial CCN-51 y el cacao nativo fino de aroma producido en la zona nororiental del Perú?

2. Hipótesis

Sí existen diferencias en la dinámica de los compuestos volátiles durante la fermentación espontánea, que confieren características sensoriales relevantes al chocolate, entre el clon comercial CCN-51 y el cacao nativo fino de aroma producido en la zona nororiental del Perú.

3. Objetivos

3.1) Objetivo general:

Diferenciar la dinámica de los COV generados durante el proceso de fermentación espontánea de las variedades de cacao nativo fino de aroma y CCN-51

3.2) Objetivos específicos:

- Identificar y semicuantificar los COV de las variedades de CFA y del CCN-51 durante el proceso de fermentación espontánea.
- Comparar la dinámica de los COV generados durante el proceso de fermentación espontánea del CFA y del CCN-51.
- Correlacionar los COV generados en el proceso de fermentación con la calidad de los cacaos investigados.

IV. Materiales y métodos

1. Material biológico de estudio

Granos de dos variedades de cacao: Cacao nativo fino de aroma (CFA), el cual consta de una mezcla de genotipos de cacao nativos de la provincia de Utcubamba, del departamento de Amazonas (12) (por ello no se mencionarán a cultivares específicos). Y la variedad CCN-51, cuya variedad tiene como ancestros al ICS95 y IMC 67 (cultivares de Ecuador) (16,30).

2. Lugar de muestreo

Los granos de cacao de ambas variedades fueron colectados en el distrito de Cajaruro, provincia de Utcubamba, departamento de Amazonas - Perú. Los productores agrícolas extrajeron los granos de cacao de las mazorcas de las variedades de cacao fino de aroma y del CCN-51. Aproximadamente se obtuvo 600 kg, entre granos y pulpa de cacao, de cada variedad y en la Cooperativa Central de Productores Agropecuarios de Amazonas (CEPROA-A), ubicada en el distrito de Cajaruro, se procedió a colocar la pulpa y granos de cacao en cajones de madera para iniciar el proceso de fermentación espontánea. Se utilizó dos cajones, uno por cada variedad. El proceso de fermentación duró 156 horas, es decir, 6 días y medio.

3. Toma de muestra

Para ambas variedades, las muestras fueron tomadas cada 12 h y el proceso de fermentación tuvo una duración de 156 h. Antes de tomar la muestra a las 0 h de fermentación, se colocó a los granos de cacao en los cajones de madera (laurel), se esperó 4 horas a que se escurra el líquido sobrante de la pulpa y se dejaron los cajones destapados. Después de esperar las 4 horas, fueron tomadas 2 muestras de 100 g para cada variedad y las masas de fermentación fueron cubiertas con tela yute para que comience el proceso de fermentación. Además, para que la fermentación ocurra de

forma homogénea, hubo remoción de las masas de fermentación de cacao cada 24 horas después de las 60 h de fermentación.

En cada muestreo fueron utilizados guantes de látex limpios. Las muestras fueron colectadas desde el fondo de la masa de fermentación, aproximadamente 25 cm de profundidad y colocadas en bolsas con cierre hermético, las cuales fueron etiquetadas y embaladas con abundante cinta. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en un tanque con nitrógeno líquido.

Las muestras fueron transportadas desde la cooperativa CEPROA-A hasta el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la UNTRM-A en el tanque con nitrógeno líquido y en el laboratorio fueron conservadas en una congeladora a -20 °C (42).

4. Medición del pH y la temperatura

El proceso de fermentación de los granos de cacao da lugar a los cambios de pH y temperatura, los cuales fueron registrados cada 12 h, al igual que las tomas de muestra.

4.1. Medición del pH de la pulpa y del cotiledón

Para determinar el pH de la pulpa de cacao, 20 g de agua destilada fueron mezclados manualmente con 20 g de pulpa (granos de cacao cubiertos por la pulpa mucilaginosa) dentro de una bolsa plástica estéril (42), luego se procedió a medir la mezcla con un pHmetro (Hanna, HI98100 Checker[®] Plus, Rumania). Para la determinación del pH del cotiledón, 135 g de agua destilada fueron mezclados manualmente con 15 g de granos sin cáscara y triturados, dentro de una bolsa plástica estéril, en seguida, la mezcla fue medida con el pHmetro (42–44).

4.2. Registro de la temperatura

La temperatura de fermentación, en ambas variedades de cacao, fue medida con un termómetro de mercurio, éste fue sumergido dentro de la masa de fermentación por un tiempo de 5 minutos, seguidamente, se registró la temperatura.

5. Análisis de COV por SPME/HS/GC-MS

Los volátiles fueron extraídos utilizando la técnica de la SPME y separados por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS), descrito por Moreira *et al.* (4) con algunas modificaciones.

Para cada muestra, los granos de cacao fueron descascarillados, parcialmente triturados en un mortero de porcelana agregando nitrógeno líquido (4), luego fueron completamente molidos utilizando un molinillo automático por 20 segundos de forma intermitente y tamizados en un tamiz de 850 μm para estandarizar el tamaño de partícula de la muestra. Cuatro gramos (4 g) de muestra fueron colocados en un vial de 20 mL y 5 μL del estándar interno 4-metilpiridina (solución compuesta por 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de 4-metilpiridina diluida en metanol) fueron adicionados (45). En seguida, el vial fue cerrado herméticamente lo más rápido posible utilizando una tapa de aluminio con septa de PTFE/silicona.

La fibra de SPME utilizada fue con una película de Divinilbenceno / Carboxeno / Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). El tiempo de equilibrio de la muestra fue de 15 min a 60 °C, luego la fibra fue expuesta al espacio de cabeza (headspace) del vial por 30 minutos a la misma temperatura. Estas condiciones fueron elegidas para el presente estudio ya que son análisis validados que se realizan de rutina en el laboratorio aplicadas para la separación e identificación de un mayor número de compuestos volátiles del cacao en sus diferentes estadios, como en muestras de

cacao crudo, durante el proceso de fermentación, secado y tostado de los granos(7,8).

Los compuestos fueron analizados en un cromatógrafo de gases Agilent 7890B equipado con detector de masas MSD 5977B y columna capilar DB–5MS UI (60 m × 0,25 mm × 1.0 μm). Fue utilizada una rampa de temperaturas como sigue: 50 °C/5 min, luego 4 °C/min hasta 250 °C. El tiempo de corrida fue de 55 min. El helio fue utilizado como gas carreador con flujo de 1.1 mL/min. El inyector (operado en modo splitless) y el detector fueron mantenidos a 250 y 150 °C. El tiempo de desorción de la fibra SPME fue de 5 min. Cada muestra fue analizada 3 veces.

Se realizó la identificación de los COV mediante la comparación de los espectros de masas de la muestra y la base de datos de la biblioteca NIST 2017 (National Institute of Standards and Technology). La identidad de los compuestos fue confirmada por la inyección del estándar de n-alcenos (C_{10} a C_{40}) y la comparación de sus índices de retención (41).

6. Semicuantificación de los COV identificados

La semicuantificación se realizó en base a la concentración del estándar interno (4-metilpiridina) adicionado en cada muestra, es por ello que se denominó "concentración relativa" al valor obtenido al multiplicar la concentración conocida del estándar interno ([*Estándar interno*]) por el promedio del área del compuesto orgánico volátil de interés (\hat{X} Área del COV) y dividido por el área del estándar interno (\hat{X} Área del Estándar Interno) (46).

$$\frac{[\textit{Estándar interno}] \times \hat{X}\textit{Área del Estándar Interno}}{[X \textit{ del COV}] \times \hat{X}\textit{Área del COV}}$$

$$[X \text{ del COV}] = \frac{[\text{Estándar interno}] * \hat{X}\text{Área del COV}}{\hat{X}\text{Área del Estándar_Interno}}$$

7. Análisis de datos

La base de datos fisicoquímicos se obtuvo directamente de los muestreos de granos de cacao en proceso de fermentación en el campo, la temperatura de fermentación fue medido una vez y, las medidas de pH de pulpa y cotiledón fueron medidas 2 veces. Utilizando el programa estadístico Excel se determinó el promedio y la desviación estándar de las medidas repetidas del pH de pulpa y cotiledón.

Para el análisis de compuestos volátiles se utilizó los softwares: MassHunter Quant 10.1, MassHunter Qual 10_0, MassHunter Unknowns Analysis y la biblioteca NIST 2017. Estos son los programas utilizados para el registro, procesamiento e identificación de compuestos volátiles en el equipo del GC-MS (Agilent Technologies®). Además, en el software MassHunter Unknowns Analysis se realizó la depuración de datos.

Los datos extraídos de los programas de GC-MS se trabajaron en Excel, calculando los promedios de áreas, promedios de tiempos de retención, desviaciones estándares y concentraciones relativas. Además, se graficaron las dinámicas (gráficas de dispersión de los tiempos de fermentación versus las concentraciones relativas) de los COV individualmente para comparar las concentraciones relativas entre las variedades de cacao: CCN-51 y CFA.

Después de la organización en Excel, los datos fueron trabajados en paquete estadístico del software R (R Development Core Team, 2020). Primero se realizó un análisis exploratorio de datos, utilizando como variable de interés a la concentración relativa. Posteriormente, se estimó la diferencia significativa de las

concentraciones de COV entre ambas variedades, utilizando la prueba de Wilcoxon (prueba no paramétrica), al 95% de nivel de confianza (se utilizó una prueba no paramétrica debido a que los datos no tuvieron una distribución normal y no cumplieron con la homogeneidad de varianzas). Seguidamente, se realizó análisis de componentes principales (ACP) para comparar el perfil de los COV entre las variedades de cacao durante el proceso de fermentación. Para el ACP se consideró un porcentaje acumulado mayor al 80% de la explicación de la variabilidad de los datos. Por último, se realizó una gráfica de calor de los COV, entre ambas variedades y durante la fermentación.

8. Local de ejecución:

El presente proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOBVEG), en el área de Cromatografía de Gases. El Laboratorio de FISIOBVEG es uno de los laboratorios del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), el cual es un órgano desconcentrado e interfacultativo de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A), ubicada en la ciudad de Chachapoyas.

V. Resultados

1. Cambios de pH y temperatura durante el proceso de fermentación espontánea

Los datos de la temperatura, el pH de la pulpa y cotiledón fueron recopilados durante el proceso de fermentación espontánea en ambas variedades y cada 12 horas (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Cambios fisicoquímicos de los granos de cacao de la variedad CFA en las 156 h de fermentación. Los valores del pH de la pulpa y cotiledón son promedios de 2 repeticiones y su respectiva desviación estándar se muestra entre paréntesis.

CFA			
Hora de fermentación	Temperatura (°C)	pH pulpa	pH cotiledón
0	29	3.86(0.10)	6.27(0.01)
12	32	3.76(0.01)	6.10(0.08)
24	35	3.85(0.05)	5.71(0.11)
36	34	4.07(0.00)	5.96(0.07)
48	40	4.25(0.08)	6.05(0.13)
60	41	4.08(0.11)	5.43(0.19)
72	44	4.00(0.05)	5.30(0.13)
84	53	4.11(0.07)	4.56(0.04)
96	50	4.30(0.01)	4.55(0.15)
108	51	4.16(0.02)	4.52(0.02)
120	53	4.23(0.07)	4.38(0.01)
132	53	4.13(0.10)	4.32(0.07)
144	50	4.23(0.08)	4.30(0.06)
156	52	4.22(0.01)	4.29(0.08)

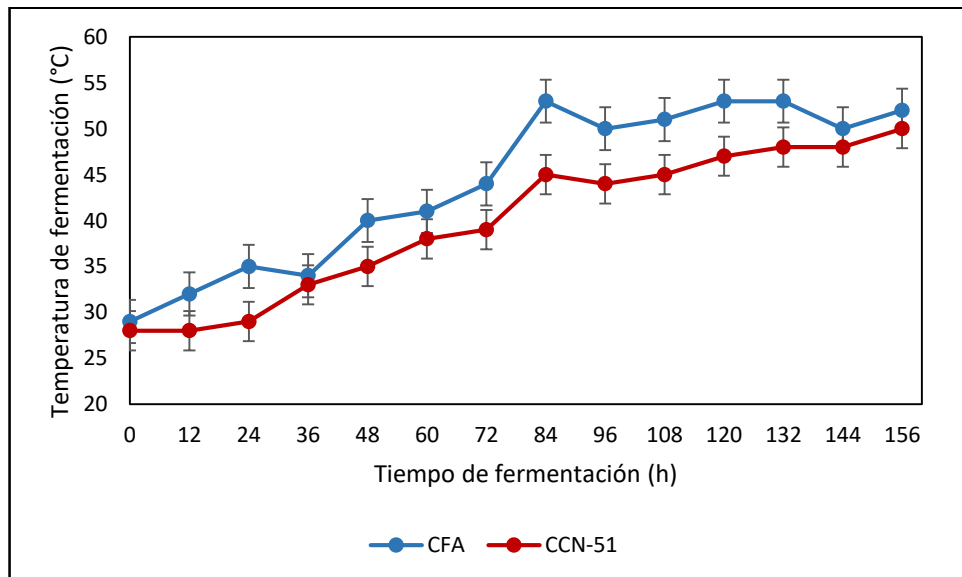
Tabla 2. Cambios fisicoquímicos de los granos de cacao de la variedad CCN-51 en las 156 h de fermentación. Los valores del pH de la pulpa y cotiledón son promedios de 2 repeticiones y su respectiva desviación estándar se muestra entre paréntesis.

CCN-51			
Hora de fermentación	Temperatura (°C)	pH pulpa	pH cotiledón
0	28	3.43(0.00)	6.59(0.00)
12	28	3.63(0.06)	6.31(0.02)
24	29	3.73(0.26)	6.16(0.15)
36	33	4.13(0.23)	6.14(0.01)

48	35	4.13(0.06)	6.02(0.11)
60	38	4.05(0.04)	5.73(0.01)
72	39	4.22(0.02)	5.71(0.01)
84	45	4.17(0.12)	5.01(0.05)
96	44	4.08(0.04)	4.63(0.05)
108	45	4.32(0.01)	4.63(0.13)
120	47	4.16(0.01)	4.52(0.04)
132	48	4.16(0.04)	4.32(0.01)
144	48	4.17(0.01)	4.30(0.01)
156	50	4.28(0.04)	4.33(0.02)

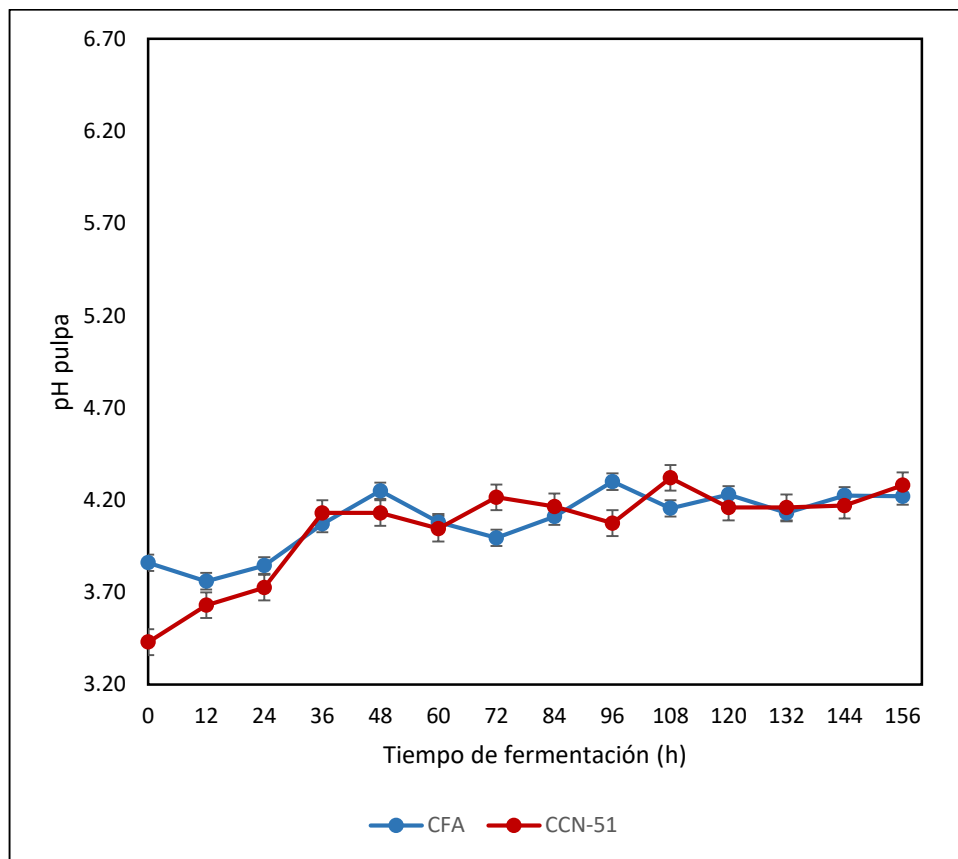
En la figura 4 se observa una diferencia de temperaturas entre las variedades, la temperatura del cacao fino de aroma tiende a ser mayor que la variedad CCN-51, sin embargo, en la prueba t de Student, indica que no existen diferencias estadísticamente significativas, el valor p fue igual a 0.1886.

Figura 4. Comportamiento de la temperatura durante la fermentación espontánea. Las barras indican el error estándar.



El pH de la pulpa del cacao fino de aroma se mantuvo entre 3.86 y 4.22 (Tabla 1) y el pH de la pulpa del cacao CCN-51 se mantuvo entre 3.43 y 4.28 (Tabla 2). En la prueba t de Student, el p-valor fue de 0.6126, es decir, no existe diferencias estadísticamente significativas entre los pH de las pulpas de ambas variedades. En la figura 5 se compara el pH de la pulpa entre las variedades mediante un gráfico dispersión.

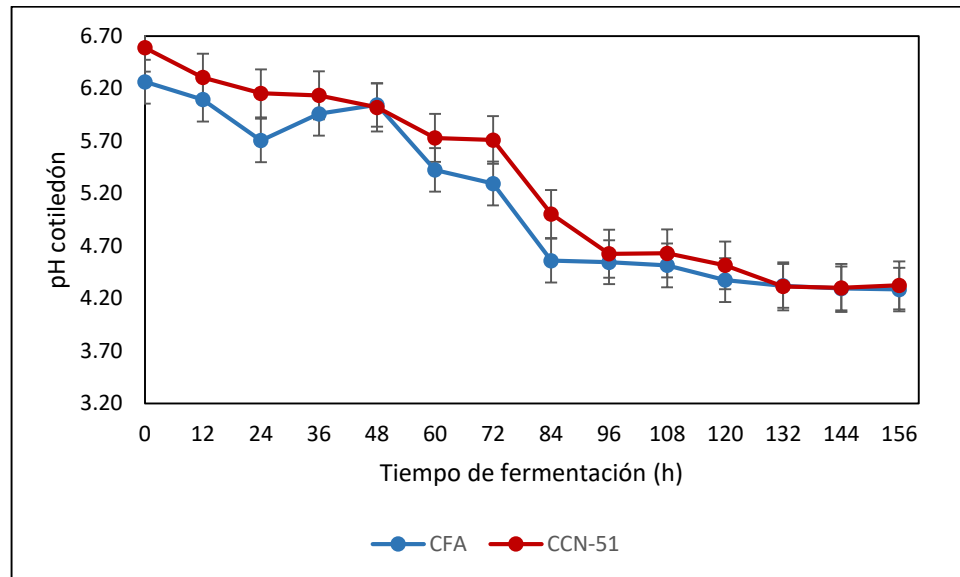
Figura 5. Comportamiento del pH de la pulpa durante la fermentación espontánea. Las barras indican el error estándar.



En la figura 6 se observa que los pH de cotiledón fueron descendiendo a medida que aumentaba las hora de fermentación. En el cacao fino de aroma, el pH fue de 6.27 a las 0 h y terminó con un pH de 4.29 a las 156 h de fermentación (Tabla 1). Por otra parte, en la variedad CCN-51, el pH comenzó con 6.59 y descendió hasta

4.33 (Tabla 2). En la prueba t de Student, el p-valor fue 0.5417, lo que significa que no hay diferencias estadísticamente significativas del pH del cotiledón entre variedades.

Figura 6. Comportamiento del pH del cotiledón durante la fermentación espontánea. Las barras indican el error estándar.



Para conocer cuál es la relación entre la temperatura de fermentación y el pH se realizó una correlación. En las figuras 7 y 8 se aprecia la relación entre los datos de los pH y la temperatura de fermentación, a medida que la temperatura de fermentación aumentaba, el pH de la pulpa aumentaba y el pH del cotiledón disminuía, en ambas variedades. Por ello, en la tabla 3 se ha colocado los valores de las correlaciones de Pearson, con un intervalo de confianza al 95%, en donde las correlaciones del pH de la pulpa y la temperatura de fermentación, en ambas variedades, es 0.76, lo cual nos indica que la correlación es alta, significativa y directamente proporcional. Por otro lado, las correlaciones del pH del cotiledón y la temperatura de fermentación, en ambas variedades, es -0.95, es decir, es altamente significativa y, por el signo negativo, es inversamente proporcional.

Además, en la tabla 3 se ha colocado los modelos de regresión lineal simple y el coeficiente de determinación, este último es una medida de bondad de ajuste y en el primer caso de la tabla 3 es 0.585, esto quiere decir que el 58.5% de la variabilidad total del modelo de la regresión lineal simple que describe el pH de la pulpa CFA, está siendo descrito por la variable temperatura. Mientras más se aproxime a 1, el coeficiente de determinación, el modelo estará siendo bien descrito por la variable temperatura. El porcentaje restante se atribuye a los factores que no se ha podido controlar durante la toma y registro de las muestras.

Tabla 3. Valores de las correlaciones, modelo de regresión lineal simple y coeficiente de determinación de las relaciones entre pH y temperatura de fermentación.

Variedades	Asociaciones	Correlación	Modelo de regresión lineal simple	Coefficiente de determinación (R ²)
CFA	pH pulpa – T°	0.76	$\text{pH}_P = 3.4475 + 0.0145 T^\circ$	0.585
	pH cotiledón – T°	-0.95	$\text{pH}_C = 8.874 - 0.0852 T^\circ$	0.924
CCN-51	pH pulpa – T°	0.76	$\text{pH}_P = 2.9979 + 0.0263 T^\circ$	0.651
	pH cotiledón – T°	-0.95	$\text{pH}_C = 9.4452 - 0.1039 T^\circ$	0.944

Figura 7. Correlación del pH de la pulpa y la temperatura, por variedad.

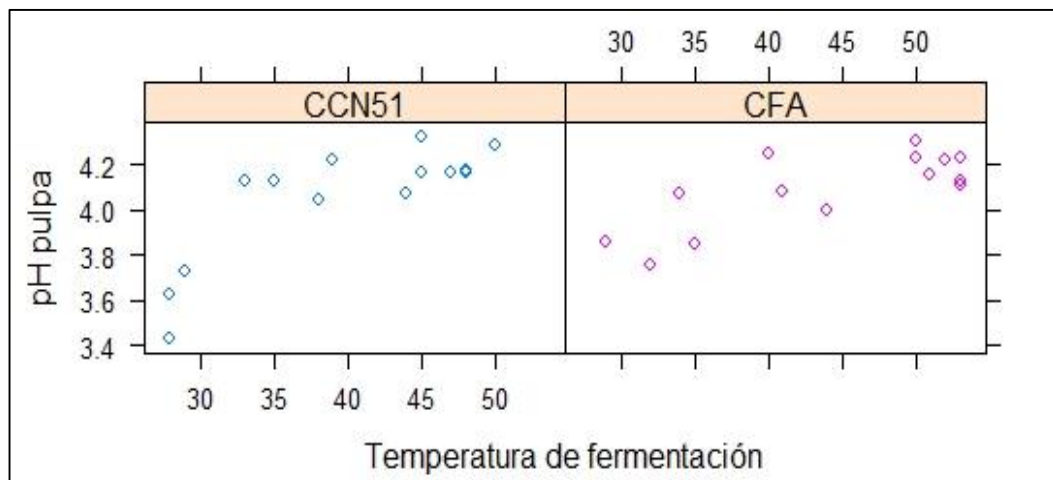
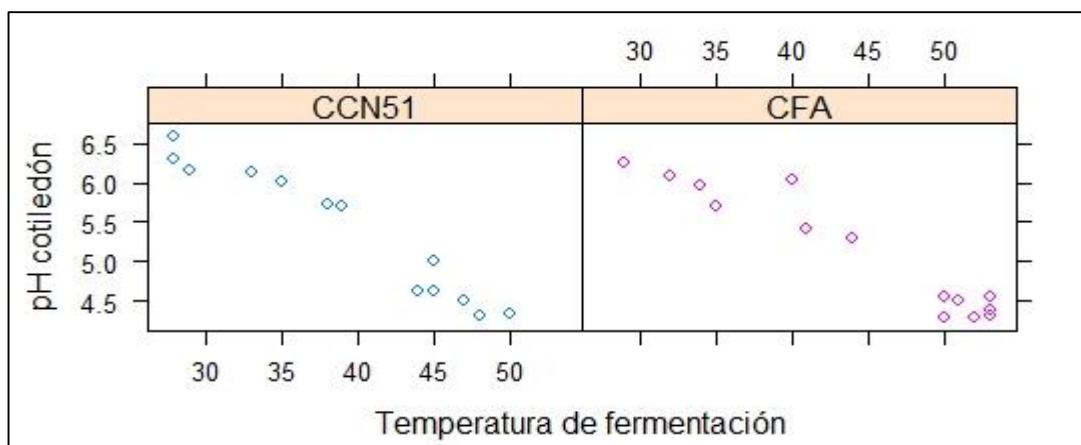


Figura 8. Correlación del pH del cotiledón y la temperatura, por variedad.



2. COV identificados durante la fermentación espontánea

Se identificaron 122 COV en total desde las 0 hasta las 156 horas de fermentación de los granos de cacao entre ambas variedades (Tabla 4). En la variedad CFA se identificaron 29 COV a las 0 h y 39 COV a las 156 h de fermentación. En cambio, en la variedad CCN-51 se identificaron 30 COV a las 0 h y 34 COV, a las 156 h de fermentación. Entre ambas variedades hubo un total de 61 COV en común. Durante las fermentaciones se encontraron los siguientes grupos de compuestos: ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, piridina, terpenos, terpenoides y otros.

Tabla 4. COV identificados durante la fermentación espontánea de las variedades: CFA y CCN-51.

Grupo funcional	Nombre del COV	TR (min)	IR calculado	IR – Biblioteca NIST 2017	Descripción de aroma	Referencia de la descripción de aroma
Ácido	Ácido pentanoico	26.00	909	904	Queso, picante	(47) y (48)
	Ácido bencenoacético	37.73	1229	1262	Dulce, floral	(32)
	Ácido octanoico	34.40	1138	1180	Desagradable, aceitoso, grasoso	(49)
	Ácido acetohidroxámico	20.49	759	760		

	2-nonanol	32.46	1085	1102	Afrutado, cítrico	(45)
	1-hexanol	21.66	791	868	Afrutado, verde, herbáceo	(49)
	1-butanol	16.71	655	659	Afrutado, vino	(14)
	Alcohol de bencilo	29.77	1012	1036	Dulce, floral	(8)
	Alcohol feniletílico	33.53	1115	1116	Miel, especia (spice), rosa, lila, floral, caramelo	(7) y (50)
	1-feniletanol	31.17	1050	1061	Rosa, miel, fragante, floral	(49)
	2-heptanol	23.29	835	900	Dulce y cítrico	(8) y (51)
Alcohol	(S)-(+)-1,2-propanodiol	18.71	710	724		
	2-pentanol, 4-metil-	18.25	698	758		
	*-.alpha.-metil-bencenometanol	31.01	1046	1055		
	(S)-.alpha.-metil-bencenometanol	31.00	1045	1055		
	(S)-(+)-3-metil-1-pentanol	21.66	790	796		
	(S)-3-Etil-4-metilpentanol	30.96	1044	1023		
	2,3-butanodiol, [R-(R*,R*)]-	17.14	667	743		
	2,3-butanodiol, [S-(R*,R*)]-	17.12	667	743		
	Ácohol propargílico	13.17	559	560		
	Nonanal	32.60	1089	1104	Graso, jobonoso - afrutado	(52)
	Benzaldehído	26.91	934	962	Amargo, dulce, almendrado, cereza	(49) y (48)
Aldehído	Bencenoacetaldehído	30.41	1029	1045	Miel, floral	(45)
	2-heptenal	26.06	911	958	Verde, fermentado	(53)
	Metional	23.70	846	907	Patata	(54)
	2-propenal	8.76	438	456		
	2-butanona	17.52	677	598	Afrutado	(45)
	2-heptanona	22.81	822	891	Afrutado, coco, queso, floral	(51)
	2-nonanona	32.09	1075	1092	Afrutado, fresco, dulce	(51)
	Acetofenona	31.61	1062	1065	Floral, almendrado, dulce	(49)
Cetona	Diacetilo	13.53	568	595	Mantecoso	(54)
	3-hidroxi-2-butanona	18.72	710	713	Mantequilla, crema	(7)
	2-octanona	27.62	953	990	Moho, verde	(55)
	2-propanona	12.43	539	486	Solvente	(48)
	3,6-heptanodiona	29.13	995	1041		
	Metilisobutilcetona	17.71	683	735		
	Acetato de 2-heptanol	29.42	1002	1045	Afrutado	(51)
Éster	Decanoato de etilo	43.41	1384	1396	Afrutado	(49)
	Acetato de 2-metilpropilo	18.71	710	771	Afrutado	(8)

	Formiato de metilo	27.69	955	372	Afrutado	(56) y (48)
	Acrilato de butilo	23.04	828	861	Afrutado tropical	(57)
	Acetato de 2-metilbutilo	22.03	800	880	Afrutado, dulce	(58)
	Éster etílico del ácido bencenoacético	38.33	1246	1246	Afrutado, dulce	(8)
	Éster etílico del ácido octanoico	36.08	1184	1196	Afrutado, floral	(49)
	Éster etílico del ácido hexanoico	27.84	959	1000	Afrutado, manzana, plátano	(49)
	Éster etílico del ácido benzoico	35.69	1173	1171	Graso, floral, afrutado	(49)
	Acetato de 3-metil-1-butanol	21.90	797	876	Plátano, afrutado	(45)
	Éster 2-feniletílico del ácido acético	39.00	1264	1258	Miel, floral	(8)
	Succinato de dietilo	35.21	1160	1182	Aroma agradable, floral	(59)
	Acetato de 2-butanol, 3-metil-	20.56	761	830		
	Éster pentílico del ácido acético	27.68	955	911		
	Éster 2-metilbutílico del ácido benzoico,	43.97	1399	1394		
	Pent-2-il éster del ácido benzoico	44.11	1404	1394		
	Éster pentílico del ácido benzoico	44.12	1404	1452		
	Éster metílico del ácido carbámico	17.53	678	630		
	Éster metílico del ácido hexanoico	24.38	865	925		
	Éter dimetílico	5.18	340	324		
Éter	Isobutil éter	22.43	811	808		
	Metil nonil éter	32.31	1081	1126		
	Éter n-butílico	22.43	812	858		
Piridina	Piridina, 2-etil-	23.75	848	906		
Terpeno	Beta-Mirceno	27.69	955	991	Picante, balsamo	(51)
	Beta-Ocimeno	30.09	1021	1037	Floral	(48)
	Cis-beta-ocimeno	30.09	1021	1038	Floral	(51)
	Linalool	32.57	1088	1099	Floral, rosa, dulce, especia, cítrico	(51)
	Trans-beta-ocimeno	30.06	1025	1049	Dulce, herbal	(51)
	Beta-Pineno	27.53	951	979	Herbal	(48)
	3-Careno	29.55	1006	1011	Cítrico	(48)
	(+)-3-Careno	32.41	1084	1010	Dulce	(48)
	Isopreno	9.22	451	498		

Terpenoide	Óxido de linalool (furanoide trans)	32.34	1082	1086	Floral, cítrico, limón, refrescante	(49)
	Óxido de linalool	32.35	1082	1074	Dulce, nuez	(49)
	Óxido de linalool (cis-furanoide)	31.52	1060	1066	Dulce, nuez	(49)
Otros	Acetato de acetoina	22.36	809	888	Afrutado, dulce	(48)
	Nitrito de etilo	8.75	438	410	Afrutado, dulce, etéreo	(48)
	Guaiacol	32.15	1077	1090	Ahumado, picante	(50)
	Estireno	23.42	839	893	Dulce , bálsamo, floral	(60) y (48)
	Gama-Butirolactona	23.85	850	915	Cre moso, aceitoso, grasoso	(45) y (48)
	Dimetoximetano	11.88	523	500	Cloroformo	(48)
	diacetato de 1,1-etanodiol	22.34	809	788		
	1,2,4,5-tetrazina	18.24	697	656		
	Monobenzoato de 1,2-etanodiol	44.11	1404	1402		
	1,3-dioxolan-2-one	24.22	860	814		
	1-butanamina	13.57	570	610		
	1-butanamina, 3-metil-	20.55	760	698		
	1-butino, 3-metil-	9.23	451	436		
	Acetato de 1-metoxi-2-propilo	24.21	860	870		
	1-propanol, 3-etoxi-	19.98	745	788		
	Acetato de 1-propen-2-ol	17.70	682	609		
	2-Aminosuccinonitrilo	32.21	1078	1088		
	Acetato de 2-nonanol	37.43	1221	1237		
	2-pentanona, 3-metil-	17.54	678	752		
	3' (1'-pirrolidinil)-2-butanona	29.41	1002	1004		
	3,4-hexanodiona, 2,2,5-trimetil-	28.09	966	1039		
	4-hidroxi-3-hexanona	22.29	808	846		
	Azetidina	16.98	663	625		
	Azetidina, 1-nitroso-	23.85	850	927		
	Bencenoetanol, beta-etenil-	39.63	1281	1261		
	3-metilbutil-2 éster del ácido benzoico	43.96	1399	1330		
	Biciclo[3.1.0]hexano, 4-metileno-1-(1-metiletilo)-	27.54	951	974		
Biciclo[3.1.1]hept-2-eno, 3,6,6-trimetil-	29.70	1010	948			
Biciclo[3.1.1]heptano, 6,6-dimetil-2-metileno-, (1S)-	27.54	951	943			
Ciclobutano	11.28	507	465			

Ciclohexano, metil-	21.12	776	728
Ciclohexeno, 4-metileno-1-(1-metiletilo)-	32.41	1084	1028
Ciclopropeno	7.89	415	342
Decano	28.10	966	1000
Dietil cianamida	23.15	831	903
Etano, metoxi-	7.29	398	395
2-(5-metil-5-vinitetrahidrofuran-2-il)propan-2-ilo carbonato de etilo	32.35	1082	1090
Glicerina	25.94	907	967
Acrilato de isobutilo	23.05	828	810
Metilgloxal	13.49	568	644
Neopentano	8.34	427	412
Oxetano, 3-(1-metiletilo)-	16.51	650	664
Peróxido, dimetilo	6.57	379	372
Propano, 1-(clorometoxi)-2-metil-	22.30	808	755
Propano, 1,3-dimetoxi-	17.54	678	699
Propano, 2-nitro-	17.00	663	675
2,2-dimetil- del ácido propanoico	22.43	811	864
Carbonato de terc-butiletilo	22.29	808	876
Butirato de vinilo	19.32	726	726

En las figuras 9 y 10 se observan los cromatogramas generales de las variedades CCN-51 y CFA, respectivamente, de los 14 tiempos de fermentación, es decir, desde las 0 a las 156 h de fermentación. En el anexo 2 se presentan a los cromatogramas comparando las 2 variedades por cada tiempo de fermentación. Los números en los cromatogramas de la figura 9 hacen referencia a los COV especificados en la tabla 5 y EI es el estándar interno 4-metilpiridina.

Figura 9. Cromatograma general de la variedad CCN-51, desde las 0 a las 156 horas de fermentación. Los números indican los COV con mayor abundancia y EI es el estándar interno 4-metilpiridina.

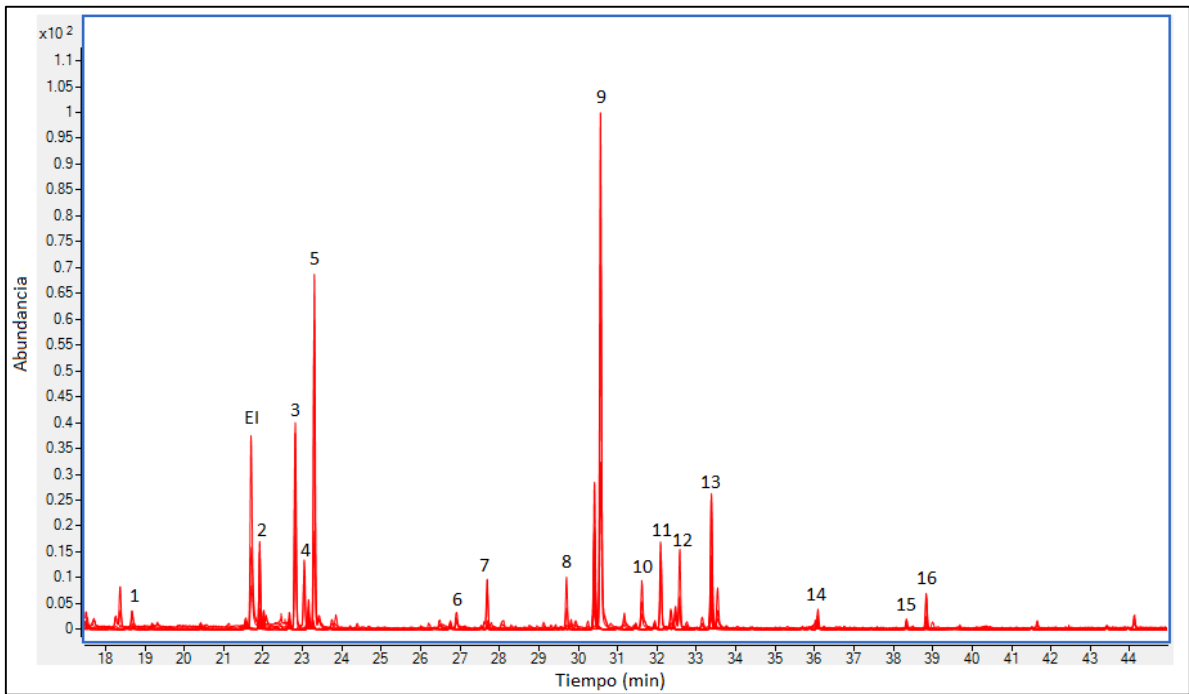


Figura 10. Cromatograma general de la variedad CFA, desde las 0 a las 156 horas de fermentación. Los números indican los COV con mayor abundancia y EI es el estándar interno 4-metilpiridina.

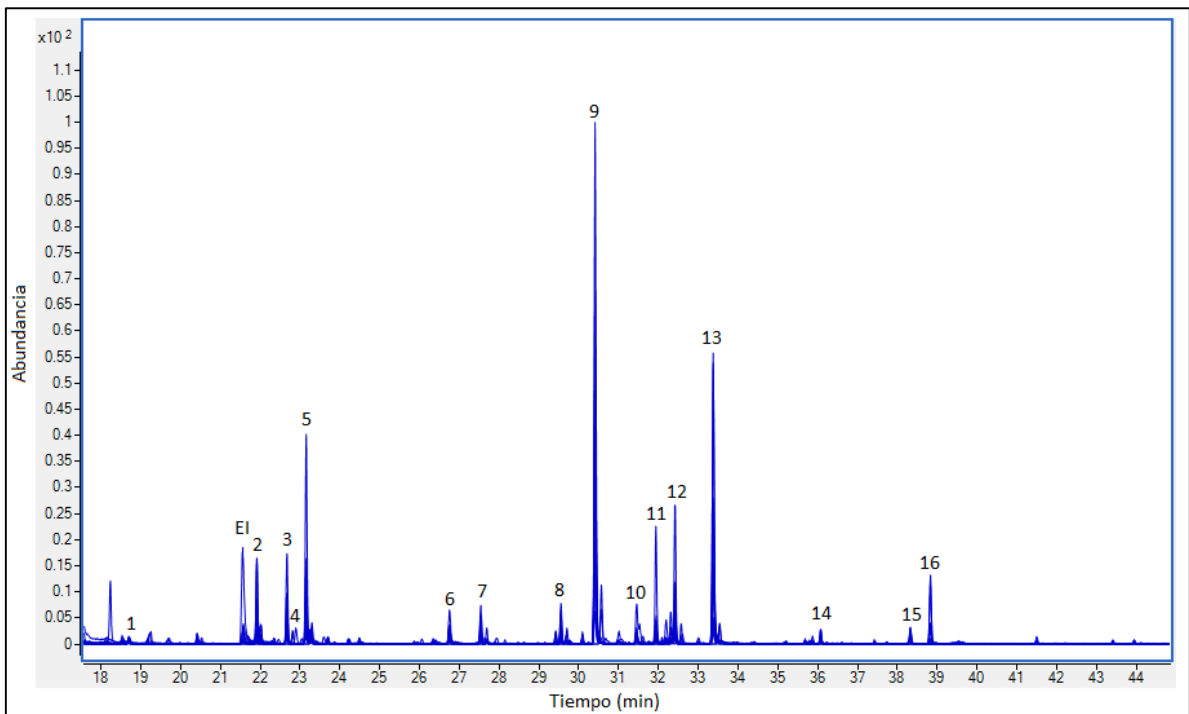


Tabla 5. Nombre de los COV con mayor abundancia identificados en los cromatogramas de las figuras 9 y 10.

Numeración	Nombre de los compuestos orgánicos volátiles
1	Acetato de 2-metilpropilo
2	Acetato de 3-metil-1-butanol
3	2-heptanona
4	Acrilato de butilo
5	2-heptanol
6	Benzaldehído
7	Beta-Mirceno
8	Trans-beta-ocimeno
9	Bencenoacetaldehído
10	Acetofenona
11	2-nonanona
12	2-nonanol
13	Alcohol feniletílico
14	Éster etílico del ácido octanoico
15	Éster etílico del ácido bencenoacético
16	Éster 2-feniletílico del ácido acético

Se realizó la exploración de datos de la concentración relativa de todos los compuestos volátiles en función a las variedades: CFA y CCN-51. En la figura 11 se muestra los valores de la concentración relativa según variedad sin discriminar los compuestos volátiles y se percibe que la concentración relativa es mayor en la variedad CFA en comparación con la de CCN-51. También se analizó el comportamiento de la concentración relativa en función al tiempo de fermentación y agrupado por variedad, nuevamente sin discriminar los compuestos volátiles. En la figura 12 se observa que, a lo largo del tiempo de fermentación, la concentración relativa de los COV de la variedad CFA va aumentando hasta la hora 60 y hay una disminución hasta el final del tiempo de fermentación, excepto por una

concentración relativa elevada a las 156 h; así mismo, en la variedad CCN-51 va aumentando las concentraciones hasta las 96 h y luego disminuye hasta el final de la de fermentación. Además, en la variedad CFA, a lo largo del tiempo, la concentración relativa es mayor frente a la concentración relativa de la variedad CCN-51.

Figura 11. Diagrama de caja-bigote de la concentración relativa en función a la variedad, 1: CCN-51 y 2: CFA.

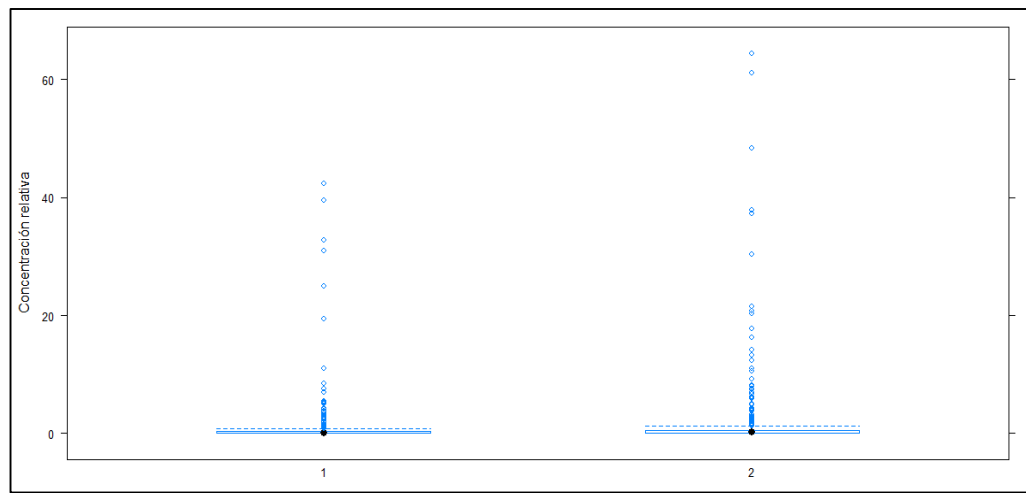
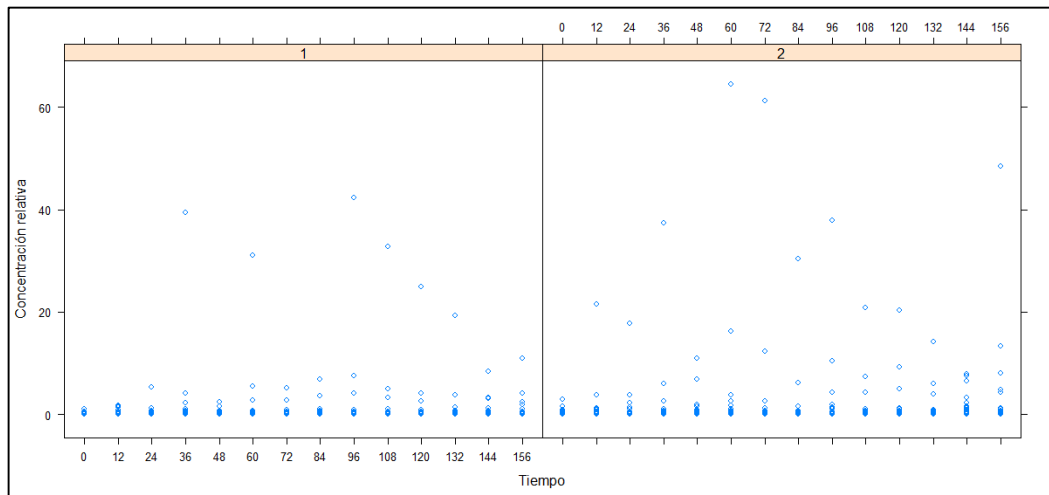


Figura 12. Distribución de la concentración relativa en función al tiempo (en horas) y agrupado por variedad, 1: CCN-51 y 2: CFA.



Los 122 compuestos orgánicos volátiles identificados no se presentaron en todos los tiempos de fermentación y en ambas variedades, por ello, el comportamiento de las concentraciones es considerablemente variable y se observan puntos atípicos en las gráficas de caja-bigote.

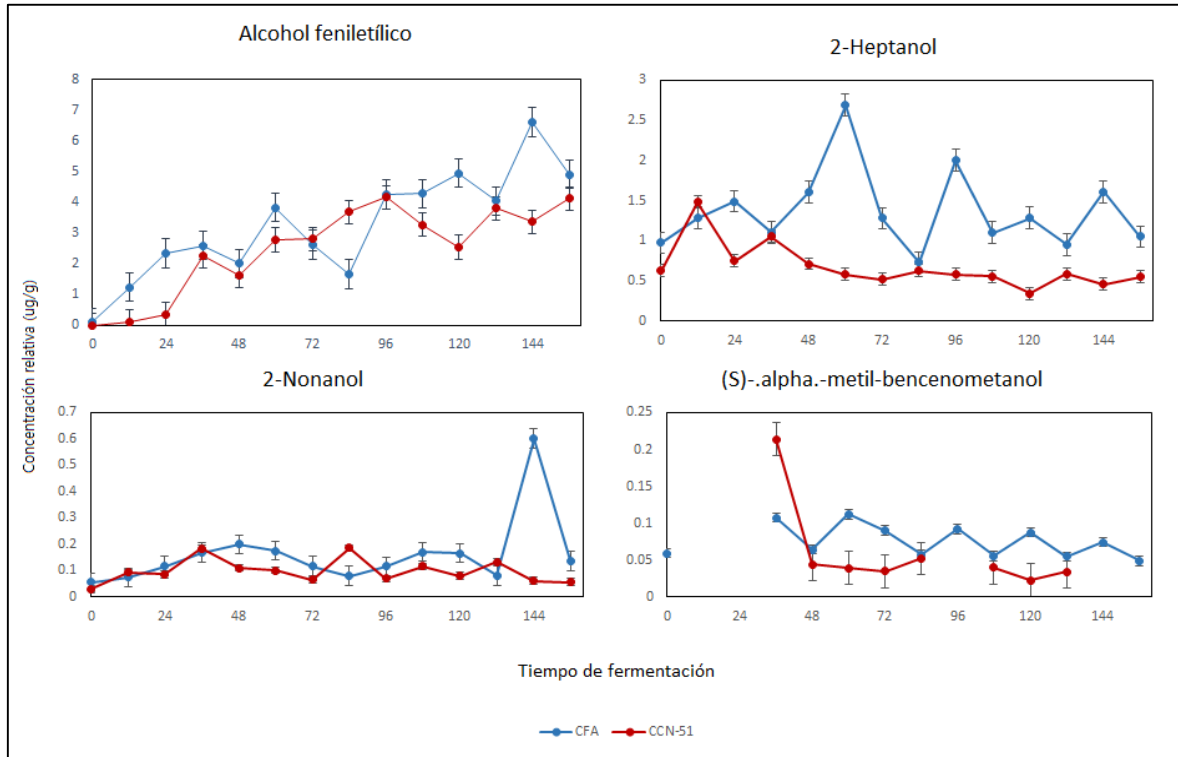
3. Dinámica de los COV en las variedades CFA y CCN-51

Se compararon las concentraciones relativas de los COV más representativos de los siguientes grupos funcionales: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos durante la fermentación espontánea entre ambas variedades: CCN-51 y CFA. Los resultados presentados son los promedios de las concentraciones relativas \pm error estándar de las medias.

3.1. Alcoholes

Se identificaron 16 alcoholes durante el proceso de fermentación espontánea (Tabla 4), como el alcohol feniletílico, 2-heptanol, 2-nonanol y (S)-.alpha.-metil-bencenometanol, de los cuales se puede apreciar la dinámica de los COV durante las 156 h de fermentación espontánea en la figura 13, en donde se observa una tendencia de la mayor concentración relativa de los COV en la variedad CFA, con respecto a la variedad CCN-51.

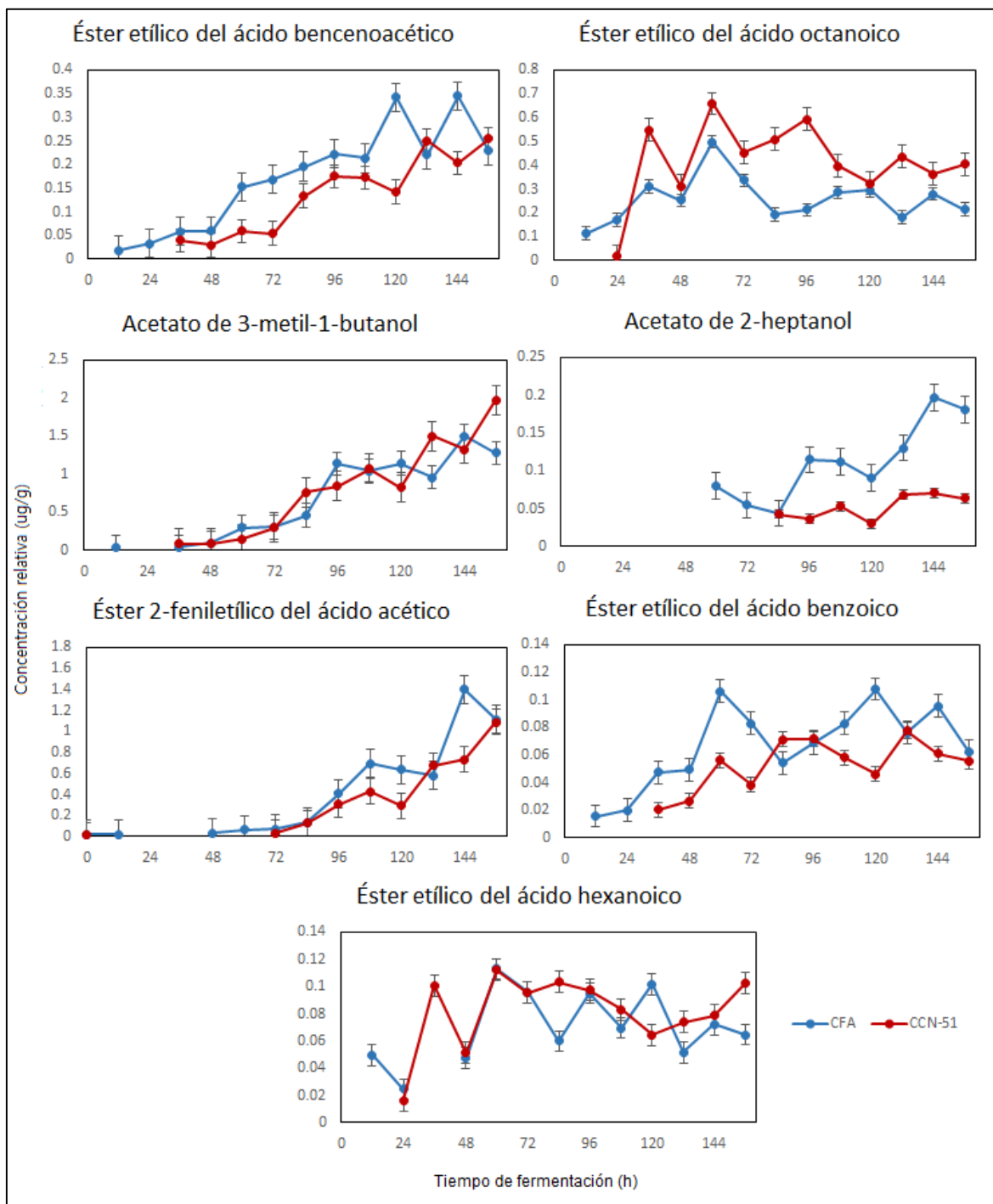
Figura 13. Dinámica de los alcoholes generados en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea. Las barras indican el error estándar.



3.2. Ésteres

Se identificaron 20 ésteres durante el proceso de fermentación espontánea (Tabla 4), de los cuales se muestran sus dinámicas en la figura 14. La dinámica de este grupo funcional, se caracterizó por el aumento de las concentraciones relativas, desde las 12 h hasta el final de la fermentación, dinámica que no ocurre en los demás grupos funcionales, excepto en el caso del alcohol feniletílico. Además, 13 de los 20 ésteres tuvieron descripciones de aromas favorables, como aromas afrutados y dulces.

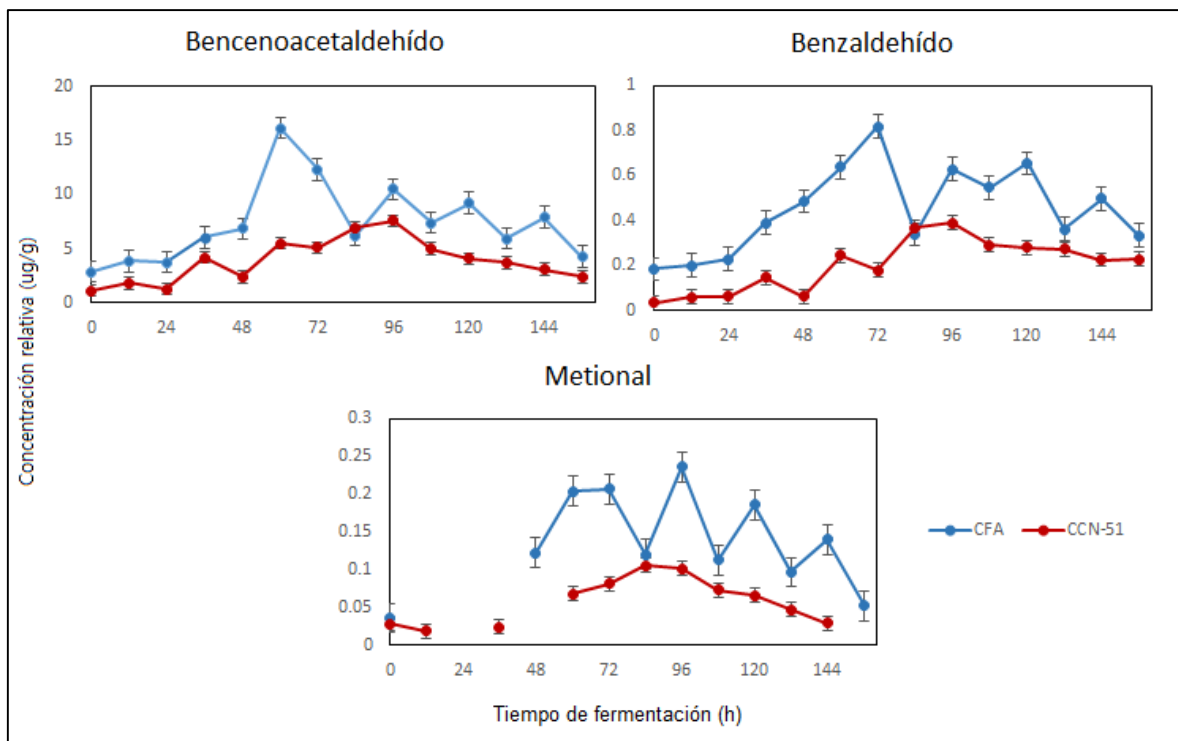
Figura 14. Dinámica de los ésteres generados en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea. Las barras indican el error estándar.



3.3. Aldehídos

Durante el proceso de fermentación espontánea fueron identificados 6 aldehídos (Tabla 4), de los cuales se ha graficado la dinámica de 3 de ellos (Figura 15). El bencenoacetaldéhidó, benzaldehído y metional aumentaron sus concentraciones relativas entre las 60 y 120 h de fermentación y, posteriormente, fueron disminuyendo hasta el final de la fermentación en ambas variedades, con la notoria diferencia que las concentraciones relativas en la variedad CFA fueron mayores en los 3 casos (Figura 15).

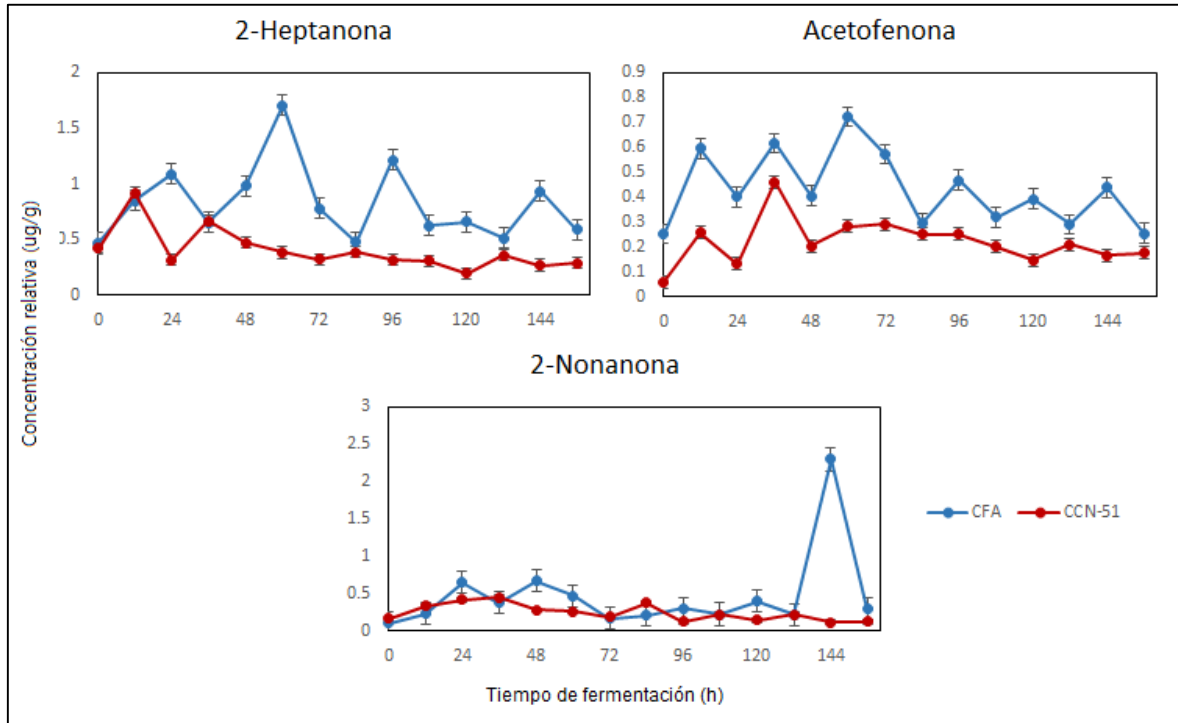
Figura 15. Dinámica de los aldehídos generados en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea. Las barras indican el error estándar.



3.4. Cetonas

Se identificaron 10 cetonas durante las 156 h del proceso de fermentación espontánea en ambas variedades y se muestra la dinámica de 3 cetonas en la figura 16. Los compuestos volátiles 2-heptanona, acetofenona y 2-nonanona estuvieron presentes durante todo el proceso fermentativo. Las concentraciones relativas de la 2-heptanona y acetofenona, alcanzaron su nivel máximo a las 60 h de fermentación en la variedad CFA, sin embargo, al final de la fermentación sus concentraciones no fueron tan diferentes a las iniciales. Por otro lado, en la variedad CCN-51, la 2-heptanona y la acetofenona alcanzaron sus mayores concentraciones a las 12 y 36 h de fermentación. Se observa también mayor variación de las concentraciones en la variedad CFA, cada 12 h, en cambio, el CCN-51 presentó menor variación de concentraciones a partir de las 36 h de fermentación, es decir, las concentraciones descendieron de forma paulatina. Lo común en ambos compuestos, fue que las concentraciones relativas fueron mayores en la variedad CFA. Por último, la dinámica del compuesto 2-nonanona fue constante desde el inicio hasta el final en ambas variedades, excepto a las 144 h de fermentación en la variedad CFA, el cual sería considerado como un punto atípico.

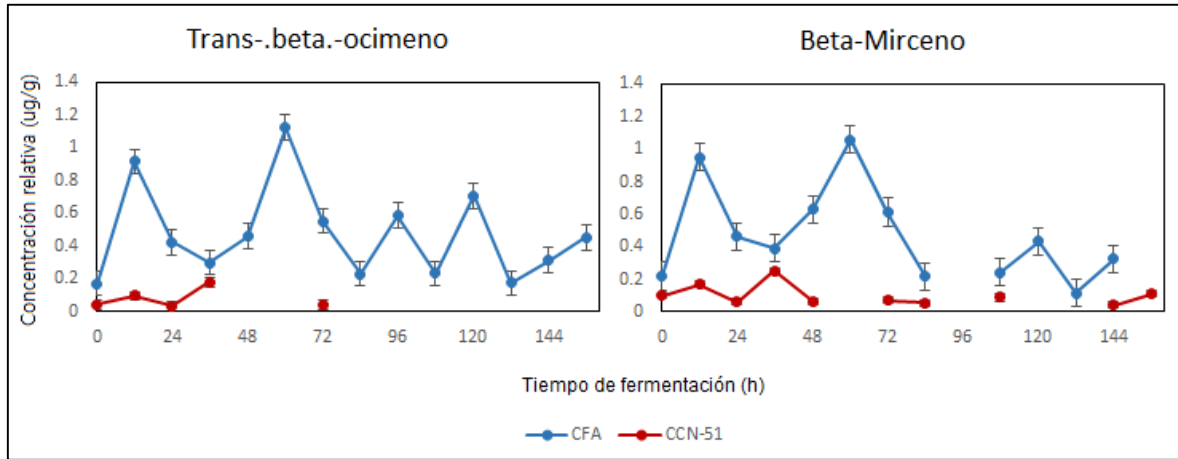
Figura 16. Dinámica de las cetonas generadas en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea. Las barras indican el error estándar.



3.5. Terpenos

Fueron identificados 9 terpenos durante las 156 h del proceso de la fermentación espontánea en ambas variedades y se observa la dinámica de 2 terpenos en la figura 17, en donde, se aprecia la ausencia del compuesto volátil trans-.beta.-ocimeno en la mayoría de las horas de fermentación en la variedad CCN-51, en cambio, en el CFA, está presente durante toda la fermentación. Con respecto al beta.mirceno, también predomina su concentración y presencia en la variedad CFA, pero no en todas las horas de fermentación.

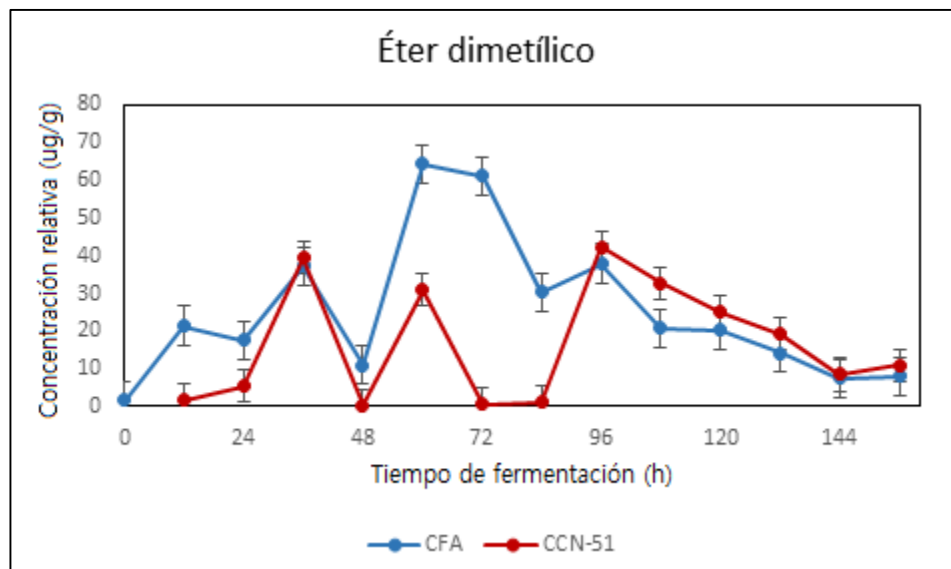
Figura 17. Dinámica de los terpenos generados en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea. Las barras indican el error estándar.



3.6. Éteres

Fueron identificados 4 éteres durante las 156 h del proceso de la fermentación espontánea en ambas variedades y se observa la dinámica de 1 éter en la figura 18. La presencia y altas concentraciones del éter dimetílico fue sobresaliente con respecto a los demás éteres y todos los demás COV de los otros grupos funcionales.

Figura 18: Dinámica del éter dimetílico generado en los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea. Las barras indican el error estándar.



4. Análisis de componentes principales (ACP)

Se realizó un análisis de componentes principales para determinar cuáles son los COV que más influyen durante el proceso de fermentación espontánea de los granos de cacao. Las variables consideradas en el ACP fueron los COV y estos fueron agrupados de acuerdo a similitudes y/o diferencias. Para ello, se trabajó con las concentraciones relativas de 22 COV (Tabla 6), los cuales estuvieron presentes en más del 50% de las muestras de ambas variedades, es decir, que se repitieron en más de 14 muestras de un total de 28 (14 de CFA y 14 de CCN-51). Esto fue debido a que los 122 COV identificados no estuvieron presentes en todos los tiempos y en ambas variedades, de tal manera que, si se consideraba a todos los COV, no hubiera información suficiente para realizar ACP.

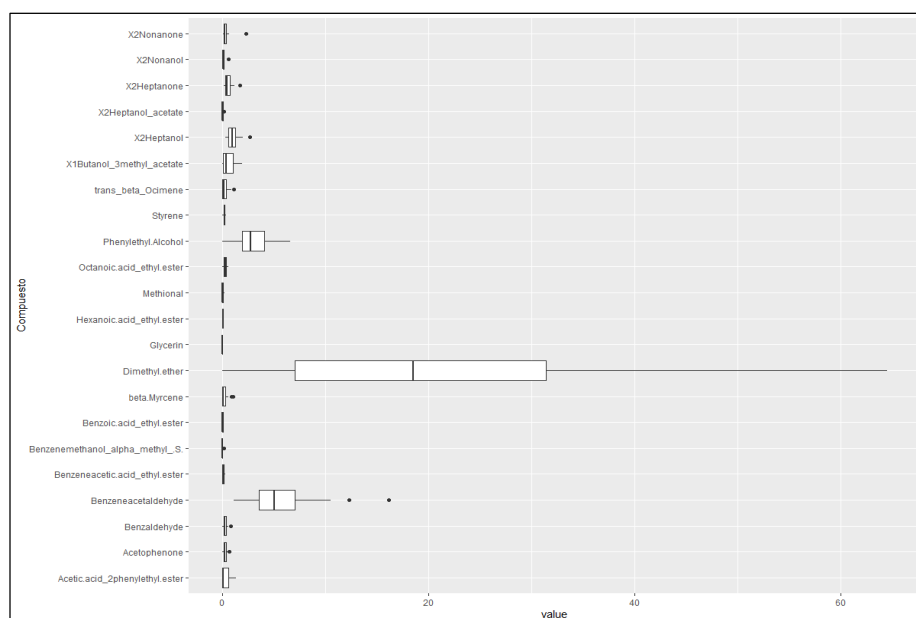
Tabla 6. COV que se consideraron en los ACP por su número de incidencia en las muestras.

N° de orden	Nombre del COV	N° veces	N° veces	Descripción de aroma
		que se repiten en CFA	que se repiten en CCN-51	
1	Éster etílico del ácido octanoico	13	12	Afrutado, floral
2	Alcohol feniletílico	14	13	Miel, especia, rosa, lila, floral, caramelo
3	Trans-.beta.-ocimeno	14	5	Dulce, herbal
4	Acetato de 3-metil-1-butanol	12	11	Plátano, afrutado
5	Acetato de 2-heptanol	9	7	Afrutado
6	Éster 2-feniletílico del ácido acético	12	9	Miel, floral
7	Beta-Mirceno	12	10	Picante, balsamo
8	Éster etílico del ácido bencenoacético	13	11	Afrutado, dulce
9	(S)-.alpha.-metil-bencenometanol	12	8	
10	Éster etílico del ácido benzoico	13	11	Graso, floral, afrutado
11	Éter dimetílico	14	13	
12	Glicerina	10	8	
13	Éster etílico del ácido hexanoico	12	12	Afrutado, manzana, plátano
14	Metional	11	11	Patata
15	2-heptanol	14	14	Dulce y cítrico

16	2-heptanona	14	14	Afrutado, coco, queso, floral
17	2-nonanol	14	14	Afrutado, cítrico
18	2-nonanona	14	14	Afrutado, fresco, dulce
19	Acetofenona	14	14	Floral, almendrado, dulce
20	Benzaldehído	14	14	Dulce y amargo
21	Bencenoacetaldehído	14	14	Miel, floral
22	Estireno	14	14	Dulce , bálsamo, floral

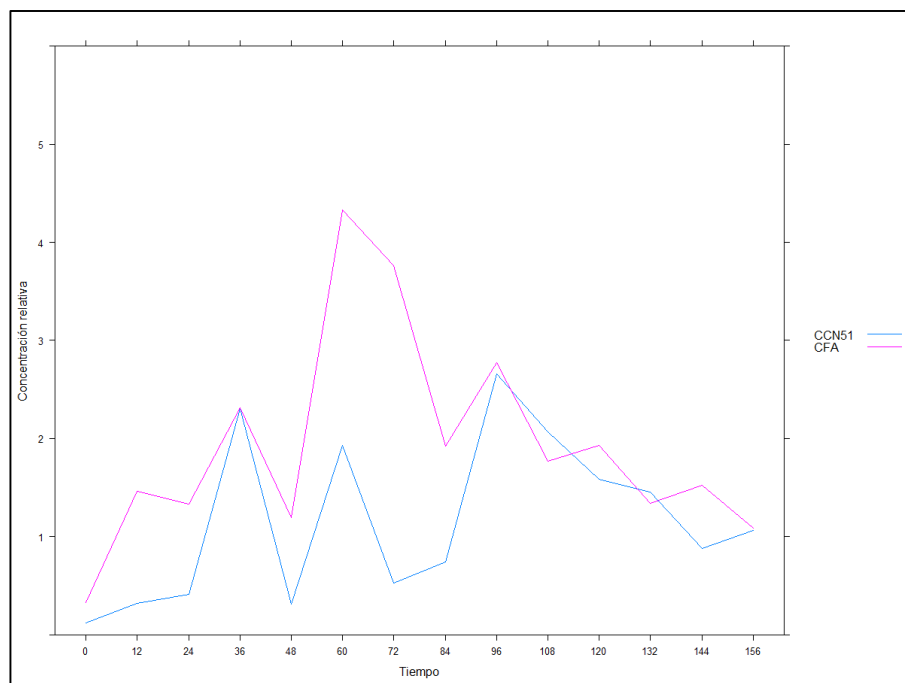
Antes de realizar el ACP, se visualizó la distribución de las concentraciones relativas de los 22 compuestos seleccionados (Tabla 6). En la figura 19 se observa el comportamiento de los datos a través de los diagramas de caja-bigote, en donde el compuesto volátil éter dimetílico es el que presenta mayor variabilidad de concentración relativa frente a los demás compuestos, por tal motivo se realizó una transformación de datos de raíz cuadrada para estandarizar los datos y proceder a la comparación de concentraciones relativas entre variedades y para los análisis de componentes principales.

Figura 19. Diagrama de caja-bigote de la concentración relativa en función a los 22 compuestos volátiles seleccionados. Eje X: Concentración relativa, eje Y: Compuestos volátiles.



Después de una transformación de raíz cuadrada de la variable: Concentración relativa, se realizó una gráfica de dispersión para comparar las variedades. En la figura 20 se observa que en los tiempos 0, 12, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 120 y 144 h, las concentraciones relativas son mayores en la variedad CFA.

Figura 20. Gráfica de dispersión de las concentraciones relativas entre variedades sin discriminar los COV.



Para poder comparar las concentraciones relativas se verificó el cumplimiento de los supuestos: normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas. Utilizando la prueba de Shapiro Wilks, se verificó que no se cumple con la normalidad de los datos (p -valor < 0.05) y, utilizando la prueba de Bartlett, tampoco se cumple con la homogeneidad de varianzas (p -valor < 0.05). Debido a que no cumple con los dos supuestos, se realizó una prueba de Wilcoxon, test que sirve para comparar dos grupos (prueba no paramétrica), obteniendo el p -valor = $3.898 \cdot 10^{-6}$ y comparado

con el 5% de nivel de significancia, se afirma que existe diferencias estadísticamente significativas entre las variedades CCN-51 y CFA.

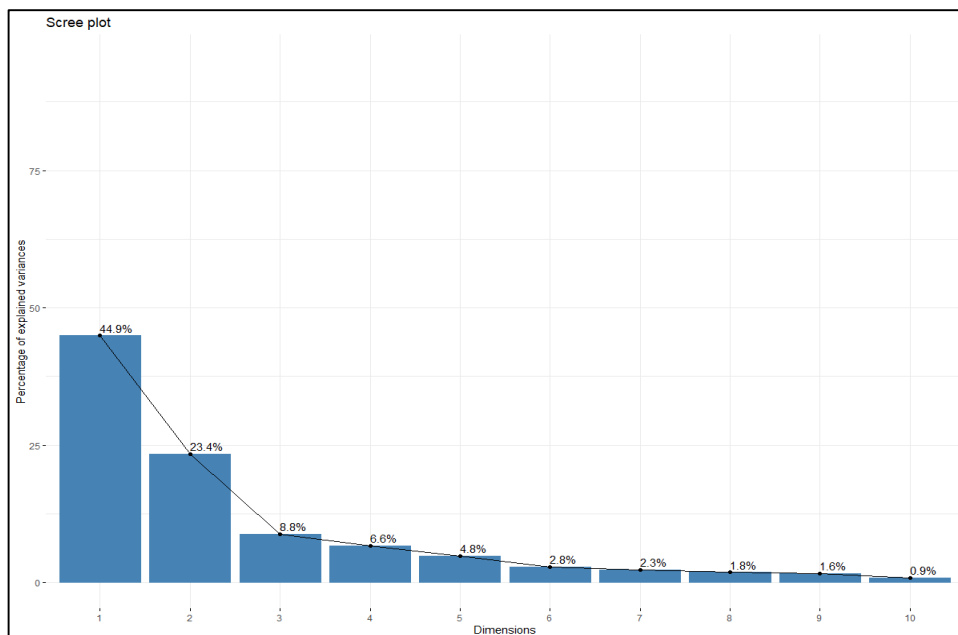
Seguidamente se realizó la matriz de correlación. En la tabla 7 se muestra el porcentaje de varianza de cada componente principal y también su porcentaje acumulado de varianza de los componentes principales, el porcentaje acumulado indica la variabilidad de la concentración relativa explicada por los componentes principales consecutivos, por lo tanto, podemos observar que con un 83.78% ya es considerado una cantidad adecuada de variación explicada en los datos, siendo suficiente utilizar hasta el cuarto componente principal.

Tabla 7. Valores de la matriz de correlación.

Componentes	Valor	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulado de varianza
Comp 1	9.8879236	44.945107	44.94511
Comp 2	5.1526635	23.421198	68.36631
Comp 3	1.9335008	8.788640	77.15495
Comp 4	1.4577785	6.626266	83.78121
Comp 5	1.0552641	4.796655	88.57787
Comp 6	0.6210834	2.823106	91.40097

En la figura 21 se puede observar gráficamente las comparaciones del aporte, en porcentaje, de los componentes principales.

Figura 21. Gráfico de sedimentación de los componentes principales.



En la tabla 8 se muestra la contribución numérica de los compuestos volátiles sobre cada dimensión, los cuales pueden ser verificados y comprobados en las figuras 22, 23, 24 y 25.

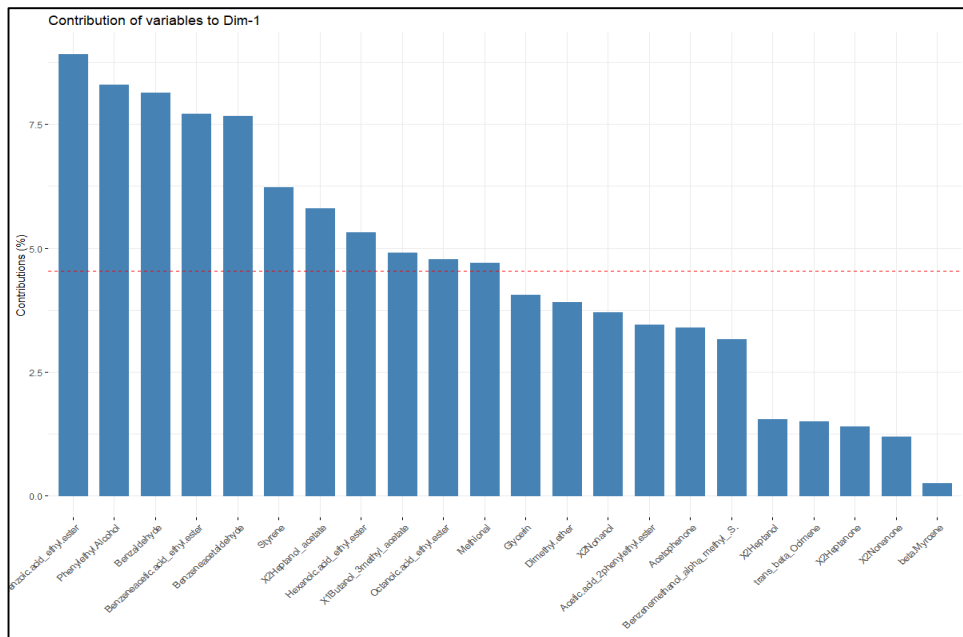
Tabla 8. Contribución de las variables sobre los componentes principales. Los números en negrita son de los COV que más influyen desde la primera hasta la cuarta dimensión.

Compuestos Orgánicos Volátiles	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5	Dim.6	Dim.7	Dim.8	Dim.9
Beta-mirceno	0.253	12.195	0.035	0.009	4.984	7.021	11.646	38.176	1.037
Acetato de 3-metil-1-butanol	4.901	7.959	2.688	0.743	0.324	1.600	1.106	0.532	0.571
2-heptanol	1.549	13.531	2.525	0.655	1.088	0.003	5.474	5.657	3.271
Acetato de 2-heptanol	5.805	2.217	9.566	5.275	0.286	0.003	0.106	1.784	0.048
2-heptanona	1.397	13.834	1.170	0.130	1.771	0.020	8.909	5.013	4.519
2-nonanol	3.701	1.753	9.070	17.959	6.137	0.145	0.878	0.010	5.433
2-nonanona	1.194	3.439	14.777	22.901	1.860	0.388	1.867	0.042	9.918
Éster 2-feniletílico del ácido acético	3.449	5.659	13.352	2.059	1.380	4.075	3.723	0.802	0.024
Acetofenona	3.388	10.064	2.761	0.331	1.159	0.084	3.478	0.617	1.107
Benzaldehído	8.144	0.522	0.139	4.858	0.115	0.550	0.217	3.661	4.417

Bencenoacetaldehído	7.664	1.777	2.224	2.332	1.217	1.569	3.938	4.406	0.487
Éster etílico del ácido bencenoacético	7.712	3.251	1.159	0.681	0.324	0.204	2.418	0.047	0.178
(S)-.alpha.-metil-bencenometanol	3.155	1.854	0.955	0.057	32.204	8.119	21.077	2.005	15.384
Éster etílico del ácido benzoico	8.909	1.119	0.426	0.007	0.008	0.003	0.330	3.383	0.095
Éter dimetílico	3.904	0.775	13.073	1.951	2.266	1.320	3.028	22.822	39.996
Glicerina	4.048	1.170	1.237	0.852	15.090	46.863	1.222	4.481	1.691
Éster etílico del ácido hexanoico	5.323	2.399	5.045	0.773	0.768	23.312	6.258	0.071	2.291
Metional	4.707	0.029	0.044	12.449	20.643	0.086	17.953	5.083	2.428
Éster etílico del ácido octanoico	4.768	2.201	12.750	9.591	0.249	0.408	0.002	0.094	0.683
Alcohol feniletílico	8.297	1.810	0.032	2.524	0.713	0.442	0.242	0.741	2.110
Estireno	6.234	0.033	6.216	8.388	5.646	0.082	4.095	0.021	1.109
Trans-.beta.-ocimeno	1.497	12.410	0.755	5.473	1.768	3.705	2.035	0.552	3.202

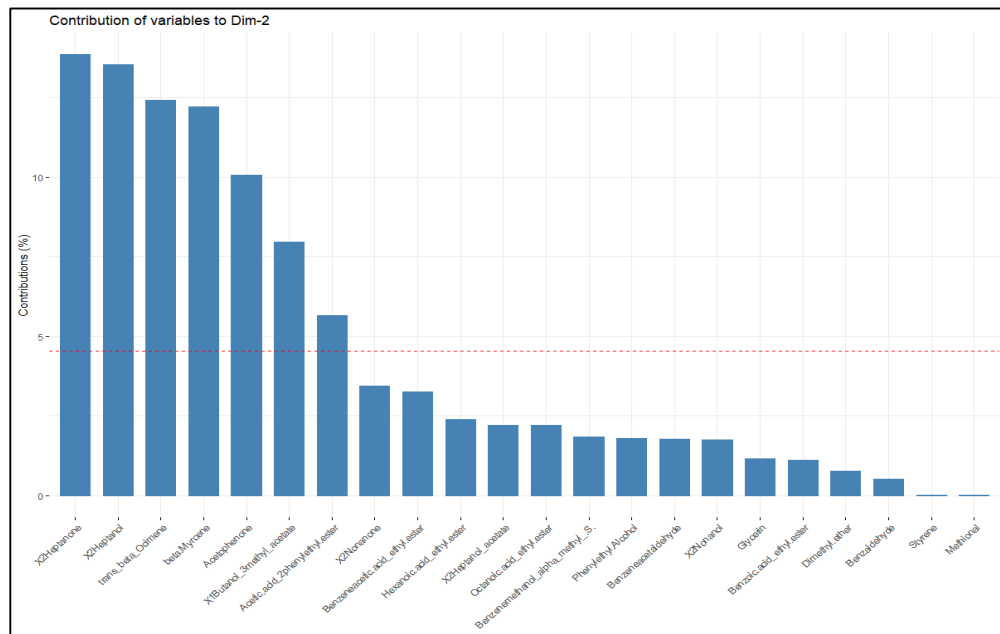
En la figura 22 se observa que los 5 primeros compuestos que más contribuyen en el componente principal 1 son: éster etílico del ácido benzoico (también llamado benzoato de etilo), alcohol feniletílico, benzaldehído, éster etílico del ácido bencenoacético y el bencenoacetaldehído (también llamado acetaldehído 2-fenilo).

Figura 22. Contribución de los COV en el componente principal 1.



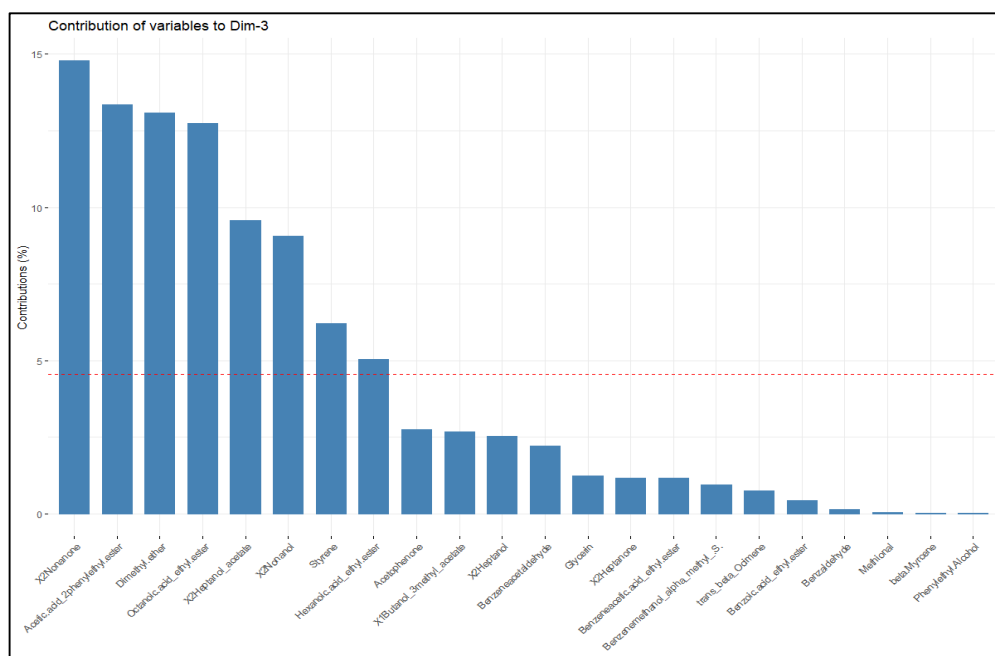
En la figura 23 se observa que los 5 componentes que más contribuyen al componente principal 2 son: 2-heptanona, 2-heptanol, trans-.beta.-ocimeno, beta-mirceno y acetofenona.

Figura 23. Contribución de los COV en el componente principal 2.



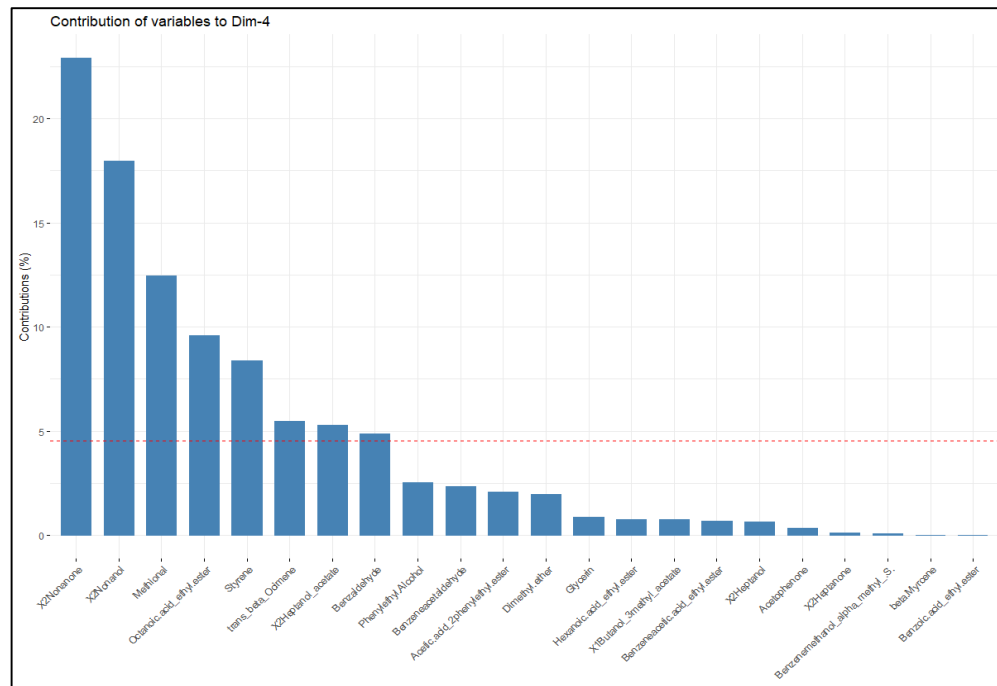
En la figura 24 se observa que los 5 componentes que más contribuyen al componente principal 3 son: 2-nonanona, éster 2-feniletílico del ácido acético, éter dimetilico, éster etílico del ácido octanoico y acetato de 2-heptanol.

Figura 24. Contribución de los COV en el componente principal 3.



En la figura 25 se observa que los 5 componentes que más contribuyen en el componente principal 4 son: 2-nonanona, 2-nonanol, metional, éster etílico del ácido octanoico y estireno.

Figura 25. Contribución de los COV en el componente principal 4.

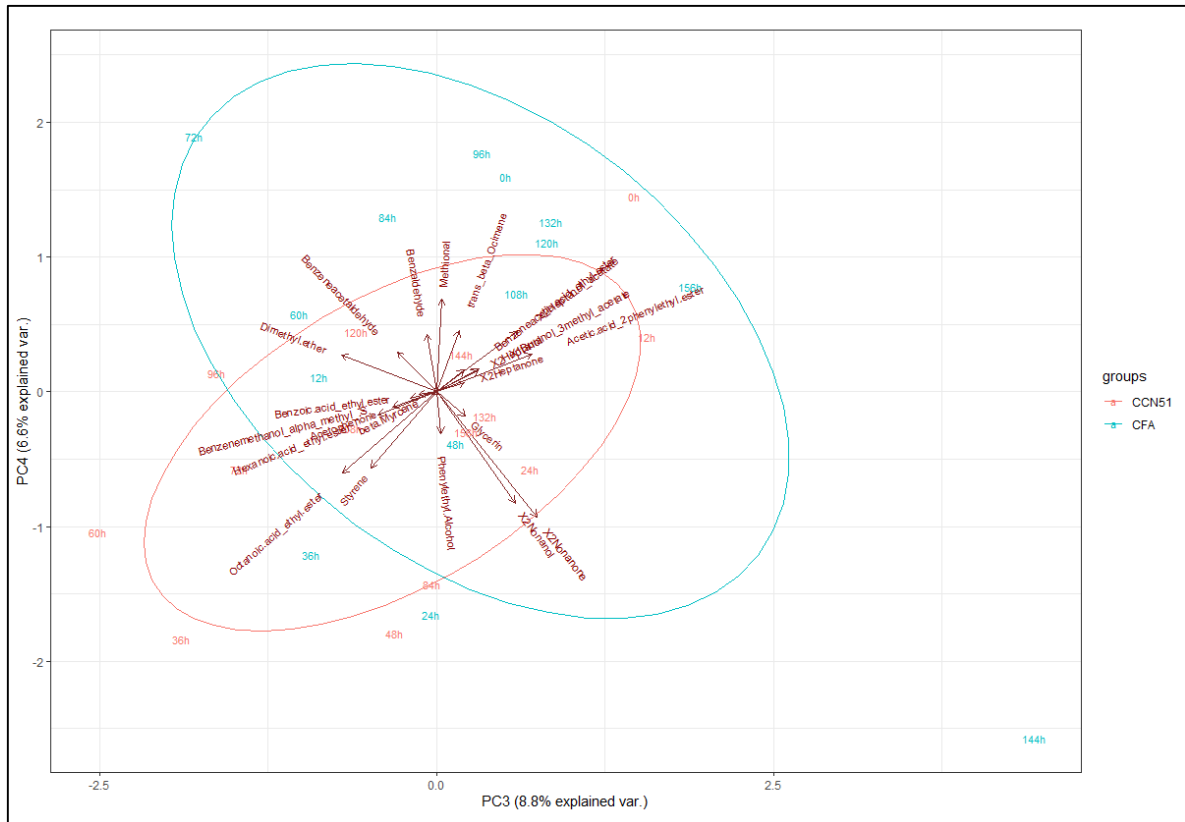


En la figura 26 se observa una gráfica de doble proyección, es decir, muestra la gráfica de las influencias de los COV que tienen mayor efecto en cada componente principal, cuya proyección se representa con flechas rojas; y la gráfica de puntuaciones son las horas de fermentación, en donde se detectaron conglomerados: las horas de fermentación de color coral pertenecen a la variedad CCN-51 y las horas de color celeste, a la variedad CFA. De esta manera se observa que los tiempos (horas de fermentación) fueron agrupados explícitamente según variedades, donde demuestra que existe mayor presencia y concentración de los compuestos volátiles afrutados, florales y dulces en la variedad CFA, mientras que fue menor en la variedad CCN-51.

El componente principal 1 explica el 44.9% de la varianza de los datos. Los COV que tuvieron influencias positivas grandes fueron los siguientes: éster etílico del ácido

éster etílico del ácido octanoico y el estireno; por otro lado, el COV que tiene efecto positivo es el metional (Figura 25).

Figura 28. Análisis de componentes principales para los COV y tiempos observados, agrupados por variedades considerando componentes principales 3 y 4.

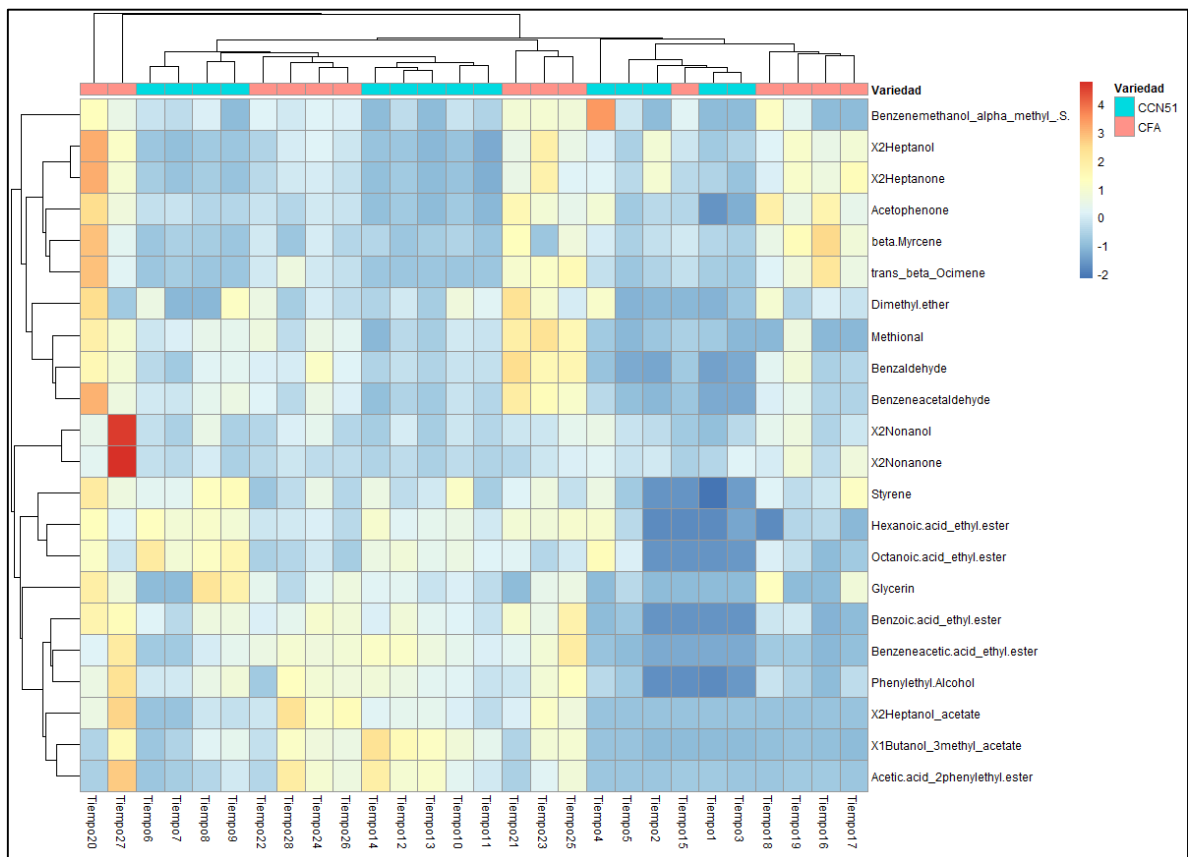


5. Gráfica de calor de los COV

En la figura 29 se muestra un gráfico de calor considerando los COV, los tiempos de fermentación según la variedad y una leyenda de color rojo (evidencia de mayor similitud) a azul (evidencia de menor similitud) entre compuestos volátiles. Por ejemplo, la figura 29 muestra que el comportamiento de las concentraciones relativas de los compuestos volátiles 2-nonanol y 2-nonanone presentan mayor

similitud entre sí en el Tiempo 27 (144 h de fermentación de la variedad CFA), ya que los cuadrados pertenecientes a estos compuestos están pintados de color rojo. También se observa agrupaciones en la variedad CFA, en la columna del Tiempo 20 (60 h de fermentación), de tonalidades anaranjadas, en donde nos indica que hay cierto grado de similitud de los siguientes compuestos: 2-heptanol, 2-heptanone, acetofenona, beta-mirceno y trans-.beta-ocimeno.

Figura 29. Gráfica de calor de los COV cada 12 horas, desde las 0 a las 156 h. Del Tiempo 1 al 14 son tiempos de fermentación de la variedad CCN-51 y del Tiempo 15 al 28, de la variedad CFA.



VI. Discusión

En las últimas décadas se ha dado mayor importancia a la producción de cacao en el Perú y como consecuencia su investigación se incrementó, recibiendo mayor interés, la variedad de cacao fino de aroma que se producen en San Martín, Junín, Cusco, Ucayali, Huánuco, Ayacucho, Amazonas y Cajamarca. Estos departamentos producen cacaos nativos y los granos de cacao presentan en común aromas y sabores afrutados, florales, cítricos y dulces, pero difieren en su genética, su morfología de la mazorca, en los granos y árbol de cacao, en los microorganismos que participan en la fermentación, en las etapas post cosecha, en el manejo integral contra enfermedades y plagas, en la fertilización de los suelos y en la ubicación geográfica. Es por ello que el Perú cuenta con una gran cantidad de cultivares de cacao finos de aromas y de otras variedades, como lo muestran en el Catálogo de cultivares de cacao del Perú (61). En el departamento de Amazonas, del año 2011 al 2013, se caracterizaron a 136 cacaos provenientes de árboles élites de cacao de la provincia de Bagua y Utcubamba (62), pero solo fue a nivel morfológico de la mazorca, de la pulpa y de granos frescos y secos de cacao. A partir de ello, se comenzaron investigaciones científicas en instituciones cercanas a las zonas de producción de cacao, como la UNTRM-A y el INDESCES, con el objetivo de dar valor agregado al CFA, ya que es un recurso natural y nativo de este departamento. En este sentido, en el 2021 se inició un proyecto de investigación llamado “Análisis metagenómico y técnicas cromatográficas para la obtención de un cultivo iniciador que mejore la calidad del chocolate a partir del cacao nativo fino de aroma en la zona Nor Oriental del Perú”, de cuyo proyecto se continúa realizando los análisis metagenómicos. Por otro lado, se ha concluido el estudio de la ecología microbiana de la fermentación del CFA (63) y el presente trabajo de investigación estudió la dinámica de los COV de las variedades de CFA y CCN-51 mediante técnicas cromatográficas. Estos estudios aportan información científica de cacaos nativos finos de aromas, propios del departamento de Amazonas, siendo de gran importancia para los agentes especializados en comprar granos de cacaos finos de aromas para empresas chocolateras en Europa, Asia

y Norte América, ya que están introduciendo a sus mercados granos de cacao de alta gama (64).

1. Cambios de pH y temperatura durante el proceso de fermentación espontánea de las variedades CFA y CCN-51

Los cambios fisicoquímicos producidos durante la fermentación espontánea son relevantes porque tienen relación con la producción de los compuestos orgánicos volátiles, no volátiles y semivolátiles, por ende, están asociados a la calidad del chocolate. El aumento de la temperatura de la masa de fermentación con respecto al tiempo no fue estadísticamente significativo entre ambas variedades, sin embargo, en la figura 4 se aprecia que la temperatura de la variedad CFA, aumentó más rápido con respecto a la variedad CCN-51, lo que se debe a factores intrínsecos, es decir, a su composición genética (9). El incremento de la temperatura es causado por microorganismos situados espontáneamente en la masa de fermentación, estos consumen los recursos energéticos de la pulpa, principalmente los azúcares y de esta manera ocurre un proceso exotérmico, liberando energía en forma de calor y la producción de alcoholes, ésteres y ácidos orgánicos (65).

El pH de la pulpa de ambas variedades se incrementó, del CFA fue de 3.86 a 4.22 y de la variedad CCN-51, de 3.43 a 4.28. No hubo diferencias significativas entre las variedades, esto puede deberse a que las condiciones de fermentación fueron las mismas, los orígenes de las variedades también fueron geográficamente muy cercanas y a que los microorganismos involucrados también fueron similares. El bajo pH al comienzo de la fermentación se debe a las altas concentraciones de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, presente naturalmente en la pulpa del cacao. En las horas iniciales, los microorganismos se multiplican, y éstos metabolizan la glucosa, fructosa, ácido cítrico y sales inorgánicas, generando altas concentraciones de etanol, posteriormente, aumenta el ácido acético y sus

derivados por la oxidación del etanol y en la etapa final de la fermentación el pH es mayor que el pH inicial (65).

El pH del cotiledón tuvo un comportamiento similar entre ambas variedades durante la fermentación espontánea, el rango de variación del pH de la variedad CFA fue de 6.27 a 4.29 y el del CCN-51, fue de 6.59 a 4.33, tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa entre variedades. Sin embargo, en la figura 6 se observa que el pH de la variedad CFA disminuyó a mayor velocidad a través del tiempo con respecto a la variedad CCN-51. La disminución del pH del cotiledón se debe a los ácidos orgánicos producidos por las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, cuyos ácidos, eventualmente, ingresan al cotiledón y, por ende, se da la muerte del mismo (38,66). Por otro lado, chocolates preparados con granos de cacao fermentados y secos con pH entre 4.75 y 5.19 y entre 5.5 y 5.8 tuvieron una clasificación de sabores y aromas menos fuertes a chocolate, mientras que chocolates preparados con granos de cacao con pH un poco más elevados (entre 5.20 y 5.49) tuvieron una clasificación de sabores y aromas más fuertes a chocolate, según los panelistas (67). En el presente estudio se obtuvo pH finales inferiores a 4.75 después de 156 h de fermentación, pero en este caso, solo estuvieron fermentados mas no secos, por ello no se podría afirmar que fue una sobrefermentación. En el proceso de secados de los granos hay pérdida de ácidos por volatilización y aumento de pH (54). No obstante, la acidificación desencadena reacciones bioquímicas que promueven la formación de aromas y sabores característicos de los chocolates, incluyendo bajos niveles de astringencia, rancidez y amargor (49), pero en variedades de cacao Criollo y finos de aroma, los niveles de aromas y sabores desagradables son bajos con respecto a las otras variedades (68).

2. Dinámica de los COV producidos durante la fermentación espontánea de las variedades CFA y CCN-51

En los granos de cacao fermentados, secos y tostados se han encontrado unos 600 compuestos volátiles (37), en granos de cacao solo durante la etapa de fermentación se han encontrado e identificado entre 38 y 121 COV (7,8,14,16,45,69), y en la presente investigación se identificaron un total de 122 COV durante todo el proceso de fermentación entre las variedades CFA y CCN-51, dentro de los cuales se encontraron 4 ácidos orgánicos, 16 alcoholes, 6 aldehídos, 10 cetonas, 20 ésteres, 4 éteres, 1 piridina, 9 terpenos, 3 terpenoides, entre otros (Tabla 4). Algunos COV identificados están presentes en los granos de cacao frescos, es decir, a las 0h de fermentación, como el 2-heptanol, benzaldehído, benceneacetaldehído y 2-nonanona, cuyos compuestos volátiles fueron identificados en bajas concentraciones en variedades de cacao Criollo y Forastero al inicio de la fermentación (5,14), al igual que en las variedades CCN-51 y CFA de la presente investigación.

Los COV generados durante la etapa de fermentación son considerados indicadores de calidad de los granos de cacao pero, no necesariamente van a perdurar hasta el producto final, sino que pueden disminuir, ser precursores de otros compuestos o aumentar las concentraciones de los COV durante procesos posteriores a la fermentación, como es el secado y tostado (8,53,68,70), todo esto debido a que la fermentación es solo la primera etapa post cosecha por la cual deben pasar los granos de cacao. En un estudio comparativo de los COV de granos de cacao nativo fino de aroma, de Amazonas, tostado y sin tostar, se demostró la presencia de COV después de la fermentación y que perduraron hasta después del tostado, como la 2-heptanona, acetofenona, 2-heptanol, alcohol feniletílico, acetato de 2-heptanol, éster etílico del ácido bencenoacético, beta-mirceno y estireno (22); COV que también se identificaron y semicuantificaron en el presente trabajo.

Algunos COV son precursores de otros a causa del metabolismo de los microorganismos y/o degradación de proteínas y ácidos grasos durante el proceso de fermentación (32), como el alcohol feniletílico, que aumenta hasta el final de la

fermentación en ambas variedades de cacao (Figura 13) y es precursor del fenilacetaldehído, además se oxida a éster de acetato de feniletilo (7), aunque los 2 últimos compuestos mencionados no se han identificado en la presente investigación.

Además, se identificaron a otros 16 alcoholes durante la fermentación espontánea (Tabla 4). Estos compuestos son formados por el metabolismo de las levaduras que abundan en las primeras horas de fermentación. El 2-heptanol y el alcohol fenilético son algunos de los COV de este grupo responsables de aromas agradables en los granos de cacao, como los aromas dulces, cítricos y florales (7,8,45,69,71). Sin embargo, estudios previos afirman que algunos alcoholes son endógenos de genotipos de cacaos finos de aroma, como el 2-pentanol y el 2-heptanol (45,51), de los cuales, sus concentraciones disminuyen durante el proceso fermentación y secado de los granos. Esto ocurre por la esterificación de alcoholes por las bacterias acéticas, formando ésteres que contribuyen al aumento de aromas afrutados y florales (8,45). Por otro lado, la disminución de alcoholes también se debe a la evaporación de estos como consecuencia del aumento de temperatura de la masa de fermentación (69). En la figura 13 observamos que hay un aumento de la concentración relativa del alcohol fenilético desde la 0 hasta las 156 h de fermentación, y esto se da en ambas variedades, habiendo una tendencia de mayor concentración en la variedad CFA. En la variedad CCN-51, el 2-heptanol alcanza su concentración máxima a las 12 h de fermentación y luego va disminuyendo, en el caso de la variedad CFA, su concentración máxima es a las 60 h y luego comienza su descenso hasta el final de la fermentación. Sin embargo, en la variedad CFA sigue predominando la concentración relativa con respecto a la variedad CCN-51, al igual que en el compuesto (S)-.alfa.-metil-bencenometanol. El 2-nonanol, el cual provee aromas afrutados y cítricos, mantuvo una concentración relativa constante desde el comienzo hasta el final de la fermentación en ambas variedades, pero un estudio comparativo de la variedad CCN-51 con variedades nativas híbridas de Ecuador,

reportó mayor concentración de 2-nonanol en granos fermentados y secos de la variedad CCN-51 con respecto a cacaos finos de aromas (16).

Con respecto a los ésteres, se identificaron a 20 (Tabla 4). Conforme aumentaba las horas de fermentación, la concentración relativa de los ésteres también aumentó. En la figura 14 se aprecia que hay un aumento constante desde las 12 h hasta el final de la fermentación. En granos de cacao fermentados y tostados, los ésteres son responsables de sabores y aromas afrutados, principalmente los acetatos (36), como el acetato de 2-heptanol y el acetato de 3-metil-1-butanol, éste último COV se forma a partir de la oxidación del 3-metil-1-butanol (72). Una de las causas del aumento de concentración de los ésteres es la oxidación de los alcoholes, como se ha mencionado anteriormente. El éster etílico del ácido benzoico y el acetato de 2-heptanol fueron los que mayor concentración relativa tuvieron hasta el final de la fermentación en la variedad CFA (Tabla 4), esto sugiere que aportan mayor cantidad de aromas florales y afrutados. Por otro lado, el éster que predominó en la variedad CCN-51, con respecto a la variedad CFA, fue el éster etílico del ácido octanoico, el cual mostró las mayores concentraciones entre las 60 y 96 h de fermentación, al igual que en investigaciones de la variedades Forastero, en donde se reporta una alta producción de ésteres entre las 48 y 96 h de fermentación (14). Al igual que los alcoholes, los ésteres son producidos a partir del metabolismo de las levaduras, se ha demostrado que varias especies de levaduras están presentes durante todo el proceso de fermentación (73), en donde las levaduras metabolizan ácidos, como el ácido cítrico que está en la pulpa del cacao (69). La generación de alcoholes y ésteres ocurre en la pulpa pero los COV identificados estuvieron presentes en los granos, esto es debido al ácido acético, que hace permeable a los granos y favorece la migración de los COV desde la pulpa hasta los granos de cacao (31). Al igual que los alcoholes, las concentraciones de los ésteres dependen también de la temperatura de fermentación, de la aireación y de las concentraciones de azúcar en la pulpa del cacao (74).

Se identificaron también a 6 aldehídos durante el proceso de fermentación espontánea (Tabla 4). Los aldehídos presentaron considerables concentraciones relativas, como el bencenoacetaldehído, responsable de los aromas a miel y floral (45), y el benzaldehído, responsable de aromas dulces y amargos (49). Se sabe que las concentraciones de los aldehídos son más altas en los granos de cacao que en la pulpa (69) debido a que están involucrados en la degradación de lípidos y estos son abundantes en los granos (75). En la figura 15 se observa que en la variedad CFA las concentraciones relativas de aldehídos fueron mayores que en la variedad CCN-51, y resultados semejantes fueron encontrados por otros investigadores (13, 15), siendo mayor la concentración final en la variedad Nacional y en variedades de cacao fino de aroma que en variedades de cacao fino Nacional híbridos de Ecuador: EET103, EET559, EET576 y EET577 que tienen mayor concentración de benzaldehído que el CCN-51 del mismo país. Los aldehídos son buenos indicadores de la calidad de los granos de cacao porque proveen al producto final sabores y aromas placenteros, como afrutados (cereza) y florales.

Las cetonas también se forman en consecuencia del metabolismo de las levaduras (39). La 2-heptanona, provee aromas afrutado, de coco, de queso y floral (51), la acetofenona, aromas floral, almendrado y dulce (49) y 2-nonanona, aromas afrutado y dulce (51). Estas 3 cetonas estuvieron presentes durante todo el proceso de fermentación y en mayores concentraciones con respecto a las demás cetonas de la tabla 4 al igual que en un estudio de un clon de cacao llamado TSH 565 (37). Estos compuestos cetónicos también se encuentran en los granos de cacao después del secado (8). En la figura 16 se observa que se presentaron en mayores concentraciones en la variedad CFA, sugiriendo que contiene mayores concentraciones de aromas agradables, como florales y afrutados en esta variedad de cacao con respecto al CCN-51. Por otro lado, la dinámica del COV 2-nonanona, fue similar y constante en ambas variedades durante todo el proceso de fermentación espontánea, aunque en otros trabajos se identificó altas cantidades

de 2-nonanona en la variedad de cacao Criollo de Ecuador, después de la fermentación (14), pero en granos ya fermentados y secos se reportó mayores concentraciones del compuesto en la variedad CCN-51 (16).

En la figura 17 se observa la dinámica de 2 terpenos: trans-.beta-ocimeno y beta-mirceno, estos tuvieron mayor presencia y concentración relativa en la variedad CFA a las 60 h, al igual que en investigaciones en donde se compararon variedades de cacao fino de aroma con CCN-51 (16). El beta-mirceno suele encontrarse en la pulpa y en los granos de cacao durante el proceso de fermentación (69). El trans-.beta-ocimeno produce aromas florales, herbales y dulces, mientras que el beta-mirceno, aromas picantes y de bálsamo, este último no confiere características organolépticas positivas al chocolate, pero suele abundar en los cacaos nativos finos de aroma después de la fermentación (16,51). El linalool es otro de los terpenos de interés en los COV de los granos de cacao porque provee aromas agradables: floral, rosa, dulce y cítrico. No obstante, el linalool se identificó solamente a las 12 y 24 h en ambas variedades, con concentraciones bajas y similares, es decir, su presencia y concentración fueron bajas en comparación con otros estudios de cacaos finos de aroma (32, 41, 57).

El éter dimetílico es el compuesto volátil que obtuvo mayores concentraciones relativas que todos los demás COV en todos los tiempos de fermentación y en ambas variedades (Figura 18). Sin embargo, no se ha reportado altas concentraciones de este compuesto en otros estudios de granos de cacao durante el proceso de fermentación y, en este caso, su presencia se podría deber a los compuestos volátiles generados por la madera de los cajones de fermentación, ya que otro nombre del éter dimetílico es “wood ether”, es decir, éter de madera según la librería NIST. Asimismo, su formación podría deberse al metanol utilizado en la preparación del estándar interno 4-metilpiridina y, por alguna reacción de deshidratación del metanol, causó la presencia del COV éter dimetílico (77). Por

ello, en primera instancia, se realizó una transformación de raíz cuadrada a los 22 COV que se seleccionaron para realizar el análisis de componentes principales, de los cuales se discutirá en el siguiente apartado.

3. Análisis de componentes principales y gráfica de calor

Se realizó análisis de componentes principales y gráfica de calor para visualizar las relaciones entre los COV identificados y las variedades de cacao CFA y CCN-51. Para ambos análisis las variables consideradas fueron los 22 COV de la tabla 6.

En la figura 26 se muestra un biplot, en donde el componente principal 1 explica el 44.9% de la varianza de los datos. Los COV que tienen influencias positivas grandes son el éster etílico del ácido benzoico, el alcohol feniletílico, el benzaldehído, el éster etílico del ácido bencenoacético y el bencenoacetaldehído (Figura 22). De ellos, el alcohol feniletílico (7) y el bencenoacetaldehído (45) proporcionan aromas florales a los granos de cacao durante la fermentación y el éster etílico del ácido bencenoacético, aroma afrutado (8). El benzaldehído provee un aroma amargo y dulce a la vez (49). El éster etílico del ácido benzoico proporciona tanto aroma floral como afrutado (49). En general, el componente principal 1 agrupa, en su eje positivo, a COV afrutados, florales y dulces que presentaron mayores concentraciones relativas en la variedad CFA entre las 60 y 144 h de fermentación.

El componente principal 2 explica el 23.4% de la varianza de los datos. Los COV que tienen influencias negativas grandes en esta componente son: 2-heptanona, 2-heptanol, trans-.beta-ocimeno, beta-mirceno y acetofenona (Figura 23). Estos mismos COV se agrupan de color anaranjado en la gráfica de calor, correspondiente a la variedad CFA y a las 60 h de fermentación, esto nos indica que en este tiempo los comportamientos de las concentraciones de los COV tienen cierta similitud, debido a que es la única variable numérica considerada (Figura 29). De ellos, los

compuestos que proporcionan aromas florales son la 2-heptanona (51) y la acetofenona, pero este último también proporciona el aroma afrutado (49). El 2-heptanol provee aroma dulce-cítrico (8), el trans-.beta-ocimeno, aroma dulce-herbal (51) y el beta-mirceno da un aroma balsamo-picante (51). El trans-.beta-ocimeno y el beta-mirceno presentaron mayores concentraciones relativas entre las 12 y 60 h de fermentación, mientras que la 2-heptanona y 2-heptanol, presentaron mayores concentraciones relativas entre las 60 y 96 h de fermentación. En consecuencia, el componente principal 2, agrupó, en su eje negativo, a COV que abundaron entre las 12 y 96 h de fermentación en la variedad CFA.

Los componentes principales 3 y 4 (Figuras 27 y 28) explican el 8.8% y el 6.6% de la varianza de los datos, respectivamente. Por un lado, los COV que tienen influencias positivas en el componente principal 3 son la 2-nonanona, la cual proporciona un aroma afrutado (51) y el éster 2-feniletílico del ácido acético que provee un aroma floral (8). Los COV que tienen influencias negativas grandes son el dimetil éter y el éster etílico del ácido octanoico. Este último proporciona aromas afrutados y florales (49), pero no se aprecian agrupaciones en particular. Por otro lado, en el componente principal 4, los COV que tienen influencias negativas altas son el 2-nonanona, 2-nonanol, éster etílico del ácido octanoico y el estireno, mientras que el COV que tiene efecto positivo es el metional, el cual provee aroma a papa. La gráfica de calor también agrupa al 2-nonanona y 2-nonanol, presentando un color rojo a las 144 h de fermentación (Tiempo 27 en la figura 29) de la variedad CFA. En ese tiempo estos COV tienen un comportamiento bastante similar y esto también se corrobora en las gráficas de las dinámicas de alcoholes y cetonas (Figuras 13 y 16).

En general, las mayores concentraciones relativas de compuestos volátiles afrutados, florales y dulces en la variedad CFA, mostradas en los resultados, se puede atribuir principalmente a factores intrínsecos, como la genética de cada

variedad (3,16) ya que todos los factores extrínsecos fueron aparentemente los mismos, es decir, las condiciones de fermentación fueron las mismas, la ubicación geográfica de las mazorcas de cacao extraídas fueron de la misma provincia, además, es muy probable que los microorganismos involucrados en la fermentación también fueron los mismos porque los agricultores no suelen separar sus herramientas (como machetes, cuchillos y sacos) específicos para cada variedad.

VII. Conclusiones

1. Se identificaron y semicuantificaron a 122 COV en total, durante las 156 h de fermentación entre el CFA y CCN-51.
2. Se comparó la dinámica de los 20 COV identificados con mayor presencia durante las 156 h de fermentación espontánea de las variedades CFA y CCN-51. En el CFA, los COV con mayores concentraciones relativas que confieren aromas afrutados, florales y dulces fueron: 2-heptanol, éster etílico del ácido benzoico, acetato de 2-heptanol, bencenoacetaldehído, benzaldehído (aromas dulce y amargo), 2-heptanona, acetofenona, 2-nonanona y trans-.beta.-ocimeno; mientras que en el CCN-51 fueron el éster etílico del ácido octanoico, acetato de 3-metil-1-butanol y éster etílico del ácido hexanoico.
3. Las concentraciones relativas de los COV generados durante la fermentación se correlacionan con la calidad de los granos de cacao, a mayores concentraciones y presencia de COV que confieren aromas afrutados, florales y dulces, los granos de cacao son de mejor calidad.
4. Los granos de cacao de la variedad CFA generaron mayores concentraciones de COV en general, con respecto al CCN-51.

VIII. Referencias bibliográficas

1. Sánchez V, Zambrano L, Iglesias C, Rodríguez E, Villalobos V, Díaz F, et al. La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe . I. Sanchez V, Zambrano J, Iglesias C, editors. 2019. 1–32 p. Available from: https://www.fontagro.org/new/uploads/adjuntos/Informe_CACAO_linea_base.pdf
2. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT . 2022. Available from: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity
3. Acierno V, Yener S, Alewijn M, Biasioli F, Van Ruth S. 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 Res Int* . 2016;84:86–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.022>
4. Moreira IM da V, Vilela L de F, Santos C, Lima N, Schwan RF. Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. *Food Res Int* . 2018;109(April):196–203. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.012>
5. Qin XW, Lai JX, Tan LH, Hao CY, Li FP, He SZ, et al. Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. *Int J Food Prop* . 2017;20(10):2261–75. Available from: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1236270>
6. Hamdouche Y, Meile JC, Lebrun M, Guehi T, Boulanger R, Teyssier C, et al. Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. *Food Res Int* . 2019;119(March 2018):477–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.001>
7. Rodriguez J, Escalona HB, Orozco I, Lugo E, Jaramillo ME. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and

- drying processes using principal components analysis. *Food Res Int* . 2011;44(1):250–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>
8. Rodriguez J, Escalona HB, Contreras SM, Orozco I, Jaramillo E, Lugo E. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chem* . 2012;132(1):277–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.078>
 9. Torres M, Tarrega A, Blanch C. Effect of cocoa roasting time on volatile composition of dark chocolates from different origins determined by HS-SPME/GC-MS. *CYTA - J Food*. 2021;19(1):81–95.
 10. Rojas R, Rodríguez C, Ruiz C, Portales R, Neyra E, Patel K, et al. Cacao Chuncho del Cusco . Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima; 2017. 121 p. Available from: https://issuu.com/jerimo/docs/cacao_chuncho_del_cusco
 11. Oliva M, Maicelo JL. Identificación y selección de ecotipos de cacao nativo fino de aroma de la zona Nor oriental del Perú. *Rev Investig Agroproducción Sustentable* . 2020;4(2):31. Available from: <http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/INDESDOS/article/view/556>
 12. Bustamante DE, Motilal LA, Calderon MS, Mahabir A, Oliva M. Genetic diversity and population structure of fine aroma cacao (*Theobroma cacao* L.) from north Peru revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Front Ecol Evol*. 2022;10(July):1–15.
 13. Oliva-Cruz M, Goñas M, Bobadilla LG, Rubio KB, Escobedo-Ocampo P, García Rosero LM, et al. Genetic Groups of Fine-Aroma Native Cacao Based on Morphological and Sensory Descriptors in Northeast Peru. *Front Plant Sci*. 2022;13(June):1–11.
 14. Cevallos JM, Gysel L, Maridueña MG, Molina MJ. Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *J Food Qual* . 2018;2018. Available from:

<https://www.hindawi.com/journals/jfq/2018/1758381/>

15. Calvo AM, Botina BL, García MC, Cardona WA, Montenegro AC, Criollo J. Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Sci Rep* . 2021;11(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95703-2>
16. Rottiers H, Tzompa D, Lemarcq V, De Winne A, De Wever J, Everaert H, et al. A multipronged flavor comparison of Ecuadorian CCN51 and Nacional cocoa cultivars. *Eur Food Res Technol* . 2019;245(11):2459–78. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03364-3>
17. Kongor JE, Hinnéh M, de Walle D Van, Afoakwa EO, Boeckx P, Dewettinck K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Res Int* . 2016;82:44–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
18. Castro-Alayo EM, Idrogo-Vásquez G, Siche R, Cardenas-Toro FP. Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*. 2019;5(1).
19. Brickell C. International code of nomenclature for cultivated plants. Eighth. International society for horticultural science. 2009. 1–206 p.
20. Ascrizzi R, Flamini G, Tessieri C, Pistelli L. From the raw seed to chocolate: Volatile profile of Blanco de Criollo in different phases of the processing chain. *Microchem J* . 2017;133:474–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.024>
21. INDECOPI. Denominación de Origen Cacao Amazonas Perú. 2016.
22. Mori Mestanza D, Zuta Chamoli V, Barrena Gurbillón MÁ, Oliva Cruz M, Chávez Quintana SG. Análisis de los compuestos volátiles de cacao nativo fino de aroma de granos tostados y sin tostar. *Rev Científica Pakamuros*. 2021;9(4):133–47.
23. Álvarez C. Identification of the Volatile Compounds in the roasting Venezuela Criollo cocoa beans by Gas Chromatography-Spectrometry Mass. *J Nutr Heal Food Eng*.

2016;5(4).

24. Chanliau S. Marqueurs de la qualite aromatique du cacao. Influence de l'origine. Renforcement de l'arome d'origine thermique. Thèse de Doctorat. Université Montpellier (Montpellier), France; 1998.
25. Cros E, Mermet G, Jeanjean N, Georges G. Relation précurseurs - développement de l'arôme cacao. 11 Conférence Int sur la Rech cacaoyère Actes. 1994;723–6.
26. Buyukpamukcu E, Goodall DM, Hansen CE, Keely BJ, Kochhar S, Wille H. Characterization of peptides formed during fermentation of cocoa bean. J Agric Food Chem. 2001;49(12):5822–7.
27. Yang JY, Scascitelli M, Motilal LA, Sveinsson S, Engels JMM, Kane NC, et al. Complex origin of Trinitario-type *Theobroma cacao* (Malvaceae) from Trinidad and Tobago revealed using plastid genomics. Tree Genet Genomes. 2013;9(3):829–40.
28. Counet C, Callemien D, Ouwerx C, Collin S. Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. J Agric Food Chem. 2002;50(8):2385–91.
29. Castro H. Posibilidad de creación de una nueva variedad de cacao de fruto hexalocular por cruzamiento entre flores mutantes hexameras. Arch. Victor Chacon Salinas, Jesus Maria, Quito, Ecuador. 1981.
30. Boza EJ, Motamayor JC, Amores FM, Cedeño-Amador S, Tondo CL, Livingstone DS, et al. Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: Its impact and significance on global cacao improvement and production. J Am Soc Hortic Sci. 2014;139(2):219–29.
31. Chetschik I, Kneubühl M, Chatelain K, Schlüter A, Bernath K, Hühn T. Investigations on the Aroma of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L.) and Its Influence on the Odor of Fermented Cocoa Beans. J Agric Food Chem. 2018;66(10):2467–72.
32. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Flavor formation and character in cocoa

- and chocolate: A critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008;48(9):840–57.
33. Batista NN, Ramos CL, Dias DR, Pinheiro ACM, Schwan RF. The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *J Food Sci Technol.* 2016;53(2):1101–10.
 34. Afoakwa E. Science and Technology of Enrobed and Filled Chocolate, Confectionery and Bakery Products. *Science and Technology of Enrobed and Filled Chocolate, Confectionery and Bakery Products.* 2009. 23–26 p.
 35. Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(6):1809–24.
 36. Aprotosoiaie AC, Luca SV, Miron A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products- An Overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf .* 2016 Jan 1;15(1):73–91. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12180>
 37. Beckett S. INDUSTRIAL CHOCOLATE MANUFACTURE AND USE. Fourth edi. Beckett S, editor. *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition.* York, UK; 2009. 169–191 p.
 38. Schwan RF, Wheals AE. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(4):205–21.
 39. Augusto F, Luiz Pires Valente A. Applications of Solid-Phase Microextraction to Chemical Analysis of Live Biological Samples. *ChemInform.* 2002;33(49):428–38.
 40. Figueroa J. “EXTRACCIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES DEL CAFÉ (*Coffea arabica* L.) TOSTADO DE VILCABAMBA (ECUADOR) PARA ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO. 2013.
 41. Stashenko EE, René Martínez J. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Sci*

- Chromatogr . 2010;2:29–47. Available from: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a3.pdf>
42. Crafac M, Mikkelsen MB, Saerens S, Knudsen M, Blennow A, Lowor S, et al. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *Int J Food Microbiol* . 2013;167(1):103–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>
 43. Guehi TS, Zahouli IB, Ban-Koffi L, Fae MA, Nemlin JG. Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material. *Int J Food Sci Technol*. 2010;45(8):1564–71.
 44. JINAP S, DIMICK PS. Acidic Characteristics of Fermented and Dried Cocoa Beans from Different Countries of Origin. *J Food Sci*. 1990;55(2):547–50.
 45. Rottiers H, Tzompa D, De Winne A, Ruales J, De Clippeleer J, De Leersnyder I, et al. Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *Eur Food Res Technol* . 2019;245(9):1917–37. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03307-y>
 46. Wang B, Qu F, Wang P, Zhao L, Wang Z, Han Y, et al. Characterization analysis of flavor compounds in green teas at different drying temperature. *Lwt* . 2022;161(February):113394. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113394>
 47. Lemarcq V, Monterde V, Tuenter E, Walle D Van de, Pieters L, Sioriki E, et al. Flavor diversification of dark chocolate produced through microwave roasting of cocoa beans. *Lwt*. 2022;159(March 2021).
 48. The Good Scents company . 2021. Available from: <http://www.thegoodscentscompany.com/search2.html>
 49. Bonvehí JS. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *Eur Food*

- Res Technol. 2005;221(1–2):19–29.
50. Frauendorfer F, Schieberle P. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. *J Agric Food Chem.* 2006;54(15):5521–9.
 51. Kadow D, Bohlmann J, Phillips W, Lieberei R. Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao L.*). *J Appl Bot Food Qual.* 2013;86(1):90–8.
 52. Crafac M, Keul H, Eskildsen CE, Petersen MA, Saerens S, Blennow A, et al. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Res Int.* 2014;63:306–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>
 53. Owusu M, Petersen MA, Heimdal H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *J Food Process Preserv.* 2012;36(5):446–56.
 54. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food Chem.* 2009;113(1):208–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.088>
 55. de Melo Pereira GV, Neto E, Soccol VT, Medeiros ABP, Woiciechowski AL, Soccol CR. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Res Int.* 2015;75:348–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.027>
 56. Thammarat P, Kulsing C, Wongravee K, Leepipatpiboon N, Nhujak T. Identification of volatile compounds and selection of discriminant markers for elephant dung coffee using static headspace gas chromatography—mass spectrometry and chemometrics. *Molecules.* 2018;23(8).

57. Liu C, Yang P, Wang H, Song H. Identification of odor compounds and odor-active compounds of yogurt using DHS, SPME, SAFE, and SBSE/GC-O-MS. *Lwt* . 2022;154:112689. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112689>
58. Pang X, Zhang Y, Qiu J, Cao J, Sun Y, Li H, et al. Coupled multidimensional GC and odor activity value calculation to identify off-odors in thermally processed muskmelon juice. *Food Chem* . 2019;301(July):125307. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125307>
59. Ramos CL, Dias DR, Miguel MG da CP, Schwan RF. Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao L.*) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Res Int* . 2014;64:908–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>
60. Yao L, Mo Y, Chen D, Feng T, Song S, Wang H, et al. Characterization of key aroma compounds in Xinjiang dried figs (*Ficus carica L.*) by GC–MS, GC–olfactometry, odor activity values, and sensory analyses. *Lwt* . 2021;150(June):111982. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111982>
61. García Carrión LF. Catálogo de cultivares de cacao del Perú . 2010. Available from: <http://www.minag.gob.pe>
62. Altini D, Robotti N, Aguirre C, Huapaya A, Pasapera M, Flores D, et al. Bagua y Utcubamba: Relictos de cacao nativos peruanos . 2016. 200 p. Available from: <http://www.fondoitaloperuano.org>
63. Ayala Tocto RY. Ecología microbiana de la fermentación del cacao fino de aroma de Amazonas, Perú . Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; 2022. Available from: <http://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/UNTRM/1482/CHAPA GRANDEZ SALLY PATRICIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
64. ICCO. International Cocoa Organization (ICCO) . 2023. Available from:

<https://www.icco.org/growing-cocoa/>

65. Ardhana MM, Fleet GH. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol.* 2003;86(1–2):87–99.
66. De Brito ES, García NHP, Gallão MI, Cortelazzo AL, Fevereiro PS, Braga MR. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao L*) during fermentation, drying and roasting. *J Sci Food Agric.* 2001;81(2):281–8.
67. Jinap S, Dimick PS, Hollender R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control.* 1995;6(2):105–10.
68. Frauendorfer F, Schieberle P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *J Agric Food Chem.* 2008;56(21):10244–51.
69. Bastos VS, Uekane TM, Bello NA, de Rezende CM, Flosi Paschoalin VM, Del Aguila EM. Dynamics of volatile compounds in TSH 565 cocoa clone fermentation and their role on chocolate flavor in Southeast Brazil. *J Food Sci Technol.* 2019;56(6):2874–87.
70. Utrilla M, Rodríguez J, Avendaño C, Gschaedler A, Lugo E. Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Res Int.* 2020;129:108834. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108834>
71. Aculey PC, Snitkjaer P, Owusu M, Bassompierre M, Takrama J, Nørgaard L, et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *J Food Sci.* 2010;75(6):300–7.
72. Smit G, Smit BA, Engels WJM. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(3 SPEC. ISS.):591–610.
73. Bastos VS, Santos MFS, Gomes LP, Leite AMO, Flosi Paschoalin VM, Del Aguila EM. Analysis of the cocobiota and metabolites of *Moniliophthora perniciosa*-resistant *Theobroma cacao* beans during spontaneous fermentation in southern Brazil. *J Sci*

- Food Agric. 2018;98(13):4963–70.
74. Perestrelo R, Fernandes A, Albuquerque FF, Marques JC, Câmara JS. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Anal Chim Acta*. 2006;563(1-2 SPEC. ISS.):154–64.
 75. Bryant RJ, McClung AM. Volatile profiles of aromatic and non-aromatic rice cultivars using SPME/GC-MS. *Food Chem* . 2011;124(2):501–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.061>
 76. Schmarr HG, Engel KH. Analysis and stereodifferentiation of linalool in *Theobroma cacao* and cocoa products using enantioselective multidimensional gas chromatography. *Eur Food Res Technol*. 2012;235(5):827–34.
 77. Pelaez-Fernandez R. Diseño De Un Proceso Catalítico Para La Obtención De Dimetil Éter a Partir De Gas De Síntesis En Una Sola Etapa . Universidad de Oviedo; 2016. Available from: http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/39154/1/TFM_RaquelPelaezFernandez.pdf

IX. Anexos

1. Fotografías del muestreo de los granos de cacao durante el proceso de fermentación espontánea.
 - a) Muestreo de los granos de cacao y medición de la temperatura de las masas de fermentación y medición del pH de pulpa y cotiledón, a las 0 h de fermentación. El cajón de madera de la izquierda contiene los granos de cacao de la variedad CCN-51 y el cajón de la derecha, de la variedad CFA.



- b) Muestreo de los granos de cacao y medición de la temperatura de las masas de fermentación y medición del pH de pulpa y cotiledón, a las 144 h de fermentación.



2. Cromatogramas desde las 0 hasta las 156 h de fermentación espontánea de las variedades CFA y CCN-51.

