

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN Y CONDICIONES DE SECADO DE CINCO SUBVARIETADES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CULTIVADAS EN UPALA, COSTA RICA, SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS ORGÁNICOS, COMPUESTOS VOLÁTILES Y PÉPTIDOS PRECURSORES DE AROMAS CLAVES PARA SU CALIDAD FINAL

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos

PRISCILLA ALVARADO MARENCO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

DEDICATORIA

A Alejandro y Ana María,
mi fuente de amor, luz y colores.

AGRADECIMIENTOS

Quiero iniciar con un agradeciendo poco convencional a Priscilla, alma valiente que tuvo el coraje de iniciar esta aventura en tiempos difíciles.

Agradezco enormemente al equipo asesor que me apoyó a lo largo del proceso: Lea Wexler, Elba Cubero y Carlos Vega, ya que, sin su guía constante, revisiones minuciosas, enseñanzas y consejos atinados, no me hubiera sido posible presentar y defender el fruto de mi trabajo.

Quiero incluir acá a dos personas que me apoyaron desinteresadamente, don Bruno Lomonte del ICP y Lorena Hernández del CIPRONA, quienes me introdujeron en el fascinante mundo de la electroforesis y la cromatografía de gases respectivamente, transmitiéndome sus conocimientos, experiencia y saberes, para enriquecer la investigación y por qué no decirlo, hacer más fácil mi camino.

Un agradecimiento especial para Lea, quien aun antes de tener definido un tema para mi trabajo final de graduación, me motivó siempre a seguir adelante.

Agradezco a Giovanni Palavicini y a los productores upaleños que nos abrieron las puertas de su empresa y fincas productoras, permitiéndome, con el acercamiento a sus procesos productivos, fortalecer un vínculo que refuerza que por medio de actividades de extensión y de investigación se fortalece a las comunidades.

También quiero agradecer a Guillermo, Bryan, Tatiana, Lucía, Tania, Mariana, Geovanni, Alonso, Marco y Leidy, quienes con su trabajo y apoyo contribuyeron a la realización de los procesos de fermentación y secado, así como a la preparación de las muestras.

Y finalmente, quiero agradecer a la Universidad de Costa Rica, por abrirme las puertas para cursar mis estudios de grado y posgrado. Hago extensivo el agradecimiento al CITA, ICP y CIPRONA, centros de investigación de gran prestigio, que son un ejemplo de que la U Pública es necesaria y juega un rol indispensable en la mejora de la calidad de vida y el desarrollo de nuestra sociedad.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos

Ph. D. Ana Mercedes Pérez Carvajal
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**

M. Sc. Lea Wexler Goering
Directora de Tesis

Ph. D. Elba Cubero Castillo
Asesora

Ph. D. Carlos Vega Aguilar
Asesor

M. Sc. Rebeca López Calvo
Directora Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos

Priscilla Alvarado Marengo
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	v
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Breve historia del cacao	4
2.2 Mercado del cacao	5
2.2.1 Situación mundial y regional.....	5
2.2.2 Situación nacional	5
2.3 Aspectos generales de la planta de <i>Theobroma cacao</i> L.	7
2.3.1 Árbol de cacao.....	7
2.3.2 Clasificación.....	7
2.3.3 Condiciones para el cultivo	9
2.3.4 Mejoramiento genético	10
2.3.5 Composición del fruto.....	10
2.4 Procesamiento del cacao	12
2.4.1 Procesamiento primario.....	13
2.4.2 Proceso secundario	20
2.5 Compuestos relacionados con el aroma.....	21
2.5.1 Compuestos volátiles	21
2.5.2 Ácidos orgánicos	23

2.5.3 Péptidos	23
2.6 Métodos de análisis	24
2.6.1 Compuestos volátiles	24
2.6.2 Ácidos orgánicos	28
2.6.3 Péptidos	29
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
4.1 Localización y contexto del estudio	34
4.2 Materias primas	34
4.3 Procesamiento del cacao	35
4.3.1 Apertura de mazorcas y extracción de las semillas.	35
4.3.2 Fermentación	37
4.3.3 Secado	38
4.3.4 Tostado.....	40
4.3.5 Reducción de tamaño y descascarillado de los granos.....	40
4.3.6 Empaque de muestras	40
4.4 Metodología objetivo 1: efecto del tiempo de fermentación	40
4.4.1 Preparación de las muestras.....	40
4.4.2 Diseño experimental	41
4.5 Metodología objetivo 2: efecto del tipo de secado	41
4.5.1 Preparación de las muestras.....	41
4.5.2 Diseño experimental	41
4.6 Métodos de análisis	42
4.6.1 Proteína y humedad cacao en baba.....	42
4.6.2 Acidez total.....	42
4.6.3 Ácidos orgánicos	43
4.6.4 Compuestos volátiles HS-SPME-GC-MS	43
4.6.5 Péptidos	45
4.6.6 Medición de pH	47
4.6.7 Medición de contenido de humedad.....	47
4.6.8 Medición de temperatura de la masa fermentativa.....	47
4.6.9 Análisis estadístico de resultados	48

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	49
5.1 Proceso de fermentación y secado	49
5.1.1 Monitoreo de temperatura.....	49
5.1.2 Prueba de corte.....	50
5.1.3 Monitoreo de pH.....	51
5.1.4 Monitoreo del contenido de humedad para finalizar el secado.....	52
5.1.5 Contenido de proteína y de humedad de cacao en baba	53
5.2 Efecto del tiempo de fermentación sobre el contenido de ácidos orgánicos, el perfil de compuestos volátiles y péptidos precursores de aromas clave	53
5.2.1 Análisis de ácidos orgánicos.....	54
5.2.2 Análisis de compuestos volátiles.....	58
5.2.3 Análisis de péptidos	79
5.2.4 Interacción de las distintas variables respuesta para el efecto del tiempo de fermentación.....	85
5.3 Efecto del tipo de secado sobre el contenido de ácidos orgánicos, el perfil de compuestos volátiles y péptidos precursores de aromas clave	88
5.3.1 Contenido de ácidos orgánicos	88
5.3.2 Análisis de compuestos volátiles.....	91
5.3.3 Análisis de péptidos	97
5.3.4 Interacción de las distintas variables respuesta para el efecto del tipo de secado.....	101
6. CONCLUSIONES.....	102
7. RECOMENDACIONES	105
8. BIBLIOGRAFÍA	106
9. ANEXOS	124
Anexo A	124
Anexo B	126
Anexo C	130
Anexo D.....	131
Anexo E.....	132
Anexo F.....	134
Anexo G	135
Anexo H.....	140

Anexo I	145
Anexo J	147
Anexo K	148

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de tres tiempos de fermentación (3, 5 y 6 días) y tres tipos de secado con aire caliente a 40 °C (circulación continua, flujo transversal a 1 m/s y flujo transversal a 2 m/s) sobre el perfil de ácidos orgánicos, compuestos volátiles y péptidos precursores de aromas clave, de cinco subvariedades de cacao orgánico cultivadas en Upala, Costa Rica. Tres de ellas son originarias del territorio upaleño (Umm, Ucs, Uea), una trasladada desde Talamanca (TU) y una corresponde a una mezcla de clones de alta productividad (CL). La fermentación a nivel piloto se realizó en cajones de madera con 25 kg de cacao en baba cada uno, en un equipo con condiciones de temperatura (40 – 55 °C) y humedad relativa (80 - 85 %) controladas a lo largo del proceso. Posteriormente se secaron hasta alcanzar una humedad de 7,0 – 7,5 %.

Los resultados obtenidos evidenciaron que los ácidos cítrico, succínico, láctico, tartárico, glucónico y málico tienen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre subvariedades, y que la talamanqueña producida en Upala tiene una mayor diversidad de ácidos orgánicos. Con respecto al tiempo de fermentación, coincidiendo con las distintas etapas de la fermentación, se observaron diferencias significativas en la concentración (mg/100 g) de los ácidos cítrico, láctico y acético del día 3 con respecto al día 5 y 6; por otra parte, para un mismo día de fermentación, no existe diferencia significativa en el contenido de ácidos orgánicos de las muestras de los tres tipos de secador.

Se identificaron 96 compuestos volátiles diferentes, por medio de HS-SPME-GC-MS, siendo la subvariedad upaleña Ucs la que tuvo mayor cantidad de compuestos previamente asociados con aromas ($n=37$) y la subvariedad Uea la que tuvo menos ($n=28$). Los compuestos se clasificaron en diez familias químicas, la mayoría pertenecientes a alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres. En todas las muestras para los tres tiempos de fermentación se identificaron compuestos asociados con notas características de chocolate, entre ellos la trimetil y la tetrametil pirazina. Se encontraron 31 compuestos que no muestran diferencia significativa ($p > 0,05$) para la interacción entre la subvariedad y el día de fermentación. Compuestos volátiles de las subvariedades fermentadas Ucs y TU, producidas en la misma finca, se separaron del resto, y parecen no mostrar diferencia entre el día 5 y el día 6 de fermentación. Por otra parte, el tipo de secado no afecta significativamente el perfil de compuestos volátiles.

La separación electroforética por SDS-PAGE de los péptidos presentes mostró que no hay diferencia significativa en la cantidad de estos péptidos en función del tiempo de fermentación ni del tipo de secado. Con respecto a la subvariedad, la única que presenta una diferencia significativa es la subvariedad upaleña Umm, que tiene péptidos de mayor peso molecular.

El análisis multifactorial confirmó que las subvariedades se agrupan en función del día de fermentación, a la vez, evidenció relación entre la cantidad de péptidos precursores de aromas, la presencia de ácidos orgánicos, principalmente ácido cítrico, y los compuestos volátiles, con las distintas fases de la fermentación. Para una misma subvariedad y un mismo día de fermentación, el tipo de secado no tuvo efecto en ninguna de las variables respuesta estudiadas; sin embargo, sí se identificaron diferencias entre el cacao del día 3 y el cacao con 5 y 6 días de fermentación.

Los resultados obtenidos aportan una base científica importante para continuar estudiando los compuestos clave que definen el perfil aromático del cacao upaleño, de manera que se pueda establecer la viabilidad de disminuir los tiempos asociados a los procesos de fermentación y secado sin afectar las características distintivas que le otorgan a este cacao la denominación de fino y de aroma.

ABSTRACT

In the present study, the effect of three fermentation times (3, 5, and 6 days) and three types of air drying at 40 °C (continuous circulation, cross flow at 1 m/s, and cross flow at 2 m/s) on the profile of organic acids, volatile compounds and key aroma precursor peptides of five organic cocoa subvarieties grown in Upala, Costa Rica, was evaluated. Three of them are native to Upala (upaleñas: Umm, Ucs, Uea), one transferred from Talamanca (TU-talamanqueña), and one corresponds to a mixture of high-productivity clones (CL). The fermentation process was carried out with average batches of 25 kg cocoa pulp-beans in a wooden box, in equipment with controlled temperature and relative humidity conditions similar to those of the producing area. They were then dried in the three different dryers to a moisture content of 7,0–7,5%.

The results obtained showed that the concentration (mg/ 100 g) of citric, succinic, lactic, tartaric, gluconic, and malic acids have significant differences ($p \leq 0,05$) concerning the subvariety and that the talamanqueña produced in Upala has a greater diversity of organic acids. For fermentation time, coinciding with the different phases of fermentation, significant differences were observed in the concentration of citric, lactic, and acetic acid on day 3 for days 5 and 6; on the other hand, for the same fermentation day, there is no significant difference in the organic acid content of the samples from the three types of dryers.

Ninety-six different volatile compounds were identified by HS-SPME-GC-MS; the upaleña subvariety Ucs had the highest number of compounds previously associated with aromas ($n=37$) and the Uea the lowest ($n=28$). The compounds were classified into 10 chemical families, most of them belonging to alcohols, carboxylic acids, and esters. Compounds associated with characteristic chocolate notes, were identified and were present in all samples for all three fermentation times, including trimethyl and tetramethyl pyrazine that play a predominant role in the cocoa aroma. Thirty-one compounds there is no significant difference ($p > 0,05$) for the interaction between subvariety and fermentation day. Principal component analysis (PCA) evidenced that the fermented cocoa subvarieties Ucs and TU, produced on the same farm for about 50 years, cluster separately from the rest and appear to show no difference between days 5 and 6. As for the type of dryer, it was found that it does not affect the profile of volatile compounds.

Electrophoretic separation by SDS-PAGE of the peptides showed that there is no significant difference in the number of peptides present as a function of fermentation time or type of drying; for the subvariety, the only one that presents a significant difference is the upaleño Umm, which has peptides of higher molecular weight.

The multifactorial analysis confirmed that the subvarieties are grouped according to the day of fermentation and, at the same time, showed a relationship between the amount of aroma precursor peptides, the presence of organic acids, mainly citric acid, and volatile compounds, with the different phases of fermentation. For the same subvariety and the same fermentation day, the type of dryer did not affect the profile of organic acids, volatile compounds and key aroma precursor peptides; however, differences were identified between partially fermented cocoa (day 3) and fermented cocoa (days 5 and 6).

The results obtained provide an important scientific basis for further study on the aromatic profile of Upala cocoa subvarieties to establish the feasibility of adjusting the parameters associated with the fermentation and drying processes without harming the perception of the quality characteristics associated with the denomination of fine-flavor cocoa.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Composición porcentual promedio de los cotiledones de la semilla de cacao	11
Cuadro 2: Clasificación y características de granos fermentados y secos mediante observación de los cotiledones tras la prueba de corte y degustación de su sabor	18
Cuadro 3. Compuestos volátiles identificados en diferentes muestras de cacao, organizados según sus familias orgánicas	22
Cuadro 4. Descripción e identificación de las cinco subvariedades estudiadas	35
Cuadro 5. Condiciones de análisis HPLC para ácidos orgánicos	43
Cuadro 6. Condiciones de análisis para SPME-GC, análisis de compuestos volátiles.....	44
Cuadro 7. Condiciones para realizar la integración de áreas de los picos identificados	45
Cuadro 8. Valores promedio de aW y contenido de humedad al momento de detener el secado de las distintas subvariedades	52
Cuadro 9. Contenido de proteína del cacao en baba de las cinco subvariedades	53
Cuadro 10. Compuestos volátiles identificados mediante GC-MS para todas las subvariedades y la descripción del aroma asociado encontrado en la literatura	61
Cuadro 11. Compuestos volátiles asociados a aromas en las diferentes subvariedades de cacao, secas y tostadas, al sexto día de fermentación	70
Cuadro 12 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos visualizados por SDS-PAGE (12 %) para las cinco subvariedades en distintos tiempos de fermentación y secador S1	81
Cuadro 13. Cantidad de bandas identificadas para cada subvariedad a lo largo de la fermentación para el secado de circulación continua de aire caliente a 40 °C	82
Cuadro 14. Datos generales promedio de contenido de humedad en las primeras 48 h de los procesos de secado para todas las subvariedades	90
Cuadro 15. Pesos moleculares (kDa) de los péptidos visualizados por SDS-PAGE (12 %) para las cinco subvariedades en distintos tiempos de fermentación y tipo de secado.....	98
Cuadro 16. Cantidad de bandas identificadas para cada subvariedad a lo largo de la fermentación para los tres tipos de secado a 40 °C	99
Cuadro 17. Procedimientos para desgrasar muestras de granos de cacao	127
Cuadro 18. Resumen del análisis de medias de Tukey para acidez total y ácidos orgánicos del cacao en baba para todas las subvariedades	132

Cuadro 19. Resumen del análisis de medias de Tukey para acidez total y ácidos orgánicos específicos para nibs de cacao de las cinco subvariedades (A) y para los tres tiempos de fermentación (B)	132
Cuadro 20. Resumen del análisis de medias de Tukey para acidez total y ácidos orgánicos específicos para los nibs de cacao de las cinco subvariedades (A) y los tres tipos de secador (B)	133
Cuadro 21. Áreas relativas promedio de compuestos volátiles para todas las subvariedades a lo largo de la fermentación y secado por circulación continua de aire caliente (Objetivo 1)	135
Cuadro 22. Áreas relativas promedio de compuestos volátiles para todas las subvariedades a lo largo de la fermentación para todos los tipos de secado (Objetivo 2)	137
Cuadro 23. Datos del análisis de comparación de medias de Bonferroni para las áreas relativas de todos los compuestos identificados-Efecto tiempo de fermentación (Objetivo 1)	140
Cuadro 24. Datos del análisis de comparación de medias de Bonferroni para las áreas relativas de todos los compuestos identificados-Efecto tipo de secado (Objetivo 2)	142
Cuadro 25. Clasificación de los compuestos volátiles identificados, su respectivo acrónimo y CAS	145
Cuadro 26. Agrupamiento de los compuestos volátiles para elaborar el análisis multifactorial	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción y exportación de cacao en Costa Rica entre 1957 – 2014	6
Figura 2. Cultivares de <i>Theobroma cacao</i> L. Fuente	8
Figura 3. Grupos genéticos de cacao de América Latina	9
Figura 4. Etapas de la cadena de valor del cacao, desde su cultivo hasta su consumo	13
Figura 5. Proceso de fermentación de cacao	16
Figura 6. Eventos bioquímicos que ocurren en la semilla durante el proceso de fermentación	16
Figura 7. Esquema de inyección de muestra por HS-SPME-GC	26
Figura 8. Esquema conceptual de un espectrómetro de masas	27
Figura 9. Ejemplo de cromatograma y espectro de masas para un TR específico	28
Figura 10. Esquema general básico de un equipo para HPLC	29
Figura 11. Equipo para correr mini geles de PAGE	31
Figura 12. Péptidos visualizados por SDS-PAGE en una muestra de cacao	31
Figura 13. Flujo de proceso de elaboración de cacao a nivel piloto	36
Figura 14. Secadores utilizados para secado del cacao	39
Figura 15. Esquema de las condiciones y parámetros establecidos para el análisis de péptidos presentes en cacao por SDS-PAGE	46
Figura 16. Vista superior de la caja fermentativa mostrando la ubicación de los 4 termopares utilizados	48
Figura 17. Comportamiento promedio de la temperatura durante el tiempo de fermentación	49
Figura 18. Muestra de prueba de corte realizada a las distintas subvariedades de cacao a los 3 y 6 días de fermentación	50
Figura 19. Comportamiento del pH a lo largo de la fermentación para las cinco subvariedades estudiadas	51
Figura 20. Contenido de ácidos orgánicos presentes en cacao en baba para las distintas subvariedades	55
Figura 21. Comportamiento del contenido total de acidez a lo largo del tiempo de fermentación para los nibs de cacao secados por circulación continua de aire caliente a 40 °C	56

Figura 22. Contenido de ácidos orgánicos significativos para los nibs de cacao de las cinco subvariedades secados por circulación continua de aire caliente a 40 °C (S1)	57
Figura 23. Contenido de ácidos orgánicos significativos para los nibs de cacao secados por circulación continua de aire caliente a 40 °C (S1) a lo largo del tiempo de fermentación	58
Figura 24. Distribución de compuestos volátiles identificados en todas las subvariedades	59
Figura 25. Comportamiento de la abundancia relativa de distintos ésteres asociados con perfiles aromáticos frutales y herbales para todas las subvariedades a lo largo del tiempo de fermentación	66
Figura 26. Abundancia relativa de pirazinas y algunos de sus compuestos precursores: (a) 2,3-butanodiol, (b) acetoína, (c) tetrametil pirazina + trimetil pirazina	68
Figura 27. Diagrama de Venn que muestra similitudes y diferencias entre los compuestos volátiles significativos, para las distintas subvariedades totalmente fermentadas (día 6)	72
Figura 28. Dendograma que muestra la clusterización aglomerativa jerárquica de las subvariedades con diferentes días de fermentación de acuerdo a los compuestos volátiles significativos	73
Figura 29. Análisis de componentes principales de compuestos volátiles para el tiempo de fermentación (día 3, día 5 y día6) y todas las subvariedades.....	76
Figura 30. Diagrama de Venn que muestra similitudes y diferencias entre compuestos volátiles significativos de la subvariedad Uea parcialmente fermentada y la subvariedad Umm fermentada	77
Figura 31. Compuestos volátiles relacionados con aromas específicos para las muestras de cacao con 5 y 6 días de fermentación, para todas las subvariedades	78
Figura 32. Visualización general de péptidos identificados por SDS-PAGE (12 %) en las cinco subvariedades de cacao	79
Figura 33 Abundancia relativa de péptidos visualizados por SDS-PAGE (12 %) en las cinco subvariedades de cacao a lo largo de la fermentación, para el secado por circulación continua de aire caliente a 40 °C (S1)	84
Figura 34. Análisis multifactorial para el efecto del tiempo de fermentación	87
Figura 35. Contenido de ácidos orgánicos significativos de nibs de cacao en función del día de fermentación y el tipo de secador	89
Figura 36. Dendograma que muestra la clusterización aglomerativa jerárquica de los compuestos volátiles significativos en función del tiempo de fermentación y el tipo de secado	92

Figura 37. Análisis de componentes principales de compuestos volátiles de las cinco subvariedades para el efecto del tipo de secado (S1, S2, S3)	94
Figura 38. Compuestos volátiles relacionados con aromas específicos para las muestras de cacao con 6 días de fermentación, para todas las subvariedades y tipo de secado	96
Figura 39. Abundancia relativa de péptidos visualizados por SDS-PAGE (12 %) en las cinco subvariedades de cacao a lo largo de la fermentación, para los 3 tipos de secado con aire caliente a 40 °C	100
Figura 40. Resultado de SDS-PAGE en muestras de cacao tostado-primera prueba preliminar	126
Figura 41. Gel obtenido utilizando el buffer de muestras reductor para la extracción de la proteína en cacao tostado	126
Figura 42. Resultados de la última prueba preliminar para diferentes muestras de cacao	128
Figura 43. Ejemplo del monitoreo continuo de temperatura documentado directamente del termo registrador para los cuatro termopares	129
Figura 44. Curvas de calibración y rectas de mejor ajuste de los resultados de la electroforesis para cada una de las cinco subvariedades	130
Figura 45. Ejemplo de cromatogramas obtenidos para el tercer día de fermentación en S1	134
Figura 46. Ejemplo de curva de secado (secador de circulación continua, S1) de la mezcla de clones para cada tiempo de fermentación	148

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	análisis de componentes principales
AMF	análisis multifactorial
ANDEVA	análisis de variancia
CAJ	análisis de clusterización aglomerativa jerárquica
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CIGRAS	Centro de Investigaciones en Granos y Semillas
CIPRONA	Centro de Investigaciones en Productos Naturales
CITA	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos
DAD	detector de arreglo de diodos
ELISA	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ESI	ionización por electrospray
ETA	Escuela de Tecnología de Alimentos
GC	cromatografía de gases
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HS	espacio de cabeza
ICCO	Organización Internacional del Cacao
ICP	Instituto Clodomiro Picado
ILAC	Iniciativa Latinoamericana del Cacao
MALDI-TOF	espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz de iones
MS	espectrometría de masas
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS	dodecilsulfato de sodio
SPME	microextracción en fase sólida
UCR	Universidad de Costa Rica

1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) que se produce en Costa Rica se ha reconocido en el mercado, desde hace varios años, por poseer características de calidad únicas y se ha catalogado como fino y de aroma (Arvelo et al., 2017; CAOBISCO/ECA/FCC, 2015; Carmiol, 2017). Recientemente, en junio de 2023, el panel *Ad hoc* sobre cacao fino y de aroma de la Organización Internacional del Cacao (ICCO) reconoció nuevamente al país como productor y exportador de cacao 100 % fino y de aroma (ED(MEM) 1206-ICCO 2023-Anexo A; El País.cr. 2023; Jiménez, 2023). No obstante, en la actualidad existe poca información científica que respalde dicho reconocimiento, y el cultivo y procesamiento del fruto se encuentra poco desarrollado en el país.

De acuerdo con datos de la Comisión Interinstitucional de Cacao de Costa Rica (2018), entre un 98 % y un 100 % del cacao exportado desde el país se considera fino y de aroma. Esto, a diferencia de grandes países productores de cacao como Costa de Marfil, cuyo fuerte es la producción de cacao ordinario, conocido también como a granel, básico, ordinario o *bulk*.

El grano de cacao se conoce como un “commodity” o materia prima que representa la base de la economía de millones de pequeños productores en el mundo. En este contexto, África es la principal región productora, con más del 75 % de la producción global, encabezada por Costa de Marfil, con una producción estimada a febrero del 2023 de 2,1 millones de toneladas de cacao ordinario (Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica [PROCOMER], 2023), mientras que la participación del cacao fino y de aroma a nivel mundial es relativamente pequeña, de alrededor de un 5 % (PROCOMER, 2018).

La clasificación de cacao fino y de aroma no viene dada solamente por su origen genético, sino por una combinación de criterios, algunos de los cuales pueden ser subjetivos y no establecen de manera científica que el cacao en cuestión tenga las características de este tipo de producto (Ríos, 2017). Entre los criterios utilizados para esta clasificación están las características morfológicas y químicas de la planta, el sabor y olor de los granos, su grado de fermentación, humedad y acidez, características físicas, químicas y sanitarias, así como cualidades percibidas por los sentidos (Aguilar, 2016; Carmiol, 2017).

Se han realizado diversos estudios para evaluar las características fisicoquímicas y los compuestos precursores que dan al cacao fino y de aroma su carácter distintivo, y se ha demostrado que, además de los antecedentes genéticos, el desarrollo del sabor y aroma depende también de prácticas adecuadas de fermentación y secado (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

Las características aromáticas del cacao se deben a la presencia de una compleja mezcla de compuestos que se forman, en su mayoría, durante su procesamiento posterior a la cosecha. Las sustancias responsables de los aromas provienen de compuestos volátiles que se detectan en los receptores olfativos (Belitz et al., 2009), los cuales se generan a partir de sustancias precursoras que provienen principalmente de los azúcares reductores, péptidos y ácidos orgánicos que se generan o transforman durante el procesamiento del cacao, y cuyo tipo y cantidad está directamente relacionado con el perfil aromático final (Meneses, 2023).

Para contribuir a potenciar la competitividad del sector cacaotero en la región latinoamericana, responsable del 80 % de la producción de cacao fino y de aroma a nivel mundial (Banco de Desarrollo de América Latina y el Caribe, 2017b), nace en el año 2016 la Iniciativa Latinoamericana del Cacao (ILAC), de la cual Costa Rica forma parte. Esta iniciativa promueve que el cacao fino y de aroma sea el más selecto que ofrezcan los mercados internacionales y pretende convertirlo en un elemento integrador y potenciador de oportunidades para mejorar las condiciones de vida de más de tres millones de personas involucradas en su cultivo. Considerando que una tonelada de cacao “bulk” tiene un valor promedio proyectado para el tercer trimestre del 2023 de entre 2.933 - 3.460 USD (ICCO, 2023), mientras que el cacao fino y de aroma nativo de América Latina puede oscilar entre 3.500 - 10.000 USD por tonelada (Banco de Desarrollo de América Latina, 2017a), una manera de contribuir con esta iniciativa es poder identificar las características químicas que confieren al cacao dicha denominación.

Considerando que la producción de cacao fino y de aroma que se produce en Costa Rica presenta un alto potencial para fomentar nuevamente su desarrollo, y que el 90 % de su producción se concentra en manos de pequeños productores en territorios rurales, en el año 2019 se aprobó, mediante acuerdo del Consejo Agropecuario Nacional N° 03-03-19, el Plan Nacional de Cacao, con un horizonte a 10 años. Este plan tiene la visión de incrementar la competitividad y sostenibilidad de la cadena nacional de cacao atendiendo las tres principales regiones cacaoteras de Costa Rica: Huetar Caribe, Huetar Norte y Brunca (Comisión Interinstitucional de Cacao de Costa Rica, 2018), y

visualiza, dentro del eslabón de comercialización, que el cacao costarricense y sus derivados incrementen su participación en el mercado nacional e internacional bajo el reconocimiento de “100 % fino y de aroma”, y que se reconozca su valor diferenciado por origen y calidad. Por otro lado, dentro del proceso de transformación, el plan ha definido como parte de sus acciones estratégicas, el crear protocolos de fermentación y secado basados en investigaciones formales, para el aseguramiento de la calidad del cacao en su utilización posterior (Comisión Interinstitucional de Cacao Costa Rica, 2018).

El mercado del cacao y del chocolate se diversifica cada vez más en términos de calidades diferenciadas vinculadas entre otras cosas con la sostenibilidad y sabores y aromas especiales, lo que sin duda alguna puede permitir a los países productores de cacao fino y de aroma buscar mejores precios para sus cosechas (Arvelo et al., 2017).

El cacao que se cultiva en Costa Rica, especialmente en la zona de Upala (Región Huetar Norte), está ubicado en la lista de los 50 mejores del mundo (Presidencia de la República, 2017); por esto, de la mano con las iniciativas nacionales (Plan Nacional de Cacao) y regionales (ILAC), y, con el fin de contribuir a la justa retribución económica de los productores upaleños, es importante contar con estudios científicos que permitan establecer las características aromáticas distintivas de subvariedades de cacao sembrado ancestralmente en Upala, así como su comportamiento durante las etapas clave del proceso de transformación posterior a la cosecha, como lo son la fermentación y el secado.

Pese a que se han realizado diversas investigaciones para identificar los compuestos que otorgan al cacao sus características de fino y de aroma, no se cuenta con estudios de las subvariedades upaleñas, y, conociendo la complejidad que envuelve la formación de las notas aromáticas del cacao, se considera indispensable establecer el perfil de ácidos orgánicos, compuestos volátiles y péptidos precursores de aromas claves para definir su calidad final y poder valorizar adecuadamente el cacao nacional.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Breve historia del cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L), es el fruto del árbol conocido como cacaotero, que pertenece a la familia Malvaceae. Se conocen de 20 a 22 especies del género *Theobroma*, las cuales se distinguen por el tamaño de la planta, la forma de sus hojas, el tamaño, forma y color del fruto y la semilla, y las cualidades nutritivas del grano (Avendaño et al. 2011).

Aunque hay diversas teorías sobre el lugar exacto en donde se originó la primera planta, no cabe duda de que es un cultivo autóctono del continente americano. Se ha documentado que su punto de origen se encontraba en Mesoamérica (entre México, Guatemala y Honduras), desde alrededor de 2000 años antes de Cristo, sin embargo, estudios posteriores demuestran que por lo menos una de sus variedades tiene su punto de origen en la Alta Amazonía (Colombia, Ecuador, Perú y Brasil) y que esta ha sido utilizada en la región por más de 5000 años (Arvelo et al., 2017; Enríquez, 1985; Laviana, 2007). En Costa Rica se tienen registros de que su siembra y producción se remonta a la época colonial (Comisión Interinstitucional de Cacao, 2018), y, según menciona Rojas (2017), fueron los pueblos originarios Maleku, que dominaban las regiones de Upala, Guatuso y Los Chiles, ubicadas en la zona norte del país, quienes dominaban el cultivo del cacao, principalmente para consumo propio y uso en ceremonias.

El cacao es uno de los alimentos más significativos y simbólicos, considerado por muchos como un símbolo del mestizaje, pues refleja la historia del encuentro entre el Viejo y el Nuevo Mundo. *Theobroma* es un vocablo griego que significa “alimento de los dioses” y la palabra cacao deriva del maya *cacau*: *cac* que significa rojo y *cau* que significa fuerza y fuego. Los mayas ocupaban bosques húmedos al margen del imperio de los aztecas y fueron los verdaderos productores de cacao en el tiempo de la conquista. Luego, el pueblo azteca adoptó y popularizó su cultivo, al punto de que el cacao empezó a utilizarse para intercambio (trueque) de bienes (Avendaño et al., 2011, Enríquez, 1985). La palabra náhuatl *cacahuatl* pasó al español como cacao y casi sin modificaciones del español a los demás idiomas del mundo (Ramírez, 2013). En la zona norte de Costa Rica, los Maleku lo conocen como *caaju*, fruto sagrado brindado por el dios Toku (Rojas, 2017).

Desde finales del siglo XVI hasta la actualidad, el cultivo y exportación de cacao ha sido una constante en la economía de varios países latinoamericanos (Laviana, 2007). En Costa Rica, su

cultivo se desarrolló en la segunda mitad del siglo XVII (1660), en el Valle de Matina y una parte de la producción se enviaba a mercados como Portobelo (Panamá) y Cartagena de Indias (Colombia) (Picado et al., 2017). Ante la escasez de moneda metálica, en 1709 se oficializó el uso del cacao como moneda, introduciéndolo como medio de cambio, especialmente en el comercio de víveres (Chacón, 2008).

2.2 Mercado del cacao

2.2.1 Situación mundial y regional

A nivel mundial, los países productores del continente africano (Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún) cubren cerca del 66 % de la oferta mundial, seguido de Asia (17,5 %) y América Latina (15 %) (Picado et al., 2017; Sánchez et al., 2019).

En las últimas cinco décadas el cacao ordinario ha ocupado la mayoría de la actividad cacaotera mundial, mientras que la participación del cacao fino y de aroma es de alrededor de un 5 %, siendo Ecuador y Trinidad y Tobago los principales productores (ICCO, 2021). Países como Bolivia, Costa Rica, México y Colombia son reconocidos por tener una participación de variedades de cacao fino y de aroma de entre 95 % - 100 % del total de sus exportaciones, mientras en países como Perú, Ecuador y Panamá, el cacao fino y de aroma representa entre el 50 % y el 75 % del total exportado (Arvelo et al., 2017; Carmiol, 2017).

El cultivo de cacao tiene gran importancia socioeconómica en América Latina y el Caribe ya que es uno de los principales productos de exportación, sea como materia prima o como productos procesados. Es cultivado desde México hasta Brasil y cerca del 90% es producido por pequeños agricultores en zonas rurales marginales, a baja escala, en parcelas o terrenos de menos de cinco hectáreas, en lo que se conoce como agricultura familiar (Banco de Desarrollo de América Latina, 2017b; Sánchez et al., 2019).

2.2.2 Situación nacional

A lo largo de la historia del cacao en Costa Rica se han identificado tres momentos clave. El tercer y último auge del cacao ocurrió entre las décadas de 1950 y 1960, teniéndose documentada la mayor exportación de la historia del país en el año 1962 (11 millones de kilogramos). Como mencionan Picado et al. (2017), a partir de ese momento, las exportaciones empezaron a descender, con breves

momentos de recuperación en los años de 1969 y 1972, hasta que, en 1978, con la llegada de la enfermedad de la monilia, producida por el hongo *Moniliophthora roreri*, se cerraría finalmente ese ciclo de expansión. Miembros de la Asociación de Productores de Cacao Agroambientalista de Guatuso (ASOPAC), cuentan que el impacto de la monilia fue muy grande y provocó un deterioro económico en la zona, tanto en fincas pequeñas como grandes. Sin embargo, comentan además que a partir del 2011 el cultivo ha empezado a desarrollarse nuevamente y que, en la actualidad, se manejan plantaciones con árboles criollos, híbridos y mejorados o injertados (Rojas, 2017). En la figura 1 se ilustra el comportamiento del cultivo de cacao en Costa Rica entre los años 1957 - 2014.

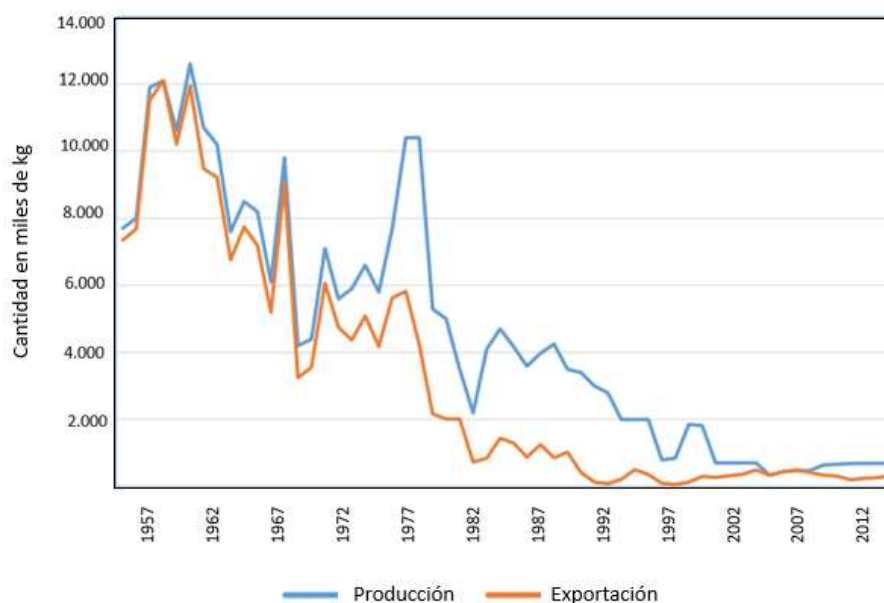


Figura 1. Producción y exportación de cacao en Costa Rica entre 1957 – 2014, en miles de kg.
Fuente: Adaptado de Porras y Picado (2017)

La calidad del cacao que se cultiva en Costa Rica es reconocida por la ICCO como 100 % fino y de aroma, lo cual es un elemento diferenciador para acceder a los mercados internacionales. Este mercado de cacaos especiales y diferenciados ha crecido en los últimos años, principalmente debido a la producción de chocolates de alta calidad que requieren materia prima con orígenes específicos en sus formulaciones para conferir el aroma, sabor o color distintivo de sus productos (ICCO, 2021).

Según PROCOMER, las exportaciones costarricenses de cacao alcanzaron 1,3 millones de dólares en el año 2021, con un crecimiento anual promedio de 3 % en el período 2019-2021. Dentro de los

principales mercados destino se encontraron: Bélgica (33 %), Panamá (25 %), Alemania (13 %) y Suiza (11 %) (PROCOMER, 2022).

2.3 Aspectos generales de la planta de *Theobroma cacao* L.

2.3.1 Árbol de cacao

Theobroma cacao es un árbol o arbusto semicaducifolio de tamaño mediano, que puede alcanzar alturas de 4 o 5 metros cuando se origina de una semilla; pero, si se ha originado de un injerto crecerá de forma lateral, no llegando nunca a alcanzar esas alturas (Echeverri, 2013).

2.3.2 Clasificación

El fruto es una baya grande conocida como mazorca, la cual puede tener diferentes formas que varían de esférica a ovalada, de color púrpura, rojiza o amarilla en la madurez. Dentro de cada mazorca por lo general se encuentran entre 20 - 50 semillas, adheridas a un eje embrionario central, al que se le da el nombre de placenta o tripa. Internamente, las semillas son de color café-rojizo, ovadas, ligeramente comprimidas, las cuales están cubiertas por una baba o mucílago blanco, que tiene un contenido de azúcares importante y que le da al cacao un sabor afrutado agradable (Dostert et al., 2017; Echeverri, 2013).

Tradicionalmente se hace referencia a tres grupos genéticos o cultivares principales conocidos como Criollo, Trinitario y Forastero (figura 2). Sin embargo, de acuerdo con Motamayor et al. (2008) existen al menos 10 cultivares genéticamente identificados.

La variedad Forastero es originaria de la cuenca amazónica y se caracteriza por tener frutos de color verde-amarillo, generalmente ovalados, amelonados y cortos, de superficie lisa, con surcos poco profundos (alrededor de 0,27 cm) y corteza gruesa, con granos pequeños, aplanados, de cotiledón oscuro o púrpura (Arvelo et al., 2017; Graziani de Fariñas et al., 2002; July, 2017;).



Figura 2. Cultivares de *Theobroma cacao* L. Fuente: Tomado de Arvelo et al. (2017).

La variedad Criollo (también conocida como nativa) fue domesticada por los pueblos precolombinos de Mesoamérica (Arvelo, 2017). Es una variedad con una gran diversidad de compuestos precursores de aromas y sabores, considerada de alta calidad, cuyo fruto se caracteriza por tener surcos profundos y corteza delgada, granos ligeramente pigmentados que, dependiendo de la subvariedad, requieren poca fermentación; su sabor es suave, delicado, dulce y aromático con notas de caramelo, miel y avellana (Arvelo et al., 2016; CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

Por otra parte, el cacao de la variedad Trinitario se generó por procesos de hibridación espontánea entre las variedades Criollo y Forastero. Debido a esto, es muy heterogénea genética y morfológicamente (Arvelo et al., 2018). Aunque se originó en Trinidad y Tobago, en la actualidad su cultivo se ha extendido en varios países de África, Asia y América y se emplea para describir varios tipos híbridos conocidos en el sector por su sabor floral y afrutado (Arvelo et al., 2016; CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

La clasificación del cacao en Criollo y Forastero no tiene base genética; se han llevado a cabo estudios de recolección de germoplasma, aunque gran parte de este no ha sido significativo en la mejora genética del cacao, debido a la poca caracterización y al desconocimiento de las relaciones entre diferentes especímenes (Arvelo et al., 2017; Durán & Dubón, 2016). La figura 3 muestra algunos de los grupos genéticos identificados en América Latina.

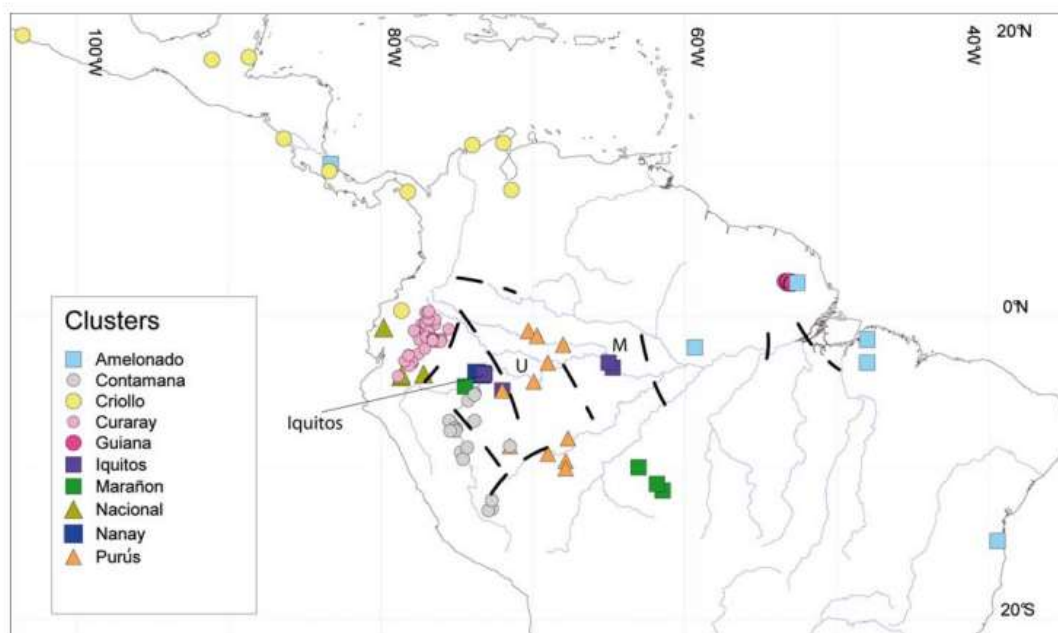


Figura 3. Grupos genéticos de cacao de América Latina. Fuente: Motomayor et al. (2008).

Desde el punto de vista comercial, el mercado mundial de cacao distingue dos categorías: el cacao en grano “fino y de aroma”, asociado con sabores y aromas específicos y utilizado para la producción de chocolates diferenciados, y el cacao en grano básico, ordinario o *bulk*, utilizado en la fabricación de manteca de cacao y de productos comerciales de chocolatería (Arvelo et al., 2017). El cacao ordinario proviene de la variedad Forastero, mientras que el cacao fino y de aroma proviene de las variedades Criollo y Trinitario (Arvelo et al., 2017; Wattnem et al., 2022).

2.3.3 Condiciones para el cultivo

Los europeos vieron el cacao por primera vez en el año 1502 y después de que fue aceptado en el Viejo Continente como un alimento indispensable, se comenzaron a trasladar semillas desde su área nativa hacia otros países. Actualmente, el cacao se cultiva en regiones cálidas y húmedas en más de cincuenta países ubicados en cuatro continentes (África, América, Asia y Oceanía) (Enríquez, 1985; Arvelo et al., 2017).

El crecimiento del árbol (brotación, floración y fructificación) está íntimamente relacionado con el lugar donde crece, los factores climáticos, el suelo y la genética (Echeverri, 2013). Para que el árbol desarrolle su máximo potencial se debe sembrar en regiones con precipitación promedio de 1150

mm y temperaturas entre los 18 y 32 °C, con temporadas secas inferiores a 3 meses, en suelos profundos, fértiles y bien drenados, ricos en materia orgánica, con altitudes por debajo de los 1300 msnm (Arvelo et al., 2017). En los primeros años el cacao requiere de mayor cantidad de sombra (60 %), pero, a medida que crece y comienza su producción, la cantidad de sombra debe disminuirse a aproximadamente un 30 % (Echeverri, 2013).

2.3.4 Mejoramiento genético

En términos generales, el mejoramiento genético busca aumentar la productividad de los árboles de cacao (Phillips-Mora et al., 2012). En la mayoría de los países se han realizado investigaciones que permiten seleccionar semillas de individuos con desempeño superior en cuanto a productividad, calidad y resistencia a enfermedades. Esto se realiza mediante la producción de semillas o por medio de clones, que consiste en la obtención de árboles idénticos (genéticamente) al padre original a partir del desarrollo de uno de sus tejidos (Arvelo et al., 2017).

Como describe la Oficina Nacional de Semillas de Costa Rica (s.f.), un clon, también conocido como variedad clonal de cacao, es un conjunto de plantas genéticamente idénticas, reproducidas en forma asexual por medio de injertos, acodos o enraizamiento a partir de estacas. La clonación permite estandarizar, preservar y reproducir las características deseables de una planta en particular, pero, pueden existir diferencias entre las plantas de un mismo clon debido a factores ambientales y de manejo.

En Costa Rica, el Programa de Mejoramiento Genético de Cacao del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ha generado variedades mejoradas usando como base la amplia diversidad genética contenida en su Colección Internacional de Germoplasma. Los clones han adquirido relevancia mundial por su aporte para combatir los efectos de la moniliasis (Phillips-Mora et al., 2012).

2.3.5 Composición del fruto

Las semillas de cacao están constituidas por una pulpa mucilaginosa que rodea los cotiledones. La pulpa contiene entre 82- 87 % de agua, 10-15% de azúcares, 1-2% de pectina y otros polisacáridos similares, 0,5-2 % de ácido cítrico y pequeñas cantidades de proteínas, aminoácidos, minerales y

vitaminas (Cocom, 2021; Rodríguez-Velázquez et al., 2022). La composición química promedio de los cotiledones difiere de la composición de la pulpa, y se ilustra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Composición porcentual promedio (g/100 g de cacao base seca) de los cotiledones de la semilla de cacao. Elaboración propia con base en Cocom (2021)

Componente	Composición (g/100 g de cacao)
Agua	32-39
Grasa	30-32
Proteína	8-12
Carbohidratos	7-9
Polifenoles	4-6
Otros	3-4

En la composición del grano de cacao influyen factores como la variedad genética, el ambiente y las técnicas de cultivo, así como el proceso de fermentación con el que inicia la transformación de la semilla (Hernández, 2018). De manera generalizada, se puede decir que el cacao es fuente importante de proteína, carbohidratos y grasas (Perea et al., 2011).

La grasa es, después de la humedad, el principal componente de las semillas frescas de cacao. Esta es rica en ácido esteárico, un ácido graso neutro no aterogénico, y en ácido linoleico, un ácido graso esencial; contiene además sustancias bioactivas, entre las que destacan polifenoles, principalmente flavanoles monoméricos [(-)-epicatequinas, (-)-catequinas]] y los oligómeros de procianidinas. Estos compuestos se encuentran en mayor proporción en el cacao crudo y durante el procesamiento se van transformando para reducir el sabor amargo y astringente, a la vez que contribuyen a la formación de precursores de aroma, asociados con notas a cacao, verdes y afrutadas (Álvarez et al., 2022; Perea et al., 2011; Vázquez-Ovando et al., 2016).

Los granos de cacao contienen entre 8-12 % de proteínas (Cocom, 2021) y están formadas por cuatro tipos principales: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en sal), prolaminas (solubles en alcohol) y gluteninas (solubles en ácidos y bases diluidas) (Bertazzo, 2010). La mayor fracción la representan las albúminas y globulinas, ambas proteínas de reserva. La vicilina (globulina) está compuesta por dos subunidades de 47 y 31 kDa más otros tres péptidos de alrededor de 15 kDa (Rawel et al., 2019). Estas proteínas sufren transformaciones durante la fermentación, secado y

tostado de los granos de cacao, dando lugar a la formación de precursores, como péptidos y aminoácidos libres, que participarán posteriormente en la formación de compuestos aromáticos (Bertazzo, 2010; Voight et al., 2016)

En cuanto a carbohidratos, se ha reportado un total de 12 - 18 % en la semilla fresca, de los cuales la sacarosa puede llegar a representar de un 2 a 3 %, y el almidón alrededor del 4 al 6 % (Cocom, 2020). La participación de los azúcares en reacciones de Maillard durante el tostado contribuye a la formación de compuestos aromáticos (Kongor et al., 2016).

2.4 Procesamiento del cacao

La naturaleza del fruto de cacao no permite su comercialización directa a gran escala, principalmente debido a la presencia de compuestos que provocan sabores amargos y astringentes y a su rápida descomposición (De Vuyst & Weckx, 2016). Por lo tanto, para poder ser comercializado se somete a procesos post-cosecha que dan lugar a la transformación de dichos compuestos. Estos tratamientos son cruciales para la calidad de los productos terminados elaborados a partir del cacao, tales como licor de cacao, manteca de cacao, cacao en polvo y chocolates (Ackah & Dompey, 2021).

La figura 4 ilustra de manera general las etapas del procesamiento del cacao hasta convertirse en los productos finales que llegan a las personas consumidoras. A las primeras etapas de la cadena de transformación se le conoce como post cosecha, beneficio o procesamiento primario.

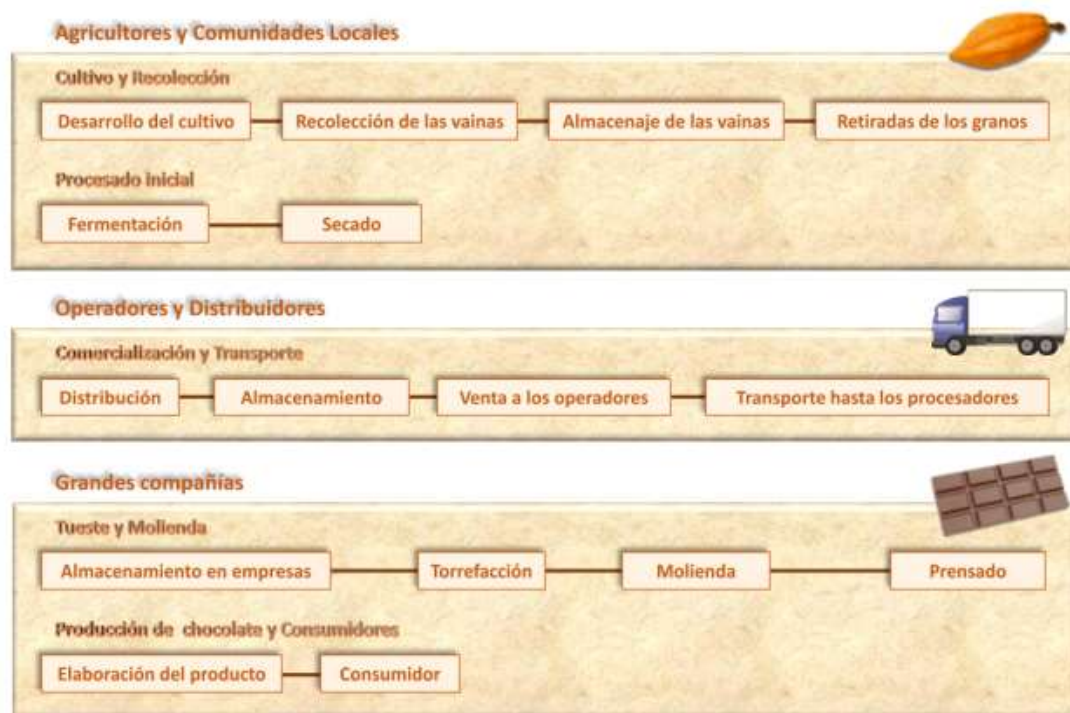


Figura 4. Etapas de la cadena de valor del cacao, desde su cultivo hasta su consumo. Fuente: Tomado de Cocom (2021).

A continuación, se presenta el detalle de estas etapas, las cuales son consideradas las más influyentes en la obtención de los compuestos precursores de aromas y sabor, así como otras características de calidad del cacao (Ackah y Dompey, 2021; Arvelo et al., 2017; Castro-Alayo et al., 2019; Marseglia et al., 2014).

2.4.1 Procesamiento primario

2.4.1.1 Cosecha

La cosecha inicia cuando la mazorca está madura, lo que ocurre en un período de 5 a 6 meses de edad desde la floración. Se recomienda cosechar solamente frutos en su estado de madurez óptima y separar las mazorcas sanas de las que se encuentren enfermas. Generalmente se presentan dos periodos de cosecha al año, los cuales corresponden, en Costa Rica, a los meses de julio a febrero, para la cosecha menor, y los meses de marzo a junio para la cosecha mayor (Arvelo et al., 2017).

2.4.1.2 Obtención del cacao en baba

Se debe primero proceder a quebrar o abrir la mazorca para poder extraer el cacao en baba, que corresponde a las semillas individuales de cacao, cubiertas por el mucílago. En esta etapa se separan las semillas de la placenta (Arvelo et al., 2017). El quebrado suele realizarse con un mazo, dando un golpe fuerte a la cáscara, aunque también se puede realizar con un cuchillo o machete invertido (Ángel, 2018).

Es importante, durante la obtención del cacao en baba, procurar que se retenga la mayor cantidad del mucílago y sus lixiviados, ya que estos contienen sustratos necesarios para la fermentación (Cocom, 2021; Voight & Lieberei, 2014). Se deben separar, además, granos cortados o vacíos (semilla sin cotiledón) (Arvelo et al., 2017).

2.4.1.3 Fermentación

La fermentación es una etapa crítica en el proceso del cacao, ya que define la formación de compuestos precursores de aromas clave. Esta etapa se lleva a cabo mediante fermentación nativa o espontánea, es decir, con la participación de la microbiota que se encuentra naturalmente en el cacao y su entorno. La fermentación ocurre en dos etapas, una primera fase anaerobia seguida de una fermentación aerobia, y, es uno de los procesos más importantes del procesamiento, ya que tiene por objetivo inducir transformaciones bioquímicas en el cotiledón que inciden en la calidad final del grano (Apriyanto, 2016; Calvo et al., 2021; De Vuyst & Weckx, 2016; García et al., 2018; Herrera-Rocha, 2021).

El pH inicial, los cambios en el contenido de azúcar y las condiciones anaeróbicas favorecen la actividad de las levaduras (Arvelo et al., 2017). Mediante secuenciamiento de ADN y espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz iones (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight - MALDI-TOF, por sus siglas en inglés), Machuca-Guevara et al. (2018) identificaron 4 cepas de levaduras en cacao fermentado, entre ellas *Pichia kudriavzevii*. Otros autores han reportado distintas especies de *Saccharomyces* entre ellas *S. cerevisiae* y *S. ludwigii*, además de *Hanseniaspora opuntiae*, *Kazachstania humilis* y varias especies de *Candida* (Cocom, 2021; Fernández-Niño et al., 2021). Esta primera fase anaerobia, que tarda entre 48 y 72 horas, es esencial para la degradación del mucílago y permitir que se difundan y desarrollen en su interior compuestos precursores de aroma, tales como azúcares reductores,

péptidos y aminoácidos libres, que dan lugar, durante el tostado, a compuestos volátiles como las pirazinas, cetonas, alcoholes, ésteres, y otros, los cuales definen la calidad del cacao fino y de aroma (Arvelo et al., 2017; Delgado-Ospina et al., 2020; Deus et al., 2021; Marseglia et al., 2014; Mori-Mestanza et al., 2021). Desde el inicio se encuentran presentes también bacterias ácido lácticas, las cuales pasan a ser preponderantes transcurridas aproximadamente las primeras 48 horas (Cocom, 2021). Algunas de las especies identificadas en cacaos fermentados son *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Pediococcus acidilactici* (Cocom, 2021; Machuca-Guevara et al., 2019;). Estas realizan principalmente tres actividades: 1) fermentan la glucosa y fructosa de la pulpa, produciendo ácido láctico y cantidades menores de etanol y ácido acético; 2) utilizan ácido cítrico, y, 3) algunas especies pueden reducir la fructosa de la pulpa a manitol (Rodríguez-Velázquez et al., 2022).

La fase aerobia inicia a partir del tercer día, cuando se permite, por medio de volteo de los granos, el ingreso de aire a la masa fermentativa. En este punto, las bacterias ácido acéticas son responsables de la oxidación de etanol a ácido acético y la posterior oxidación de este último a dióxido de carbono y agua. A partir del tercer día, el pH del mucílago aumenta por dos razones: la degradación del ácido cítrico (Apriyanto, 2016, Rodríguez-Velázquez et al., 2022), y la transformación de los azúcares en etanol y ácidos orgánicos, como el acético, los cuales difunden hacia el interior de los cotiledones, razón por la cual, al mismo tiempo, el pH interno de los granos desciende desde 6,5 hasta aproximadamente 4,5 en las primeras 24 - 48 horas desde el inicio de la fermentación (Apriyanto, 2016). En forma paralela, la temperatura de la masa fermentativa aumenta a valores de 45 - 55 °C (Belitz et al., 2009; Rodríguez-Velázquez et al., 2022).

En la figura 5 se muestra la interacción que ocurre en el proceso de fermentación del cacao entre las distintas comunidades microbianas, su relación con los compuestos precursores formados y el comportamiento del pH del mucílago (pulpa). El control de pH es importante porque influye en la actividad enzimática que contribuye a la formación de los péptidos precursores de aroma obtenidos a partir de la proteína globular vicilina a pH cercano a 5 (Calvo et al., 2021). Como se observa, el desarrollo de los compuestos aromáticos del cacao es muy complejo e implica la acción de varios microorganismos en la pulpa y cotiledones, además de la acción enzimática sobre los carbohidratos, proteínas y polifenoles (Rodríguez-Velázquez et al., 2022).



Figura 5. Proceso de fermentación de cacao: (a) Dinámica de las diferentes poblaciones de microorganismos relacionados. (b) Degradación del sustrato y cinética de producción de metabolitos de un proceso espontáneo de la fermentación. (c) Comportamiento del pH de la pulpa de dos tipos de cacao durante la fermentación. Fuente: Tomado de De Vuyst y Weck (2016) y Rojas-Rojas et al. (2020).

La figura 6 ilustra las transformaciones que ocurren durante la fermentación, tanto en el mucílago como en los cotiledones. El aumento de la temperatura generado por la conversión exotérmica anaeróbica de azúcares en etanol y dióxido de carbono y posteriormente a ácido acético por bacterias ácido acéticas, junto con la liberación de alcohol y ácidos orgánicos, provoca la muerte del embrión, convirtiendo la semilla en grano; a su vez, se liberan enzimas y sustratos que permiten continuar con el desarrollo de precursores aromáticos (Calvo et al. 2021).

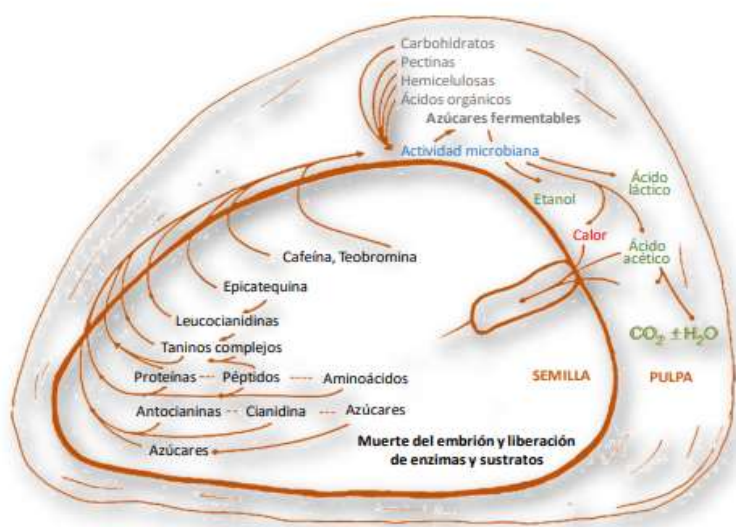


Figura 6. Eventos bioquímicos que ocurren en la semilla durante el proceso de fermentación. Fuente: Tomado de Cocom (2021)

En forma paralela, durante este proceso fermentativo, una parte de los polifenoles es eliminada directamente o degradada mediante procesos oxidativos (Calvo et al., 2021; Cocom, 2021).

Por otra parte, las proteínas y aminoácidos juegan también un rol importante en la formación de precursores de sustancias aromáticas y los péptidos formados a partir de las proteínas; por ejemplo, la presencia de fracciones de vicilina (21 kDa) se puede proponer como un indicador del adecuado grado de fermentación para procesos que involucran a las mismas variedades (Caligiari et al., 2016).







El procedimiento de fermentación varía de acuerdo con la región, inclusive con el país. En Costa Rica, la forma más usual de fermentar el cacao es utilizando cajones de madera, los cuales pueden albergar entre 350 - 750 kg de cacao en baba. Estos cajones están expuestos a temperatura ambiente y durante los primeros 3 días los granos de cacao se mantienen sin movimiento, ocasionalmente tapados con hojas de banano. Al dejarlos estáticos, se garantizan las condiciones anaerobias para la acción de las levaduras. A partir del tercer día, la masa fermentativa se empieza a remover o voltear para permitir el ingreso de aire y propiciar la acción de las bacterias ácido acéticas. Este volteo permite, además, uniformar la temperatura de la masa fermentativa y liberar el CO₂ que se ha ido formando (Teneda, 2016).

El avance de la fermentación se controla monitoreando el comportamiento de la temperatura y el pH, así como realizando una prueba de corte para ver la transformación física de los cotiledones durante la fermentación. La prueba de corte consiste en partir, mediante un corte longitudinal, un número determinado de granos, de manera que se pueda observar la máxima superficie del interior del cotiledón abierto. En el grano fermentado, el corte se puede realizar con un cuchillo bien afilado o navaja con mango; en el grano seco el corte también se puede realizar con una guillotina comercial fabricada para cortar 50 granos a la vez.

La prueba de corte al grano en las distintas etapas de la fermentación es particularmente importante a nivel de la finca productora, ya que el grado de fermentación es indicativo de la calidad del lote. Posteriormente, se debe realizar la prueba de corte a los granos fermentados y secos. Para esto, se deben cortar 300 granos por tonelada y posteriormente clasificar y contar los granos observados a plena luz del día o con una lámpara con luz equivalente. A mayor porcentaje de granos fermentados y, menor porcentaje de granos violetas, pizarrosos y/o sobre-fermentados, el sabor y aroma del cacao serán de mayor calidad (menos ácido, menos astringente y amargo o libre de sabor

indeseable) (Aguilar et al., 2016). En el cuadro 2 se muestra la clasificación que se hace al cacao fermentado y seco según la apariencia de los granos cortados. Terminada la fermentación, los granos deben estar hinchados y la cáscara con una coloración más oscura (Arvelo et al., 2017)

Cuadro 2. Clasificación y características de granos fermentados y secos mediante observación de los cotiledones tras la prueba de corte. Fuente: Adaptado de Aguilar (2016)

Clasificación	Características	Apariencia
Bien fermentado	Coloración marrón o marrón oscuro. Apariencia hinchada, no compacto. Estrías profundas, grietas o cavidades. Testa o cascarilla suelta.	
Fermentación parcial	Coloración marrón violeta	
No fermentado	Totalmente violeta. No hinchados, compactos. Ausencia de aroma.	
Sobrefermentado	Coloración marrón oscuro. Defecto serio.	
Mohoso	Moho visible a simple vista (diversos colores).	
Pizarroso	Ningún efecto de fermentación. Color pizarra (gris). Compacto, sin agrietamiento. Defecto serio.	

2.4.1.4 Secado

Al finalizar la fermentación, los granos de cacao, que tienen una humedad de entre 55 - 60 %, pasan a la operación de secado, la cual detiene la actividad fermentativa y permite que continúe el desarrollo del aroma a partir de los precursores. Además, se completan los cambios bioquímicos que suceden a la fermentación, reduciéndose la acidez y la humedad hasta valores óptimos de 7,0

– 7,5 %, y se obtiene el característico sabor y aroma a chocolate (Arvelo et al., 2017; Castro-Alayo et al., 2019).

Desde el punto de vista de estabilidad e inocuidad, la reducción del contenido de humedad controla el riesgo de alteración de los granos por microorganismos como mohos y bacterias indeseables durante el almacenamiento previo al procesamiento secundario (Cocom, 2021).

El proceso de secado inicia las reacciones de oxidación de los polifenoles, catalizadas por la enzima polifenol oxidasa, dando lugar a la reducción de la astringencia, a la formación de nuevos compuestos precursores de aromas y sabor, y a la pérdida de algunos compuestos, como el ácido acético, a la vez que induce a la formación del color café característico del cacao, mediante la formación de compuestos de Amadori, precursores necesarios para las reacciones de Maillard que se llevan a cabo en una etapa posterior (D'Souza et al., 2018; Kongor et al., 2016).

El secado debe hacerse de forma homogénea, lenta y gradual para no interrumpir la hidrólisis enzimática, ni provocar endurecimiento de la cascarilla, lo cual impediría la salida o difusión de ácidos volátiles, dando como resultado cacaos ácidos (Parra, 2014).

El cacao se ha secado ancestralmente de manera natural, por exposición al sol, dando resultados satisfactorios en términos de calidad aromática, sin embargo, este método tiene algunas desventajas, tales como el tiempo requerido, la falta de estandarización y la dependencia de factores climáticos (Cocom, 2021).

Por esta razón se han realizado estudios para evaluar alternativas tecnológicas al secado solar, usualmente utilizando temperaturas que van de 40 - 60 °C, sin embargo, hay estudios que han reportado buenos resultados con temperaturas más altas (Rodríguez-Campos et al., 2012). Por ejemplo, se han utilizado secadores rotatorios (Naranjo-Vargas et al., 2021), secadores estacionarios, generalmente de leña o gas, con bandejas perforadas y flujo forzado de aire al ingreso del secador (Parra, 2014), secado de una capa fina de granos de cacao tanto de forma natural como por medio de aire forzado (Hii et al., 2008a), y, más recientemente, secado convectivo estacionario y transitorio, con aire caliente a 60 °C, los cuales, según Chica (2022), influyen positivamente no solo en la disminución del tiempo de secado, sino en la retención de compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante potencial, el contenido de azúcares y metilxantinas, y la disminución de los ácidos orgánicos.

Si bien se han analizado distintos modelos y se ha demostrado que la cinética de secado permite reducir la humedad a valores entre 6 - 8 %, no se ha documentado suficientemente su impacto en la calidad aromática final de los granos de cacao.

2.4.2 Proceso secundario

Luego del secado, última etapa del beneficio o proceso primario, el cacao está listo para ser almacenado y distribuido como materia prima para la industria de transformación en productos de chocolatería.

2.4.2.1 Tostado

La primera operación de transformación es el tostado o torrefacción, proceso que, además de facilitar la remoción de la cascarilla de los granos, permite que en las semillas fermentadas y secas se formen productos de las reacciones de Maillard y Strecker, donde participan aminoácidos libres, péptidos y azúcares reductores, las cuales son cruciales para el desarrollo de la calidad sensorial de los granos de cacao y sus productos asociados. Además, permite seguir reduciendo las concentraciones de los ácidos volátiles (Vázquez-Ovando et al., 2016, Zapata et al., 2015); que se reduzca el contenido de compuestos indeseables y, que muchos de los precursores formados en las etapas previas de fermentación y secado se transformen en distintos compuestos aromáticos (Barišic et al., 2019; Frauendorfer & Schieberle, 2008). Se considera que esta etapa es fundamental para la liberación de la mayoría de los compuestos volátiles asociados con el perfil de aroma del cacao (Meneses et al., 2023), ya que la degradación de aminoácidos específicos por medio de Strecker, produce aldehídos con aromas únicos (Vázquez-Ovando, 2016).

Durante el tostado, los granos secos se someten a temperaturas de entre 110 - 140 °C, por tiempos que suelen ir de los 20 a los 50 minutos, según la variedad y el origen del cacao. Con respecto al tiempo, se ha demostrado que tiempos de tostado cortos (15 minutos) no son suficientes para la formación efectiva de estos compuestos, aun a temperaturas elevadas (130°C) (Vega et al., 2016).

Los compuestos más importantes formados durante el tostado del cacao son las alquilpirazinas. Esta operación permite, además, que los granos adquieran finalmente el color característico del chocolate. Al respecto, Orazc y Nebesny (2018) reportaron que a temperaturas de tostado de entre 135 y 150 °C. las reacciones de Maillard producen melanoidinas, compuestos de alto peso molecular que son responsables del color café, así como de la textura típica de los granos.

2.4.2.2 Otras operaciones del proceso de transformación del cacao en productos de chocolatería

Después del tostado se llevan a cabo distintas operaciones, según el producto final que se desee obtener. Como se mostró en la figura 4, estas pueden ser molienda y prensado, las cuales generan materias primas para diferentes productos finales.

2.5 Compuestos relacionados con el aroma

El aroma es una percepción sensorial que se detecta con los sentidos del olfato y el gusto simultáneamente, mediante lo que se conoce como percepción retronasal (Januszewska, 2018). Desde el punto de vista químico, el aroma está constituido por compuestos orgánicos que poseen bajos pesos moleculares (< 300 Da) y altas presiones de vapor, lo que facilita su liberación de la matriz en la que se encuentran (Muñoz, 2014).

El aroma y sabor están entre los atributos de calidad más importantes de los alimentos, directamente ligados a la percepción y aceptación de estos por parte de las personas consumidoras. La concentración mínima de un compuesto aromático que puede provocar una impresión de olor específica se conoce como umbral de olor (Hartmann, 2015), y permite capturar esa primera impresión que hace atractivos los alimentos. Estos atributos son el resultado de un amplio grupo de compuestos orgánicos con diferentes funcionalidades, polaridades y reactividades (Pino, 2017).

Los perfiles aromáticos de los granos de cacao están ligados a diferentes compuestos que se forman durante las etapas de fermentación, secado y tostado a partir de sustancias presentes en el grano o generadas por el procesamiento, llamadas precursoras. Cuanto mayor sea el número de dichos compuestos precursores, más complejo será el aroma general de una subvariedad específica (Meneses, 2023). Algunas de las principales sustancias precursoras de aromas del cacao son los azúcares reductores, los péptidos, aminoácidos libres y los ácidos orgánicos (Mori-Mestanza et al., 2021; Rottiers et al., 2019).

2.5.1 Compuestos volátiles

Dentro de los grupos de compuestos que dan aroma a los alimentos, los compuestos volátiles son los más importantes. Además de su bajo peso molecular y alta presión de vapor, otras características de este tipo de compuestos son su gran heterogeneidad en cuanto a estructura química (ésteres, aldehídos, cetonas, lactonas, terpenos, ácidos, compuestos azufrados), su volatilidad y polaridad, y,

el amplio rango de concentraciones en las que aparecen en los alimentos (Muñoz, 2014). Estas sustancias, junto con los compuestos que provocan los sabores, permiten despertar diversas sensaciones al consumir alimentos a pesar de estar presentes en cantidades muy pequeñas (alrededor de 10-15 mg/kg) (Belitz et al., 2009).

Se han identificado más de 600 compuestos volátiles en el cacao, sin embargo, no todos son importantes para su perfil aromático (Kongor et al., 2016). Por ejemplo, Meneses et al. (2023), mencionan que en cacao de variedades Criollo y Trinitario de México se han identificado 46 - 47 compuestos relacionados con el aroma; también que en cacao de Ecuador se han encontrado 69 compuestos relacionados. Se ha concluido a partir de diversos estudios que el tiempo de fermentación y el tipo de secado influye de manera positiva en el desarrollo de aquellos compuestos volátiles que son favorables para la calidad de un cacao fino y de aroma (Portillo et al., 2009; Xiao et al., 2017), y que la cantidad y tipo de compuestos volátiles se considera un indicador de la calidad del cacao (Kongor et al., 2016).

La mayoría de los compuestos volátiles relacionados con el aroma son ésteres, seguidos de ácidos, alcoholes, aldehídos y cetonas, además de pirazinas, aminas, pirroles, furanos y otros (Fraundendorfer & Schieberle, 2008; Meneses et al., 2023). En el cuadro 3 se muestran algunos compuestos volátiles identificados por distintos autores en muestras de cacao fermentado y seco.

Cuadro 3. Compuestos volátiles identificados en diferentes muestras de cacao.

Compuesto	Referencias (*)	Compuesto	Referencias (*)
Alcoholes		Aldehídos	
3-metil-1-butanol	[4], [9], [5]	5-metil-2-fenil-2- hexenal	[8]
2-furanmetanol	[8]	Bencenoacetaldehído	[7], [10]
2,3-butanodiol	[8], [2]	Furfural	[1], [5]
Etanol	[12], [2]	Nonanal	[10]
Ácidos carboxílicos		Cetonas	
Ácido 3-butanoico	[5]	2,3-butanediona	[11], [12]
Ácido acético	[5], [8]	Trans-isomentona	[8]
Ácido 2-metilbutanoico	[2]	2-heptanona	[6], [5], [12]
Ácido L-láctico	[6]	Cafeína	[5]
Ésteres		Pirazinas	
Acetato de 3-metil-1-butanol	[5], [2]	2,5-dimetilpirazina	[1], [8], [10]
Acetato de 2-pentanol	[6]	3-etil-2,5- dimetil-pirazina	[8]
Acetato de etilo	[9], [5], [8]	Tetrametilpirazina	[8]
Caprilato de etilo	[8]	Trimetilpirazina	[8], [2]

Notas: (*) [1] Cocom (2021), [2] Deusher et al. (2020), [4] Frauendorfer y Schieberle (2008), [5] Januszewska (2018), [6] Kadow et al. (2013), [7] Mori-Mestanza et al. (2021), [8] Otero et al. (2022), [9] Rodríguez-Campos et al. (2012), [10] Suzuki et al. (2019), [11] Hartmann (2015), [12] Rottiers et al. (2019).

2.5.2 Ácidos orgánicos

La fracción no volátil del sabor de los granos fermentados y secos está formada por compuestos fenólicos, metilxantinas y ácidos orgánicos como málico, láctico, succínico y cítrico (Chica, 2022; Lin et al., 2022). Entre los ácidos orgánicos se incluye, además, el ácido acético, el cual es volátil y está relacionado con características aromáticas específicas.

La composición de los ácidos orgánicos tiene un impacto en la calidad del grano. Como se mencionó anteriormente, el ácido cítrico disminuye en las primeras 24 - 48 horas de fermentación, por otra parte, las bacterias ácido lácticas actúan sobre los demás ácidos equilibrando ligeramente el pH de la pulpa, además, los procesos metabólicos de las bacterias ácido acéticas, provocan la generación de ácido acético permitiendo que se lleve a cabo la actividad proteolítica que contribuye a la muerte del embrión y a la formación de precursores de aroma y sabor (Barišic et al., 2019; Viesser et al., 2020).

Los ácidos orgánicos responsables del sabor ácido en el cacao se eliminan en su mayoría durante las etapas de secado y tostado. Respecto a esto último, se ha documentado que el intenso sabor agrio causado por acidez excesiva debido a la presencia de ácidos orgánicos en los granos secos es difícil de eliminar aun en etapas posteriores al secado (Hii et al., 2008b).

2.5.3 Péptidos

Las proteínas presentes en la semilla del cacao sufren transformaciones durante la fermentación, debido a las reacciones enzimáticas que provocan su hidrólisis y la consiguiente obtención de fracciones menores (péptidos) y aminoácidos libres, ambos reconocidos precursores de aroma y sabor (Kumari et al. 2016). Los péptidos pueden aportar un amplio ámbito de sabores, tales como dulces, amargos y umami (Fu et al., 2019; Temussi, 2011);

En la formación de aromas clave participan también aminoácidos libres y péptidos hidrofóbicos, los cuales reaccionan con compuestos α -dicarbonílicos, como la 2,3-butanodiona, y, mediante la degradación de Strecker, generan, cuando se someten a altas temperaturas, como en el tostado, pirazinas, compuestos volátiles asociados con aromas clave en cacao (Gallardo, 2008; Granvogl et al., 2012; Rodríguez-Campos et al., 2012; Toker et al., 2020).

Cuando metabolitos formados en la fermentación, tales como etanol, ácido láctico y ácido acético, difunden hacia el interior del grano, la acción de enzimas proteolíticas facilita la degradación de las proteínas más abundantes, las cuales son albúmina y vicilina (D'Souza et al., 2018). Estudios realizados demuestran que los péptidos derivados de la proteólisis de la proteína trimérica vicilina (conocida como 7S), son precursores esenciales de compuestos volátiles específicos que proporcionan notas aromáticas de nuez, tostado y chocolate, y, que su formación depende del pH, ya que se generan a pH entre 4,4 - 5,2 (Kratzer et al., 2009; Voigt et al., 2018).

Desde finales del siglo XX, autores como Mohr et al. y Ziegleder y Biehl (citados en Voigt & Lieberei, 2014) mencionaban que el típico sabor a cacao se obtenía por la formación de fracciones peptídicas en cacao fermentado y tostado en presencia de aminoácidos libres, azúcares reductores y otros compuestos precursores formados durante la fermentación.

A medida que avanza la fermentación, los péptidos se van transformando hacia fracciones más pequeñas, lo cual se evidencia por el cambio en los perfiles de abundancia de diferentes fracciones proteicas (Buyukpamukcu, 2001).

Se han aislado e identificado alrededor de 40 péptidos de diferentes muestras de cacao bien fermentado (Marseglia et al., 2014); además, se han caracterizado algunos péptidos individuales relacionados con notas aromáticas específicas de algunas subvariedades mediante hidrólisis ácida inducida y posterior identificación por MALDI-TOF (Voigth et al., 2016).

2.6 Métodos de análisis

2.6.1 Compuestos volátiles

2.6.1.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (Gas Chromatography, GC por sus siglas en inglés) permite la separación de mezclas complejas de sustancias que cumplan los siguientes requisitos: alta termoestabilidad, volatilidad mediana o alta y peso molecular no superior a 400-450 kDa (Stashenko & Martínez, 2010).

La elución se produce por el flujo controlado de una fase móvil de gas inerte y los compuestos se separan con base en el tiempo que necesita cada componente para aparecer al final de una columna empacada (fase estacionaria) que puede ser un sólido o un líquido que recubre un sólido. A

diferencia de otros tipos de cromatografía, en la GC la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito (Zumbado, 2021).

La separación de los compuestos volátiles presentes en la muestra se basa en la diferente interacción de estos con la fase móvil y estacionaria, la cual puede ser de dos tipos: adsorción (cromatografía gas-sólido) o partición (cromatografía gas-líquido) (Corzo, 2019). Para compuestos volátiles, la GC más utilizada es la de adsorción (Zumbado, 2021). En esta, la muestra es introducida en un puerto de inyección, desde el cual será volatilizada y luego eluída por el gas inerte a través de la fase estacionaria. Dependiendo de su volatilidad y polaridad, los compuestos serán retenidos durante tiempos diferentes en el interior de la columna. A la salida, se cuenta con un detector que permite realizar la identificación o cuantificación de los distintos compuestos (Corzo, 2019).

Una de las técnicas más utilizadas para la extracción de la muestra en el análisis de compuestos volátiles de alimentos es la microextracción en fase sólida (Solid Phase Micro Extraction, SPME, por sus siglas en inglés), que fue desarrollada para cromatografía de gases (GC) en 1990; tiene entre sus ventajas que se emplea muy poca cantidad de muestra y no se utilizan disolventes. Aquí la fase estacionaria está contenida en un finísimo capilar similar a una jeringa (de diámetro interno en el orden de los micrómetros) que contiene una fibra que permite separar los compuestos volátiles contenidos en la muestra molida finamente y que son directamente extraídos y concentrados en el recubrimiento de la fibra para su posterior desorción térmica e inyección en el cromatógrafo (Nielsen 2010; Zumbado, 2021). En el caso de analitos volátiles en muestras líquidas y sólidas, la extracción se puede realizar tanto por espacio de cabeza (Head Space – HS por sus siglas en inglés) como por inmersión directa (Salamero, 2017). En la figura 7 se muestra de manera esquemática los pasos para realizar la cromatografía gaseosa por HS-SPME.

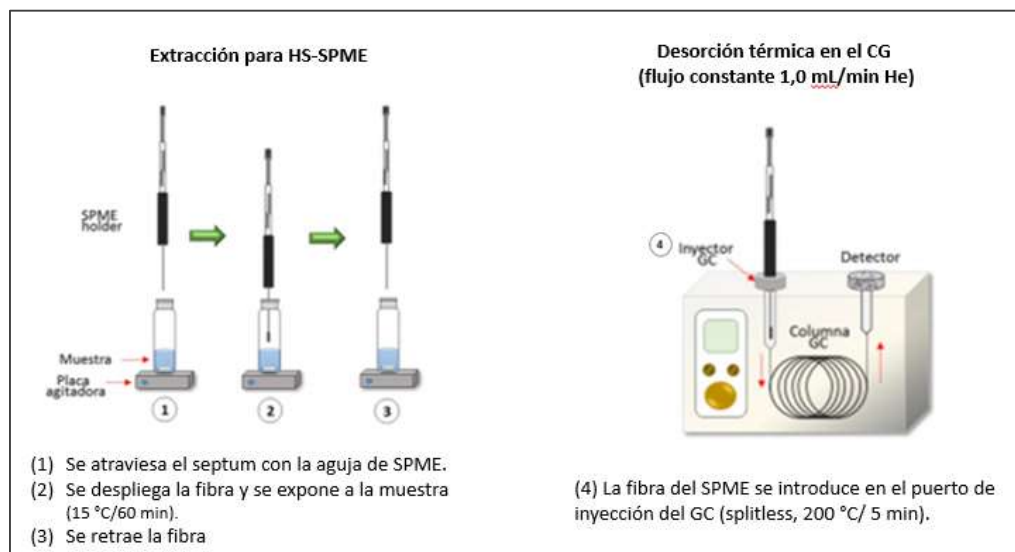


Figura 7. Esquema de inyección de muestra por HS-SPME-GC. Fuente: adaptado de Ríos (2017)

Al ser SPME una técnica de equilibrio, la calidad de la separación dependerá, en gran medida, de la composición de la muestra y del control cuidadoso de todos los parámetros, siendo uno de estos el tipo de fibra utilizada y el control de su vida útil (Nielsen, 2010).

2.6.1.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (Mass Spectrometry – MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que permite determinar, de forma cualitativa y cuantitativa, la masa molecular de una muestra, en relación con su masa (m) y carga (z) (Ruiz, 2020).

Todo espectrómetro de masas está constituido por tres elementos o partes esenciales: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector. Inicialmente la muestra es volatilizada mediante aplicación de calor en una cámara de alto vacío y luego es bombardeada con electrones para cargar las moléculas mediante la pérdida de un electrón, fragmentándose y dando como resultado iones con diferente carga y masa. Posteriormente estos pasan por un acelerador de iones y entran a un campo magnético que determina su trayectoria; los iones con carga son desviados y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos o magnéticos. Los haces de iones de igual relación masa/carga (m/z) impactan en el detector, el cual determina su intensidad. Los iones más pequeños llegarán más rápido al detector que enviará una señal eléctrica que es convertida en un gráfico (cromatograma), permitiendo así analizar el compuesto mediante los patrones de fragmentación y sus relaciones m/z apropiadas, detectado la presencia,

cuantificación y estructura química del analito (Ruiz, 2020; Zumbado, 2021). En la figura 8 se muestra el esquema de un espectrómetro de masas.



Figura 8. Esquema conceptual de un espectrómetro de masas. Fuente: Tomado de Zumbado (2021).

2.6.1.3 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

La espectrometría de masas (MS) se ha convertido en un método rutinario en muchos laboratorios analíticos y probablemente su aplicación más común sea la interfaz o acoplamiento con la cromatografía de gases (GC) la cual permite la identificación y cuantificación de moléculas orgánicas volátiles (Nielsen, 2010). En este caso, los espectros de los compuestos se recolectan a medida que salen de la columna cromatográfica y se almacenan en una computadora para el siguiente proceso (Skoog et al., 2008).

El equipo de GC-MS puede proporcionar información de cientos de espectros en un corto tiempo, cada uno de ellos formado por decenas o cientos de picos, los cuales pueden ser visualizados en tiempo real. La identificación de un compuesto a partir de su espectro de masa requiere buscar en bases de datos (o librerías) de espectros de los compuestos puros hasta que el analito de interés, en este caso los distintos compuestos volátiles, coincida con alguno de los picos (Skoog et al., 2008). Algunas de las librerías más utilizadas son Apps Lab Library de Thermo Scientific (la que se utilizará en este estudio, instalada en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), NIST Chemistry WebBook y SDBS Spectral Data Base System for Organic Compounds (Universidad de Sevilla, sf).

La figura 9 muestra un ejemplo de cromatograma de compuestos volátiles en cacao y el espectro de masas respectivo para el pico (compuesto) con un tiempo de retención (TR) de 16,13 minutos, obtenido por GC-MS y búsqueda en la base de datos Apps Library.

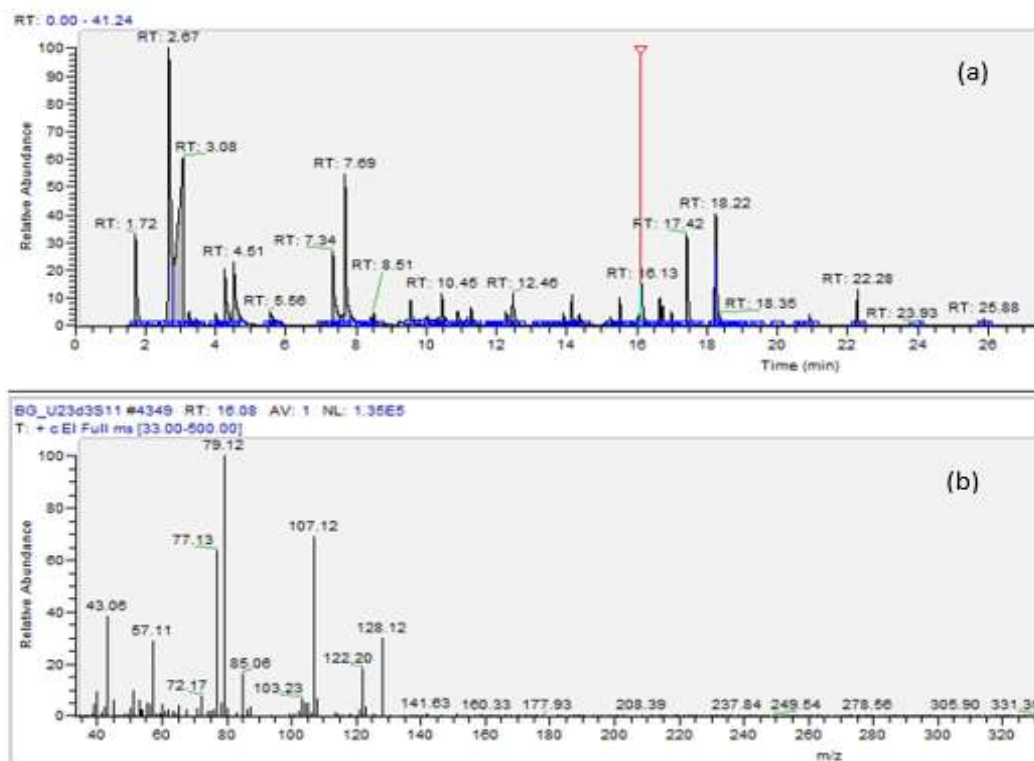


Figura 9. (a) Cromatograma de compuestos volátiles presentes en granos de cacao tostado y (b) el espectro de masas correspondiente a un tiempo de retención de 16,13 minutos. Fuente: Elaboración propia

2.6.2 Ácidos orgánicos

Para el análisis de ácidos orgánicos se emplean distintos métodos cromatográficos, entre ellos cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography –HPLC, por sus siglas en inglés), acoplada a distintos sistemas de detección.

2.6.2.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En cuanto a la HPLC, esta utiliza una pequeña cantidad de muestra (del orden de los μL), la cual es eluída por la fase móvil a través de pequeñas columnas, rellenas con materiales especialmente preparados, por el efecto de altas presiones (Corzo, 2019). Por lo general, este tipo de cromatografía

se utiliza para separar mezclas complejas de sustancias de procedencia diversa, compuestos con presión de vapor baja o alto peso molecular, que no pueden separar por GC (Zumbado, 2021). En el caso de ácidos orgánicos, la columna que se utiliza es de intercambio iónico (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos [CITA], 2019).

Uno de los sistemas de detección más utilizados en el detector de diodo Array (DAD por sus siglas en inglés), conocido también como detector de arreglo de diodos, cuyo sistema electrónico permite de forma continua y simultánea captar varios espectros de absorción en la región UV-Vis en una fracción de segundo (Zumbado, 2021).

En la figura 10 se muestra un esquema general del funcionamiento de un cromatógrafo de HPLC.

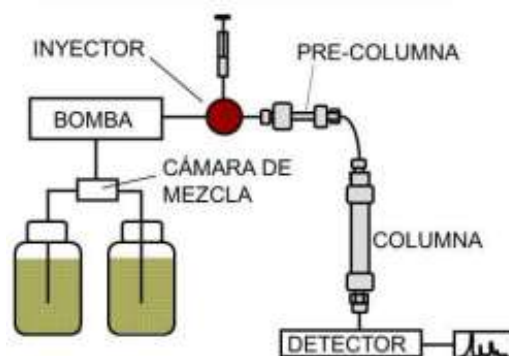


Figura 10. Esquema general básico de un equipo para HPLC. Fuente: Tomado de Corzo (2019).

2.6.3 Péptidos

El análisis de péptidos y proteínas se puede realizar utilizando varias técnicas, dependiendo de los objetivos del estudio y su alcance (cualitativo, cuantitativo).

2.6.3.1 Electroforesis

La electroforesis es una técnica que permite separar biomoléculas (generalmente ácidos nucleicos o proteínas) según su movilidad relativa en un campo eléctrico sobre una matriz porosa, cuya composición depende de la molécula a analizar (Montalbo & Lugo, 2019). La separación electroforética de proteínas se hace empleando un gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis – PAGE por sus siglas en inglés), ya sea en dos dimensiones (2D-PAGE) o en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Ambas técnicas permiten determinar de manera

aproximada la cantidad de proteína presente, o bien, conocer sus pesos moleculares, teniendo sin embargo la limitación de que no revela la identidad de las proteínas o péptidos separados (Cid, 2016; Lomonte, 2020).

Cuando el interés es conocer la transformación que sufren las proteínas durante la fermentación para dar lugar a la formación de péptidos precursores de aroma, las técnicas de PAGE resultan convenientes, ya que permiten determinar el peso molecular de las fracciones proteicas presentes en las distintas etapas del proceso de una manera rápida y efectiva. Según menciona Lomonte (2020), la más utilizada es la SDS-PAGE, ya sea para analizar mezclas de proteínas o para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia.

Diversos autores han utilizado esta técnica para estudiar preliminarmente la evolución de las proteínas del cacao durante el proceso primario; por ejemplo, Voigt et al. (2018) la utilizaron para estudiar la proteína globular vicilina (7S) purificada y parcialmente purificada por enzimas que participan en la fermentación del cacao, y Kumari et al. (2016) la aplicaron para visualizar los péptidos precursores de aroma formados a lo largo de 6 días de fermentación de una variedad específica de cacao.

En la técnica de SDS-PAGE, las proteínas extraídas de la muestra se mezclan con el detergente SDS, que desnaturaliza estructuras secundarias y terciarias, formando complejos desnaturalizados con carga negativa, los cuales se separan de acuerdo con su peso molecular: a mayor tamaño, menor movilidad de la proteína y viceversa. De manera simultánea, se corre un patrón marcador con proteínas de peso molecular conocido, lo cual permite posteriormente interpolar para obtener el peso de las bandas incógnitas (Lomonte, 2020; Montalbo & Lugo, 2019).

Para llevar a cabo la corrida electroforética se utilizan comúnmente un sistema de mini-geles, que consiste de una cámara como la mostrada en la figura 11 en la que se colocan los geles de poliacrilamida con una cierta cantidad de carriles para colocar las muestras; en uno de ellos se debe colocar un patrón marcador con fracciones proteicas de peso molecular conocido que permitirá, por interpolación, obtener el peso molecular de las proteínas presentes en la muestra. Los geles se colocan dentro de una cámara a la que se le añade un buffer y una vez que se conecta a una fuente de poder se inicia la separación.



Figura 11. Equipo para correr mini geles de PAGE: (1) Cámara de electroforesis para corrida vertical, (2) Accesorios para chorrear los mini geles, (3) Peines para definir el número de carriles (cantidad de muestras), (4) Conexión a la fuente de poder. Imagen tomada de https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5535.pdf

Tal y como se muestra en la figura 12, el resultado de la separación electroforética por SDS-PAGE se visualiza luego de la decoloración del gel que fue previamente teñido con un colorante, donde cada columna o carril corresponde a una muestra diferente y cada banda coloreada corresponde a una proteína o péptido; la cuarta columna de izquierda a derecha es la del patrón marcador con proteínas de peso molecular conocido, que permite luego, por interpolación, obtener el peso molecular de las proteínas presentes en la muestra.

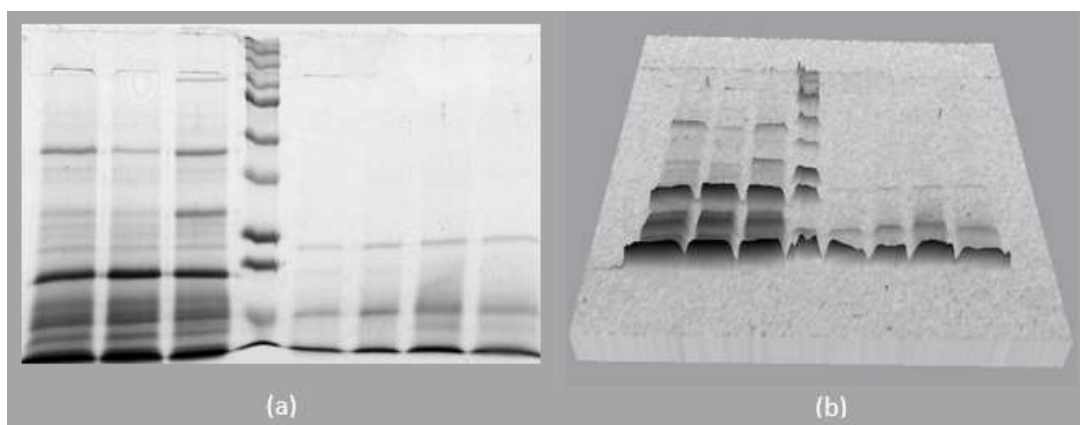


Figura 12. Péptidos visualizados por SDS-PAGE en una muestra de cacao: (a) Imagen bidimensional convencional. (b) Imagen tridimensional. Fuente: elaboración propia.

2.6.3.2 Otras técnicas de identificación y cuantificación

Por otro lado, las proteínas o sus fracciones se pueden cuantificar mediante técnicas de inmunoensayo, como la técnica ELISA, basada en la detección de conjugados de un antígeno o anticuerpo con una enzima inmovilizados en una fase sólida. También se pueden utilizar metodologías desarrolladas utilizando HPLC acoplada a espectrometría de masas, espectrometría de masas molecular por ionización por electrospray (ESI-MS) o por MALDI-TOF (Cid, 2016).

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto de diferentes tiempos de fermentación y tipos de secado de tres subvariedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) de cultivo ancestral, una subvariedad introducida desde Talamanca y una mezcla de clones de alta productividad, todas cultivadas en Upala, Costa Rica, sobre el contenido de ácidos orgánicos, el perfil de compuestos volátiles y la formación de péptidos precursores de aroma para la determinación de la sinergia de estos factores en la calidad final.

Objetivos específicos:

1. Analizar el efecto de tres tiempos de fermentación sobre los ácidos orgánicos, el perfil de compuestos volátiles y péptidos de tres subvariedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) de cultivo ancestral, una subvariedad introducida desde Talamanca y una mezcla de clones de alta productividad, todas cultivadas en Upala, Costa Rica.
2. Analizar el efecto de dos velocidades de secado con aire de flujo transversal y del secado por circulación continua de aire caliente sobre el contenido de ácidos orgánicos, el perfil de compuestos volátiles y de péptidos de tres subvariedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) de cultivo ancestral, una subvariedad introducida desde Talamanca y una mezcla de clones de alta productividad, todas cultivadas en Upala, Costa Rica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se presenta la metodología empleada para el desarrollo de la investigación.

4.1 Localización y contexto del estudio

Este estudio es parte del proyecto inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR) denominado “Estudio del efecto de tiempos de fermentación y velocidad del aire de secado de subvariedades de cacao de cultivo tradicional en Upala, Costa Rica, y de un clon de cacao de alta productividad sobre sus características fisicoquímicas y sensoriales, para aumentar las ventajas competitivas en el mercado cacaotero”, con el código 735-C2-513. El proyecto se financió con fondos del Programa Hélice UCR, bajo la modalidad colaboración Universidad-Sector Externo, por medio de la cooperación binacional entre la República de Costa Rica y la República de Corea.

El cacao se trasladó en mazorca desde la zona productora de Upala hasta las instalaciones de la planta piloto del CITA, donde se realizó el proceso de fermentación y la operación de tostado. El secado se llevó a cabo en los laboratorios de procesamiento de alimentos de la Escuela de Tecnología de Alimentos (ETA) y del Centro de Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), ambos de la Universidad de Costa Rica. La reducción de tamaño del grano, así como su descascarillado se realizaron en el laboratorio de procesamiento de cacao del CITA.

Los análisis de ácidos orgánicos, compuestos volátiles y péptidos se realizaron, respectivamente, en el laboratorio de química del CITA, Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) e Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica.

4.2 Materias primas

El cacao fue proporcionado por una empresa procesadora de Upala, Alajuela, que adquiere el fruto de productores orgánicos de la zona. Para cada corrida se recibió una muestra de aproximadamente 200 kg de mazorcas de cacao, recién cosechadas en su grado de madurez óptimo, las cuales se almacenaron a temperatura ambiente por un tiempo máximo de 48 horas hasta su procesamiento.

Las subvariedades provienen de las fincas de productores que venden cacao orgánico a dicha empresa y se procesaron por separado. Tres de estas subvariedades son de los árboles que se han reproducido por casi un siglo en Upala (subvariedades híbridas criollo-trinitario de cultivo ancestral); la cuarta subvariedad es reproducida en la zona, pero fue trasladada hace varias décadas desde

Talamanca, Limón, de donde es originaria. La quinta subvariedad corresponde a una mezcla de clones de alta productividad desarrollados por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), altamente distribuida en las zonas productoras del país. Esta mezcla está compuesta por los siguientes clones: R1, R4, R6, CSC195, PNCT158, CCI37, injertados sobre patrón criollo. En el cuadro 4 se detalla la identificación y descripción de cada una de las cuatro subvariedades y de los clones.

Cuadro 4. Descripción e identificación de las cinco subvariedades estudiadas

Identificación de la subvariedad	Descripción
Umm	Híbrida criollo-trinitario sembrada ancestralmente en Upala. Proveedor 1
Ucs	Híbrida criollo-trinitario sembrada ancestralmente en Upala. Proveedor 2
Uea	Híbrida criollo-trinitario sembrada ancestralmente en Upala. Proveedor 3
TU	De origen Forastero cultivado en Upala, pero trasladada desde Talamanca, de donde es originaria. Proveedor 2
CL	Mezcla de clones de alta productividad del CATIE. Proveedor 4

Se realizaron tres repeticiones del proceso para cada subvariedad de cacao, por lo que en total se recibieron 15 lotes de 200 kg de mazorcas cada uno.

4.3 Procesamiento del cacao

A continuación, se describen las etapas llevadas a cabo para el procesamiento del cacao y obtención de las muestras a analizar. El proceso a nivel piloto inició con la extracción manual de las semillas para obtener el cacao en baba, luego se procedió con el flujo de proceso que se muestra en la figura 13.

4.3.1 Apertura de mazorcas y extracción de las semillas.

Las mazorcas de cacao se abrieron golpeándolas con un mazo, luego se desgranaron de forma manual, asegurando que las semillas se separaran de la placenta y que se descartaran aquellas en las que se observó germinación del embrión, olor o coloración anormal, o semillas vacías.

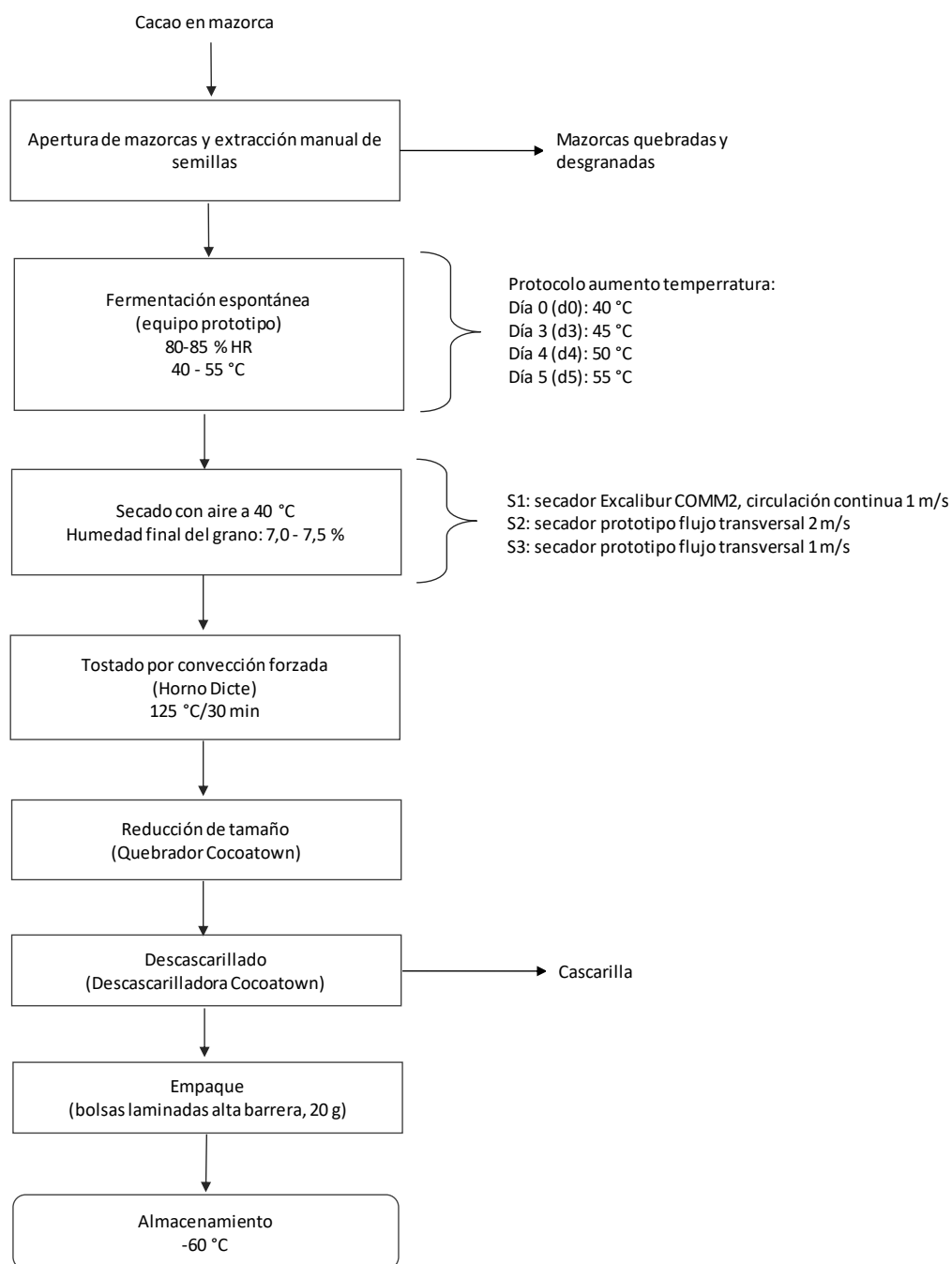


Figura 13. Diagrama de elaboración de nibs de cacao a nivel piloto. Elaboración propia.

4.3.2 Fermentación

Se utilizó una cámara de fermentación rectangular con espacio para dos cajones de fermentación, con una compuerta de cierre hermético que se adaptó para poder controlar la humedad relativa y la temperatura interna de lotes pequeños (aproximadamente 50 kg) de fermentación de cacao. La cámara de fermentación se programó a una humedad relativa de 80 - 85 %, condición ambiental promedio de la zona productora de Upala.

El cacao en baba se colocó en cajas fermentativas de madera de laurel, con un diseño a escala, similar al que se utiliza tradicionalmente en las fincas productoras. La dimensión de las cajas es de 40 cm x 30 cm x 30 cm, con aberturas laterales, así como orificios en el fondo para la salida de los líquidos lixiviados; las cajas se apoyaron sobre una base de aproximadamente 6 cm de alto dentro de una bandeja donde se recolectan los lixiviados evitando su contacto directo con el fondo de la caja. Previo a introducir el cacao en baba, en cada caja se colocó una manta prelavada con gramaje de 140 g/m², con la cual se envolvió el cacao.

La fermentación fue espontánea o natural, sin la incorporación de cultivos iniciadores. Las cajas se introdujeron a la cámara fermentadora, que se programó inicialmente a 40 °C. Se monitoreó la temperatura interna de la masa fermentativa a lo largo de los distintos días del proceso de fermentación mediante 4 termopares acoplados a un termo registrador, para obtener el perfil de temperaturas durante el proceso en diferentes secciones de las cajas.

Las cajas se mantuvieron en la cámara fermentadora durante 6 días. En los primeros 3 días el cacao permaneció en reposo mientras transcurrió la fase de fermentación anaerobia; al tercer día, se aumentó la temperatura de la cámara a 45 °C y se empezó con el volteo, dos veces al día, de los granos para propiciar el inicio de la fase de fermentación aerobia. El volteo se realizó dos veces al día hasta el día 5. Al sexto día se detuvo el proceso de fermentación. Según se indica en el diagrama de la figura 13, la temperatura se subió el día 4 a 50 °C y el día 5 a 55 °C.

Las temperaturas para programar la cámara durante los 6 días de fermentación se definieron mediante pruebas preliminares para poder mantener la temperatura de la masa fermentativa a lo largo del tiempo, ya que, cuando se trata de cantidades pequeñas de granos, es posible que el calor se disipe dando lugar a una fermentación poco satisfactoria (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015; Nielsen et al., 2013). Cuando se fermentan grandes cantidades (500 kg), los granos alcanzan temperaturas

cercanas a los 50 °C, pero, en cantidades pequeñas, como es el caso de este estudio, el volteo para airear podría impedir que las temperaturas alcancen los 55 °C óptimos para una fermentación completa.

Para evaluar visualmente el avance de la fermentación se tomaron muestras de 5 - 7 granos al día 3, 4, 5 y 6. La evaluación se hizo mediante una prueba de corte del grano comparando la forma y coloración para observar la presencia de estrías internas bien definidas (Aguilar, 2016; CAOISCO/ECA/FCC, 2015). También se hizo un monitoreo del pH, midiéndolo directamente en la masa fermentativa.

Para el estudio del tiempo de fermentación se definió analizar los granos el día 3, 5 y 6. Estos tiempos se establecieron con base en las fases de la fermentación del cacao y sus efectos sobre el aroma.

Para determinar el día final de fermentación, se consideró que en la zona productora de Upala, el cacao se fermenta por un tiempo total de 6 días; este tiempo máximo de fermentación es el mismo que utilizan en otros países y ha sido documentado en diversos estudios como el tiempo óptimo para obtener un perfil de aroma y sabor de calidad (Fernández-Niño et al., 2021; Santander et al., 2020). El día 5 se seleccionó porque se consideró que, en un proceso de fermentación controlado, algunas subvariedades podrían requerir menos tiempo, y es importante tratar de captar, observando el comportamiento de los compuestos relacionados con el aroma, si este es el caso de las subvariedades de cacao estudiadas.

4.3.3 Secado

Para evaluar el impacto de diferentes tipos y tiempos de secado sobre la formación de compuestos volátiles, el contenido de ácidos orgánicos y péptidos precursores de aroma, los granos fermentados fueron sometidos a tres diferentes procesos de secado: circulación continua de aire caliente en un secador de bandejas comercial dos zonas, marca Excalibur modelo COMM2 como el que se muestra en la figura 14a (identificado como S1), aire forzado de flujo transversal con velocidad de 2 m/s en un secador prototipo cuyo esquema se muestra en la figura 14b (identificado como S2), y aire forzado de flujo transversal con velocidad de 1 m/s en un secador prototipo con el mismo principio del S2, pero incorporado dentro de un silo (identificado como S3).

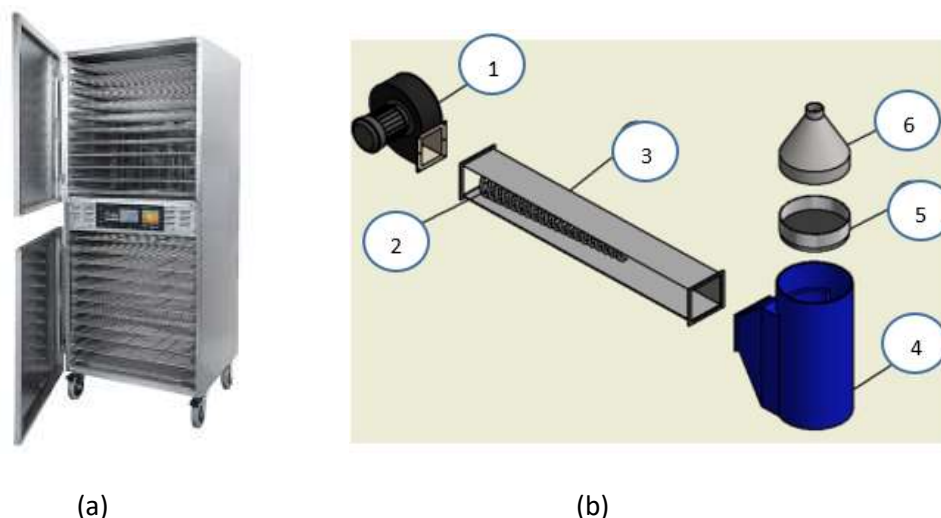


Figura 14. (a) Imagen del secador de circulación continua de aire caliente (S1) marca Excalibur. (b) Representación esquemática del secador prototipo de flujo transversal a 2 m/s. (S2) y sus partes: (1) Ventilador centrífugo. (2) Resistencia eléctrica. (3) Ducto de aire. (4) Homogenizador. (5) Tamiz. (6) Salida de aire. Fuente: (a) Tomado de <https://excaliburdehydrator.com/products/comm2-excalibur-2-zone-commercial-dehydrator#specs> (b) Tomado de Vargas (2019).

El secado con circulación continua de aire caliente se aplicó a muestras fermentadas los días 3, 5 y 6. Las bandejas conteniendo los granos se rotaron de posición cada 24 horas, con el fin de permitir una adecuada y homogénea distribución del calor y garantizar una muestra representativa. Para el secado con flujo transversal, como los dos secadores prototipo son de baja capacidad, no fue posible realizar el secado a muestras de tres tiempos de fermentación, por lo que se definió secar muestras con 3 y 6 días de fermentación.

Se consideró que el tercer día es clave ya que marca el final de la fermentación anaerobia y el principio de la fermentación aerobia; en cuanto al sexto día, de acuerdo con los procedimientos de los productores de Upala, este es el tiempo final de la fermentación artesanal.

En los tres casos se utilizó una temperatura de la cámara de secado de 40 °C y el proceso se llevó a cabo por el tiempo necesario para obtener una humedad final de entre 7,0 - 7,5 %.

Las muestras secas se empacaron temporalmente en bolsas laminadas de alta barrera a la humedad conformadas por un coextruido de polietileno de alta densidad, polietileno de baja densidad y EVOH (etileno-vinil alcohol). Las muestras se mantuvieron en congelación (temperatura mínima de -60 °C) hasta la siguiente etapa.

4.3.4 Tostado

Esta operación se realizó en un horno de convección de aire caliente, marca Dicte, a una temperatura de 125 °C por un tiempo de 30 min, constante para todas las muestras. Estas condiciones se consideran un tostado leve a medio.

Para realizar el tostado, los granos de cacao secos se colocaron en bandejas de acero inoxidable, perforadas para facilitar el flujo del aire caliente.

4.3.5 Reducción de tamaño y descascarillado de los granos

Una vez tostados, a los granos de cacao se les eliminó la cascarilla con una descascarilladora marca *Cocoatown*, manteniendo totalmente abierta la boquilla de la entrada de aire del soplador.

Para la reducción de tamaño de los granos se utilizó un equipo quebrador de la misma marca. El producto obtenido son los denominados *nibs*.

4.3.6 Empaque de muestras

Para cada repetición, cada tiempo de fermentación y cada tipo de secador se pesaron muestras de 20 g de *nibs* de cacao. Las muestras obtenidas se empacaron en las bolsas laminadas de alta barrera antes mencionadas y se mantuvieron en congelación, a temperatura de -60 °C, hasta su correspondiente análisis.

4.4 Metodología objetivo 1: efecto del tiempo de fermentación

Para evaluar el efecto del tiempo de fermentación sobre cada una de las cuatro subvariedades de cacao y de la mezcla de clones de alta productividad, se aplicó el proceso de fermentación descrito en el punto 4.3.2. El estudio se realizó en muestras con 3, 5 y 6 días de fermentación, secadas por circulación continua de aire caliente (secador S1).

4.4.1 Preparación de las muestras

Para el cacao en baba, los análisis de proteína, humedad, acidez total y ácidos orgánicos se realizaron a las semillas completas (mucílago más cotiledones).

La preparación de las muestras del cacao procesado se realizó de dos formas diferentes, dependiendo de las variables respuesta a analizar.

Para el análisis de péptidos, se requirió, según se describe más adelante, realizar pruebas preliminares para la adaptación del método SDS-PAGE a la matriz de cacao. Una vez definidos los parámetros para las pruebas definitivas se decidió realizar el análisis a muestras de cacao sin tostar, y, debido a la disponibilidad de muestras, el análisis se realizó solamente a un lote de cada subvariedad.

El efecto de los distintos tiempos de fermentación (días 3, 5 y 6) en el contenido de ácidos orgánicos y el perfil de compuestos volátiles se analizó en los *nibs* de cacao obtenidos para tres lotes de cada subvariedad (tres repeticiones).

4.4.2 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado para el efecto de la fermentación fue de bloques completos al azar, con dos factores, donde uno es la subvariedad de cacao y, el otro es el tiempo de fermentación (3, 5 y 6 días secados en el secador S1). Los bloques corresponden a días de cosecha que se tomaron al azar de los productores que entregan el fruto en la empresa transformadora del cacao. Las variables respuesta fueron el contenido de ácidos orgánicos (g/100 g de cacao), perfil de compuestos volátiles (presencia y abundancia relativa con base en el área de los picos obtenidos en el cromatograma) y la cantidad y peso molecular de los péptidos presentes.

4.5 Metodología objetivo 2: efecto del tipo de secado

Para evaluar el efecto del tipo y velocidad de secado sobre cada una de las cuatro subvariedades y la mezcla de clones de alta productividad, el cacao fermentado del día 3 y el día 6 se sometió al proceso de secado descrito en el punto 4.3.3. Para cada uno de los secadores (S1, S2 y S3) se tomaron muestras de 2,5 kg. El proceso de secado se detuvo en el momento en que los granos alcanzaron una humedad final entre 7,0 - 7,5 %.

4.5.1 Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon de la misma forma descrita en el punto 4.4.1.

4.5.2 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado para el efecto del secado fue de bloques completos al azar, con tres factores, los cuales son: las cinco subvariedades antes mencionadas, los tres tipos de secado (secador de flujo transversal con 2 velocidades (1 y 2 m/s) y secador de bandejas de circulación

continua de aire caliente, a una temperatura de 40 °C) y los dos días de fermentación (3 y 6 días). Los bloques corresponden a días de cosecha que se tomaron al azar de los productores que entregaron cacao en la empresa. Las variables respuesta fueron el contenido de ácidos orgánicos (ácidos cítrico, málico, succínico, láctico, acético), el perfil de compuestos volátiles y péptidos.

4.6 Métodos de análisis

4.6.1 Proteína y humedad cacao en baba

El análisis de proteína para el cacao en baba se realizó en el Laboratorio de Química del CITA, mediante prestación de servicios, utilizando el método acreditado P-SA-MQ-003 (CITA, 2021a).

El análisis se realizó por triplicado utilizando el método Kjeldahl. Se tomaron 0,7 – 2,2 g de muestra molida, a la que se le agregaron 3 gotas de antiespumante. La digestión de la muestra se realizó a 420 °C durante 1,5 h. El porcentaje de nitrógeno obtenido se convirtió a proteína cruda multiplicando por un factor de 6,25 (CITA, 2021a).

El análisis de humedad se realizó en el Laboratorio de Química del CITA, mediante prestación de servicios, utilizando el método acreditado P-SA-MQ-002 (CITA, 2021b).

El análisis se realizó por triplicado; el método gravimétrico utilizado consiste en la medición de la pérdida de masa debida a la evaporación de agua en una estufa de vacío o de convección natural (CITA, 2021b).

4.6.2 Acidez total

El análisis se realizó en el Laboratorio de Química del CITA mediante prestación de servicios, utilizando el método acreditado P-SA-MQ-011 (CITA 2020), por valoración de los ácidos presentes en un extracto acuoso de la muestra, con NaOH 0,1 mol/L debidamente valorado; expresando el resultado en g de ácido por 100 g o 100 mL, con un factor apropiado al tipo de ácido que se espera sea preponderante (CITA, 2020).

El análisis se realizó por triplicado a partir de 10,0 g de *nibs* de cacao. A la muestra se le agregaron 80 mL de agua grado 3 a 100 °C, y se mantuvo en agitación durante 20 min. Luego se centrifugó, enfrió y filtró utilizando algodón, para llevarla a un balón aforado de 200,0 mL. La valoración se realizó con una alícuota de 100,0 mL del filtrado (CITA, 2020).

4.6.3 Ácidos orgánicos

El análisis para obtener el perfil de ácidos orgánicos se realizó por triplicado en el Laboratorio de Química del CITA, mediante prestación de servicios, utilizando HPLC con columna de intercambio iónico, método acreditado P-SA-MQ-051, acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD). La identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos se realizó utilizando estándares de concentración conocida y los tiempos de retención o elución de cada uno (CITA, 2019). Se utilizó una muestra de 1,00 g de cacao, finamente molida antes de realizar la extracción acuosa de los ácidos orgánicos. El equipo se acondicionó previamente con los parámetros que se muestran en el cuadro 5:

Cuadro 5. Condiciones de análisis HPLC-DAD para ácidos orgánicos. Fuente: CITA (2019).

Parámetro	Condiciones
Temperatura del horno	60 °C
Longitud de trabajo DAD	210 nm
Volumen de inyección	3 µL
Flujo	0,50 mL/min
Tiempo de proceso	25 min

4.6.4 Compuestos volátiles HS-SPME-GC-MS

Este análisis se realizó en el CIPRONA, siguiendo la metodología propuesta por Ducki et al. (2008) con modificaciones, con extracción por espacio de cabeza (HS) y microextracción en fase sólida (SPME) combinada con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Se utilizó un cromatógrafo de gases-masas, con triple cuadrupolo (GC-MS/MS), marca Thermo Scientific TSQ 9000. Para la microextracción (SPME) se utilizó una fibra cubierta con 50/30 µm DVB/CAR-PDMS (divinilbenceno/carboxeno en polidimetilsiloxano) y una columna Thermo TG-5MS 30 m x 0,25 mm de 0,25 µm con un flujo de 1 mL/min.

La preparación de las muestras consistió en moler finamente los *nibs* de cacao congelados, utilizando un molino de cuchillas Grindomix GM 200, marca Retsch. La molienda se realizó durante

15 s a 10 000 rpm. Una vez molidas, las muestras se colocaron en viales de vidrio para cromatografía de gases y se mantuvieron congeladas a -60 °C hasta su análisis.

Con respecto a la metodología de Ducki et al. (2008), se modificó la cantidad de muestra a 3,00 g y se utilizó una temperatura de acondicionamiento de 60 °C por 15 min; la propuesta de esta modificación es resultado de un estudio previo de determinación de compuestos volátiles en cacao que se realizó en el mismo equipo y con la misma fibra y columna antes mencionadas (L. Wexler, comunicación personal, 1 de junio 2022). Los parámetros establecidos para la microextracción y la cromatografía de gases de todas las corridas se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Condiciones de análisis para HS-SPME-GC, análisis de compuestos volátiles.

Parámetro SPME	Condiciones	Parámetro GC	Condiciones
Tiempo de acondicionamiento	15 min	Gas acarreador	Helio
Temperatura de acondicionamiento	60 °C	Flujo	2 mL/min, constante
Tiempo de exposición al HS	15 min	Tiempo desorción	5 min
Temperatura exposición al HS	60 °C	Temperatura desorción	200 °C
Frecuencia de agitación	1 min	Temperatura inicial	30 °C
Modo desorción	Splitless	Rampa	6 °C/min hasta 200 °C
Temperatura desorción	270 °C		25 °C/min hasta 270 °C
Tiempo desorción	5 min	Condiciones	270 °C por 5 min

Para el espectrómetro de masas se utilizó una temperatura de la línea de transferencia de 260 °C y para la fuente iónica de 280 °C, en modo de ionización EI. El tiempo de inicio fue de 1,5 min con el filtro del cromatógrafo encendido, con un tiempo de ancho del pico cromatográfico de 1 s. La polaridad de los iones fue positiva, con un tiempo de escaneo de 0,2 s.

La identificación de los compuestos volátiles se realizó comparando los resultados del espectrómetro de masas contra la librería Apps Lab Library de Thermo Scientific instalada en el equipo, utilizando el programa Thermo Scientific Xcalibur. La abundancia relativa de los compuestos se calculó con base en los picos de las áreas de los compuestos identificados. Los parámetros para la integración de las áreas de los picos cromatográficos se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Condiciones para realizar la integración de áreas de los picos identificados

Parámetros de integración de áreas	Condiciones
Porcentaje de pico más alto	0,3
Pico mínimo	1,0
Umbral	1,0
Detección de valle activada	2,0
Tolerancia al ruido	10,2
Factor de rechazo del ruido de referencia	2,0

4.6.5 Péptidos

El análisis de péptidos se realizó en el Instituto Clodomiro Picado (ICP), mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), utilizando el sistema de mini-geles de Bio-Rad (Mini-Protean II® -Tetra Cell) para corridas de 10 carriles y el patrón marcador estándar #161-0375.

Esta metodología se encuentra implementada en el ICP donde ha sido ampliamente utilizada en estudios con toxinas de serpientes y otras matrices, sin embargo, no se había utilizado previamente para análisis en cacao, por lo tanto, se realizaron varias pruebas preliminares con el fin de establecer la metodología para la extracción de la muestra y otros parámetros.

4.6.5.1 Pruebas preliminares

Se realizaron pruebas preliminares con el fin de adaptar el procedimiento descrito por Lomonte (2020) a la determinación de péptidos en las muestras de cacao. A continuación, una breve descripción de estas pruebas. En el anexo B se puede ver el detalle completo de las pruebas realizadas.

Preparación de la muestra:

Los granos de cacao se molieron finamente utilizando un molino de cuchillas Grindomix GM 200, marca Retsch, con el mismo procedimiento descrito para el análisis de compuestos volátiles. Se realizaron pruebas preliminares para definir aspectos de extracción y preparación de la muestra, tales como si las muestras debían o no ser desgrasadas previamente, en caso de ser necesario,

definir el método de desgrase idóneo, si se analizaría cacao fermentado, fermentado y seco, o *nibs* de cacao, las diluciones de la muestra a correr en el gel de electroforesis, entre otros.

Concentración del gel separador

Según describe Lomonte (2020), el gel separador se puede preparar en distintas concentraciones finales de acrilamida/bisacrilamida (20 %, 15 %, 12 %, 10 %, 7,5 %, 5 %). Se realizaron pruebas preliminares para definir la concentración que produjera la mejor visualización de las bandas de péptidos separados de la muestra.

Parámetros de corrida de la electroforesis

Si bien el método implementado en el ICP indica que la separación en la cámara de electroforesis se corre a un voltaje constante de 200 V, mediante pruebas preliminares se definió el voltaje de inicio de la corrida mientras la muestra se encuentra en el gel superior compactador, así como el voltaje a programar durante la separación en el gel inferior.

En la figura 15 se resumen las condiciones establecidas para el análisis definitivo con base en los mejores resultados de las pruebas preliminares:

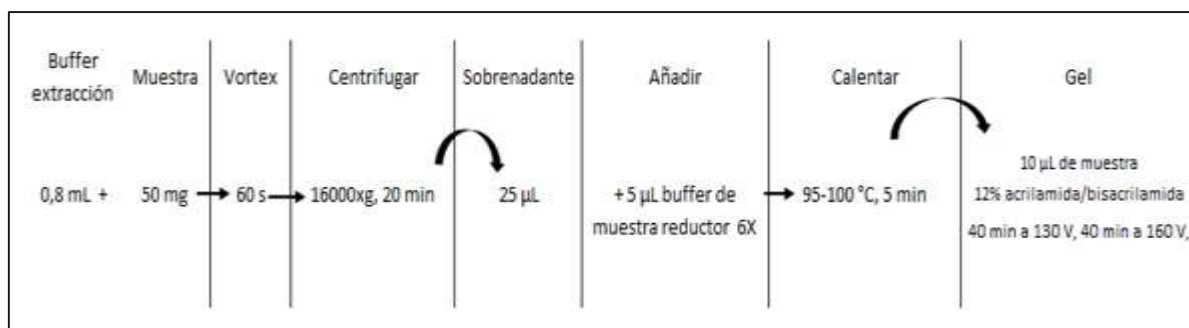


Figura 15. Esquema de las condiciones y parámetros establecidos para el análisis de péptidos presentes en cacao por SDS-PAGE. Elaboración propia.

4.6.5.2 Visualización de las bandas de péptidos

Se utilizó disolución fijadora con base en metanol, por 15 min con agitación suave; la tinción del gel se realizó con colorante azul Coomassie R-250. Posteriormente, para visualizar las bandas de separación de los distintos péptidos se utilizó un decolorador acuoso con base en metanol, etanol y ácido acético (Lomonte, 2020).

El análisis se realizó con el software Image Lab, para lo cual, los resultados de la separación se registraron mediante una fotografía. Para obtener el peso molecular promedio de los péptidos

separados en la electroforesis se realizó la interpolación de las bandas incógnitas, con base en una regresión lineal simple determinada con un patrón de proteínas de masas moleculares conocidas, que se corrió al mismo tiempo y en el mismo gel, al lado de las muestras. Para el análisis de abundancia relativa se utilizó la intensidad de las bandas identificadas.

4.6.6 Medición de pH

Para medir el pH se utilizó un equipo marca Sartorius modelo PB11. Se colocaron 100 g de semillas de cacao en un beaker y el electrodo de medición se introdujo directamente en contacto con el mucílago húmedo. La lectura se tomó 3 min después.

4.6.7 Medición de contenido de humedad

Según describe Vargas-Elías et al. (2022), la medición del contenido de humedad en los granos secos se hizo de manera indirecta midiendo el a_w de *nibs* de cacao molidos en un molino pequeño comercial para granos de café de 110 V y 125 W marca Hamilton Beach. La muestra molida se colocó en recipiente de 7,5 mL dentro de un medidor de actividad de agua (a_w) marca AQUALAB modelo 4TE. La medición se realizó por triplicado.

4.6.8 Medición de temperatura de la masa fermentativa

El registro del comportamiento de la temperatura se realizó por medio de una medición con termopares, utilizando el registrador de temperatura Datalogger Extech Instruments SDL200. A los granos de cacao colocados en la caja de madera se le colocaron 4 termopares, ubicados en distintas posiciones según se observa en la figura 16. Los termopares se introdujeron hasta la mitad de la altura de la masa fermentativa, para asegurar el registro de la temperatura en su punto central. Cada día, antes de realizar los volteos, se documentó de forma manual la temperatura mostrada por el termo registrador.



Figura 16. Vista superior de la caja fermentativa mostrando la ubicación de los 4 termopares utilizados. Elaboración propia.

4.6.9 Análisis estadístico de resultados

El análisis estadístico se realizó con el programa XLSTAT.

Para los datos procedentes de los distintos tratamientos y análisis de ambos objetivos, se realizó un análisis de varianza, ANDEVA. Si se encontraron diferencias significativas en los efectos simples se aplicó una comparación de medias de Tukey y si alguna interacción resultó significativa se aplicó la prueba de comparación de medias de Bonferroni, como fue el caso de los compuestos volátiles; para los ácidos orgánicos, comparación con medias de Tukey. Esto permitió identificar si existía o no diferencias significativas entre las variables respuesta de las cinco subvariedades y entre los factores contemplados en el diseño del estudio.

Para evaluar el efecto de los distintos factores sobre la composición de los compuestos volátiles de las distintas subvariedades, se llevó a cabo un análisis de clusterización aglomerativa jerárquica (CAJ), así como un análisis multivariado de componentes principales (ACP), los cuales permitieron concluir sobre similitudes y diferencias entre las muestras analizadas para todas las variables respuesta simultáneamente (compuestos volátiles).

Finalmente, para el efecto del tiempo de fermentación, se realizó un análisis multifactorial para evaluar la interrelación de las distintas variables respuesta y conocer posibles sinergias entre ellas.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Proceso de fermentación y secado

5.1.1 Monitoreo de temperatura

El avance del proceso de fermentación del cacao se monitoreó mediante el comportamiento de la temperatura de la masa fermentativa, la cual se midió permanentemente a lo largo del proceso utilizando un termo registrador. En la figura 17 se observan los valores de temperatura promedio para cada una de las cinco subvariedades, así como la temperatura del fermentador, en el momento en que se inició la fermentación (día 0) y en el momento justo antes de iniciar el primer volteo de cada día, mostrando de manera general, su evolución a lo largo de los 6 días de fermentación. En la figura 42 del anexo C se observa el monitoreo continuo documentado directamente del termo registrador.

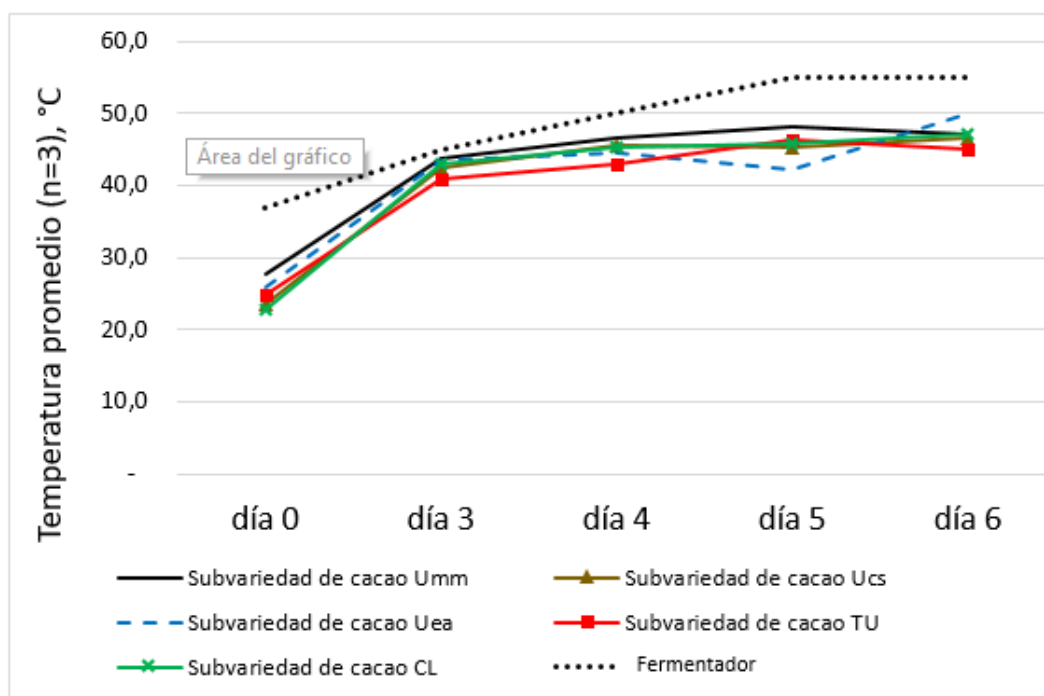


Figura 17. Comportamiento promedio de la temperatura durante el tiempo de fermentación

Para las cinco subvariedades el comportamiento muestra un aumento continuo entre el día 0 y el día final de la fermentación, lo cual se debe inicialmente a las reacciones exotérmicas producto de

la acción de las levaduras, las cuales convierten los azúcares presentes en la pulpa y el cotiledón en etanol y CO₂ (Calvo et al., 2021; Cocom, 2021; Herrera-Rocha et al., 2021; De Vuyst & Weck, 2016).

A partir del día 3 el incremento se vio favorecido por los volteos realizados para permitir la aireación de la masa fermentativa y con ello, la ocurrencia de la segunda fase de la fermentación, así como el comportamiento de la temperatura del fermentador (considerada como la temperatura ambiente de la microfermentación realizada) (Hernández-Hernández et al., 2016; De Vuyst & Weck, 2016). Tal y como mencionan Nielsen et al. (2013), en esta segunda fase, la oxidación de los metabolitos hasta ácido acético se lleva a cabo mediante reacciones exotérmicas que provocan el aumento de la temperatura de la masa fermentativa hasta 45 - 50 °C.

Lo anterior demuestra que el protocolo seguido para aumentar la temperatura de la cámara de fermentación permitió conservar el calor generado, propiciando así una fermentación adecuada.

5.1.2 Prueba de corte

La prueba de corte fue realizada a partir el día 3 en el momento de realizar cada uno de los volteos. Para todas las corridas se pudo apreciar el avance mediante los cambios de coloración blanquecino-morado a café-marrón, así como la formación de estrías o surcos bien definidos al día 6, cumpliendo con los criterios de una buena fermentación (Aguilar, 2016). Los resultados obtenidos se documentaron por medio de fotografía; en la figura 18 se muestra un ejemplo de los resultados.

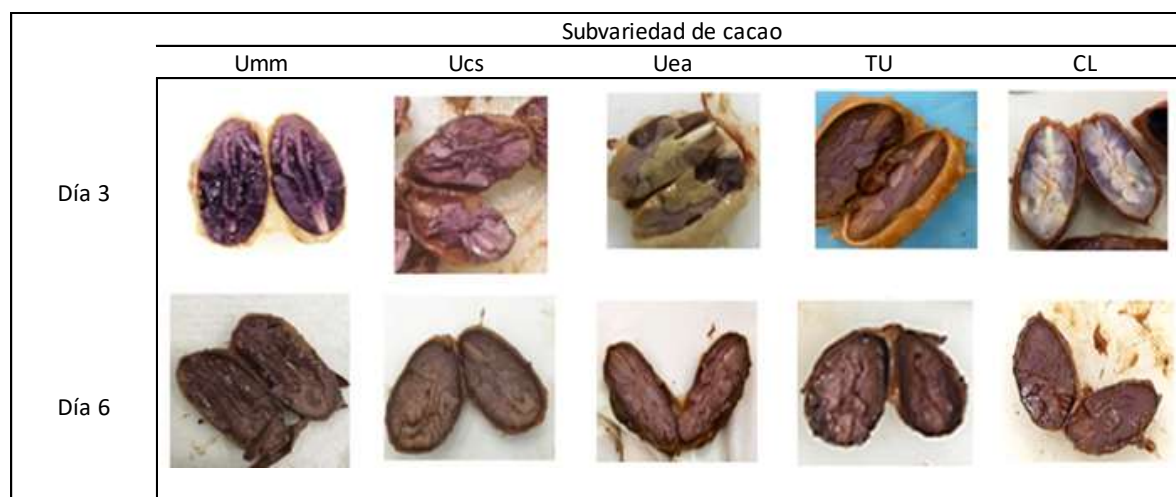


Figura 18. Muestra de prueba de corte realizada a las distintas subvariedades de cacao a los 3 y 6 días de fermentación.

5.1.3 Monitoreo de pH

La figura 19 muestra la evolución del pH del mucílago (exterior de los granos) a lo largo de la fermentación para cada subvariedad. Su comportamiento mostró resultados similares a los reportados por Homem de Abreu et al. (2017), quienes obtuvieron valores entre 3,0 y 3,5 para el cacao en baba, debido a la presencia de ácido cítrico en la pulpa. Luego, durante la primera fase de la fermentación, llevada a cabo principalmente por levaduras en los primeros tres días, el pH aumenta como consecuencia de su metabolización (Cocom, 2021).

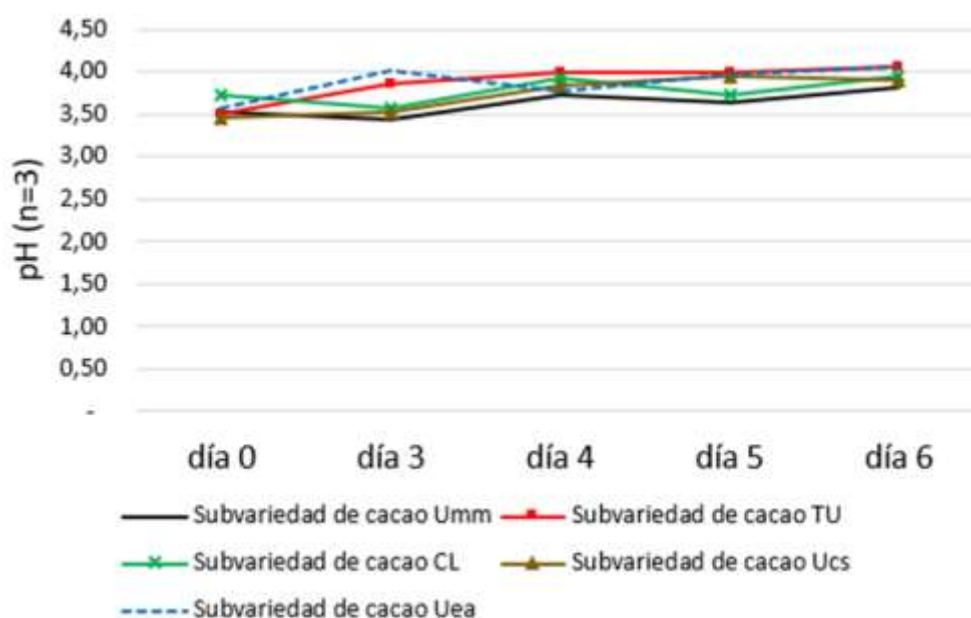


Figura 19. Comportamiento del pH a lo largo de la fermentación para las cinco subvariedades estudiadas.

A partir del tercer día, el pH externo de los granos continúa aumentando debido a que, además de la metabolización del ácido cítrico, los ácidos que se forman producto de la fermentación aerobia difunden a través de la cascarilla hacia el interior de los granos (Cocom, 2021; De Vuyst & Weck, 2016). Los resultados obtenidos son similares a los reportados previamente por García et al. (2019) quienes obtuvieron valores de pH de 4,24 a los cuatro días de fermentación.

En la figura 19 se observa, para las subvariedades Umm y CL, una leve disminución de pH en los días 3 y 5 a diferencia del comportamiento de las otras subvariedades. Esto podría deberse a la forma de medición del pH, que se hizo determinándolo al mucílago de los granos y la muestra pudo haber

estado compuesta por granos individuales en distintos momentos de la fermentación, lo cual se evidenció por la presencia de algunos con mayor cantidad de mucílago, y, por tanto, mayor contenido de ácidos sin metabolizarse. La medición realizada es un indicador general del comportamiento del pH de la masa fermentativa, sin embargo, no ofrece una lectura representativa de las transformaciones bioquímicas que están sucediendo en el mucílago y el grano, por lo que se puede recomendar para futuras investigaciones, medir el pH en un extracto acuoso, tal y como lo reportan Homem de Abreu et al. (2017).

Es importante mencionar que el avance de la fermentación se mide combinando el comportamiento del pH, de la temperatura y la prueba de corte, las cuales mostraron coincidencia con lo reportado como normal para una fermentación completa (Aguilar, 2016; Calvo et al., 2021; Cocom, 2021; De Vuyst & Weck, 2016).

5.1.4 Monitoreo del contenido de humedad para finalizar el secado

En cuanto al proceso de secado, según un estudio realizado por Vargas-Elías et al. (2022) como parte del alcance del proyecto 735-C2-513 del cual formó parte esta investigación, para poder detener el proceso en el momento en que los granos llegaran a una humedad de entre un 7,0 - 7,5 % se realizó la medición de a_w . En el cuadro 8 se muestra el valor promedio de a_w y del contenido de humedad en base húmeda (bh) al momento de detener el secado, los cuales validan el uso de un criterio uniforme para detener el secado cuando los granos han alcanzado un contenido de humedad entre 7,0 - 8,0 %, garantizando así que se detenga la fermentación, continúe el desarrollo de compuestos aromáticos y se garantice la estabilidad microbiológica de los granos (Arvelo et al., 2017; Castro-Alayo et al., 2019; Cocom, 2021).

Cuadro 8. Valores promedio de a_w y contenido de humedad de granos de cacao al momento de detener el secado de las distintas subvariedades (n=3).

Subvariedad	Contenido de humedad (g/100 g cacao bh)	Actividad de agua (a_w)
CL	7,4 ± 0,7	0,58 ± 0,03
TU	7,5 ± 1,2	0,56 ± 0,07
Umm	7,6 ± 1,1	0,56 ± 0,05
Ucs	7,2 ± 0,6	0,57 ± 0,06
Uea	7,4 ± 1,4	0,54 ± 0,04

5.1.5 Contenido de proteína y de humedad de cacao en baba

Con respecto al contenido de proteína y humedad, en el cuadro 9 se muestran los valores obtenidos para el cacao en baba de las distintas subvariedades, donde el análisis de medias de Tukey reveló que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en su contenido en las distintas subvariedades estudiadas.

Cuadro 9. Contenido promedio de proteína y humedad del cacao en baba de las cinco subvariedades.

Subvariedad	Proteína (g/100 g de cacao), (n=3)	Humedad (g/100 g de cacao), (n=3)
Umm	31,134	59,900
Ucs	28,730	57,933
Uea	28,539	59,433
TU	28,785	55,533
CL	30,679	62,567

Estos resultados pueden indicar que el contenido inicial de humedad y proteína no serían factores que afecten o definan la posible formación de diferentes concentraciones e identidades de precursores de aroma entre las distintas subvariedades.

5.2 Efecto del tiempo de fermentación sobre el contenido de ácidos orgánicos, el perfil de compuestos volátiles y péptidos precursores de aromas clave

Con el fin de presentar de manera ordenada el análisis de la gran cantidad de datos obtenidos durante este estudio, se han establecido dos secciones para evaluar el cumplimiento de los dos objetivos específicos por separado. Al final de cada una de estas secciones se analizan las interacciones entre las variables respuesta de cada objetivo (péptidos precursores de aroma, compuestos volátiles y ácidos orgánicos), con el fin de determinar alguna sinergia de estas variables en la calidad final de las distintas subvariedades estudiadas.

5.2.1 Análisis de ácidos orgánicos

5.2.1.1 Cacao en baba

Acidez total

La acidez característica de los granos de cacao sin procesar se debe a que el mucílago o pulpa tiene un alto contenido de ácidos orgánicos que actúan, durante la fermentación, como precursores de compuestos asociados al aroma y sabor del cacao; entre estos ácidos se encuentran el ácido acético, láctico, málico, succínico y cítrico (Chica, 2022; Lin et al., 2022).

Los valores de acidez total obtenidos se encuentran entre 0,293 y 0,414 g/100 g de cacao en baba; estos valores son inferiores a los reportados por Pelaez et al. (2016) en muestras de semillas (pulpa y cotiledones) de cacao forastero peruano sin fermentar (0,58 - 0,96 g/100 g); el análisis de varianza y el posterior análisis de medias de Tukey (cuadro 18, anexo E) indicaron que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) en el contenido de acidez total de las distintas subvariedades de cacao en baba.

Contenido de ácidos orgánicos

En el cacao en baba estuvieron presentes el ácido cítrico, quínico, láctico, oxálico, glucónico, succínico, tartárico y acético. Tal y como se aprecia en la figura 20, el ácido cítrico, responsable del aumento del pH al inicio de la fermentación, cuando por acción de las levaduras y bacterias ácido lácticas se degrada y difunde al interior de la semilla (Barišic et al., 2019; Viesser et al., 2020), se encuentra presente en una mayor proporción (contenidos de 1,207 – 0,704 g/110 g, dependiendo de la subvariedad); el ácido acético, cuyo contenido aumenta en la fase aerobia de la fermentación por acción de las bacterias ácido acéticas sobre el etanol (Apriyanto, 2016), fue el que estuvo presente en menor cantidad (menos de 0,0200 g/100 g de cacao); en cuanto al ácido glucónico estuvo presente en todas las subvariedades, excepto en la TU.

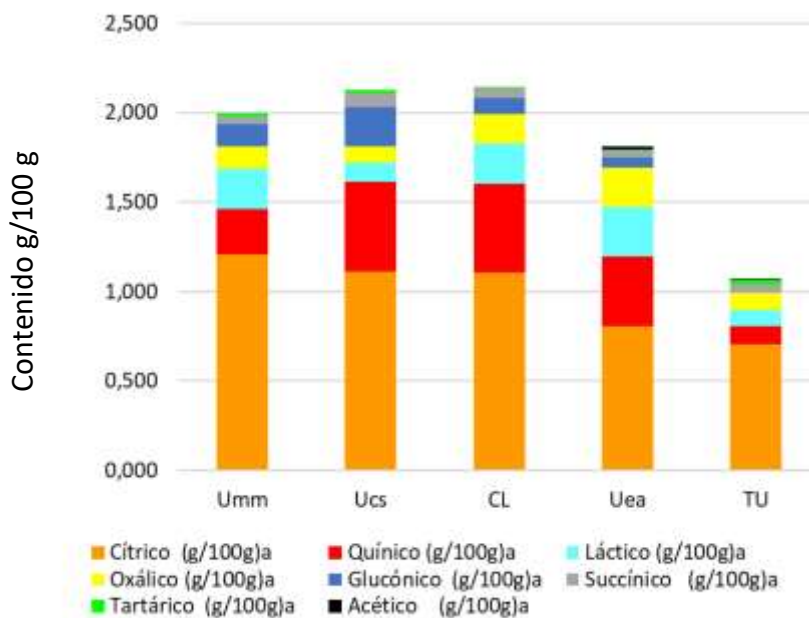


Figura 20. Contenido de ácidos orgánicos presentes en cacao en baba para las distintas subvariedades.

El análisis estadístico del contenido de cada uno de estos ácidos evidenció que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las cinco subvariedades estudiadas (cuadro 18, anexo E), por lo que se puede inferir que su contenido inicial no será un factor determinante en el perfil de los granos fermentados y secos.

5.2.2.1 Cacao fermentado y seco

Acidez total

El análisis realizado a lo largo del tiempo de fermentación mostró que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en la acidez total de las distintas subvariedades (cuadro 19A, anexo E), pero sí se identificaron diferencias influenciadas por el día de fermentación (cuadro 19B, anexo E). Los resultados muestran que la acidez total de los granos de cacao aumenta con el tiempo de fermentación, y que el contenido de acidez total del cacao con tres días de fermentación (1,097 g/100 g de cacao) es significativamente diferente ($p \leq 0,05$) al contenido de las muestras con 5 y 6 días de fermentación (1,393 – 1,430 g/100 g de cacao respectivamente). Este comportamiento obedece a que, a partir del tercer día, con el inicio de la fase aerobia, las bacterias ácido acéticas convierten el etanol producido por las levaduras en ácido acético, provocando el aumento

observado entre el día 3 y día 5 de fermentación (figura 21), comportamiento previamente descrito por De Vuyst y Weck (2016) y Cocom (2021).

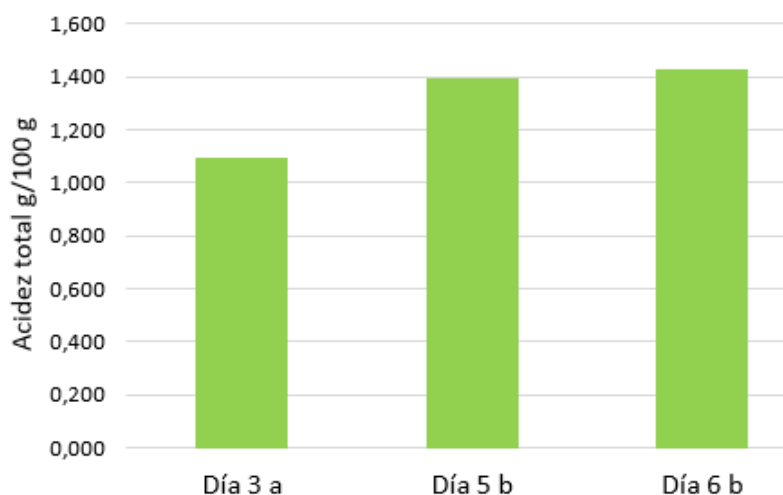


Figura 21. Comportamiento del contenido total de acidez a lo largo del tiempo de fermentación para los nibs de cacao secados por circulación continua de aire caliente a 40 °C.

Contenido de ácidos orgánicos

En cuanto al contenido de ácidos orgánicos específicos, se identificó la presencia de oxálico, cítrico, succínico, láctico, acético, quínico, tartárico, glucónico, málico y adípico.

El análisis de varianza y la posterior comparación con medias de Tukey evidenciaron que el ácido oxálico, acético (mayor contenido en todas las subvariedades), quínico y adípico (que no estuvo presente en el cacao en baba), no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a la subvariedad (cuadro 19A, anexo E). Por su parte, la figura 22 muestra el comportamiento de los ácidos que sí reportaron diferencias significativas, entre los que se encuentra el ácido málico que tampoco estuvo presente en el cacao en baba.

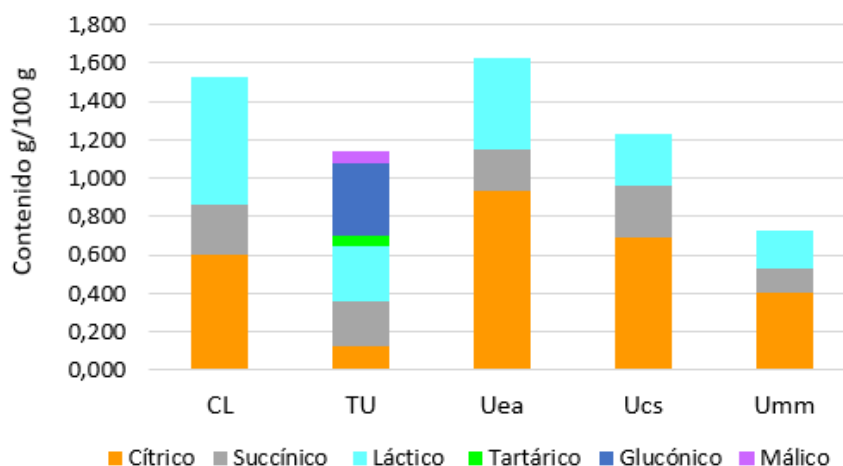


Figura 22. Contenido de ácidos orgánicos significativos para los nibs de cacao de las cinco subvariedades secados por circulación continua de aire caliente a 40 °C (S1).

Como se observa en la figura 22, la subvariedad TU es la que tiene una mayor diversidad de ácidos orgánicos significativos e incluye entre estos el ácido tartárico, glucónico y málico, que no estuvieron presentes en las demás subvariedades, por lo que será interesante conocer si estas diferencias en el perfil de ácidos orgánicos aportan diferencias en el perfil aromático y de sabor.

Con respecto al tiempo de fermentación, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (cuadro 19B) en el ácido cítrico, láctico y acético del día 3 con respecto a los días 5 y 6. Coincidiendo con la degradación del ácido cítrico por parte de levaduras y bacterias ácido lácticas (Barišic et al., 2019; Viesser et al., 2020), este ácido pasó de 0,696 g/100 g de cacao en el día 3 a 0,430 g/100 g de cacao en el día 6; contrario a lo que sucedió con el ácido acético y el ácido láctico, que aumentaron su contenido en el tiempo producto de la acción de las bacterias ácido acéticas y ácido lácticas a partir del inicio de la fase aerobia de la fermentación (De Vuyst & Weck, 2016; Nielsen et al., 2013). Se esperaba que el ácido acético, al ser volátil, disminuyera durante el secado y tostado (Vázquez-Ovando et al., 2016, Zapata et al., 2015), comportamiento que no se observó en los resultados obtenidos. Una posible razón es que el proceso de secado haya provocado el endurecimiento de la cascarilla, lo cual, como refieren Parra (2014) y PROCOMER (2020), la convierte en una barrera para la salida o difusión del ácido acético. En relación con esto, como menciona CAOBISCO/ECA/FCC (2015) un secado demasiado rápido es también una causa de mayor acidificación del grano.

La figura 23 muestra el comportamiento de estos ácidos que sufrieron cambios significativos a lo largo del tiempo ($p \leq 0,05$).

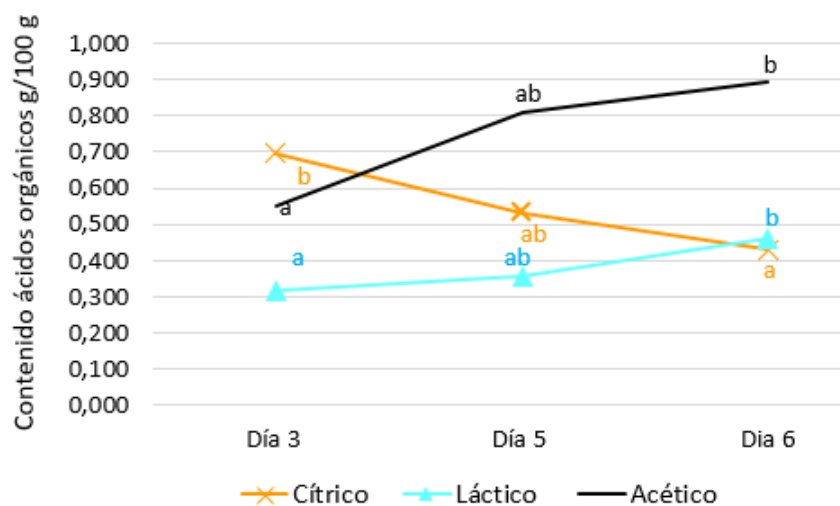


Figura 23. Contenido de ácidos orgánicos significativos para los nibs de cacao secados por circulación continua de aire caliente a 40 °C (S1) a lo largo del tiempo de fermentación.

En vista de que el contenido de ácidos orgánicos del día 5 y el día 6 no muestra diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguna de las subvariedades estudiadas, es importante evaluar posteriormente si los perfiles aromáticos y de sabor asociados a cada tiempo son similares, para así valorar la factibilidad de reducir el tiempo de fermentación en algunas de las subvariedades.

5.2.2 Análisis de compuestos volátiles

5.2.2.1 Compuestos volátiles generales

De manera general, se identificaron un total de 96 compuestos volátiles en las muestras fermentadas y secas. La subvariedad con mayor cantidad de compuestos volátiles fue la CL, con 76 compuestos, seguida de las subvariedades upaleñas (Ucs con $n=71$, Umm con $n=64$, Uea con $n=63$) y TU, que presentó la menor cantidad de compuestos volátiles ($n=53$).

Los compuestos se clasificaron en 10 grupos químicos diferentes, de los cuales la mayoría fueron alcoholes ($n=21$), seguidos de ácidos carboxílicos ($n=16$) y ésteres ($n=12$) (figura 24a). Los tipos de compuestos encontrados muestran relación con lo reportado por diversos autores, para diferentes

subvariedades de cacao procedentes de distintos países (Meneses et al., 2023; Mori-Mestanza et al., 2021; Otero et al., 2022; Rodríguez-Campos et al., 2012; Suzuki et al., 2019).

Tal y como se muestra en la figura 24b, los alcoholes fueron los compuestos volátiles encontrados mayoritariamente en todas las subvariedades y los éteres los de menor proporción.

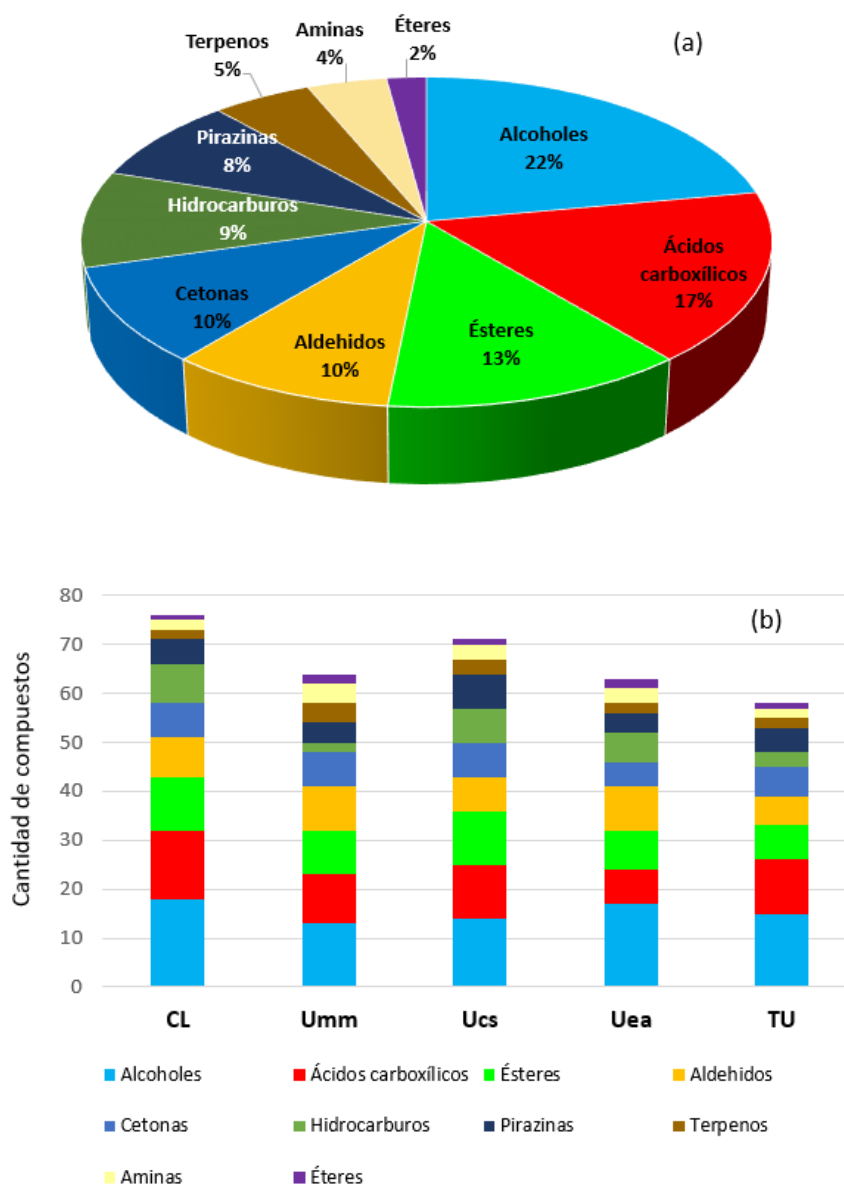


Figura 24. (a) Distribución porcentual de compuestos volátiles identificados en todas las subvariedades, y (b) cantidad observada para cada familia por cada subvariedad.

En el cuadro 10 se detallan los compuestos individuales identificados. La identificación se realizó por comparación del tiempo de retención de cada compuesto y su respectivo espectro de masas, verificando la identidad con la base de datos de la librería Apps Lab Library de Thermo Scientific instalada en el equipo utilizado. En el cuadro se incluyen además los descriptores de aroma para 56 compuestos volátiles que han sido previamente asociados con aromas específicos por distintos autores (Frauendorfer y Schieberle, 2008; Rodríguez-Campos et al., 2012; Kadow et al., 2013; Hartmann, 2015; Januszewska, 2018; Suzuki et al., 2019; Deusher et al., 2020; Cocom, 2021; Otero et al., 2022); estos corresponden a un 61,4 % del total de compuestos identificados y no todos son exclusivos de cacao.

Es importante mencionar que algunos de los restantes 40 compuestos que no han sido previamente reportados por su asociación con aromas del cacao u otros alimentos podrían aportar aromas diferenciadores al cacao upaleño, sin embargo, sería necesario hacer un análisis con un sistema de olfatometría para poder determinarlo.

Más adelante, en el apartado 5.2.2, se explica con detalle el comportamiento de algunos de los compuestos identificados.

Cuadro 10. Compuestos volátiles totales identificados mediante HS-SPME-CG-MS en los nibs de cacao tostados de todas las subvariedades, incluyendo los tres tiempos de fermentación y los tres tipos de secado, y la descripción del aroma asociado encontrado en la literatura.

Número	Compuesto	Acronimo	Descripción de aroma asociado	Referencias (*)
<i>Alcoholes</i>				
1	1-butanol, 3-metil-	Al02	Malta, chocolate, amargo, extraño	[4], [9], [5]
2	1,3-propanodiol	Al01		
3	1-pentanol	Al03	Pungente, verde, levadura, frutal	[13]
4	1-tetradecanol	Al04		
5	2,3-butanodiol	Al05	Chocolate, frutal, floral	[8], [2]
6	2,5,8,11,14-pentaoxahexadecan-16-ol	Al06		
7	2-butanol	Al07	Goma	[2]
8	2-heptanol, 3-metil	Al08	Frutal, cítrico	[12], [9]
9	2-naftalenol	Al09		
10	2-propanol, 1-(1-metiletoxi)	Al10		
11	2-propanol, 1-(2-butoxi)etoxi-	Al11		
12	3,6,9,12-tetraoxahexadecan-1-ol	Al12		
13	3-heptanol, 3-metil	Al13	Floral	[13]
14	3-pentanol, 3-metil	Al14		
15	4-penten-2-ol	Al15		
16	Bencenometanol, α -metil-	Al16	Floral, miel	[13]
17	Etanol	Al17	Alcohol, chocolate oscuro	[12], [2]
18	Alcohol isopropílico	Al18	Floral	[13]
19	Fenol	Al19	Floral, frutal	[2]
20	Fenol, 2,3,5,6-tetrametil	Al20		
21	Alcohol feniletílico	Al21	Miel, picante, floral, caramelo, rosa	[3]
22	Propilenglicol	Al22		
<i>Ácidos carboxílicos</i>				
23	Ácido 2,6-piridindicarboxílico	Ac01		
24	Ácido 3-butanoico	Ac02	Rancio	[5]
25	Ácido 4-metiloctanoico	Ac03		
26	Ácido acético	Ac04	Vinagre	[5], [8]
27	Ácido acético, dietil-	Ac05		
28	Ácido benzoico, 4-formil	Ac06		
29	Ácido 2-metilbutanoico	Ac07	Queso derretido	[2]
30	Ácido 3-metilbutanoico	Ac08	Queso derretido	[2]
31	Ácido 2-etilheptanoico	Ac09		
32	Ácido hexanoico	Ac10	Acre, pungente, rancio, no deseado	[9], [10]
33	Ácido L-láctico	Ac11	Floral, lavanda, cítrico, arándano	[6]
34	Ácido octanoico	Ac12	Grasoso, jabonoso, no agradable	[5], [2]
35	Ácido 2-butiloctanoico	Ac13		
36	Ácido pentanoico, 4-oxo	Ac14		
37	Ácido propanoico	Ac15	Pungente, rancio	[9]
38	Ácido 2-metilpropanoico	Ac16		

Notas: (*) [1] Cocom (2021); [2] Deusher et al. (2020); [3] Frauendorfer y Schieberle (2006); [4] Frauendorfer y Schieberle (2008); [5] Januszewska (2018); [6] Kadow et al. (2013); [7] Mori-Mestanza et al. (2021); [8] Otero et al. (2022); [9] Rodríguez-Campos et al. (2012); [10] Suzuki et al. (2019); [11] Hartmann (2015); [12] Rottiers et al. (2019); [13] FEMA (2023); [14] Felipe y Bucas (2016); [15] Lubinska-Szczygieł (2018); [16] Chemical Book (2023). Los compuestos en negrita estuvieron presentes en todas las subvariedades y en todos los tiempos de fermentación.

Cuadro 10. Continuación

Número	Compuesto	Acónimo	Descripción de aroma asociado	Referencias (*)
<i>Ésteres</i>				
39	1,3-propanediol, acetato	Es01		
40	1,3-propanediol, diacetato	Es02		
41	Acetato de 2-metil-1-butanol	Es03	Manzana, banano, pera	[13]
42	Acetato de 3-metil-1-butanol	Es04	Banano, frutal	[5], [2]
43	Acetato de 2-pentanol	Es05	Tropical, herbal	[6]
44	4-metil-2-pentil acetato	Es06		
45	Ácido benzoico, éster etílico	Es07	Manzanilla, apio, floral	[13]
46	Acetato de etilo	Es08	Piña, levadura, frutal, verde	[9], [5], [8]
47	Acetato de isobutilo	Es09	Frutal	[9]
48	Isobutil isovalerato	Es10	Frutal	[13]
49	Acetato de 2-butilo	Es11	Banano	[8]
50	Ácido tiocianico, éster fenilmetilo	Es12	Frutal	[13]
<i>Aldehidos</i>				
51	2,3,6-triclorobenzaldehído	Ad01		
52	3-ciclohexeno-1-acetaldehído, a,4-dimetil-	Ad02	Espicias	[13]
53	3-furaldehído	Ad03		
54	Benzaldehído	Ad04	Chocolate, almendra tostada, caramelo	[5], [10]
55	Bencenoacetaldéhidó	Ad05	Floral, miel, almendra, frutal	[7], [10]
56	Furfural	Ad06	Almendra, caramelo, semilla marañón	[1], [5]
57	Nonanal	Ad07	Cítrico, floral, frutal, verde, lavanda, melón	[10]
58	2-metilpropanal	Ad08	Chocolate, tostado	[1], [2]
59	Undecanal	Ad09		
<i>Cetonas</i>				
60	2,3-butanediona	Ce01	Mantequilla	[11], [12]
61	2-butanona	Ce02	Frutal	[13]
62	2-heptanona	Ce03	Frutal, floral, coco, madera, herbal, leche	[6], [5], [12]
63	2-hexanona, 4-metil	Ce04		
64	2-nonanona	Ce05	Coco, herbal, frutal, fresco, tierra, horneado	[6], [8], [10]
65	2-octanona	Ce06	Moho	[13]
66	Acetoína	Ce07	Grasoso, crema leche	[5]
67	Acetofenona	Ce08	Almendra, floral	[8], [12]
68	Cafeína	Ce09	Café	[5]
<i>Hidrocarburos</i>				
69	Benceno, 1-propenilo	Hc01		
70	Benceno, etoxi	Hc02		
71	Ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletilideno)	Hc03		
72	Decano	Hc04	Frutal	[10]
73	Heptano, 2,2,4,6,6-pentametil	Hc05		
74	Nonano	Hc06		
75	Octano, 3,5-dimetil	Hc07		
76	Tridecano	Hc08	Cítrico, frutal	[10]
77	Undecano	Hc09		[10]

Notas: (*) [1] Cocom (2021); [2] Deusher et al. (2020); [3] Frauendorfer y Schieberle (2006); [4] Frauendorfer y Schieberle (2008); [5] Januszewska (2018); [6] Kadow et al. (2013); [7] Mori-Mestanza et al. (2021); [8] Otero et al. (2022); [9] Rodríguez-Campos et al. (2012); [10] Suzuki et al. (2019); [11] Hartmann (2015); [12] Rottiers et al. (2019); [13] FEMA (2023); [14] Felipe y Bucas (2016); [15] Lubinska—Szczygieł (2018); [16] Chemical Book (2023). Los compuestos en negrita estuvieron presentes en todas las subvariedades y en todos los tiempos de fermentación.

Cuadro 10. Continuación

Número	Compuesto	Acrónimo	Descripción de aroma asociado	Referencias (*)
<i>Pirazinas</i>				
78	2,3-dietilpirazina	Pz01	Cereal, avellana, nuez	[13]
79	3-metilpiridazina	Pz02		
80	Pirazina, 2,3-dimetil	Pz03	Caramelo, cocoa, nuez, mantequilla de maní, avellana	[10], [13]
81	Pirazina, 2,5-dimetil	Pz04	Chocolate, nuez, café, madera	[1], [8], [10]
82	Pirazina, 2,5-dimetil-3-propil	Pz05		
83	Pirazina, 2,6-dimetil	Pz06	Nuez rostizada, café, chocolate, herbal	[1], [13]
84	Tetrametilpirazina	Pz07	Tostado, chocolate, nuez, herbal	[8], [13]
85	Trimetilpirazina	Pz08	Cocoa, tostado, nuez, maní, vegetal	[8], [2]
<i>Terpenos</i>				
86	α -Terpineno	Tp01	Bergamota	[14]
87	c-Terpineno	Tp02	Limón	[14]
88	Linalol	Tp03	Floral, lavanda, bergamota, limón	[5], [10], [12]
89	Terpinen-4-ol	Tp04	Cítrico	[15]
90	Timol	Tp05	Frutal general	[10]
<i>Aminas</i>				
91	2-Propanamida	Am01		
92	4,5-Dimetil-orto-fenilendiamina	Am02		
93	Acetaldehído dimetilhidrazona	Am03		
94	2,6-Dimetilpiperidina	Am04		
<i>Éteres</i>				
95	Acetaldehído, acetal dipropílico	Et01	Herbal	[16]
96	Éter alílico etílico	Et02		

Notas: (*) [1] Cocom (2021); [2] Deusher et al. (2020); [3] Frauendorfer y Schieberle (2006); [4] Frauendorfer y Schieberle (2008); [5] Januszewska (2018); [6] Kadow et al. (2013); [7] Mori-Mestanza et al. (2021); [8] Otero et al. (2022); [9] Rodríguez-Campos et al. (2012); [10] Suzuki et al. (2019); [11] Hartmann (2015); [12] Rottiers et al. (2019); [13] FEMA (2023); [14] Felipe y Bucas (2016); [15] Lubinska—Szczygieł (2018); [16] Chemical Book (2023). Los compuestos en negrita estuvieron presentes en todas las subvariedades y en todos los tiempos de fermentación.

5.2.2 Efecto del tiempo de fermentación

Al analizar el efecto del tiempo de fermentación se encontraron presentes 95 de los 96 compuestos volátiles identificados; el compuesto no detectado fue el alcohol 1,3-propanodiol, que no se ha asociado previamente con aromas del cacao.

A cada compuesto se le asignó un acrónimo, en el cual las primeras dos letras hacen referencia a la familia química a la que pertenecen. Los acrónimos respectivos para cada compuesto identificado se encuentran en el cuadro 25 del anexo I.

El grupo que presenta mayor cantidad de compuestos volátiles es el de los alcoholes. Se identificaron el alcohol feniletílico (Al21) y el 2,3-butanodiol (Al05), asociados con notas características de chocolate, acarameladas, frutales y florales (Deusher et al., 2020; Otero et al., 2022), los cuales estuvieron presentes en todas las muestras y permanecieron durante toda la

fermentación. En el caso del 3-metil-1-butanol (Al02), reportado por Rodríguez-Campos et al. (2012) como deseable por sus notas a chocolate y malta, es importante notar que también ha sido reportado como generador de aromas amargos, extraños y pungentes por Frauendorfer y Schieberle (2008) y Januszewska (2018).

Se identificaron otros alcoholes con aromas no deseables (pungente y gomoso), como el 1-pentanol (Al03) y el 2-butanol (Al07) (Deusher et al., 2020; FEMA, 2023), que no desaparecieron durante la fermentación, sin embargo, las abundancias relativas de los mismos, medidas como porcentaje del área de los picos del cromatograma, en general, son menores al 2 % (cuadro 21, anexo G). En comparación, el 2,3-butanodiol (Al05), generador de aromas deseables y precursor de pirazinas (Grafack et al. como se cita en Utrilla-Vásquez et al., 2019), tiene abundancias relativas cercanas al 30 %, excepto para la subvariedad TU.

El segundo grupo en importancia en cuanto a cantidad de compuestos es el de los ácidos carboxílicos; entre ellos, el de mayor abundancia fue el ácido acético (Ac04), compuesto no deseado al final de la fermentación por sus notas avinagradas (Januszewska, 2018; Otero et al., 2022), el cual estuvo presente en todas las muestras en abundancias relativas cercanas al 30 %, excepto en la subvariedad TU en la que se encontraron valores más altos. El contenido de este ácido, importante en las primeras etapas porque actúa como agente de control de flora microbiana alterante, debió disminuir en las etapas de secado y tostado (Cocom, 2021; Copetti et al., 2014; Fraunderdorfer & Schieberle (2008), sin embargo, los resultados obtenidos no lo evidencian, lo que puede significar un proceso de secado no eficiente para el cacao.

El tercer grupo en abundancia fueron los ésteres, considerados los compuestos que generan más notas aromáticas florales y frutales en los alimentos (Rottiers et al., 2019). En todas las subvariedades y tiempos de fermentación están presentes el acetato de 3-metil, 1-butanol (Es04) y el acetato de 2-pentanol (Es05), que otorgan aromas a frutas tropicales, y, específicamente aroma a banano (Deusher et al., 2020; Januszewska, 2018; Kadow et al., 2013). Además, en todas las muestras totalmente fermentadas (día 6) se identificó acetato de etilo (Es08), característico por su aroma a piña, frutal y verde (Januszewska, 2018; Otero et al., 2022; Rodríguez-Campos et al., 2011). Este compuesto se produce generalmente al inicio de la fermentación (18 - 24 h), por acción enzimática que cataliza reacciones de condensación entre acetyl/acil-CoA y el etanol y otros alcoholes superiores, pero, conforme avanza el proceso, va disminuyendo; adicionalmente, la

esterificación del 2-pentanol, que genera aromas a frutas tropicales y herbales, se ha reportado que contribuye a una gran cantidad del total de volátiles reportados en la pulpa de cacao y también disminuye en el tiempo, dando lugar a otros compuestos (Rottiers et al., 2019). Esta tendencia a disminuir conforme avanza la fermentación se observó en los ésteres antes mencionados, excepto para la subvariedad TU que en general, muestra un comportamiento contrario (figura 25).

En cuanto a aldehídos y cetonas, compuestos muy importantes generados a partir de la degradación de Strecker, en todas las muestras se encontró la presencia de acetoína (Ce07), bencenoacetaldehído (Ad05) y 2-heptanona (Ce03). La primera se asocia con aromas lácteos y las otras dos con aromas florales, frutales, a coco, almendras y miel (Januszewska, 2018; Kadow et al., 2013; Mori-Mestanza et al., 2021; Suzuki et al., 2019). Por otra parte, la 2-nonanona (Ce05) (presente en las subvariedades upaleñas completamente fermentadas) se asocia con aromas frutales (Rottiers et al., 2019). En las muestras del día 3 de todas las subvariedades se identificó el 2-metilpropanal (Ad08), cuya participación en reacciones secundarias de condensación con otros aldehídos, genera compuestos que aportan notas aromáticas florales y dulces (Toker et al., 2020).

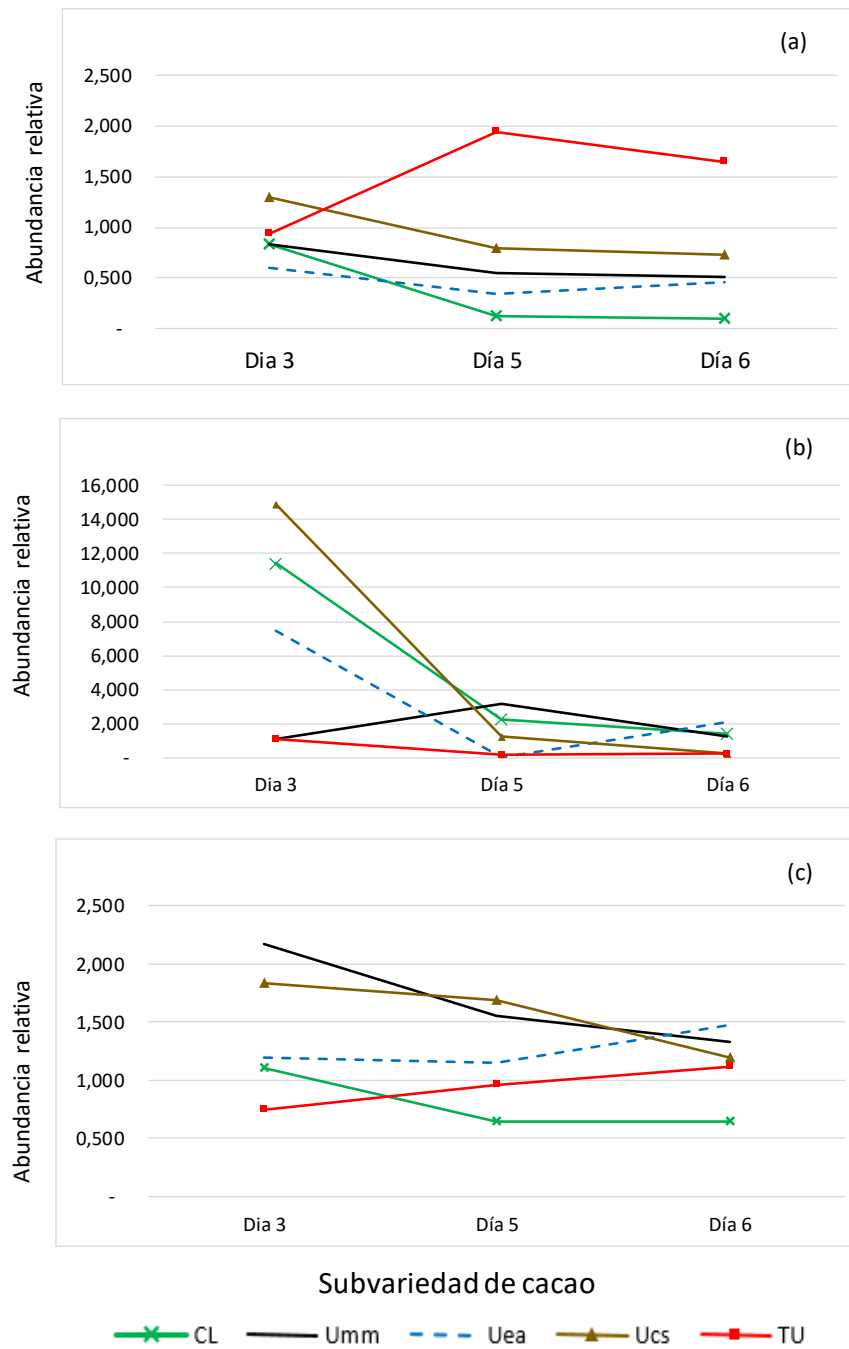


Figura 25. Comportamiento de la abundancia relativa de distintos ésteres asociados con perfiles aromáticos frutales y herbales para todas las subvariedades a lo largo del tiempo de fermentación: (a) acetato de 3-metil-1-butanol, (b) acetato de etilo, (c) acetato de 2-pentanol.

En el proceso de tostado, debido a la aplicación de calor, algunos aldehídos pueden dar origen a compuestos volátiles heterocíclicos, como las pirazinas, las cuales se han asociado con aromas diferenciados que se forman debido a la participación de precursores (péptidos de cadena corta, aminoácidos libres y azúcares reductores) en reacciones de Maillard y en la degradación de Strecker (Solarte, 2021; Vázquez-Obando, 2016). Las más abundantes y que estuvieron presentes en todas las muestras analizadas, fueron la tetrametil y la trimetil pirazina, identificadas previamente por su aporte de notas a caramelo, chocolate, nueces, maní, tostado, herbal, entre otros (Cocom, 2021; Deusher et al., 2020; Otero et al., 2022; Suzuki et al., 2019). Algunos estudios sugieren que la trimetil pirazina es la principal y más abundante pirazina encontrada en los granos de cacao fermentados, secos y tostados, atribuyéndole además la característica de potenciar el aroma del cacao (Solarte, 2021).

La formación de este tipo de compuestos se atribuye principalmente a las reacciones a partir de α -aminocetonas (Rodríguez-Campos et al., 2012), en las que reaccionan la acetoína y el 2,3-butanodiol con aminoácidos libres (Grafack et al., como se cita en Utrilla-Vásquez et al., 2019). Sin embargo, también se ha reportado que pueden formarse por el metabolismo de *Bacillus subtilis* y *B. megatrium*, que pueden intervenir alrededor del quinto día de fermentación, a temperaturas entre 30-50 °C (Jinap et al., 1994).

La figura 26 ilustra el comportamiento en el tiempo de la acetoína (figura 26b) y el 2,3-butanodiol (figura 26a), antes mencionados como precursores de las pirazinas. Al no evidenciarse una disminución de estos precursores en el tiempo, pero sí un aumento en la abundancia relativa de las pirazinas (figura 26c), es probable que algunas de las pirazinas identificadas se hayan formado por el metabolismo de bacterias del género *Bacillus*, tal y como mencionan Jinap et al. (1994).

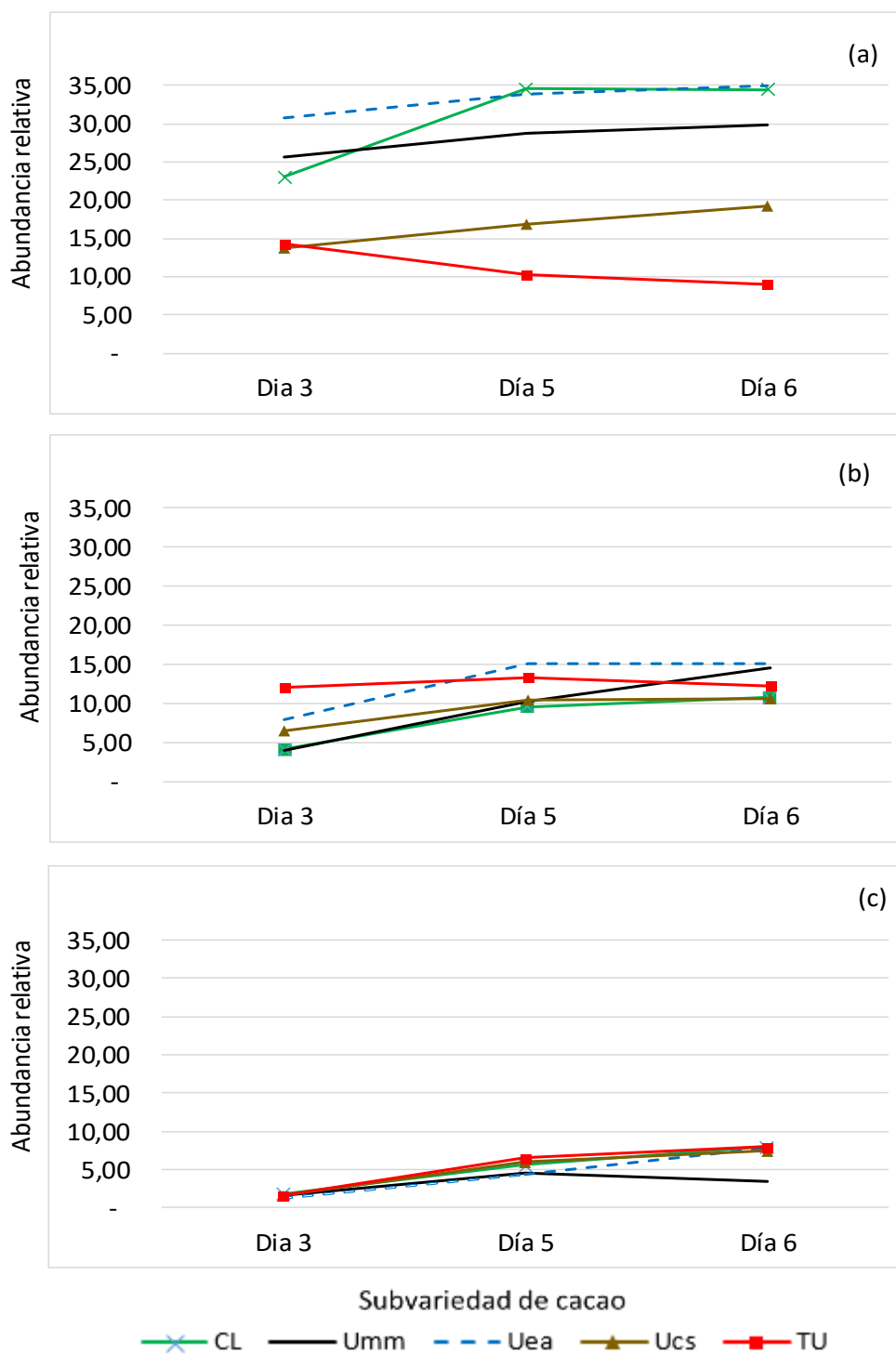


Figura 26. Abundancia relativa de pirazinas y algunos de sus compuestos precursores: (a) 2,3-butanodiol, (b) acetoina, (c) tetrametil pirazina + trimetil pirazina.

Siempre refiriéndose a las pirazinas, Serra-Bonheví (como se cita en Rodríguez-Campos et al., 2012) menciona que estos compuestos pueden representar hasta un 40 % del aroma total de cacao tostado, aun cuando su abundancia relativa es baja, menor a un 5 %. Como se puede apreciar en la figura 26c, y coincidiendo con estos autores, la abundancia relativa de las dos pirazinas mayoritariamente encontradas en las cinco subvariedades estudiadas al sexto día de fermentación, presentan valores entre 3,3 - 7,9 %.

Otros compuestos identificados incluyen aminas y terpenos, entre ellos el c-terpineno y el timol, que aportan notas frutales, dulces y cítricas (Januszewska, 2018; Suzuki et al., 2019), así como algunos hidrocarburos, entre ellos tridecano y decano, asociado con aromas cítricos y frutales (Suzuki et al., 2019).

Como ya se mencionó, algunos compuestos identificados no se han relacionado previamente con aromas específicos. Esto coincide con lo reportado por Kongor et al. (2016), quienes refieren que no todos los compuestos volátiles presentes son importantes para el perfil aromático del cacao.

En el cuadro 11 se muestran los compuestos asociados con aromas para las distintas subvariedades, secas y tostadas, al final de la fermentación (día 6). La subvariedad Ucs resultó con la mayor cantidad de compuestos volátiles (38 compuestos) previamente asociados con aromas. Importante mencionar que en la mezcla de clones y en la subvariedad upaleña Umm se identificó un terpeno específico, el linalool, asociado con aromas florales a lavanda y jazmín, muy apreciados en el cacao.

Cuadro 11. Compuestos volátiles asociados a aromas en las diferentes subvariedades de cacao, secas y tostadas, al sexto día de fermentación.

N°	Compuestos asociados con aromas	Acrónimo	CL	Umm	Uea	Ucs	TU
1	Ácido 3-butanoico	Ac02		x	x	x	
2	Ácido acético	Ac04	x	x	x	x	x
3	Ácido butanoico, 2-metil	Ac07	x		x	x	x
4	Ácido butanoico, 3-metil	Ac08	x	x	x	x	x
5	Ácido L-lactico	Ac11	x		x	x	x
6	Ácido propanoico	Ac15	x			x	
7	1-butanol, 3-metil-	Al02	x	x	x	x	x
8	2,3-butanodiol	Al05	x	x	x	x	x
9	2-butanol	Al07	x			x	
10	2-heptanol, 3-metil	Al08	x	x	x	x	x
11	Bencenometanol, α -metil-	Al16	x	x		x	x
12	Etanol	Al17	x	x	x	x	x
13	Alcohol isopropílico	Al18		x	x		x
14	Fenol	Al19	x		x		
15	Alcohol feniletílico	Al21	x	x	x	x	x
16	3-ciclohexeno-1-acetaldehído, α ,4-	Ad02	x	x	x		
17	Benzaldehido	Ad04			x	x	x
18	Bencenoacetaldehído	Ad05	x	x	x	x	x
19	Nonanal	Ad07	x	x			
20	Propanal, 2-metil	Ad08		x		x	x
21	2,3-butanediona	Ce01		x	x	x	
22	2-butanona	Ce02	x			x	
23	2-heptanona	Ce03	x	x	x	x	x
24	2-nonanona	Ce05		x	x	x	
25	2-octanona	Ce06		x			x
26	Acetoína	Ce07	x	x	x	x	x
27	Acetofenona	Ce08	x	x		x	x
28	Cafeína	Ce09				x	x

Notas: Los compuestos en negrita se encontraron presentes en todas las subvariedades. El color indica la familia química a la que pertenece cada compuesto:

Ácidos carboxílicos	Ésteres	Aldehidos	Pirazinas
Alcoholes	Hidrocarburos	Cetonas	Terpenos

Cuadro 11. Continuación

N°	Compuestos asociados con aromas	Acrónimo	CL	Umm	Uea	Ucs	TU
29	Acetato de 1-butanol, 3-metil	Es04	x	x	x	x	x
30	Acetato de 2-pentanol	Es05	x	x	x	x	x
31	Acetato de etilo	Es08	x	x	x	x	x
32	Acetato de isobutilo	Es09					x
33	Acetato de 1-butanol, 2-metil	Es03		x	x	x	x
34	Ácido benzoico, éster etílico	Es07					x
35	Decano	Hc04	x				
36	Tridecano	Hc08				x	
37	2,3-dietilpirazina	Pz01			x	x	x
38	3-metilpiridazina	Pz02				x	
39	Pirazina, 2,3-dimetil	Pz03			x	x	x
40	Pirazina, 2,5-dimetil	Pz04		x		x	
41	Pirazina, 2,5-dimetil-3-propil	Pz05	x				x
42	Pirazina, 2,6-dimetil	Pz06				x	
43	Tetrametilpirazina	Pz07	x	x	x	x	x
44	Trimetilpirazina	Pz08	x	x	x	x	x
45	α-Terpineno	Tp01		x			
46	c-Terpineno	Tp02	x	x			x
47	Linalol	Tp03	x	x			
48	Terpinen-4-ol	Tp04			x	x	
49	Timol	Tp05				x	
Total de compuestos asociados con aromas			29	30	28	37	31

Notas: Los compuestos en negrita se encontraron presentes en todas las subvariedades. El color indica la familia química a la que pertenece cada compuesto:



Los análisis de varianza mostraron interacción subvariedad*día de fermentación y, por lo tanto, se obtuvieron las medias de Bonferroni realizadas a los 95 compuestos volátiles identificados (anexo H) que evidenciaron que un 32,6 % (31 compuestos) no muestran diferencia significativa para la interacción entre la subvariedad de cacao y el día de fermentación. Para ilustrar mejor las diferencias y similitudes entre los compuestos volátiles significativos encontrados en las distintas muestras de cacao se utilizó la herramienta diagramática conocida como diagrama de Venn, que consiste en representaciones gráficas que muestran la agrupación de elementos y sus relaciones en diferentes conjuntos, cuando estos elementos pueden pertenecer a varias categorías al mismo tiempo (Vásquez et al., 2014).

El diagrama mostrado en la figura 27 representa los compuestos volátiles significativos al final de la fermentación, en donde se observó que hay 16 compuestos que están presentes en las cinco subvariedades estudiadas. La cantidad de compuestos que solo están presentes en una de las

subvariedades se señala con una flecha negra; el resultado obtenido evidenció que dos de las subvariedades (Umm y Uea) no presentaron compuestos diferenciadores con respecto a las demás, pero, la subvariedad Ucs tiene tres compuestos diferenciados relacionados con aromas cítricos y frutales (tridecano y timol), así como una pirazina (3-metilpiridazina) que no se encontró en ninguna de las otras subvariedades; por su parte, la mezcla de clones (CL) presentó dos compuestos que aportan notas cítricas, florales, dulces y frutales (nonanal, decano) y la subvariedad TU tiene un compuesto diferenciado, el acetato de isobutilo, que se relaciona con notas frutales.

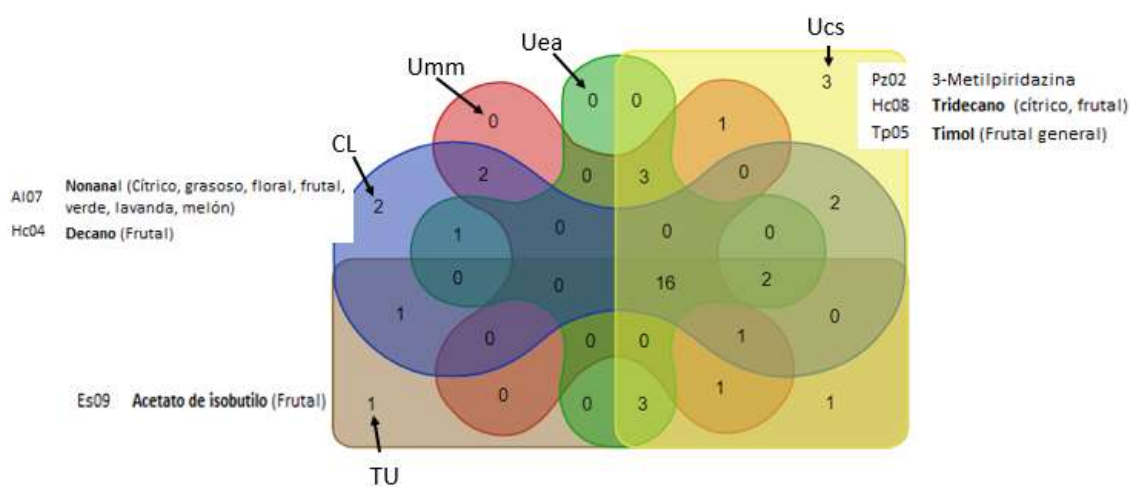


Figura 27. Diagrama de Venn que muestra similitudes y diferencias entre los compuestos volátiles significativos, para las distintas subvariedades totalmente fermentadas (día 6). Diagrama realizado con la herramienta on line https://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html

Ya que se tienen 95 compuestos volátiles no es factible analizar una comparación de medias por cada uno. Con el fin de visualizar las interacciones subvariedad-tiempo de fermentación entre los 64 compuestos que mostraron diferencia significativa ($p \leq 0,05$), se realizó un análisis de clusterización aglomerativa jerárquica (CAJ) y un análisis de componentes principales (ACP). El dendograma de la figura 28 muestra el resultado del análisis de CAJ.

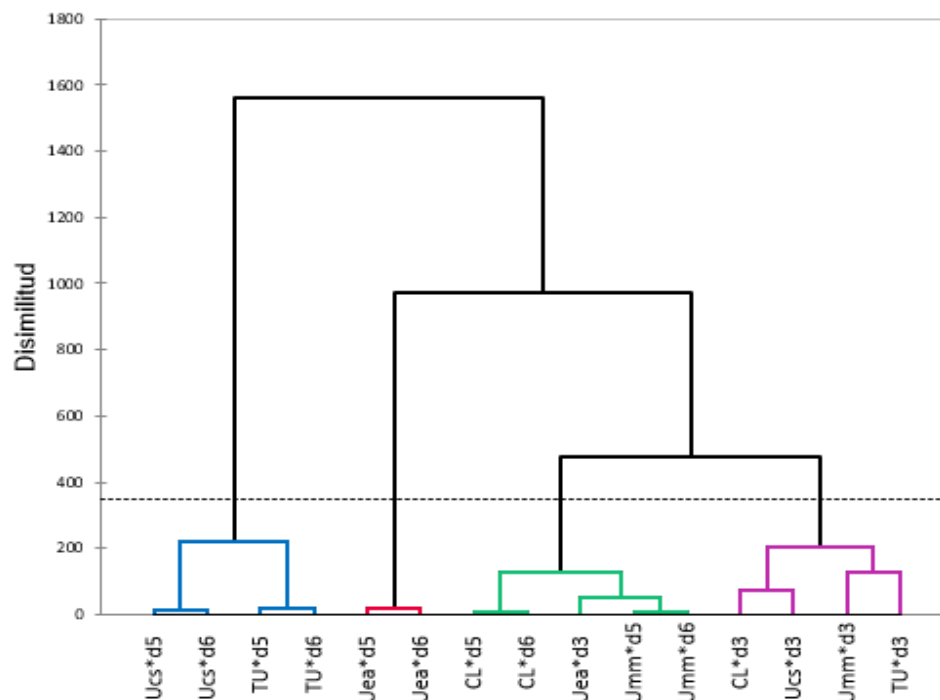


Figura 28. Dendrograma que muestra la clusterización aglomerativa jerárquica de las subvariedades con diferentes días de fermentación de acuerdo con los compuestos volátiles significativos.

Como se puede apreciar, el cacao fermentado de las subvariedades Ucs y TU se agrupan separadas del resto de subvariedades, y parecen no mostrar diferencia entre el día 5 y el día 6. Es interesante este comportamiento ya que ambas subvariedades se producen en la misma finca desde hace alrededor de 50 años, lo que podría sugerir que ha habido intercambio genético entre ellas, y que las condiciones ambientales y las prácticas agrícolas de esta finca productora generan similitudes en sus características de calidad cuando ya se encuentran fermentadas. Es interesante resaltar que 2 de las subvariedades upaleñas y la talamanqueña cultivada en Upala (TU) con 3 días de fermentación se encontraron agrupadas con el clon fermentado al día 3, indicando que los compuestos volátiles iniciales son similares.

Por otra parte, es importante notar que el cacao de la subvariedad Uea parcialmente fermentado (día 3), se agrupa junto con el cacao de 5 y 6 días de fermentación de la subvariedad Umm, lo cual puede sugerir, como mencionan algunos autores, que, debido a procesos de hibridación espontánea, algunos frutos pueden requerir poca o menor fermentación que otras variedades (Arévalo et al., 2016; CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

El análisis de componentes principales (ACP) mostrado en la figura 29 evidenció que los componentes CP1 y CP2 explican un 42,42 % de las variaciones observadas; por otra parte, el CP3 logra explicar en un 14,27 %. El CP1 agrupa, en el eje negativo, todas las subvariedades totalmente fermentadas (día 6), excepto para la subvariedad TU (figura 29a), cuyas muestras con 5 y 6 días de fermentación TU se agrupan de forma separada, en el eje positivo, junto con las muestras Ucs con 5 y 6 días de fermentación, coincidiendo con lo mostrado en el dendograma de la figura 28 y lo comentado de que ambas muestras provienen de la misma finca productora.

En la figura 29c se observa que las muestras fermentadas completamente (6 días) de las subvariedades Uea y Ucs se ubican en el eje negativo del CP2, y se asocian con compuestos volátiles indicadores de aromas claves, como la trimetil pirazina (Pz08) y tetrametil pirazina (Pz07), formadas principalmente en cacaos fermentados durante los procesos de secado y tostado. La tetrametil pirazina se encuentra en mayor cantidad, tal y como se refiere por varios autores (Delgado-Ospina et al., 2020; Deus et al., 2021; Mori-Mestanza et al., 2021), asociada también a otras pirazinas, como la pirazina 2,3-dimetil (Pz03).

También es interesante observar que, en el eje positivo de ambos componentes, se agrupa la mayoría de las muestras parcialmente fermentadas (día 3), sin embargo, compuestos como el etanol (Al07), formado en esos primeros días por acción de las levaduras, se encuentra asociado principalmente en cantidades pequeñas al cuadrante inferior izquierdo (figura 29c), en donde se ubican muestras con 5 y 6 días de fermentación, en las cuales este compuesto ya no debería estar presente debido a la conversión a ácido acético producto de la acción de bacterias ácido acéticas (Calvo et al. 2021, Rodríguez-Velázquez et al. 2022).

En la figura 29b se observa que las subvariedades Ucs y TU se agrupan en dimensiones opuestas y que las muestras parcialmente fermentadas (día 3) se agrupan ahora en el eje positivo del CP1, pero en ambos ejes del CP3 (figura 29b). Asimismo, la subvariedad upaleña Uea parcialmente fermentada se encuentra más cerca del eje central, separándose del resto de subvariedades con 3 días de fermentación, coincidiendo con lo observado en el análisis de CAJ.

Además, con el CP3 se observa un efecto importante de la subvariedad TU, la cual agrupa en su eje positivo a las muestras de los tres tiempos de fermentación, cercanas a las demás variedades parcialmente fermentadas, asociando a esta subvariedad con compuestos como el etanol (lo cual

podría estar asociado con una menor fermentación) y, con la presencia del ácido acético (figura 29d). Si bien estos compuestos se consideran no deseados en el cacao fermentado, Deusher et al. (2020) asociaron por primera vez, mediante análisis GC-Olfatometría (GC-O), varios compuestos, entre ellos el etanol, con olor característico a chocolate oscuro en cacaos fermentados, secos y tostados. En este componente se agrupan también ésteres y cetonas asociados a compuestos aromáticos del cacao [acetato de 3-metil-1-butanol (banano, frutal, dulce) y 2-nonanona (herbal, frutal, dulce)] (Deusher et al., 2020; Januszewska, 2018; Kadow et al., 2013; Suzuki et al., 2019).

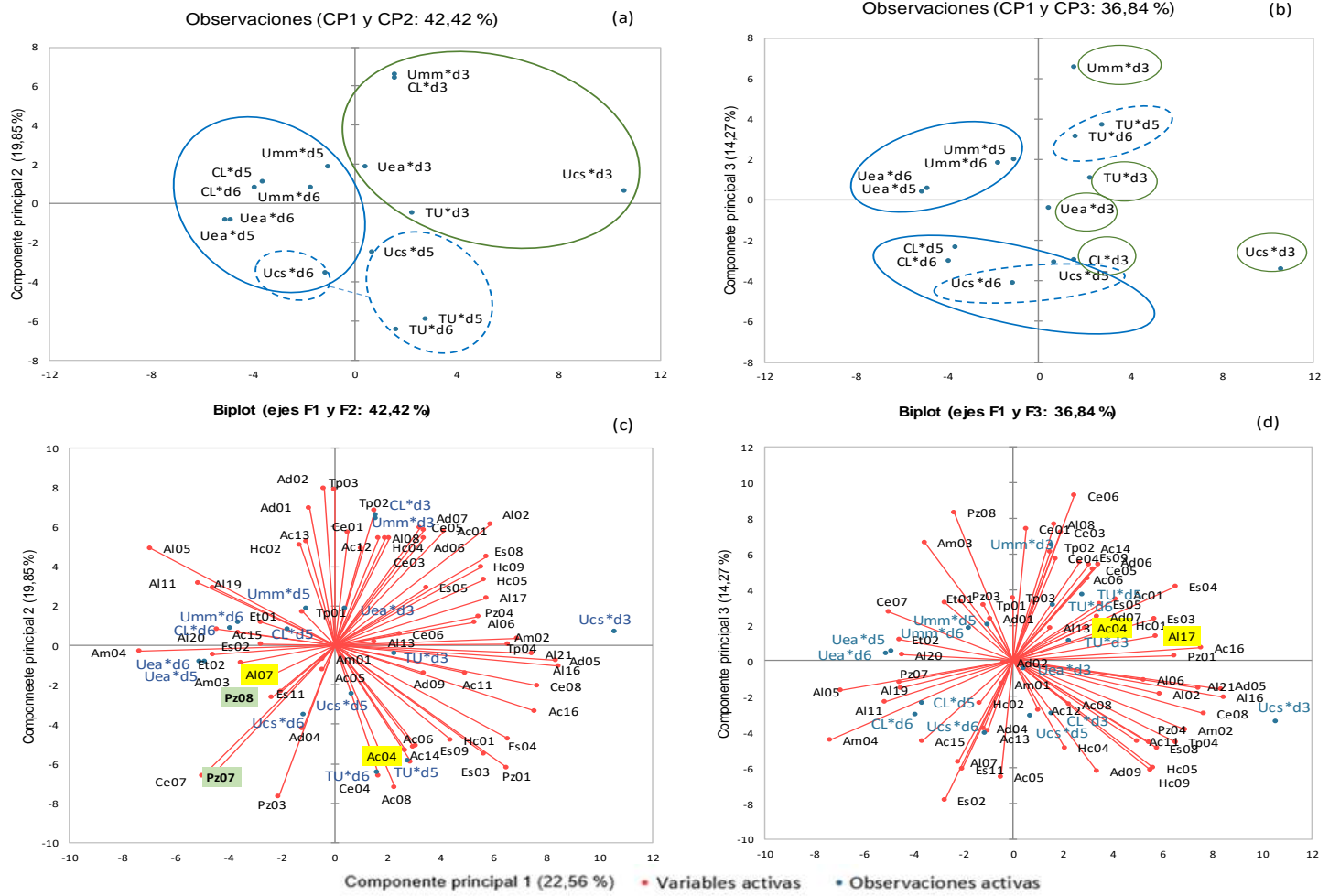


Figura 29. Análisis de componentes principales de compuestos volátiles para el tiempo de fermentación (día 3, día 5 y día 6) y todas las subvariedades.

Para tratar de evidenciar si la subvariedad Uea parcialmente fermentada podría requerir menos días de fermentación para tener un perfil de compuestos volátiles similar al de la subvariedad Umm con más días de fermentación, se realizó un diagrama de Venn. La figura 30 muestra que la mayoría de los compuestos volátiles aromáticos de la subvariedad Umm con 5 y 6 días de fermentación están presentes en la subvariedad Uea parcialmente fermentada (día 3), pero, además, la subvariedad Uea del día 3 tiene un perfil de compuestos aromáticos que no están presentes en la Umm con 5 y 6 días de fermentación. Pese a que hay compuestos que solo están en la Umm, resultaría muy interesante poder corroborar estos resultados con una evaluación sensorial, para eventualmente poder reducir el tiempo de fermentación de la subvariedad Uea sin afectar su perfil aromático.

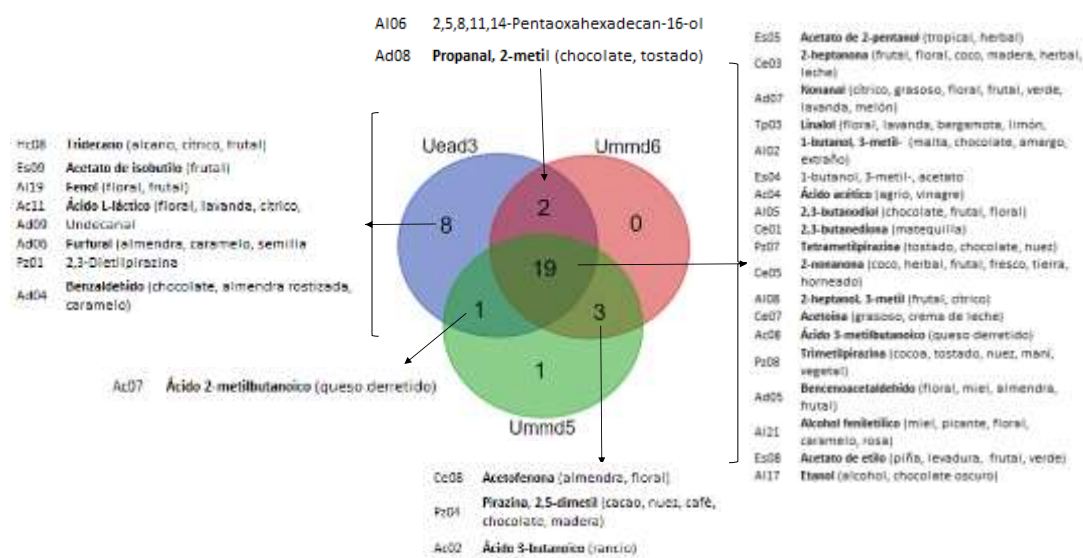


Figura 30. Diagrama de Venn que muestra similitudes y diferencias entre compuestos volátiles significativos de la subvariedad Uea parcialmente fermentada y la subvariedad Umm fermentada.

Diagrama realizado con la herramienta on line https://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html

Para finalizar esta sección, con el fin de visualizar si a diferentes tiempos de fermentación hay compuestos comunes, se realizó un nuevo diagrama de Venn para las cinco subvariedades con 5 y 6 días de fermentación (figura 31).

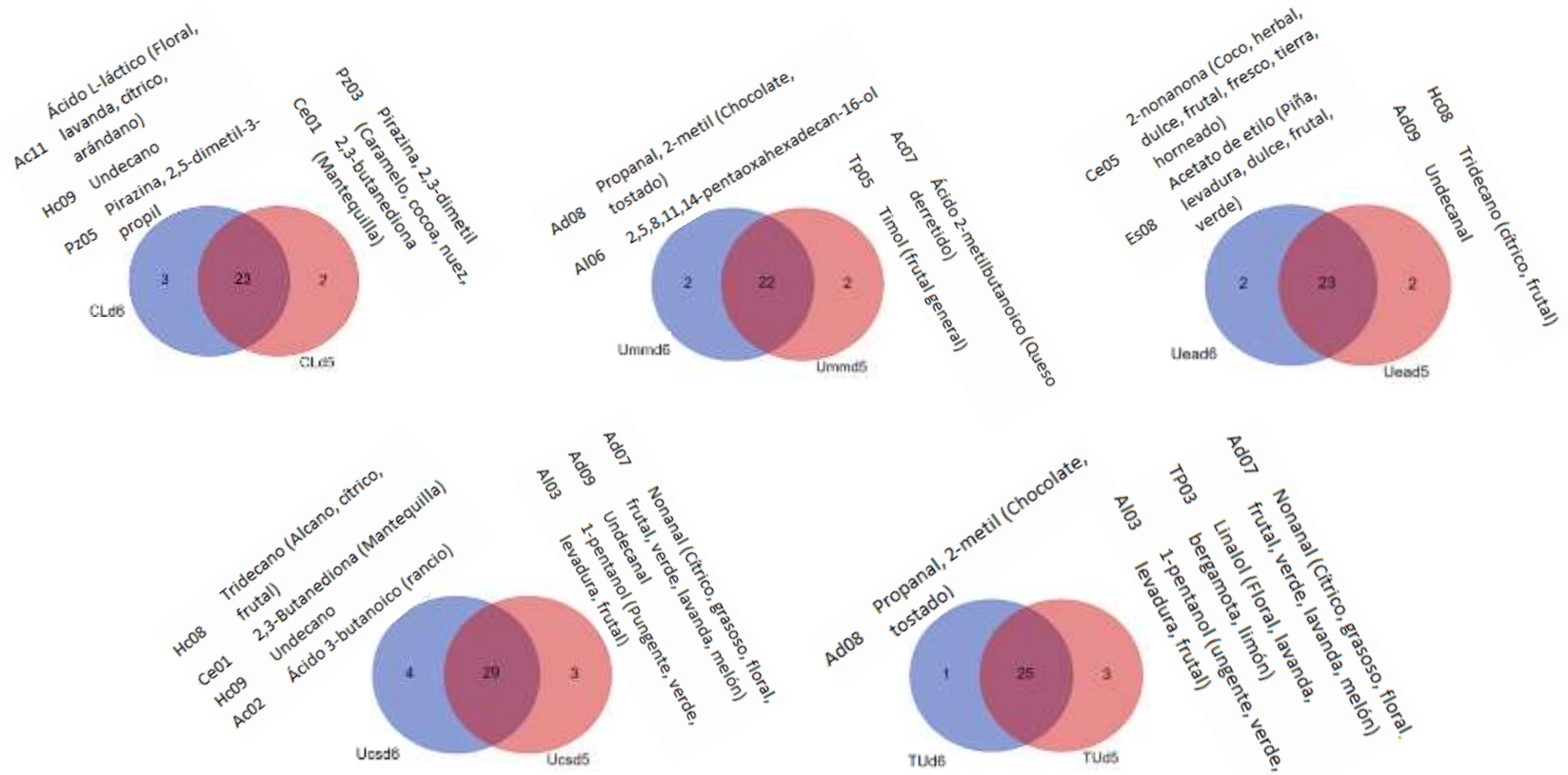


Figura 31. Compuestos volátiles relacionados con aromas específicos para las muestras de cacao con 5 y 6 días de fermentación, para todas las subvariedades. Diagrama realizado con la herramienta on line https://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html

Como se muestra en la figura 31, las subvariedades tienen entre 22 – 29 compuestos comunes en ambos días; esto representa una similitud de 81 % (29 compuestos comunes de un total de 36) para la subvariedad Ucs, 82 % para CL, 85 % para las subvariedades Umm y Uea, y 86 % para TU. Si bien la mayoría de los compuestos identificados están presentes en ambos días, al igual que se comentó anteriormente, sería muy interesante poder validar sensorialmente si el perfil aromático de las distintas subvariedades se ve afectado o no por las diferencias encontradas.

5.2.3 Análisis de péptidos

El análisis SDS-PAGE aplicado a muestras de cacao fermentado y seco permitió obtener la separación electroforética de los péptidos y proteínas presentes en las muestras, de acuerdo con sus pesos moleculares. La figura 32 presenta el resultado obtenido para las cinco subvariedades; cada una de las bandas que aparece en la figura corresponde a un grupo de péptido y proteínas presentes en el cacao, que comparten el mismo peso molecular.

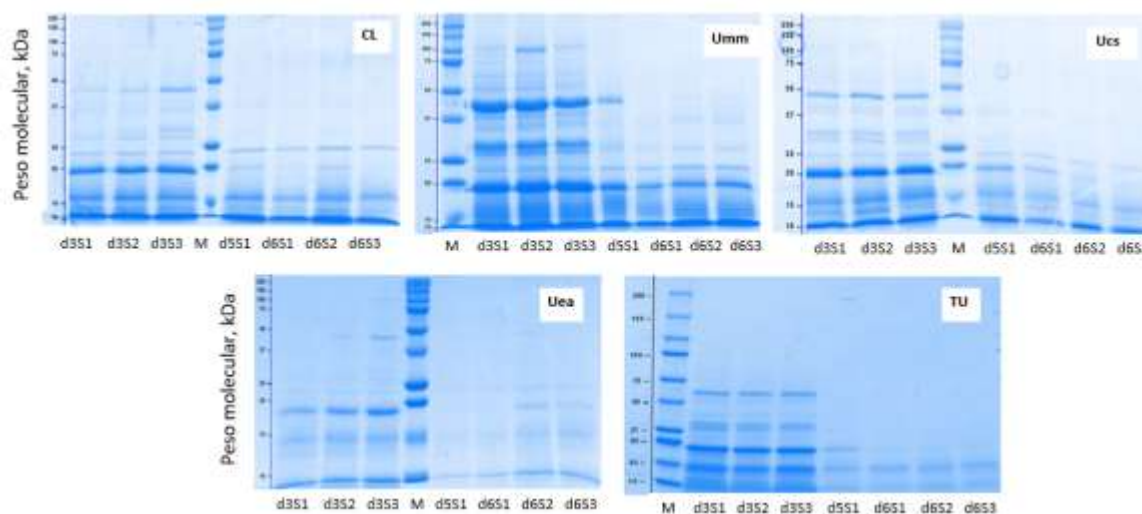


Figura 32. Visualización general de péptidos identificados por SDS-PAGE (12 %) en las cinco subvariedades de cacao sembrado en Upala, Costa Rica.

Notas: El tiempo de fermentación se muestra en días (día 3 = d3, día 5 = d5, día 6 = d6). El tipo de secado se identifica con la letra S (S1: secador de circulación continua de aire caliente, S2: secador de aire transversal a 1 m/s, S3: secador de aire transversal a 2 m/s). La movilidad relativa de las bandas no es comparable entre los distintos geles, para cada uno la referencia es la línea que tiene el marcador (M).

Tal y como se puede apreciar, de manera general, al día 3 hay más bandas de mayor peso molecular que el resto de los días. Esto se explica debido a que, a partir del tercer día de fermentación, la muerte del embrión, inducida por la acción de los microorganismos y sus metabolitos, con el

consecuente aumento de la temperatura y cambio de pH, permite que se liberan enzimas proteolíticas endógenas que catalizan la producción de péptidos y aminoácidos a partir de las proteínas presentes inicialmente, en especial la globulina y la vicilina (Cocom, 2021; Deus et al., 2021; Janek et al., 2016; Marseglia et al., 2014; Santander et al., 2020;).

El cuadro 12 muestra los pesos moleculares de los péptidos visualizados para cada una de las cinco subvariedades a lo largo de la fermentación; estos fueron calculados por interpolación de las bandas incógnitas en la curva de calibración, a partir de la recta de mejor ajuste. Los datos de dichas rectas y sus respectivos coeficientes de correlación se encuentran en el anexo D.

Al tercer día, para la subvariedad Umm se identificaron las bandas de mayor peso molecular (60 – 114 kDa), mientras que para la subvariedad Uea se identificaron las de menor peso (< 30 kDa). Al día 6 se obtienen, para todas las subvariedades, péptidos con peso molecular menor a los 30 kDa. Algunos de los péptidos visualizados coinciden con estudios previos que identificaron por la misma técnica, péptidos de 15, 31 y 47 kDa provenientes de la vicilina (Voigt et al., 1993). Los resultados obtenidos (cuadro 12) evidencian, excepto para la subvariedad Umm, que a partir del día 5, solamente es posible identificar péptidos menores a 30 kDa, lo cual coincide con lo reportado por Kumari et al. (2016), quienes identificaron a partir del quinto día, en granos híbridos procedentes de Costa de Marfil, una banda cercana a los 21 kDa, y una débil banda de 15 kDa, confirmando así la transformación de estos compuestos a lo largo del proceso.

Cuadro 12 Pesos moleculares (kDa) de los péptidos visualizados por SDS-PAGE (12 %) para las cinco subvariedades en distintos tiempos de fermentación y secador S1.

Subvariedad	Día 3	Día 5	Día 6	Subvariedad	Día 3	Día 5	Día 6
Umm	114			CL	57		
	96				29		
	81				23	25	25
	68				18	19	-
	53	58			13	13	13
	46				11	11	11
	40				10	10	9
	31	30	31		28	29	29
	28				20		
	23	23	23		13		15
	18	18	18		11		
	12	14	13		7	8	8
	11	11	11		43		
Ucs	58			TU	31		
	45				26		
	33				24		
	29				21		
	23	24	23		18		
	18	19	18		16	17	18
	11	13	12		13	13	13
	10				10		
	8	9	9		9	9	10

Los resultados son similares a los reportados por Amin et al. (1997) quienes encontraron bandas que revelan la presencia de péptidos de 41,7 kDa en el cacao en baba y en los tres primeros días de fermentación, los cuales, sin embargo, ya no se detectan por este método a partir del cuarto día.

Con respecto a los altos pesos moleculares (> 68 kDa) observados en la muestra Umm, Buyukpamukcu (2001) identificó, en los primeros 3 días de fermentación, bandas cercanas a los 90 kDa en cacao amelonado (variedad Forastero) procedente de Costa de Marfil. Por otra parte, Lerceteau et al. (1999) reportaron que, producto de una modificación pos-traducciona (inducida o en vivo) de la vicilina (tipo 7S, encontrada también en semillas de algodón), se puede formar un trímero de 139 kDa. La degradación posterior de ese tipo de polipéptidos podría explicar la mayor cantidad de bandas de alto peso molecular visualizadas para esta especie en particular.

La cantidad de péptidos y proteínas visualizadas para cada una de las subvariedades se presenta en el cuadro 13. Según se aprecia, con respecto al tiempo de fermentación no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) en la cantidad de péptidos visualizados el día 5 y el día 6, pero si existe diferencia con respecto al días 3, en el que se visualizaron una mayor cantidad de bandas. Con respecto a la subvariedad, hay diferencia significativa entre la subvariedad upaleña Umm, que tiene una mayor cantidad de péptidos para cada tiempo de fermentación y la subvariedad Uea, en la que

se visualizó la menor cantidad de péptidos; sin embargo, no existe diferencia significativa entre cada de estas subvariedades y las subvariedades CL, TU y Ucs.

Cuadro 13. Cantidad de bandas identificadas para cada subvariedad a lo largo de la fermentación para el secado de circulación continua de aire caliente a 40 °C.

Subvariedad	Tiempo de fermentación		
	Día 3 ^a	Día 5 ^b	Día 6 ^b
CL ^{ab}	7	5	4
Umm ^a	13	6	5
Ucs ^{ab}	9	4	4
Uea ^b	5	2	3
TU ^{ab}	10	3	3

Con el fin de evidenciar la transformación sufrida por los péptidos visualizados a lo largo de la fermentación, se hizo un análisis de la intensidad de sus bandas, asociándola de esta forma con su abundancia relativa en el tiempo.

En la figura 33 se observa el resultado para todas las subvariedades. Es interesante notar que desde el día 3 hay presencia de péptidos de bajo peso molecular (< 20 kDa), cuya intensidad de banda muestra que están presentes en una mayor abundancia relativa que en el quinto y sexto día de fermentación. Si bien el contenido de proteínas del cacao está compuesto mayoritariamente por albúmina (52%) y vicilina (43 %), en cacao no fermentado se ha reportado la presencia de otras fracciones nitrogenadas proteicas más pequeñas (Kumari et al., 2016; Lerceteau, 1999).

Los perfiles de abundancia obtenidos parecen tener relación con lo reportado por Lerceteau et al. (1999), quienes analizaron la evolución de las proteínas de cacao durante la fermentación por 2D-PAGE e identificaron, mediante el análisis de su abundancia y posterior cuantificación, tres categorías de péptidos. La primera de ellas representó aproximadamente el 70 % y, corresponde a polipéptidos que resisten la degradación a lo largo de la fermentación (peso molecular de 16,5 kDa) o de lenta degradación (21 kDa). Una segunda categoría incluyó aquellos que ya no están presentes al final de la fermentación, correspondientes a la globulina, que se transformaron en los primeros tres días de la fermentación en subunidades de 47 kDa, 31 kDa y 14,5 kDa. Por último, la tercera categoría corresponde a fracciones más pequeñas, de entre 11 – 17 kDa, las cuales aumentan su concentración.

Los cambios observados en la intensidad de las bandas de todas las subvariedades confirman la transformación en el tiempo de las fracciones de mayor peso molecular en compuestos menores, como péptidos y aminoácidos libres. Esta transformación no solo va a permitir que estos compuestos contribuyan con la formación de compuestos aromáticos mediante su participación en reacciones de Maillard durante el tostado, si no que se transformen en otro tipo de compuestos que no pueden ser detectados mediante la técnica aplicada, por ejemplo, aminas bioactivas (Castro-Alayo et al., 2019, Deus et al., 2021).

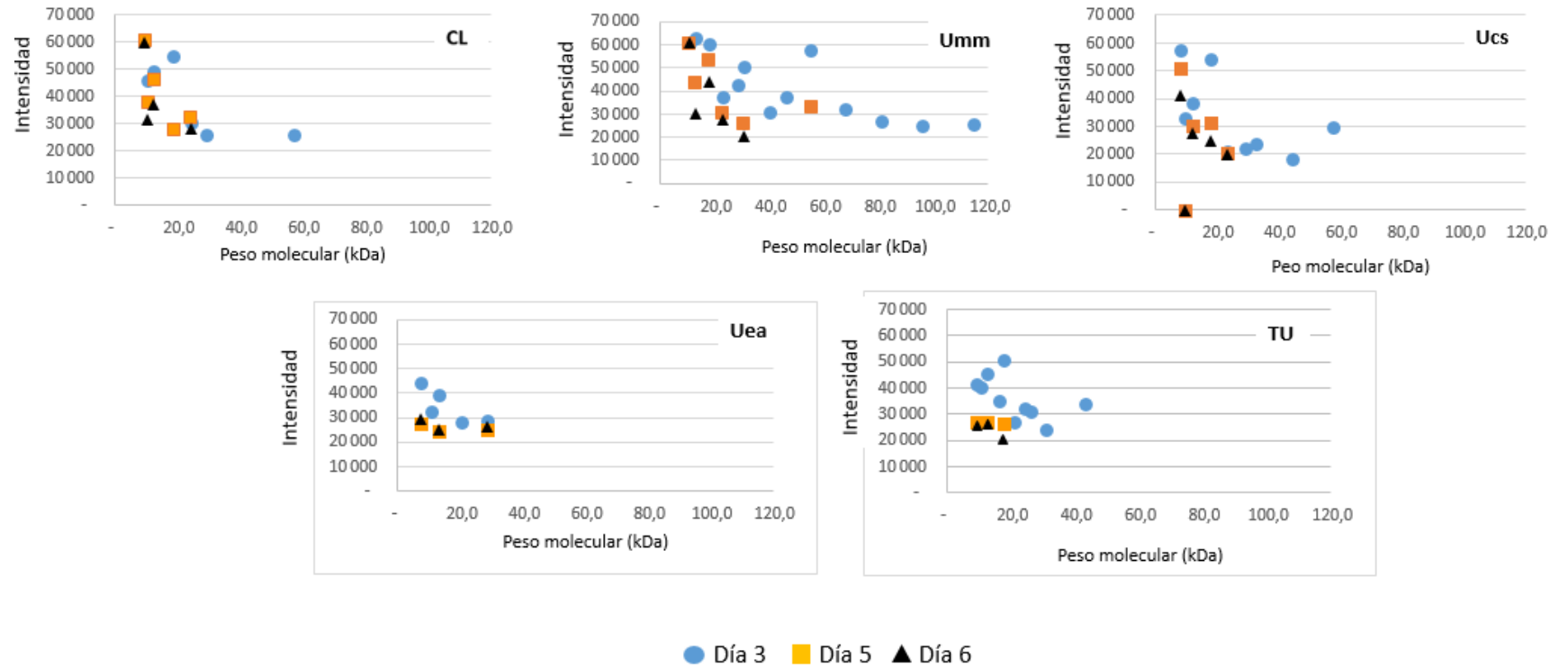


Figura 33. Abundancia relativa de péptidos visualizados por SDS-PAGE (12 %) en las cinco subvariedades de cacao a lo largo de la fermentación, para el secado por circulación continua de aire caliente a 40 °C (S1).

5.2.4 Interacción de las distintas variables respuesta para el efecto del tiempo de fermentación

Con el fin de visualizar si existen sinergias entre las distintas variables respuesta evaluadas en función del tiempo de fermentación, se aplicó un análisis multifactorial (AMF), el cual logró explicar un 42,35 % de las relaciones observadas. Para simplificar la imagen obtenida (figura 34), los compuestos volátiles significativos se agruparon según la cercanía mostrada en el análisis de componentes principales (el detalle del agrupamiento se encuentra en el cuadro 26-anexo J).

Este análisis confirmó que las subvariedades se agrupan en función del día de fermentación (figura 34a), a la vez que evidenció algunas relaciones interesantes entre las variables estudiadas, las cuales se detalla a continuación.

Asociados a la fase aerobia se ubica la mayor cantidad de péptidos precursores de aroma (cuadrante positivo del factor 1). Como se mencionó anteriormente, conforme avanzaron los días de fermentación, los péptidos de mayor peso molecular se fueron transformando en péptidos más pequeños, y, algunos de estos posteriormente se transformaron en compuestos aromáticos, provocando la disminución en el tiempo de la cantidad de fracciones peptídicas identificadas. Por otra parte, el vector que indica la presencia de ácido cítrico, presente en mayores cantidades al inicio de la fermentación al ser uno de los ácidos presentes en el cacao en baba, se ubica cerca del agrupamiento de las variedades con 3 días de fermentación, así como también de la subvariedad Umm del día 5 y día 6, que se habían mostrado, en el dendograma de la figura 28, agrupadas más cerca de las subvariedades parcialmente fermentadas que de las del final de la fermentación.

Se puede apreciar también que el agrupamiento de los cacaos parcialmente fermentados se relaciona mayoritariamente con la presencia de una gran cantidad de compuestos volátiles asociados con aromas, como las cetonas (identificadas como Ce); también aldehídos, alcoholes e hidrocarburos, algunos de los cuales (undecano (Hc09), benceno 1-propenilo (Hc01), 4,5-dimetil-orto-fenilendiamina (Am02), heptano, 2,2,4,6,6-pentametil (Hc05)) no han sido previamente asociados con compuestos aromáticos específicos, pero podrían jugar un papel importante como precursores.

En cuanto a las pirazinas, se observa que en el cuadrante inferior derecho (figura 34b) no hay vectores asociados a este tipo de compuestos, es decir, no están presentes en cantidades

apreciables en las muestras parcialmente fermentadas (día 3). Tal y como se reporta en la literatura, compuestos aromáticos como las pirazinas, se forman posteriormente a partir de precursores formados durante la fase anaerobia de la fermentación (Arvelo et al., 2017; Deus et al., 2021; Marseglia et al., 2014). Esto se evidencia en el análisis multifactorial, pues la presencia de estos compuestos (identificados en recuadro amarillo en la figura 34b en el cuadrante superior izquierdo, identificadas como Pz1 y Pz2) se encuentra relacionada con el agrupamiento de las muestras con 5 y 6 días de fermentación, principalmente con las subvariedades Ucs, Uea y TU.

De esta manera, los resultados obtenidos muestran relación entre la cantidad de péptidos precursores de aromas, la presencia de ácidos orgánicos, principalmente ácido cítrico y ácido acético, y los compuestos volátiles, con las distintas fases de la fermentación, identificando relaciones específicas en cacaos parcialmente fermentados (día 3) en comparación con las muestras fermentadas (5 y 6 días).

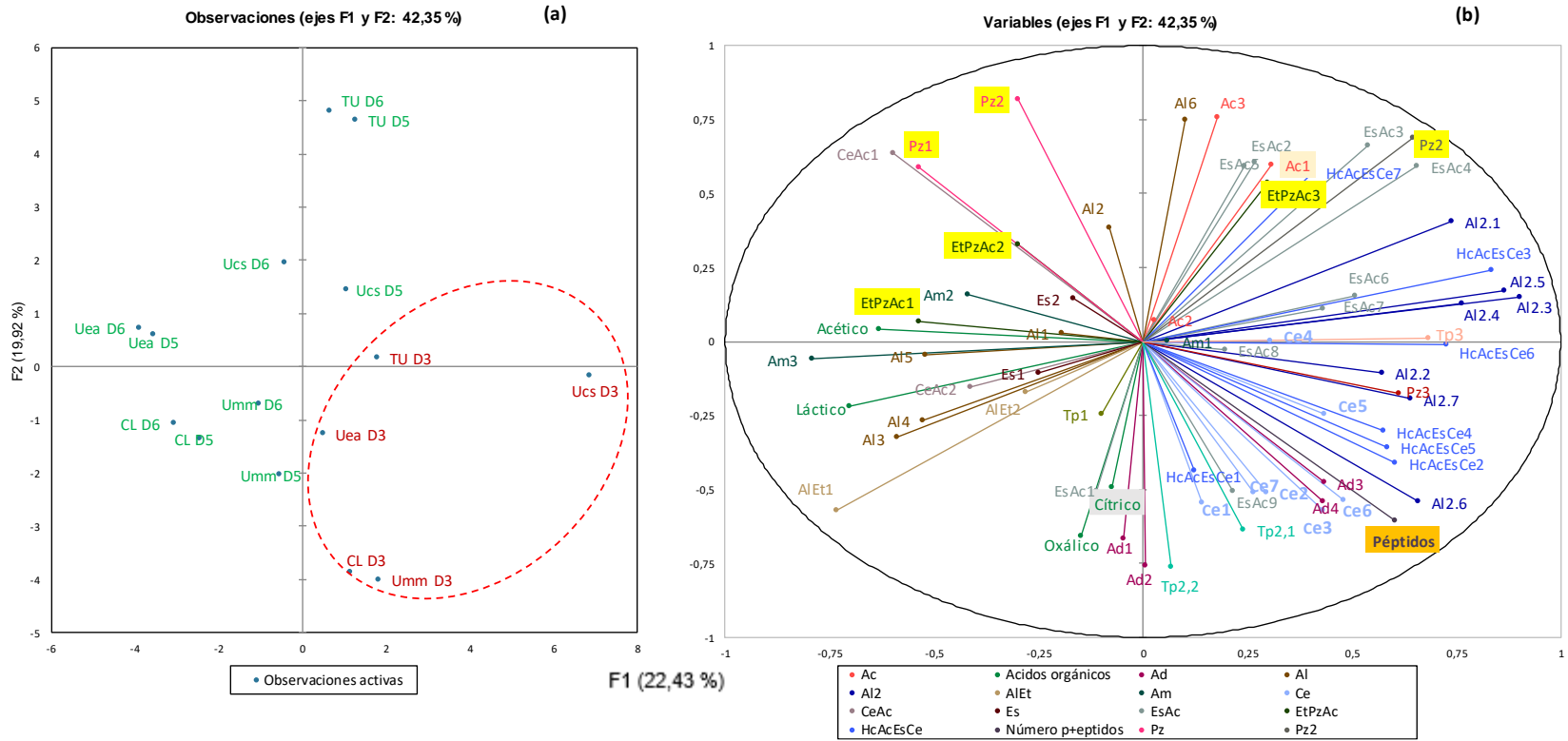


Figura 34. Análisis multifactorial para el efecto del tiempo de fermentación.

5.3 Efecto del tipo de secado sobre el contenido de ácidos orgánicos, el perfil de compuestos volátiles y péptidos precursores de aromas clave

5.3.1 Contenido de ácidos orgánicos

Se estudió el efecto del tipo de secado aplicado sobre el cacao posterior a su fermentación, para lo cual se contó con tres sistemas: el secador de circulación continua (S1), el secador de flujo transversal con una velocidad de 2 m/s (S2), y el secador de flujo transversal con velocidad de 1 m/s (S3). El análisis estadístico reveló que la acidez total no muestra diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a la subvariedad, pero en cuanto a ácidos específicos, los 9 ácidos identificados (oxálico, cítrico, succínico, láctico, acético, quínico, tartárico, glucónico y málico) muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a la subvariedad (cuadro 18A, anexo E). Al igual que en el efecto observado para el secador de circulación continua (S1), en la subvariedad TU están presentes todos los ácidos cuantificados, y es esta subvariedad la que presenta menor contenido de ácido oxálico, cítrico y acético.

Con respecto al día de fermentación y tipo de secador, los ácidos que mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) fueron el oxálico, cítrico, láctico, acético y tartárico (cuadro 20B, anexo E). En general, para un mismo día de fermentación, no existe diferencia significativa en el contenido de ácidos orgánicos de las muestras de los tres tipos de secador.

En la figura 35 se muestra el contenido de estos ácidos orgánicos significativos en función del tipo de secador, para las muestras parcialmente fermentadas (día 3) y totalmente fermentadas (día 6); se observa que para el ácido cítrico, todos los secadores favorecen la disminución de su contenido en el tiempo, contrario a lo que sucede con el ácido acético y el ácido láctico, que, como se explicó anteriormente para el secador S1, aumentan con el tiempo de fermentación debido al metabolismo de las bacterias ácido acéticas y ácido lácticas; sin embargo, se esperaba que el ácido acético, al ser volátil, disminuyera durante el secado, comportamiento que no se observó en ninguno de los tres secadores.

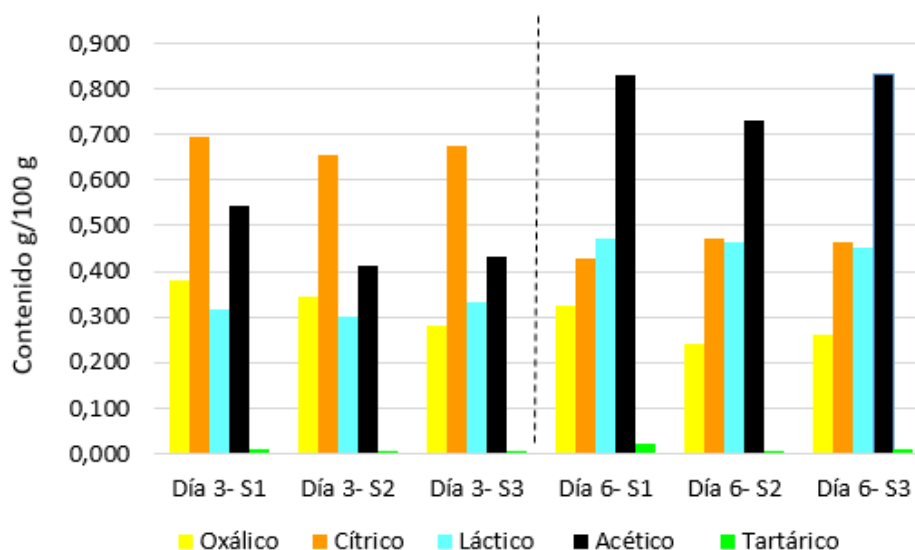


Figura 35. Contenido de ácidos orgánicos significativos de nibs de cacao en función del día de fermentación y el tipo de secador

El ácido acético, compuesto volátil, debería haber disminuido su concentración al someterse a los procesos de secado y tostado, sin embargo, al observar el comportamiento de este ácido en los dos secadores de flujo transversal, S2 y S3, se obtiene el mismo comportamiento observado en el secador de circulación continua (S1), lo cual refiere nuevamente a la posibilidad de que se haya producido un endurecimiento de la cascarilla que dificultara la difusión del ácido acético (Parra, 2014), o bien, que el secado se haya realizado demasiado rápido (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

Reforzando lo anterior, Hoskin y Dimick (citados en Chica, 2022), mencionan que la difusión de los ácidos se ve disminuida durante el secado debido a que la cascarilla se adhiere a los cotiledones. Por su parte, en un estudio realizado por García-Alamilla et al. (2007), se comprobó que la humedad de la cascarilla alcanzaba valores cercanos al 10 % en aproximadamente 1 h de secado, provocando esto el efecto de barrera y disminución de la tasa de difusividad.

El endurecimiento de la cascarilla está relacionado no solo con la temperatura, sino además con el tiempo de secado. En un estudio realizado por Rodríguez-Campos et al. (2011) se reportó, en muestras secadas en horno de convección a 60, 70 y 80 °C por 12, 8 y 6 h respectivamente, contenidos de ácido acético entre 0,8769 – 0,9576 g/100 g, valores que son superiores a los obtenidos en la presente investigación, en la que el secado se realizó a 40 °C. Estos autores

reportaron, además, que el contenido de ácido acético fue significativamente menor ($p < 0,05$) en muestras de cacao secado al sol. El secado solar tiene la particularidad de requerir tiempos de secado más largos (Cocom, 2021), lo que podría estar favoreciendo la difusividad del ácido acético a través de la cascarilla.

En el cuadro 14 se presentan los datos generales del proceso de secado realizado; las cinco subvariedades estudiadas requirieron de 5 - 7 días para alcanzar valores de humedad de 7,2 – 7,6 % (humedades reportadas previamente en el cuadro 8) y, los resultados obtenidos confirman que en las primeras 48 h de secado, la humedad disminuyó desde alrededor de 60 % hasta valores de 9 - 12 % dependiendo de la subvariedad. En la figura 46 del anexo K se muestra un ejemplo de las curvas de secado.

Cuadro 14. Datos generales promedio de contenido de humedad en las primeras 48 h de los procesos de secado para todas las subvariedades

Subvariedad	Umm	Ucs	Uea	TU	CL
Tiempo total del proceso de secado, horas	160	130	150	140	120
Humedad inicial de los granos fermentados (%)	58	56	60	58	60
Humedad de los granos con 48 h de secado	12	9	12	10	9

La disminución observada corresponde a una pérdida del 79 - 85 % de la humedad en los primeros dos días de secado (dependiendo de la subvariedad), lo cual podría estar influyendo en la reducción de la difusividad del ácido acético, sin embargo, para poder confirmarlo se requiere profundizar en el estudio de los efectos del proceso de secado sobre el ácido acético y, en general, sobre otros compuestos volátiles.

En resumen, los resultados obtenidos evidencian que las diferencias encontradas en la cantidad de ácidos orgánicos presentes en las muestras de *nibs* de cacao de las distintas subvariedades se ven influenciadas por el tiempo de fermentación (día 3 y día 6) y no por el tipo de secador utilizado.

5.3.2 Análisis de compuestos volátiles

Para el efecto del tipo de secado se identificaron 96 compuestos volátiles, un compuesto adicional a los encontrados para el efecto del tiempo de fermentación. Este compuesto es el 1,3-propanodiol (AlO1), alcohol que se identificó únicamente en la muestra fermentada del día 6 de la mezcla de clones (CL) secada en los dos secadores de flujo transversal (S2 y S3). El grupo de los alcoholes es el que se encuentra en mayor proporción en todas las subvariedades, y es la subvariedad CL la que tiene mayor cantidad de compuestos volátiles (n=71).

Los análisis de varianza y medias de Bonferroni realizados a la totalidad de los compuestos (cuadro 24, anexo H) evidenciaron que un 12,5 % (12 compuestos) no muestran diferencia significativa ($p > 0,05$) para la interacción entre la subvariedad y el tipo de secado. Al igual que se hizo con el tiempo de fermentación, con el fin de visualizar las interacciones entre los 84 compuestos que mostraron diferencia significativa, se realizó un análisis de clusterización aglomerativa jerárquica (CAJ) y un análisis de componentes principales (ACP).

Como se puede apreciar en la figura 36, el cacao parcialmente fermentado (día 3) de la subvariedad TU, se agrupa, para todos los tipos de secador, junto con las muestras totalmente fermentadas (día 6) de las subvariedades TU y upaleñas. Por otro lado, la mezcla de clones del día 6 se agrupa con las subvariedades upaleñas Umm y Uea parcialmente fermentadas (día 3). Estos agrupamientos pueden sugerir que las subvariedades mencionadas tienen características aromáticas similares. En ninguno de los casos, los agrupamientos por subvariedad muestran diferencia con respecto al tipo de secador.

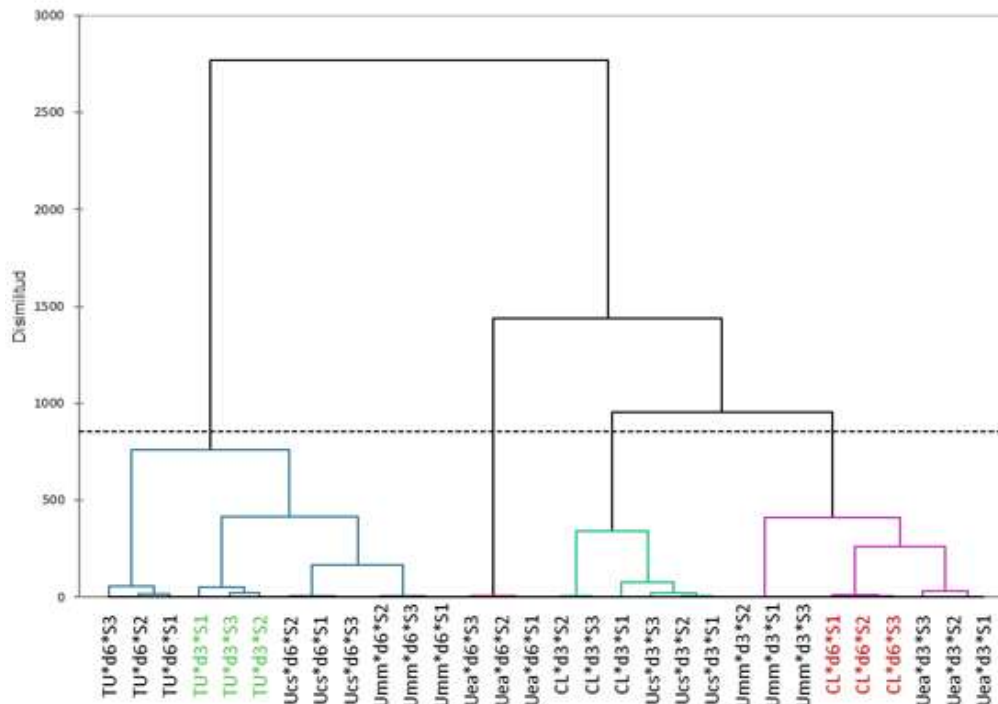


Figura 36. Dendrograma que muestra la clusterización aglomerativa jerárquica de los compuestos volátiles significativos en función del tiempo de fermentación y el tipo de secado.

El ACP (figura 37) explica con tres componentes un 48,77 % de las variaciones observadas (CP1 = 19,90 %, CP2 = 15,68 %, CP3 = 13,19 %). En la figura 37a se observa que las muestras se agrupan en función de la subvariedad y día de fermentación, sin mostrar diferencias para el tipo de secador.

Se observa que en el eje positivo del CP1 y en concordancia con lo mostrado en el dendrograma de la figura 36, las muestras parcialmente fermentadas (día 3) de todas las subvariedades se mantienen juntas (eje positivo del CP1), mientras que las muestras de TU, sin importar el día de fermentación, se agrupan en el eje negativo del CP2 (figura 37a). El tercer componente (figura 37b) mantiene agrupadas las muestras parcialmente fermentadas en el eje positivo del CP1, pero en planos opuestos al agrupamiento del CP2. El ACP confirma que los resultados son independientes del tipo de secado, pues tanto el secador de circulación continua de aire caliente (S1) como los secadores de aire con flujo transversal a velocidad de 1m /s (S2) y 2 m/s (S3) se agrupan de la misma manera para todas las subvariedades fermentadas.

En la figura 37c se observa que la 2,3-dimetilpirazina, (Pz03), que únicamente se encontró en las muestras TU y Ucs, se mantiene relacionada con estas subvariedades, las cuales, como se mencionó

anteriormente, se producen en la misma finca y tienen ambas la mayor cantidad de compuestos volátiles previamente asociados con aromas. Éstas se asocian además con una mayor presencia de compuestos como la tetrametilpirazina (Pz07), responsable de aromas a tostado, chocolate, nuez, avellana y herbal (FEMA, 2023; Frauendorfer & Schieberle, 2006; Suzuki et al., 2011), con la cetona 2-heptanona (Ce03) y el éster acetato de 2-butilo (Es11), asociados con aromas florales y frutales (Januszewska, 2018; Otero et al., 2022; Rottiers et al., 2019).

Por su parte, en la figura 37d se aprecia que, al incorporar el CP3, la subvariedad upaleña Umm queda un poco más aislada del resto, mostrando afinidad con compuestos como el ácido 3-butanoico (Ac02), asociado con aromas rancios (Januszewska, 2018) y con el acetaldehído, acetal dipropílico (Et01), asociado con notas herbales (Chemical Book, 2023).

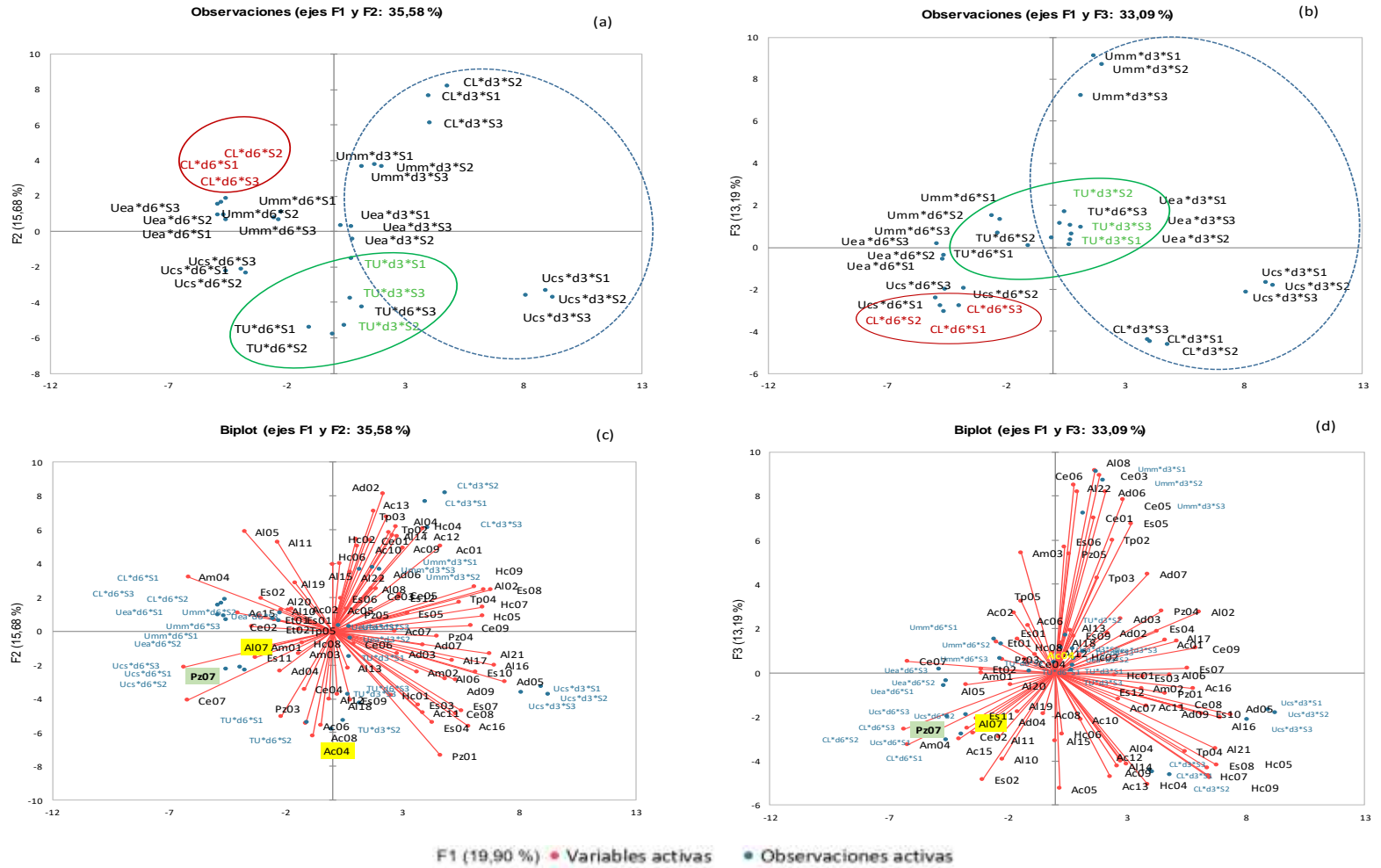


Figura 37. Análisis de componentes principales de compuestos volátiles de las cinco subvariedades para el efecto del tipo de secado (S1, S2, S3).

Pese a que el análisis estadístico indicó que no hay diferencias entre los tres tipos de secado aplicados, para visualizar las similitudes y diferencias entre los compuestos volátiles identificados para cada secador y cada subvariedad al final de la fermentación (día 6), se realizó el diagrama de Venn que se muestra en la figura 38.

Como se aprecia, todas las subvariedades comparten una alta cantidad de compuestos volátiles independientemente del tipo de secado aplicado. En el caso de la subvariedad upaleña Ucs, en el secado por circulación continua de aire caliente aparece un compuesto diferenciado asociado con aroma cítrico y frutal, el tridecano (Hc0), mientras que la subvariedad TU presentó, para el secado por aire de flujo transversal a 1 m/s (S3), un compuesto asociado con aromas herbales y frutales, pero también un compuesto asociado con aromas grasos y jabonosos, no deseables, el ácido octanoico (Hc12). Por su parte, la mezcla de clones presenta aromas diferenciados (herbales, frutales, nuez, tostado, mantequilla de maní) para la muestra secada en el secador de flujo transversal con velocidad de 2 m/s (S2), y la subvariedad upaleña Umm presenta aromas diferenciados en el secado por circulación continua de aire caliente (S1).

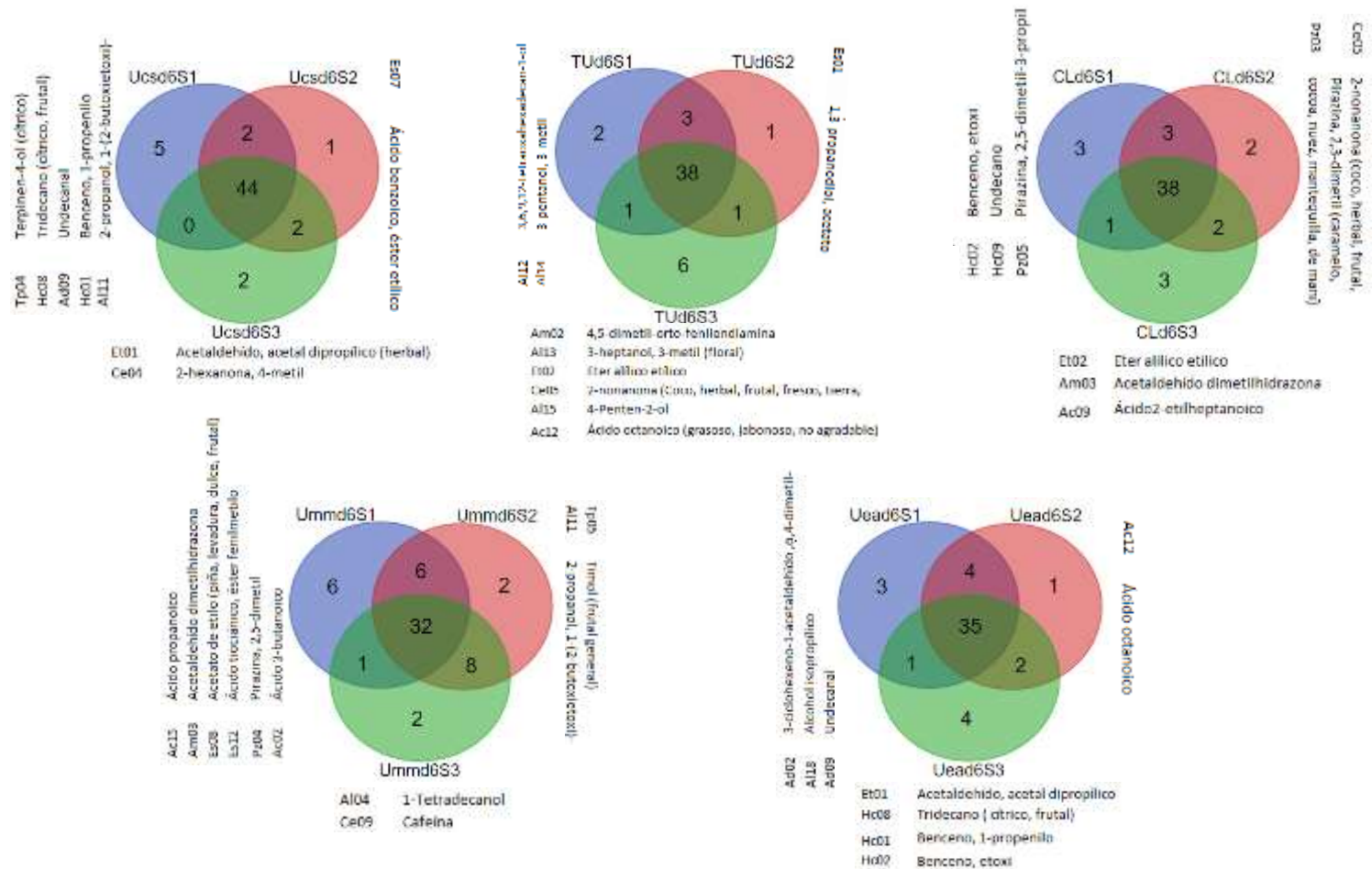


Figura 38. Compuestos volátiles relacionados con aromas específicos para las muestras de cacao con 6 días de fermentación, para todas las subvariedades y tipo de secado. Diagrama realizado con la herramienta on line https://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html

Los resultados obtenidos demuestran que para estas cinco subvariedades cultivadas en Upala el tipo de secador utilizado no afecta significativamente el perfil de compuestos volátiles. Este es un resultado interesante ya que, según reportan Badilla et al. (2022), estos tres tipos de secador son igualmente efectivos para disminuir la humedad de granos de cacao, pero en su estudio se concluyó que, a nivel piloto, el secado que utilizó flujo transversal a 2 m/s logró la reducción de humedad en un tiempo menor, lo cual puede ser beneficioso para los productores de la zona, pues podrían reducir su tiempo de proceso, siempre y cuando se lleve a cabo un control estricto de la temperatura y humedad final de los granos. Es importante considerar que debe existir un equilibrio entre la tasa de disminución de la humedad y el contenido de compuestos clave de aroma, por lo que, para tomar la decisión de disminuir el tiempo de secado o seleccionar el tipo de secador más adecuado, se deben realizar estudios más detallados que permitan determinar si los compuestos que se asocian con un tipo de secado específico otorgan perfiles aromáticos diferenciadores a las distintas subvariedades, por ejemplo, análisis sensoriales y de olfatometría. Además, es importante realizar estudios que permitan optimizar el proceso de secado, considerando las condiciones de temperatura, humedad relativa y velocidad del aire.

5.3.3 Análisis de péptidos

El efecto del tipo de secado sobre la formación de péptidos precursores de aroma ha sido poco estudiado. Se analizaron muestras a los 3 y 6 días de fermentación luego de ser secadas en los tres tipos de secador, todos a una temperatura de 40 °C, temperatura que garantiza que no se afecte la hidrólisis enzimática (Parra, 2014), y, con ello, la generación de péptidos y aminoácidos precursores.

En el cuadro 15 se muestran los pesos moleculares identificados para las distintas subvariedades y se observa que, al tercer día, la subvariedad Umm tiene los péptidos más grandes para el cacao secado en los tres tipos de secador. Los datos coinciden con los observados para evaluar el efecto del tiempo de fermentación en el secador de circulación continua de aire caliente (S1), previamente discutidos.

Cuadro 15. Pesos moleculares (kDa) de los péptidos visualizados por SDS-PAGE (12 %) para las cinco subvariedades en distintos tiempos de fermentación y tipo de secado.

Subvariedad	Pesos moleculares, kDa						Subvariedad	Pesos moleculares, kDa					
	Día 3			Día 6				Día 3			Día 6		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3		S1	S2	S3	S1	S2	S3
Umm	114	114	119				57	57	57				
	96	98							33				
	81	81					29	29	29				
	68	69	71				23	24	24	25	25	25	
	55	53	55				18	19	19		19		
	46	47	48		45	44	13	13	13	13	13	13	
	40	41	43				11	11	11	11	10	10	
	31	31	32	31	30	30	10	10	10	9	9	9	
	28	28	29						63	62			
	23	23	23	23	24	23	28	27	27	29	29	30	
	18	18	18	18	19	19	20	20	20		22	22	
13	12	13	13	13	13	13	14	14	15	15	14		
11	11	11	11	11	11	11	11	11					
Ucs	58	57	57				7	7	7	8	8	8	
		48					43	43	43				
	45		44					39					
	33	32	32				31	30	31				
	29	29	29				26	28	25				
	23	23	24	23	21	19	24	25					
	18	18	18	18	12		21	21	21				
	11	12	13	12	11	10	18	17	17	18	18		
	10	10					16	16					
	8	8	9	9	8	7	13	13	13	13	13	14	
							10	10	10				
						9	9	9	10	10	10		

Notas: El tipo de secado se identifica con la letra S (S1: secador de circulación continua de aire caliente, S2: secador de aire transversal a 1 m/s, S3: secador de aire transversal a 2 m/s).

Por su parte, Brunetto et al. (2020) hacen referencia a que la formación y acumulación de oligopéptidos y aminoácidos libres no es constante durante la fermentación y el secado, y, que, además de depender del pH y la temperatura, se ve afectada por el material genético, lo cual podría explicar las variaciones observadas entre subvariedades.

En cuanto a la cantidad de péptidos visualizados, según se aprecia en el cuadro 16, con respecto al tiempo de fermentación hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$) en el día 3, pero, con respecto al tipo de secado no existe diferencia significativa. Al igual que se observó anteriormente, la subvariedad Umm muestra diferencia con respecto a las demás para todos los tipos de secado.

Cuadro 16 Cantidad de bandas identificadas para cada subvariedad a lo largo de la fermentación para los tres tipos de secado a 40 °C.

Subvariedad	S1 ^b		S2 ^b		S3 ^b	
	d3 ^a	d6 ^b	d3 ^a	d6 ^b	d3 ^a	d6 ^b
CL ^b	7	4	7	5	8	4
Umm ^a	13	5	13	6	11	6
Ucs ^b	9	4	9	4	8	4
Uea ^b	5	3	6	4	6	4
TU ^b	10	3	11	3	8	3

La figura 39 muestra la variación de la abundancia relativa de los péptidos identificados para los distintos tipos de secado aplicados. De nuevo, los perfiles de abundancia parecen tener relación con lo reportado por Lerceteau et al. (1999), mostrando el mismo comportamiento obtenido para el efecto del tiempo de fermentación mostrado en la figura 33, y evidenciando la transformación de las distintas fracciones proteicas a lo largo de la fermentación, independientemente del tipo de secado.

Como se mencionó anteriormente, estos tres tipos de secador son efectivos para disminuir la humedad de granos de cacao (Badilla et al., 2022); por su parte, Vargas (2019), comprobó que el uso de un secador de flujo transversal con una velocidad de aire de 1 m/s a una temperatura de 65 °C es efectivo para obtener la humedad final de 7,45 % en los granos secos.

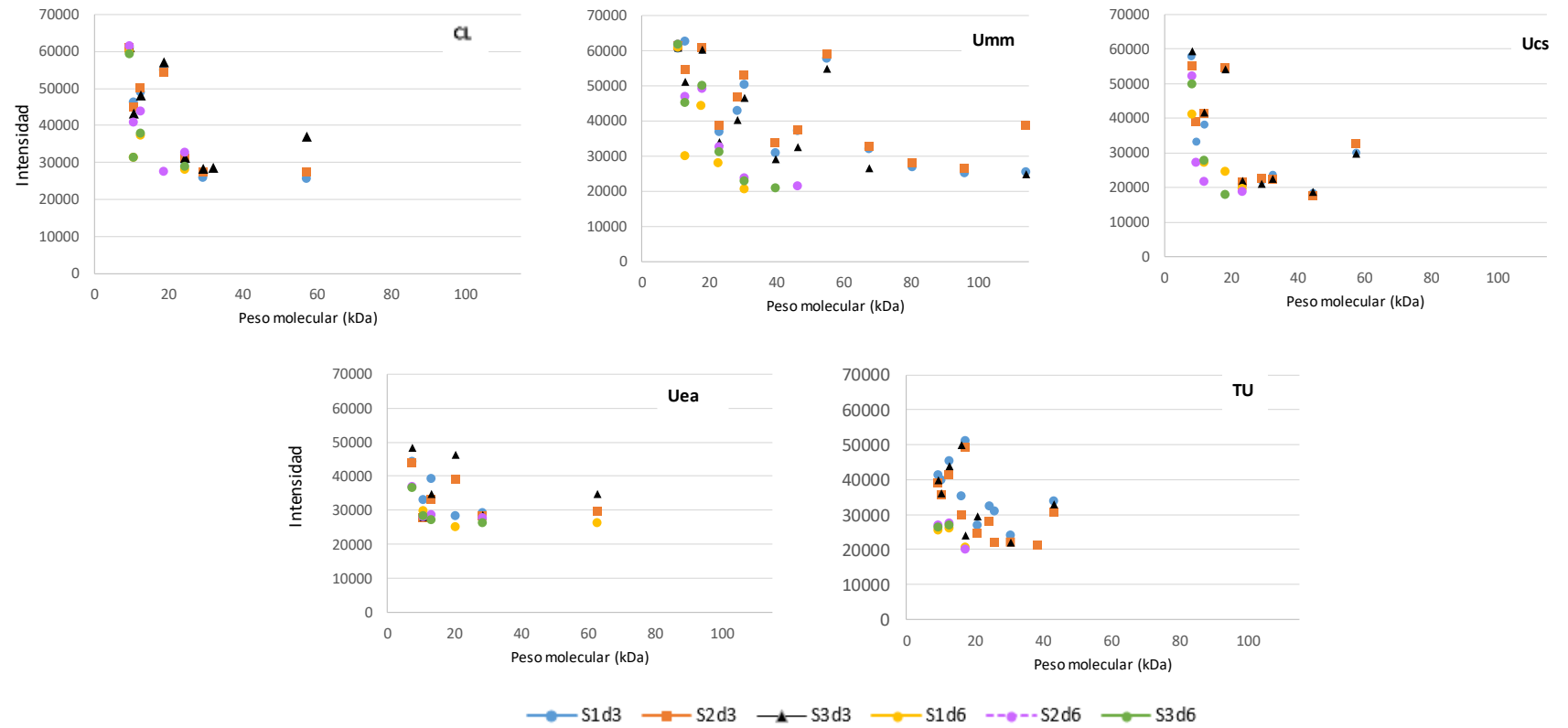


Figura 39. Abundancia relativa de péptidos visualizados por SDS-PAGE (12 %) en las cinco subvariedades de cacao a lo largo de la fermentación, para los 3 tipos de secado con aire caliente a 40 °C.

Notas: El tiempo de fermentación se muestra en días (día 3 = d3, día 6 = d6). El tipo de secado se identifica con la letra S (S1: secador de circulación continua de aire caliente, S2: secador de aire transversal a 1 m/s, S3: secador de aire transversal a 2 m/s).

En el caso del análisis de péptidos precursores de aroma y en vista de los resultados obtenidos, para una misma subvariedad y un mismo día de fermentación, ni el tipo de secado (flujo transversal o flujo de circulación continua), ni la velocidad del aire en el flujo transversal, ejercieron un efecto significativo en los péptidos visualizados por SDS-PAGE. Dado que no existen diferencias significativas en la cantidad de los péptidos visualizados para el cacao proveniente de los tres tipos de secador, la reducción del tiempo y la cinética de secado que garantiza la humedad final de entre 7,0 - 7,5 % para el cacao obtenido de los secadores de flujo transversal podría ser beneficiosa para las personas productoras, siempre y cuando se consiga al final un producto que conserve sus características de cacao fino y de aroma.

5.3.4 Interacción de las distintas variables respuesta para el efecto del tipo de secado

Para el efecto del tipo de secado quedó evidenciado que el tipo de secador utilizado no influye en las variables respuesta analizadas.

Considerando que los tres tipos de secador utilizados logran una disminución del contenido de humedad del grano de cacao que permite garantizar su estabilidad en el tiempo (humedad final entre 7,2 – 7,6 %); y que en cacaos de subvariedades amazónicas utilizando distintos tipos de secadores a temperaturas similares (30 - 60 °C) se logró el desarrollo de características aromáticas asociadas con la calidad del grano (Herman et al., 2018; Hii et al., 2008b), será interesante profundizar en estudios con el secador de flujo transversal de aire a 2 m/s (S2), que logró la reducción del contenido de humedad en un tiempo menor, de manera que se pueda mantener el perfil aromático de las cinco subvariedades sembradas en Upala con un tiempo de secado menor. También, es importante lograr un secado que evite que continúen las etapas fermentativas, y evite el endurecimiento de la cascarilla, proporcionando así un grano que no contenga altas cantidades de ácido acético, que podría ser perjudicial en su sabor y aroma.

Los productores upaleños generalmente utilizan el secado al sol, que tiene algunos inconvenientes, como por ejemplo la dependencia de las condiciones climáticas y la variabilidad que estas otorgan al cacao, por tanto, los resultados obtenidos son relevantes ya que sientan las bases para estudiar más profundamente el proceso de secado de flujo transversal para evaluar si es posible transferir esta tecnología de secado para disminuir tiempos de proceso y estandarizar la calidad.

6. CONCLUSIONES

El protocolo seguido para aumentar la temperatura de la cámara de fermentación permitió conservar el calor generado por la masa fermentativa, con lo que logró estudiar algunos compuestos determinantes de la calidad del cacao durante la fermentación en microlotes.

En el cacao en baba no se encontraron diferencias en el contenido de proteína, acidez total y ácidos orgánicos de las distintas subvariedades upaleñas estudiadas y de la mezcla de clones.

No existe diferencia significativa en la acidez total de las distintas subvariedades, pero sí se identificaron diferencias influenciadas por el tiempo de fermentación, donde se evidencia su aumento del día 3 al 5 y 6, lo cual se debe al aumento del ácido acético y láctico, y no se ve afectado por el contenido relativo de ácido cítrico, que más bien disminuyó.

En el cacao seco y fermentado existen diferencias en los contenidos de ácidos cítrico, succínico, láctico, tartárico, glucónico y málico de las distintas subvariedades. La subvariedad talamanqueña cultivada en Upala, además de tener el menor contenido de ácido cítrico, tiene cantidades menores de otros ácidos que no están presentes en las demás subvariedades.

Se identificaron 96 compuestos volátiles diferentes, por medio de HS-SPME-GC-MS, siendo la subvariedad upaleña Ucs la que tuvo mayor cantidad de compuestos previamente asociados con aromas (n=37) y la subvariedad Uea la que tuvo menos (n=28).

La mayoría de compuestos volátiles presentes en las muestras de cacao fueron alcoholes, seguidos de ácidos carboxílicos y ésteres; entre los alcoholes identificados se encuentran el alcohol feniletílico y el 2,3-butanodiol, asociados con notas características de chocolate, acarameladas, frutales y florales; el 3-metil-1-butanol, reportado como deseable por sus notas a chocolate y malta; y, en abundancias relativas menores al 2 %, el 1-pentanol y el 2-butanol asociados con aromas no deseables (pungente y gomoso); el ácido mayoritario fue el acético, no deseado al final de la fermentación por su aroma a vinagre, que estuvo presente en todas las muestras, con abundancias relativas cercanas al 30 %, excepto en la subvariedad TU en la que se encontraron valores más altos.

En todas las subvariedades y tiempos de fermentación están presentes los ésteres acetato de 3-metil-1-butanol, y acetato de 2-pentanol, que otorgan aromas a frutas tropicales; además, en todas

las muestras fermentadas (día 6) se identificó acetato de etilo, característico por su aroma a piña, frutal y verde, de ahí que no se puede diferenciar las subvariedades upaleñas de la mezcla de clones.

Se identificaron ocho pirazinas, que son compuestos que juegan un rol preponderante en el aroma del cacao; la trimetil y la tetrametil pirazina, identificadas previamente por su aporte de notas a caramelo, chocolate, nueces, maní, tostado y herbal, estuvieron presentes en todas las muestras analizadas, con abundancias relativas entre 3,3 y 7,9 % al final de la fermentación.

Un 32,6 % de los compuestos volátiles (31 compuestos) no mostraron diferencia significativa ($p > 0,05$) para la interacción entre las subvariedades y el día de fermentación; esta cantidad se reduce a 12,5 % (12 compuestos) al analizar el efecto del tipo de secado.

Al día final de la fermentación hay 16 compuestos volátiles que están presentes en las cinco subvariedades estudiadas; específicamente, las subvariedades Umm y Uea no presentaron compuestos diferenciadores con respecto a las demás, pero, la subvariedad Ucs tiene tres compuestos diferenciados relacionados con aromas cítricos y frutales (tridecano y timol), así como una pirazina (3-metilpiridazina) que no se encontró en ninguna de las otras subvariedades.

Compuestos volátiles de las subvariedades fermentadas Ucs y TU, producidas en la misma finca, se separaron del resto, y parecen no mostrar diferencia entre el día 5 y el día 6 de fermentación. En general, al comparar los compuestos volátiles encontrados el día 5 y el día 6 se observa que la mayoría de los compuestos identificados están presentes en ambos días.

Se evidenció además que el tipo de secado a 40 °C (circulación continua de aire caliente, flujo transversal de aire a 1 m/s y flujo transversal de aire a 2 m/s) no afecta significativamente el perfil de compuestos volátiles.

Se implementó una nueva metodología para el análisis electroforético por SDS-PAGE para analizar el comportamiento del peso molecular de los péptidos en muestras de cacao fermentado y seco. Esta podrá ser útil para futuras investigaciones sobre la posible relación de estos compuestos con características de calidad del grano.

El análisis por SDS-PAGE aplicado al cacao fermentado y seco permitió obtener la separación electroforética de los péptidos presentes en las muestras. Algunos de los péptidos visualizados coinciden con estudios previos que identificaron fracciones de 15, 31 y 47 kDa provenientes de la

vicilina. Los cambios observados en la intensidad de las bandas de todas las subvariedades confirman la transformación en el tiempo de las fracciones de mayor peso molecular en compuestos menores.

La cantidad de péptidos visualizados no muestra diferencia significativa con respecto al tiempo de fermentación ni el tipo de secador utilizado. Con respecto a las subvariedades, la única que presenta diferencia con respecto a las demás es la subvariedad upaleña Umm, que tiene péptidos de mayor peso molecular.

Por último, el análisis multifactorial confirmó que las subvariedades se agrupan en función del día de fermentación, a la vez, evidenció relación entre la cantidad de péptidos precursores de aromas, la presencia de ácidos orgánicos, principalmente ácido cítrico, y los compuestos volátiles, con las distintas fases de la fermentación.

Los resultados obtenidos aportan una base científica importante para continuar estudiando los compuestos clave que definen el perfil aromático del cacao upaleño, de manera que se pueda establecer la viabilidad de ajustar los parámetros asociados a los procesos de fermentación y secado sin afectar las características distintivas que le otorgan a este cacao la denominación de fino y de aroma.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda fermentar lotes procedentes de la misma época del año, para reducir la variabilidad que pueda estar influenciada por la época de cosecha.

Validar sensorialmente si el perfil aromático de las subvariedades con 5 y 6 días de fermentación se ve afectado o no por las diferencias encontradas en el perfil de ácidos orgánicos y compuestos volátiles, con el fin de poder considerar la reducción de un día en el tiempo de fermentación.

Es importante optimizar el proceso de secado, considerando las condiciones de temperatura, humedad relativa, tipo de flujo y velocidad del aire en función de la calidad del grano.

Con el fin de poder validar si el secador de flujo transversal con velocidad de aire de 2 m/s es una alternativa tecnológica viable para reducir el tiempo de secado y mantener las características aromáticas de las variedades de cacao cultivadas en Upala, se recomienda realizar un estudio comparativo con muestras secadas al sol, proceso comúnmente realizado en la zona productora de Upala.

Complementar este estudio con un análisis de cromatografía de gases-olfatometría, o bien con una evaluación sensorial con panel entrenado, para conocer si algunos de los 40 compuestos volátiles no asociados previamente con aromas juegan un rol importante en las características de calidad de las subvariedades analizadas.

Continuar realizando estudios electroforéticos por SDS-PAGE con el fin de analizar la posible relación entre el peso molecular de los péptidos y características de calidad del grano; además, utilizar las bandas obtenidas en los geles como punto de partida para continuar con la identificación de los péptidos relacionados.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ackah, E. & Dompey, E. (2021). Effects of fermentation and drying durations on the quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during the rainy season in the Juaboso District of the Western-North Region, Ghana. *Bulletin of the National Research Centre*, 45, 1-10. <https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-021-00634-7>
- Amin, I. Jinap, S. & Jamilah, B. (1997). Vicilin-class globulins and their degradation during cocoa fermentation. *Food Chemistry*, 59(1), 1-5. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00188-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00188-3)
- Ángel, J. (2018). Proceso de Cosecha y Beneficio del Cacao. TvAgro. [Video]. https://www.youtube.com/watch?v=BOGWZWfrxHw&ab_channel=TvAgro
- Aguilar, H. (2016). Manual para la Evaluación de la Calidad del Grano de Cacao. Fundación hondureña de investigación agrícola. http://www.fhia.org.hn/descargas/Proyecto_de_Cacao_SECO/Manual_para_la_Evaluacion_de_la_Calidad_del_Grano_de_Cacao.pdf
- Álvarez, C., Pérez, E. & Lares, M. (2022). Beneficio del cacao Criollo venezolano: variaciones en composición proximal, metilxantinas y polifenoles. *RIVAR*, 9(27), 113-128. <https://www.scielo.cl/pdf/rivar/v9n27/0719-4994-rivar-9-27-113.pdf>
- Apriyanto, M. (2016). Changes in Chemical Properties of Dreid Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans during Fermentation. *International Journal of Food Fermented*, 5(1), 11-16. Doi: 10.5958/2321-712X.2016.00002.8
- Arvelo, M., Delgado, T., Maroto, S. Rivera, J., Higuera, I. & Navarro, A. (2016). Estado actual sobre la producción y el comercio del Cacao en América. IICA-CIATEJ. 148 p. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/21191>
- Arvelo, M., González, D., Maroto, S., Delgado, T. & Montoya, P. (2017). Manual Técnico del Cultivo de Cacao Prácticas Latinoamericanas. IICA. 165 p. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/6181>

- Avendaño, C., Villareal, J., Campos, E., Gallardo, R., Mendoza, A., Aguirre, J., Sandoval, A. & Espinoza, S. (2011). Diagnóstico del cacao en México. Universidad Autónoma Chapingo https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/232186/Diagnostico_del_cacao_en_mexico.pdf
- Badilla-Mena, B., Vargas-Elías, G., Rojas-Barrantes, S., Salas-Rivera, L., Zúñiga-Camacho, K. & Wexler-Goering, L. (2022). Secado de granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) a baja temperatura en tres secadoras con diferentes flujos de aire. Poster. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/87867>
- Bertazzo, A., Comai, S., Brunato, I., Zancato, M. & Costa, C. (2011). The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. *Food Chemistry* 124, 93–96. doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.110
- Belitz HD., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). Química de los alimentos. Zaragoza, España, Acribia. 914p.
- Buyukpamukcu, E., Goodall, D., Hansen, CE., Keely, B., Kochhar, S. & Wille, H. (2001). Characterization of Peptides Formed during Fermentation of Cocoa Bean. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5822–5827. Doi: 10.1021/jf0104127
- Banco de Desarrollo de América Latina. (2017a). Cacao fino, la joya de América Latina. <https://www.caf.com/es/actualidad/noticias/2017/04/cacao-fino-la-joya-de-america-latina/#:~:text=En%20cuanto%20a%20cacao%20fino,y%2010%20C000%20d%C3%B3lares%20por%20tonelada.>
- Banco de Desarrollo de América Latina. (2017b). Latinoamérica produce el 80% del cacao prime del mundo. <https://www.caf.com/es/actualidad/noticias/2017/11/latinoamerica-produce-el-80-del-cacao-prime-del-mundo/#:~:text=Entre%2070%25%20y%20100%25%20del,estas%20variedades%20especiales%20de%20cacao>
- Barišić, V., Kopjar, M., Jozinovic, A., Flanjak, I., Ackar, D., Milicevic, B., Šubaric, D., Jokic, S. & Babic, J. (2019). The Chemistry behind Chocolate Production. *Molecules*, 24. doi:10.3390/molecules24173163

- Brunetto, M., Gallignani, M., Orozco, W., Clavijo, S., Delgado, Y., Ayala, C. & Zambrano, A. (2020). The effect of fermentation and roasting on free amino acids profile in Criollo cocoa (*Theobroma cacao* L.) grown in Venezuela. *Brazilian Journal of Food Techmology*, 23, e2019150. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.15019>
- Caligiani, A., Marsegli, A., Prnadi, B., Pall, G. y Sforza, S. (2016). Influence of Fermentation Level and Geographical Origin on Cocoa Bean Oligopeptide Pattern. *Food Chemistry*, 211, 431-439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.072>
- Calvo, A., Botina, B., García, M., Cardona, W., Montenegro, A. & Criollo, J. (2021). Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Nature portfolio*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95703-2>
- CAOBISCO/ECA/FCC (Chocolate, Biscuits & Confectionery of Europe/European Cocoa Association/Federation of Cocoa Commerce). (2015). Cocoa Beans: Chocolate and Cocoa Industry Quality Requirements. Edison, P. & Montero, A. (trad.). https://cocoaquality.eu/data/Cacao%20en%20Grano%20Requisitos%20de%20Calidad%20de%20la%20Industria%20Apr%202016_es.pdf
- Carmioli, G. (2017). Análisis de la actividad cacaotera costarricense y perspectivas de su reactivación. SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria), Costa Rica. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E16-10869.pdf>
- Castro-Alayo, EM., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R. & Cardenas-Toro, FP. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, 5(1). doi:10.1016/j.heliyon.2019.e011157
- Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). (2019). Determinación de ácidos orgánicos por HPLC. Método P-SA-MQ-051, emisión N° 3, acreditado por Ente Costarricense de Acreditación, ECA. Costa Rica. 16 jun. 7p. Copia no controlada.
- Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). (2020). Acidez total. Método P-SA-MQ-011, emisión N° 10, acreditado por Ente Costarricense de Acreditación, ECA. Costa Rica. 21 ene. 16p. Copia no controlada.

- Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). (2021a). Nitrógeno total por método Kjeldahl utilizando equipo Foss-Tecator. Método P-SA-MQ-003, emisión N° 9, acreditado por Ente Costarricense de Acreditación, ECA. Costa Rica. 16 jun. 15p. Copia no controlada.
- Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). (2021b). Humedad. Método P-SA-MQ-003, emisión N° 11, acreditado por Ente Costarricense de Acreditación, ECA. Costa Rica. 16 sep. 13p. Copia no controlada.
- Chacón, M. (2008). El cacao como moneda en Costa Rica en el siglo XVIII. Diálogos Revista Electrónica de Historia, número especial. 9° Congreso Centroamericano de Historia, Universidad de Costa Rica.
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/dialogos/article/download/31194/30918/#:~:text=El%20cacao%20utilizado%20como%20moneda,lo%20era%20la%20de%20oro.&text=Al%20igual%20que%20en%20la,por%208%20reales%20de%20cacao>
- Chemical Book. (2023). CAS. DataBase <https://www.chemicalbook.com/>
- Chica, V. (2022). Secado de granos de cacao (variedad TCS01) y su efecto sobre la concentración de compuestos fenólicos, azúcares y ácidos orgánicos. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Colombia].
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/83378/1086109084.2022.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Cid, L. (2016). Análisis cuantitativo de péptidos/proteínas intactos o modificados post-traduccionalmente mediante HPLC y Espectrometría de masas. [Tesis de maestría, Universidad de Oviedo].
https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/39063/TFM_Laura%20Cid%20Barrio.pdf?sequence=6&isAllowed=y
- Cocom, B. (2021). Estudio del proceso de fermentación de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. [Tesis doctoral, Universidad de Almería].
<http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/9936/01.%20Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Comisión Interinstitucional de Cacao Costa Rica. (2018). Plan Nacional de Cacao 2018-2028. Hacia la consolidación de una agrocadena competitiva y sostenible. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E14-11072.pdf>
- Copetti, M., Iamanaka, B., Pitt, J. & Taniwaki, M. (2014). Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 13–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023>
- Corzo, A. (2019). Técnicas de análisis en química orgánica-Cromatografía. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. <https://fcf.unse.edu.ar/archivos/series-didacticas/SD-44-Cromatografia-CORZO.pdf>
- De Vuyst, L. & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5-17. doi: 10.1111/jam.13045.
- Delgado-Ospina, J., Di Mattia, C.D., Paparella, A., Mastrocola, D., Martuscelli, M. & Chaves-Lopez, C. (2020). Effect of fermentation, drying and roasting on biogenic amines and other biocompounds in Colombian criollo cocoa beans and shells. *Foods* 9(4). Doi: 10.3390/foods9040520
- Deus, V., Bispo, E., Franca, A. & Gloria, M. (2021). Understanding amino acids and bioactive amines changes during on-farm cocoa fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 97, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103776>
- Deuscher, Z., Gourrat, K., Repoux, M., Boulanger, R., Labouré, H. & Le Quéré, J. (2020). Key Aroma Compounds of Dark Chocolates Differing in Organoleptic Properties: A GC-O Comparative Study. *Molecules*, 25. Doi:10.3390/molecules25081809
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. & Weigend, M. (2017). Hoja botánica: Cacao. Proyecto Perúbiodiverso. https://www.researchgate.net/publication/321796762_Hoja_botanica_Cacao_-_Theobroma_cacao_L

- D'Souza, R., Grimbs, A., Grimbs, S., Behrends, B., Corno, M., Ullrich, M. & Kuhnert, N. (2018). Degradation of cocoa proteins into oligopeptides during spontaneous fermentation of cocoa beans. *Food Research International*, 109, 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.068>
- Durán, E. & Dubón, A. (2016). Tipos genéticos de cacao y distribución geográfica en Honduras. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. http://www.fhia.org.hn/descargas/Proyecto_de_Cacao_SECO/guia_tipos_geneticos_de_cacao_y_distribucion_geografica_en_honduras.pdf
- Echeverri, J. (2013). Tecnología moderna en la producción de cacao: manual para productores orgánicos. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. [http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10551\(1\).pdf](http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10551(1).pdf)
- El País.cr. (2023). Costa Rica recibe reconocimiento como país productor y exportador de cacao fino. [6 de julio 2023]. <https://newsinamerica.com/pdcc/boletin/2023/costa-rica-recibe-reconocimiento-como-pais-productor-y-exportador-de-cacao-fino/>
- Enríquez, G. (1985). Curso sobre el cultivo del cacao. Serie Materiales de enseñanza N° 22. CATIE. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/1058>
- Felipe, L. & Bucas, J. (2016). Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova* Escola 39(2), 120-130. <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>
- FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States). (2023). Flavor library. <https://www.femaflavor.org/>
- Fernández-Niño, M., Rodríguez-Cubillos, M., Herrera-Rocha, F., Anzola, J., Cepeda-Hernández, M., Aguirre, J., Chica, M., Olarte, H., Rodríguez-López, C., Calderón, D., Ramírez-Rojas, A., Del Portillo, P., Restrepo, S. & González, A. (2021). Dissecting industrial fermentations of fine flavour cocoa through metagenomic analysis. *Nature Portfolio, Scientific report*, 11, 8638. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88048-3>
- Fraudorfer, F. & Schieberle, P. (2006). Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5521–5529. <https://doi.org/10.1021/jf060728k>

- Frauendorfer, F. & Schieberle, P. (2008). Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10244-10251. Doi: 10.1021/jf802098f
- Fu, Y., Zhang, Y., Soladoye, O. & Aluko, R. (2019). Maillard reaction products derived from food protein-derived peptides: insights into flavor and bioactivity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Doi: 10.1080/10408398.2019.1691500
- Gallardo, E. (2008). Degradación tipo strecker de aminos y aminoácidos producida por lípidos oxidados. [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla]. <https://idus.us.es/handle/11441/105821>
- García-Alamilla, P., Salgado-Cervantes, M., Barel, M., Berthomieu, G., Rodríguez-Jiménez, G. & García-Alvarado, M. (2007). Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. *Journal of Food Engineering*, 79, 1159-1165. Doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.04.005
- García, E., Serna, A., Córdoba, D., Marín, J., Montalvo, C. & Ordoñez, G. (2019). Estudio de la fermentación espontánea de cacao (*Theobroma Cacao* L.) y evaluación de la calidad de los granos en una unidad productiva a pequeña escala. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales* 6(1), 41-51. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8739280>
- Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L., Angulo, J. & Parra, P. (2002). Características físicas del fruto de cacao tipos criollo, forastero y trinitario de la localidad de Cumboto, Venezuela. *Agronomía Tropical* 52(3). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2002000300006
- Hartmann, S. (2015). Studies on the formation of odorants and their possible precursors during cocoa processing. Universidad de Munich, Alemania. ISBA 978-3-938896-89-1
- Herman, C., Spreutelsb, L., Turomzsac, N., Konaganoa, E. & Haut, B. (2018). Convective drying of fermented Amazonian cocoabeans (*Theobroma cacao* var. Forasteiro). Experiments and mathematical modeling. *Food and Bioproducts Processing* 108, 81-94. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.01.002>
- Hernández, C. (2018). Análisis de la composición química del cacao, extracción y estudio de compuestos antioxidantes en genotipos del banco de germoplasma de México. [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=212620>

- Hernández-Hernández, C., López-Andrade, P., Ramírez-Guillermo, M., Guerra, D. & Caballero, J. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in México. *Food Science & Nutrition*, 4(5), 690–695. doi: 10.1002/fsn3.333
- Herrera, C., Bolaños, N. & Lutz, G. (2017). Química de alimentos. Manual de laboratorio. 140 pp. Editorial UCR, Universidad de Costa Rica. ISBN 9789977677859
- Herrera-Rocha, F., Cala, M., Aguirre, J., Rodríguez-López, C., Chica, M., Olarte, H., Fernández-Niño, M. & González, A. (2021). Dissecting fine-flavor cocoa bean fermentation through metabolomics analysis to break down the current metabolic paradigm. *Nature Portfolio*, 11, 21904. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01427-8>
- Hii, C., Law, C. & Cloke, M. (2008a). Modelling of thin layer drying kinetics of cocoa beans during artificial and natural drying. *Journal of Engineering Science and Technology*, 3(1), 1–10. <http://jestec.taylors.edu.my/Vol%203%20Issue%201%20April%2008/001-010%20Hii.pdf>
- Hii, C., Law, C., Cloke, M. & Suzannah, S. (2008b). Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems Engineering*, 102(2), 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.10.007>
- Homem de Abreu, G., Reis de Araujo, Q., René, R., Andrade, G. & Moreira de Souza, S. (2017). Influencia de factores agroambientales sobre la calidad del clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) PH-16 en la región cacaotera de Bahia, Brasil. *Ecosistemas y recursos agropecuarios* 4, (12), 579-587. <https://doi.org/10.19136/era.a4n12.1274>
- ICCO (Organización Internacional del Cacao). (2021). Cocoa market report October 2021. <https://www.icco.org/wp-content/uploads/ICCO-Monthly-Cocoa-Market-Report-October-2021.pdf>
- Janek, K., Niewianda, A., Wöstemeyer, J. & Voigt, J. (2016). The cleavage specificity of the aspartic protease of cocoa beans involved in the generation of the cocoa-specific aroma precursors. *Food Chemistry*, 211(15), 320-328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.033>
- Januszewska, R. (2018). Hidden persuaders in cocoa and chocolate. A flavor lexicon for cocoa and chocolate sensory professionals. Reino Unido. Elsevier. ISBN 978-0-12-815447-2

- Jiménez, S. (2023). Cacao cultivado en Upala le otorga a Costa Rica reconocimiento internacional. La Región, Costa Rica. [5 de julio 2023]. <https://laregion.cr/cacao-cultivado-en-upala-le-otorga-a-costa-rica-reconocimiento-internacional/>
- Jinap, S., Siti, M. & Norsiaty, M. (1994). Formation of Methyl Pyrazine during Cocoa Bean Fermentation. *Pertanika Journal Tropical Agriculture Science*, 17(1), 27-32. <https://core.ac.uk/download/pdf/42990543.pdf>
- July, W. (2007). Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. [Tesis de maestría, CATIE]. https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/5354/Morphologic_and_molecular_characterization.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Kadow, D., Bohlmann, J., Phillips, W. & Lieberei, R. (2013). Identification of main fine flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86, 90–98. Doi:10.5073/JABFQ.2013.086.013
- Kongor, J., Hinneh, M., Van de Walle, D., Ohene, E., Boeckx, P. & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — A review. *Food Research International*, 82, 44–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kratzer, U., Frank, R., Kalbacher, H., Biehl, B., Wöstemeyer, J. & Voigt, J. (2009). Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. *Food Chemistry*, 113(4), 903-913. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.017>
- Kumari, N., Kofi, K., Grimbs, S., D'Souza, R., Kuhnert, N., Vrancken, G. & Ulrich, M. (2016). Biochemical fate of vicilin storage protein during fermentation and drying of cocoa beans. *Food research International*, 90, 53-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.033>
- Laviana, M. (2007). La ruta del cacao en América Latina. *Tierra Firme. Revista de Historia y Ciencias Sociales*, (25)100, 485-499. <https://digital.csic.es/handle/10261/26636>

- Lerceteau, E., Rogers, J., Pétiard, V. & Cruzillat, D. (1999). Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 619-625. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990315\)79:4%3C619::AID-JSFA230%3E3.0.CO%3B2-O](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1097-0010(19990315)79:4%3C619::AID-JSFA230%3E3.0.CO%3B2-O)
- Liu, M., Liu, J., He, C., Song, H., Liu, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Guo, J., Yang, H. & Su, X. (2017). Characterization and comparison of key aroma-active compounds of cocoa liquors from five different areas. *International Journal of Food Properties*, (20)10, 2396-2408. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1238929>
- Lomonte, B. (2020). Manual de Métodos Inmunológicos, 5ª edición (v.5.1). Instituto Clodomiro Picado, ICP, Universidad de Costa Rica, UCR. [versión on line]. <https://kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/9244.2>
- Lubinska-Szczygieł, M., Róžańska, A., Namieśnik, J., Dymerski, T., Shafreen, R., Weisz, M., Ezra, A. & Gorinstein, S. (2018). Quality of limes juices based on the aroma and antioxidant properties. *Food Control*, 89, 270-279. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.005>
- Machuca-Guevara, J., Suárez-Peña, E., Motte, E. & Mialhe-Matannier, E. (2019). Caracterización molecular de los microorganismos presentes durante el proceso fermentativo de los granos de cacao (*Theobroma cacao*). *Revista peruana de biología*, 26(4), 535–542. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i4.17220>
- Marseglia, A., Sforza, S., Faccini, A., Bencibenni, M., Plla, G. & Caligiani, A. (2014). Extraction, identification and semi-quantification of oligopeptides in cocoa beans. *Food Research International*, 63, 382-389. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996914002154>
- Meneses, O., Pilamunga, D., Arroyo, A., Vidaurre, P. & Vidaurre, N. (2023). Key Aromatic Volatile Compounds from Roasted Cocoa Beans, Cocoa Liquor, and Chocolate. *Fermentation*, 9, 1-21. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020166>
- Montalbo, C. & Lugo, M. (2019). Electroforesis: fundamentos, avances y aplicaciones. *Epistemus, Ciencia, Tecnología y Salud*. Doi: 10.36790/epistemus.v13i26.96

- Mori-Mestanza, D., Zuta-Chamoli, V., Barrena, M., Oliva, M. & Chávez, S. (2021). Análisis de los compuestos volátiles de cacao nativo fino de aroma de granos tostados y sin tostar. *Revista Científica Pakamuros*, 9(4), 133–147. <http://revistas.unj.edu.pe/index.php/pakamuros/article/view/243>
- Motomayor, J., Lachenaud, P., Wallace da Silva, J., Loor, R., Kuhn, D., Brown, J. & Schnell, R. (2008). Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3(10). <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003311>
- Muñoz, C. (2014). Influencia de la matriz vítica y de parámetros oro-fisiológicos en la liberación del aroma del vino. Impacto en el aroma retronasal. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid]. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/115001/1/IMPACTO%20EN%20EL%20AROMA%20RETRONASAL.pdf>
- Naranjo-Vargas, E., Moyano-Arévalo, J., Zamora-Solorzano, Y. & Balseca-Sampedro, O. (2021). Optimización del tiempo de secado a través del diseño de una secadora de cacao con movimiento rotatorio. *Polo del Conocimiento*, 6(58), 864-878. Doi: 10.23857/pc.v6i5.2714
- Nielsen, S. (2010). *Food Analysis Fourth Edition*. Springer. 585 p. <http://154.68.126.6/library/Food%20Science%20books/batch1/Food%20Analysis%20Fourth%20Edition.pdf>
- Nielsen, D., Craffack, M., Jespersen, L. & Jakobsen, M. (2013). Chapter 4: The Microbiology of Cocoa Fermentation. En *Chocolate in Health and Nutrition*, Watson, R., Preedy, V. & Zibadi, S (Ed). Doi:10.1007/978-1-61779-803-0_4
- Oficina Nacional de Semillas de Costa Rica. (s.f.) ¿Qué es un clon de cacao? <http://ofinase.go.cr/certificacion-de-semillas/certificacion-de-semilla-de-cacao/clones/>
- Oracz, J. & Nebesny, E. (2018). Effect of roasting parameters on the physicochemical characteristics of high-molecular-weight Maillard reaction products isolated from cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups. *European Food Research and Technology*, 245, 111–128. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3144-y>

- Ortega, N., Romero, MP., Macía, A., Reguant, J., Angles, N., Morelo, JR. & Motilva, MJ. (2008). Obtention and Characterization of Phenolic Extracts from Different Cocoa Sources. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9621–9627. <https://doi.org/10.1021/jf8014415>
- Otero, E., Herrera, F., Perdomo, A. & Jiménez, J. (2022). Evaluación del método de extracción SPME-GC-MS para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en licor de cacao de Nariño-Colombia. *Revista ION*, 35(1), 103-116. Doi: <https://doi.org/10.18273/revion.v35n1-2022007>
- Payne, M., Hurst, W., Stuart, D., Boxin, O., Fan, E., Ji, H. & Kou, Y. (2010). Determination of Total Procyanidins in Selected Chocolate and Confectionery Products Using DMAC. *Journal of AOAC international*, (93)1, 89-96. DOI:10.1093/JAOAC/93.1.89
- Parra, P. (2014). Secado artificial de cacao. Estado del arte. Primer Congreso Salesiano de Ciencia, Tecnología e Innovación para la Sociedad. Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/10984/1/Secado%20artificial%20de%20cacao%20Estado%20del%20arte.pdf>
- Peláez, P., Guerra, S. & Contreras, D. (2016). Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes. *Scientia Agropecuaria*, 7(2), 111-119. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2016.02.04
- Perea, J., Ramírez, O. & Villamizar, A. (2011). Caracterización fisicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), 35–42. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/bioteologia/article/view/764/391>
- Phillips-Mora, W., Arcinegas-Leal, A., Mata-Quirós, A. & Motamayor-Arias, J. (2012). Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. CATIE, Costa Rica. https://www.worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/files_mf/phillipsmora2012clones4.64mb.pdf

- Picado, W., Hernández, C. & Porras, J. (2017). Flujos de comercio exterior de cacao y sus derivados en Costa Rica (1955-2015). Ponencia presentada en el Taller "Cadenas Globales de Valor: Manejos conceptuales y enfoques metodológicos", organizado por la Red de Investigadores en Cadenas Globales de Valor de la Universidad Nacional, Costa Rica (CINPE-E. Historia-E. Economía-E. Relaciones Internacionales), Centro Internacional en Política Económica y Desarrollo Sostenible (CINPE), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. https://www.researchgate.net/publication/324170936_Flujos_de_comercio_exterior_del_cacao_y_sus_derivados_en_Costa_Rica_1955-2015
- Pino, J. (2017). Revisión de las tendencias en las publicaciones relacionadas con la microextracción en fase sólida y el aroma y sabor de los alimentos durante 1992-2016. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 27(3), 32-36. <https://www.revcitecal.iiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/article/view/115/98>
- Porras, J. & Picado, W. (2017). Comercio exterior de cacao en Costa Rica (1957-2015). Observatorio de Historia Agroecológica y Ambiental, Universidad Nacional, Costa Rica. http://www.redilacg.org/descargas/Comercio_exterior_de_cacao_en_Costa_Rica_1957_2015_4.pdf
- Portillo, E., LaBarca, M., Grazziani, L., Cros, E., Assemat, S., Davrieux, F., Boulnager, R. & Macano, M. (2009). Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista UDO Agrícola*, 9(2), 458-468. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09058>
- Presidencia de la República. (2017). Cacao tico sigue ganando terreno entre los mejores del mundo. Gobierno de Costa Rica. <https://www.presidencia.go.cr/comunicados/2017/11/cacao-tico-sigue-ganando-terreno-entre-los-mejores-del-mundo/>
- Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica. (2018). Manual Técnico 2: Cosecha de cacao fino y de aroma. <https://www.procomer.com/wp-content/uploads/Manual-Cosecha-de-cacao-fino-y-de-aroma.pdf>

- Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica. (2020) Manual Técnico 3: Poscosecha de cacao fino y de aroma. <https://www.procomer.com/wp-content/uploads/Manual-poscosecha-de-cacao-fino-y-de-aroma.pdf>
- Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica. (2022). Se espera que suministros globales de cacao disminuyan 5% en 2022. [15 marzo 2022]. https://www.procomer.com/alertas_comerciales/comprador-internacional-alerta/se-espera-que-suministros-globales-de-cacao-disminuyan-5-en-2022/
- Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica. (2023). Factores climáticos comprometen la producción africana de cacao. [12 junio 2023]. https://www.procomer.com/alertas_comerciales/exportador-alerta/factores-climaticos-comprometen-la-produccion-africana-de-cacao/
- Ramírez, P. (2013). Ayer, hoy y siempre en el desarrollo socioeconómico y cultural del mundo, norte de Santander y Cúcuta. *Mundo FESC*, (3)6, 76-83. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4966233>
- Rawel, H., Huschek, G., Sagu, S. & Homann, T. (2019). Cocoa Bean Proteins—Characterization, Changes and Modifications due to Ripening and Post-Harvest Processing. *Nutrients*, 11(2), 428; doi:10.3390/nu11020428
- Ríos, J. (2015). Nuevos desarrollos metodológicos en SPME. [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/42933/1/T38815.pdf>
- Rodríguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H., Contreras-Ramos, S., Orozco-Ávila, J., Jaramillo-Flores, E. & Lugo-Cervantes, E. (2012). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132, 277-288. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.078
- Rodríguez-Velázquez, N., Chávez-Ramírez, B., Gómez de la Cruz, I., Vázquez, MS. & Estrada de los Santos, P. (2022). El cultivo del cacao, sus características y su asociación con microorganismos durante la fermentación. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 7(25), 36-51. <http://doi.org/10.5281/zenodo.6326782>

- Rojas, A. (2017). Guatuso: Memoria viva del cacao. ASOPAC. Beca-Taller. Ministerio de Cultura y Juventud, Costa Rica. 30p.
- Rojas-Rojas, K., Hernández-Aguirre, C. & Mencía-Guevara, A. (2020). Transformaciones bioquímicas del cacao (*Theobroma cacao* L.) durante un proceso de fermentación controlada. *Agronomía Costarricense*, 45(1), 53-65. https://www.mag.go.cr/rev_agr/v45n01_053.pdf
- Rottiers, H., Tzompa, D., De Winne, A., Ruales, J., De Clippeleer, J., De Leersnyder, I., De Wever, J., Everaert, H., Messens, K. & Dowettinck, K. (2019). Dynamics of volatile compounds and favor precursors during spontaneous fermentation of fine favor Trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03307-y>
- Ruiz, M. (2020). Espectrometría de masas. Universidad Simón Bolívar. <https://bonga.unisimon.edu.co/bitstream/handle/20.500.12442/7987/Gu%C3%ADa%20de%20Espectrometr%C3%ADa%20de%20masas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Salamero, M. (2017). Microextracción en fase sólida: aplicaciones de interés farmacéutico. [Tesis de licenciatura, Universidad de Sevilla]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/64943/Microextracci%C3%B3n%20en%20fase%20s%C3%B3lida..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, V., Zambrano, J. & Iglesias, C. (2019). La Cadena de Valor del Cacao en América Latina y El Caribe. Caco 2030 - 2050. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5382>
- Santander, M., Rodríguez, J., Vaillant, F. & Escobar, S. (2020). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, 60(10), 1593-1613. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>
- Skoog, D., Holler, F. & Crough, S. (2008). Principios de análisis instrumental. https://www.academia.edu/37326567/Principios_de_an%C3%A1lisis_instrumental_6ta_Edici%C3%B3n_Douglas_A_Skoog_LIBROSVIRTUAL
- Solarte, M. (2021). Caracterización de algunos compuestos de interés en los procesos de fermentación y tostado de dos especies de cacao Amazónico. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79691>

- Stashenko, E. & Martínez, J. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47. <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a3.pdf>
- Suzuki, D., Sato, Y., Nishiura, H., Harada, R., Kamasaka, H., Kuriki, T. & Tamura, H. (2019). A Novel Extraction Method for Aroma Isolation from Dark Chocolate Based on the Oiling-Out Effect. *Food Analytical Methods*, 12, 2857–2869. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01642-0>
- Temussi, P. (2011). The good taste of peptides. *Journal of Peptides Science*, (18), 73-82. DOI 10.1002/psc.1428
- Teneda, W. (2016). Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao (*Theobroma cacao* L.) Variedad Nacional y Variedad CCN51. Universidad Internacional de Andalucía, España. 140 p. <https://www.virtualpro.co/biblioteca/mejoramiento-del-proceso-de-fermentacion-del-cacao-theobroma-cacao-l-variedad-nacional-y-variedad-ccn51>
- Toker, O., Palabiyik, I., Pirouzian, H., Aktar, T. & Konar, N. (2020). Chocolate aroma: Factors, importance and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 580-592. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.035>
- Utrilla-Vázquez, M., Rodríguez-Campos, J., Avendaño-Arazate, C., Gschaedler, A. & Lugo-Cervantes, E. (2019). Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Research International*, 129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108834>
- Vargas, R. (2019). Análisis del secado, el equilibrio higroscópico y la torrefacción de los granos de cacao (*Theobroma cacao*). [Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. https://www.ingbiosistemas.ucr.ac.cr/wp-content/uploads/2020/02/TFG_RebecaVargasF.pdf
- Vargas-Elías, G., Morales-García, V., Badilla-Mena, B., Vargas-Gómez, D., Alvarado-Marengo, P. & Cubero-Castillo, E. (2022). Aproximación de la humedad en granos de cacao por medio de su actividad de agua. Poster. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/87890/Actividad%20Agua%20Cacao%20GuillermoVargas%20CIGRAS->

[UCR%20Poster22.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=El%20contenido%20de%20humedad%20m%C3%A1ximo,de%20la%20misma%20zona%20productora.](#)

Vásquez, E., Pérez, A., Baeza, C., Salas del Río, A., Galicia, M. & Contreras, P. (2014). Diagrama de Venn. Universidad Autónoma de Nuevo León. https://www.uanl.mx/utilerias/chip/descarga/diagrama_venn.pdf

Vázquez-Ovando, A., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Betancur-Ancona, D. & Salvador-Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(3), 239-254. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222016000300010#:~:text=La%20degradaci%C3%B3n%20de%20Strecker%20se,se%20producen%20contribuyen%20al%20aroma.

Vega, F., Rodríguez-Campos, J., Escalona, H. & Lugo, C. (2016). Optimización del proceso de tostado de *Theobroma cacao* var. Criollo en función del perfil cromatográfico. *Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química*. Memorias del XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Jalisco, México. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/417/1/Optimizaci%C3%B3n%20del%20proceso%20de%20tostado.pdf>

Viesser, J., Pereira, G., Neto, D., Vandenberghe, L., Azevedo, V., Brenig, B., Rodez, H., Góes-Neto, A. & Soccol, C. (2020). Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: Isolation, selection and evaluation. *Food Research International*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109478>

Voigt, J., Biehl, B. & Wazir, S. (1993). The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry*, 47, 145-151. DOI:10.1016/0308-8146(93)90236-9

Voigt, J. & Lieberei, R. (2014). Biochemistry of cocoa fermentation. En Achwan, R. & Fleet, H (Ed). *Cocoa and coffee fermentations*. CRC Press. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b17536-10/biochemistry-cocoa-fermentation-r-gen-voigt-andr-ei-nhardli-eber-ei>

- Voigt, J., Janek, K., Textoris-Taube, K., Niewianda, A. & Wöstemeyer, J. (2016). Partial purification and characterization of the peptide precursors of the cocoa-specific aroma components. *Food Chemistry*, 192, 706–713. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.068>
- Voigt, J., Textoris-Taube, K. & Wöstemeyer, J. (2018). pH-Dependency of the proteolytic formation of cocoa- and nutty-specific aroma precursors. *Food Chemistry*, 255, 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.045>
- Wattnem, T., Wiegel, J., González, C. & Reyes, B. (2022). Who Defines Fine Chocolate? The Construction of Global Cocoa Quality Standards from Latin America. *International Journal of Sociology of Agriculture and Food*, 28(1),73-87
- Xiao, Q., Jian, L., Le, T., Chao, H., Fu, L., Shu, H. & Ying, S. (2017). Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. *International Journal of Food Properties*, 20(10), 2261-2275. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2016.1236270>
- Zapata, S., Tamayo, A. & Rojano, B. (2015). Efecto del Tostado Sobre los Metabolitos Secundarios y la Actividad Antioxidante de Clones de Cacao Colombiano. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7497-7507. Doi: <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47836>
- Zumbado, H. (2021). Análisis Instrumental de los alimentos. Editorial Universitaria Ministerio de Educación Superior, La Habana, Cuba. 539 p. [https://www.ecured.cu/An%C3%A1lisis_instrumental_de_los_alimentos_\(libro\)#/media/File:40d78409-8f5a-44ad-af96-811f110af4ad.jpg](https://www.ecured.cu/An%C3%A1lisis_instrumental_de_los_alimentos_(libro)#/media/File:40d78409-8f5a-44ad-af96-811f110af4ad.jpg)

9. ANEXOS

Anexo A

Extracto de las Deliberaciones del Panel *Ad Hoc* de 2023 sobre la revisión del Anexo "C" del Convenio Internacional del Cacao (CIC), 2010



INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION
ORGANISATION INTERNATIONALE DU CACAO
МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО КАКАО
ORGANIZACION INTERNACIONAL DEL CACAO



ED(MEM) 1206
Original: Inglés

Organización Internacional del Cacao
Immeuble ICCO
II - Plateau ENA
Avenue Boga Doudou
Abidjan
Côte d'Ivoire

Tel: +225 27 22 51 4950
Fax: +225 27 22 51 4979

E-mail: michel.attrion@icco.org

A: Todos los participantes en el Panel *Ad Hoc* de 2023

Del: Director Ejecutivo

Asunto: Deliberaciones del Panel *Ad Hoc* de 2023 sobre la revisión del Anexo "C" del Convenio Internacional del Cacao (CIC), 2010

El Director Ejecutivo tiene el honor de adjuntar un informe sobre las deliberaciones del Panel *Ad Hoc* arriba mencionado, tras la reunión celebrada los días 13-14 de junio de 2023 en el Hotel Radisson Blu Waterfront en Antananarivo, Madagascar. El informe también contiene los comentarios y observaciones del Panel.

Se recuerda que, según el reglamento interno del Panel (documento ICC/104/6/Rev.2), todo representante oficial de un país que haya presentado un dossier podrá solicitar la revisión de las recomendaciones del Panel en base a la provisión de información nueva. Toda solicitud de revisión deberá presentarse al Director Ejecutivo en un plazo de 30 días a partir de la fecha de distribución de las recomendaciones del Panel, es decir, **antes del cierre de las oficinas el 15 de julio de 2023**.

El informe de la reunión (FFP/REP/8) será distribuido para su estudio y aprobación por el Consejo Internacional del Cacao en su próxima reunión ordinaria.

14 de junio de 2023

**DELIBERACIONES DEL PANEL *AD HOC* DE 2023 SOBRE LA REVISIÓN DEL ANEXO
"C" DEL CONVENIO INTERNACIONAL DEL CACAO, 2010**

Países	Decisión del Consejo de diciembre de 2020 (% de exportaciones totales de cacao en grano)	Recomendación del Panel en junio de 2023 (% de exportaciones totales de cacao en grano)	Comentarios y observaciones
Belice	<i>a/</i>	Eliminado del Anexo C	Este país no presentó un dossier para su consideración por el Panel, y no debe figurar en la versión revisada del Anexo C.
Bolivia	<i>a/</i>	Eliminado del Anexo C	Este país no presentó un dossier para su consideración por el Panel, y no debe figurar en la versión revisada del Anexo C.
Brasil	100%	100%	El Panel recomendó mantener el país como exportador exclusivo de cacao fino. Tomó nota del dinamismo del sector nacional de cacao y chocolate, y sobre todo del reconocimiento del cacao único del bioma amazónico.

Camerún	<i>b/</i>	<i>a/</i>	El Panel reconoció la valiosa información proporcionada en el dossier y en la presentación, que demostraba los esfuerzos realizados para desarrollar un sector nacional del cacao fino. Tomó nota especialmente de los esfuerzos por establecer Centros de Excelencia en todo el país para la elaboración post-cosecha y la trazabilidad de las explotaciones. Además, el Panel recomendó el desarrollo de un sistema integrado de clasificación y sugirió que en el futuro se facilitara información más detallada sobre la apreciación de la calidad por parte del mercado.
Colombia	95%	80%	El Panel reconoció los esfuerzos realizados para desarrollar un sector cacaoero nacional fuerte. No obstante, el Panel consideró que el porcentaje solicitado era demasiado elevado y no reflejaba la realidad actual del mercado en términos de apreciación de la calidad de los lotes de cacao exportados.
Costa Rica	100%	100%	El Panel recomendó mantener el país como exportador exclusivo de cacao fino. Reconoció especialmente la existencia de un sector diversificado para las exportaciones de cacao certificado.
Dominica	100%	Eliminado del Anexo C	Este país no presentó un dossier para su consideración por el Panel, y no debe figurar en la versión revisada del Anexo C.
República Dominicana	60%	Eliminado del Anexo C	Este país no presentó un dossier para su consideración por el Panel, y no debe figurar en la versión revisada del Anexo C.

Anexo B

Pruebas preliminares para análisis de péptidos

Para la primera prueba preliminar se utilizaron dos muestras de cacao tostado finamente molido: una íntegra y otra desgrasada con una mezcla de éter etílico: éter de petróleo 1:1 (ver procedimiento resumido en cuadro 17).

Para el montaje de la muestra en el gel de electroforesis, las mismas se prepararon a partir de una disolución de 10 mg/mL en agua destilada. Se utilizó gel de acrilamida/poliacrilamida al 15 % y buffer reductor.

En esta corrida no fue posible, a partir de ninguna de las muestras, observar las bandas que evidencian la presencia de péptidos. Sin embargo, como se aprecia en la figura 40, una de las muestras desgrasadas mostró una separación de bandas muy tenue, que, aunque imposible de analizar, sugiere que para siguientes pruebas es mejor utilizar la muestra desgrasada.

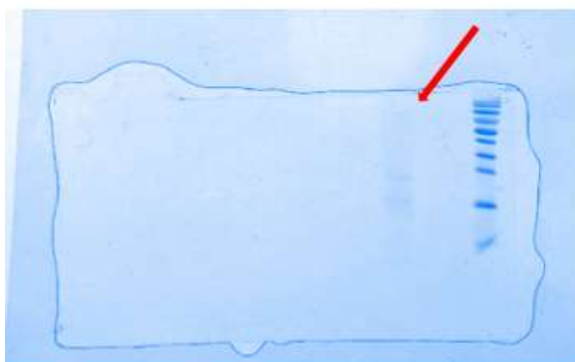


Figura 40. Resultado de SDS-PAGE en muestras de cacao tostado-primera prueba preliminar.

Se decidió por tanto repetir la prueba partiendo de la muestra desgrasada, corriendo una alícuota de una disolución más concentrada, probando dos opciones: 50 y 100 mg/mL, con el fin de determinar si las cantidades presentes son tan pequeñas que el efecto de la disolución no permite identificar las bandas.

Se hizo una revisión de distintos procedimientos de extracción recomendados en la literatura para desgrasar muestras de cacao, algunos específicamente para análisis de polifenoles, los cuales se muestran en el cuadro 17.

Cuadro 17. Procedimientos para desgrasar muestras de granos de cacao.

Método	Disolvente (s)	Descripción	Referencia
1	Éter etílico: éter de petróleo 1:1	5-10 g de cacao molido se ponen en contacto con 25 mL del disolvente y se agita manualmente por 1 min, luego se centrifuga a 4.500 rpm/10 min y se descarta el líquido sobrenadante. Se repite el procedimiento dos veces más. Por último, la muestra desgrasada se coloca en una placa Petri para permitir la evaporación del disolvente	Herrera et al., 2019
2	Hexano	10 g de muestra molida se ponen en contacto con 35 mL de hexano y se centrifuga a 4.500 rpm/5 min, se descarta el líquido y se repite el procedimiento dos veces más. Luego se espera a que se evapore en disolvente.	Payne et al., 2010
3	Hexano	15 g de cacao molido se ponen en contacto con 125 mL de hexano y se agitan por 20 min en un agitador orbital a 200 rpm, luego se centrifugan a 15.000g/15 min. El procedimiento se repite tres veces más.	Ortega et al., 2008
4	Diclorometano	50 g de cacao molido se ponen en contacto con 100 mL de diclorometano destilado y se dejan en agitación durante 2 h.	Liu et al., 2017

Se realizaron nuevas pruebas con los métodos 2 y 3 descritos en el cuadro 17, utilizando gel de acrilamida/poliacrilamida al 15% y buffer reductor, pero los resultados tampoco fueron satisfactorios.

Se decidió utilizar luego el buffer de muestras reductor recomendado por Lomonte (2020), siempre con una concentración de gel del 15 %. En este momento ya se observaron “manchas” en los distintos carriles (figura 41), sin embargo, ya sea por una alta concentración o por un bajo poder de resolución, tampoco fue posible obtener un resultado adecuado.

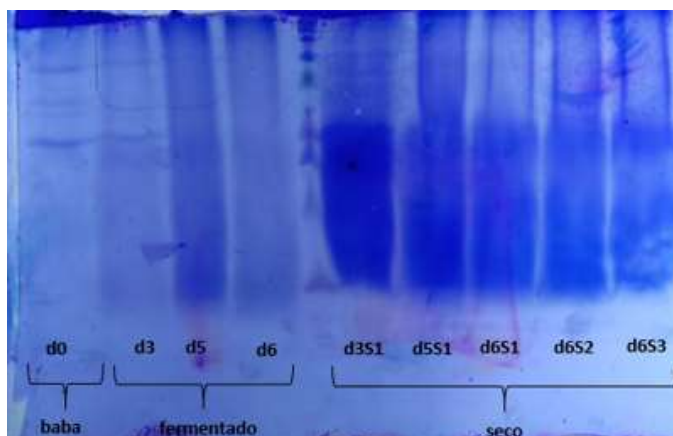


Figura 41. Gel obtenido utilizando el buffer de muestras reductor para la extracción de la proteína en cacao tostado.

Para la siguiente prueba preliminar se decidió seguir el procedimiento descrito por Kumari et al. (2016) con algunas modificaciones, quienes utilizaron la técnica SDS-PAGE como parte de un estudio para investigar las transformaciones que sufre la vicilina durante el procesamiento del cacao, desde la fermentación hasta el tostado. Esto significó modificar el procedimiento y los disolventes de la extracción, así como la concentración de acrilamida/bisacrilamida del gel, pasando de 15 a 12%.

Además, se tomó la decisión de utilizar el cacao seco y no tostado, ya que esta última etapa, aunque se considera un tostado suave, la temperatura de 125 °C podría dañar las proteínas, impidiendo la visualización de las bandas de péptidos por SDS-PAGE.

Se corrieron además pruebas con muestra liofilizada y sin liofilizar. Para la preparación se utilizó un liofilizador marca SP Scientific modelo Benchtop Pro 9L Es-55 disponible en el Laboratorio de Química de Alimentos de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la UCR. Se utilizaron muestras de cacao en baba, cacao fermentado sin secar, y cacao fermentado y seco. Con estas modificaciones, ya fue posible obtener bandas definidas (figura 42), que no evidenciaron diferencia entre las muestras liofilizadas y no liofilizadas, por lo que para las pruebas definitivas no se realizó la liofilización. Por último, debido a los resultados obtenidos, se decidió realizar la electroforesis en el cacao fermentado y seco.

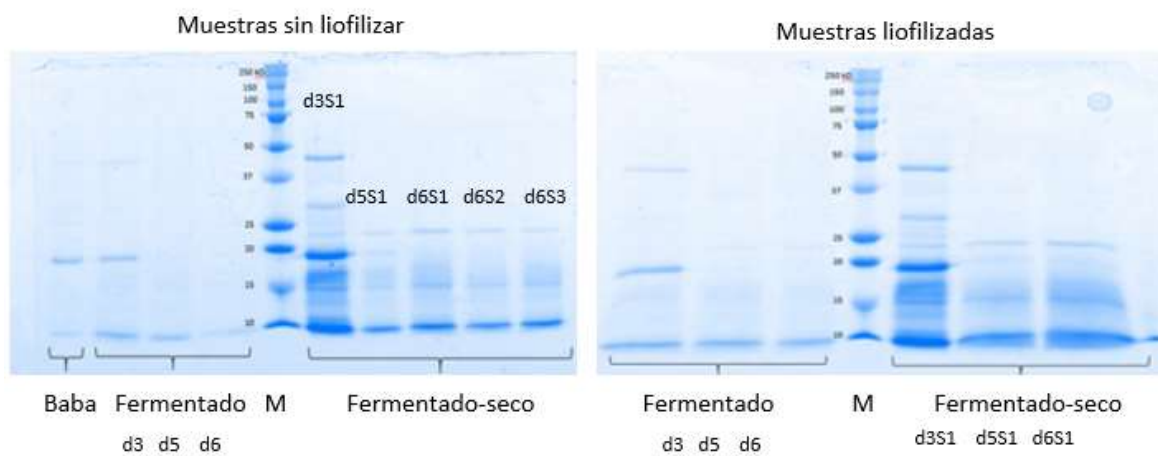


Figura 42. Resultados de la última prueba preliminar para diferentes muestras de cacao.

Anexo C

Monitoreo continuo de la temperatura a lo largo de las fermentaciones

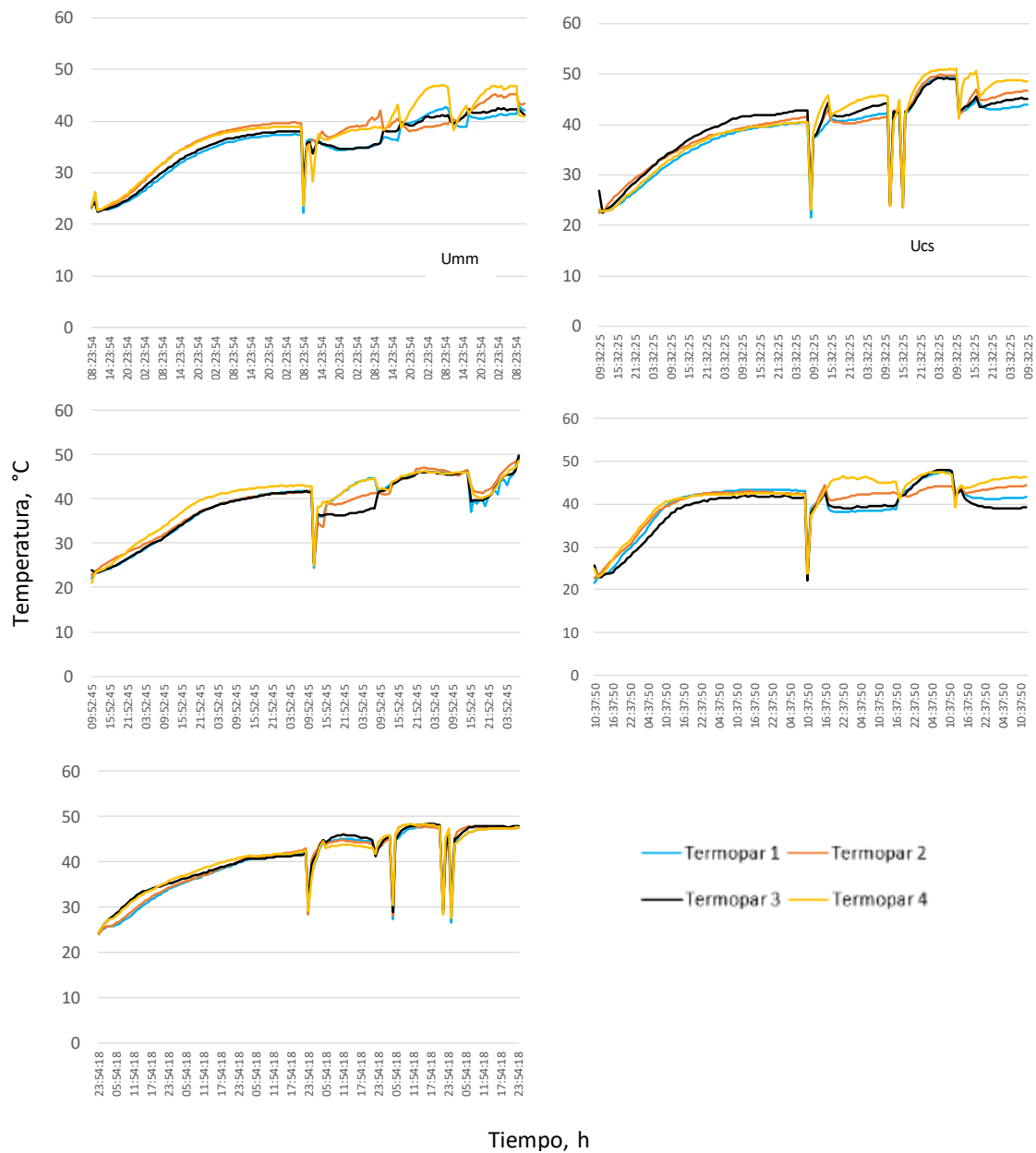


Figura 43. Ejemplo del monitoreo continuo de temperatura documentado directamente del termo registrador para los cuatro termopares, durante todo el tiempo de fermentación para todas las subvariedades.

Las caídas abruptas de temperatura mostradas en la figura 43 pueden deberse a los momentos en que los termopares se sacaban para voltear el cacao.

Anexo D

Curvas de calibración y rectas de mejor ajuste para el cálculo de peso molecular de los péptidos visualizados

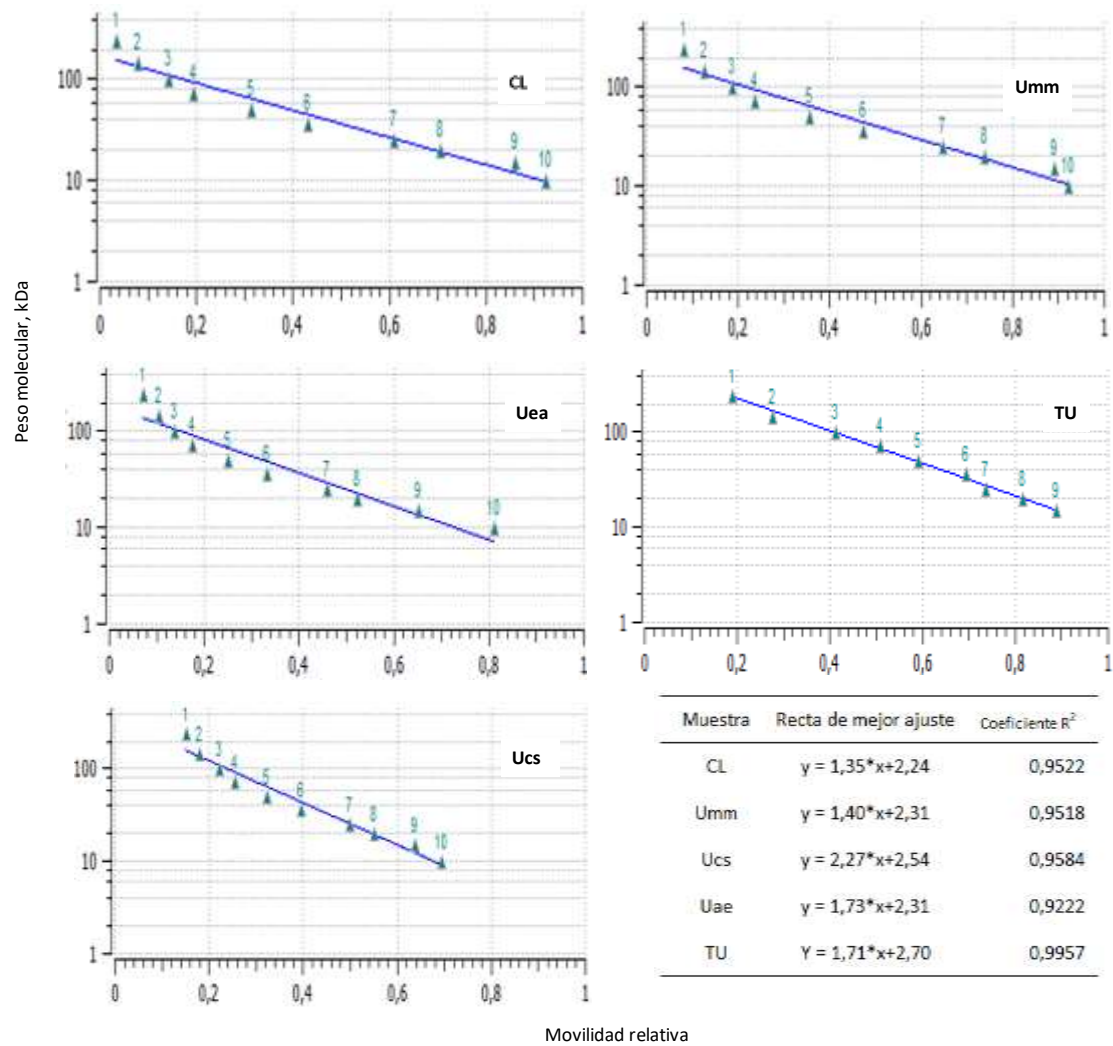


Figura 44. Curvas de calibración y rectas de mejor ajuste de los resultados de la electroforesis para cada una de las cinco subvariedades.

Anexo E

Evidencia de los análisis estadísticos realizados a los datos de ácidos orgánicos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con un intervalo de confianza del 95 % utilizando el software XLSTAT

Cuadro 18. Resumen del análisis de medias de Tukey para acidez total y ácidos orgánicos del cacao en baba para todas las subvariedades.

Resumen (Medias)-Tukey	Acidez total (g/100g)	Oxálico (g/100g)	Cítrico (g/100g)	Succínico (g/100g)	Láctico (g/100g)	Acético (g/100g)	Tartárico (g/100g)	Glucónico (g/100g)	Quínico (g/100g)
Umm	0,383 a	0,123 a	1,207 a	0,046 a	0,229 a	0,000 a	0,018 a	0,125 a	0,253 a
Ucs	0,414 a	0,096 a	1,109 a	0,075 a	0,106 a	0,000 a	0,016 a	0,220 a	0,503 a
CL	0,314 a	0,164 a	1,108 a	0,055 a	0,224 a	0,000 a	0,004 a	0,089 a	0,497 a
Uea	0,293 a	0,221 a	0,806 a	0,043 a	0,280 a	0,019 a	0,002 a	0,054 a	0,388 a
TU	0,409 a	0,096 a	0,704 a	0,051 a	0,092 a	0,007 a	0,022 a	0,000 a	0,102 a
Pr > F(Modelo)	0,474	0,639	0,970	0,926	0,745	0,635	0,695	0,639	0,477
Significativo	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Pr > F(MUESTRA)	0,954	0,696	0,911	0,881	0,576	0,566	0,633	0,715	0,586
Significativo	No	No	No	No	No	No	No	No	No

Cuadro 19. Resumen del análisis de medias de Tukey para acidez total y ácidos orgánicos específicos para nibs de cacao de las cinco subvariedades (A) y para los tres tiempos de fermentación (B).

(A) Subvariedad	Acidez total (g/100g)	Oxálico (g/100g)	Cítrico (g/100g)	Succínico (g/100g)	Láctico (g/100g)	Acético (g/100g)	Quínico (g/100g)	Tartárico (g/100g)	Glucónico (g/100g)	Málico (g/100g)	Adípico (g/100g)
CL	1,440 a	0,405 a	0,605 b	0,258 b	0,666 c	0,740 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
TU	1,169 a	0,249 a	0,121 a	0,236 ab	0,287 ab	0,646 a	0,060 a	0,052 b	0,381 b	0,068 b	0,001 a
Uea	1,308 a	0,374 a	0,934 c	0,219 ab	0,472 bc	0,945 a	0,039 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
Ucs	1,361 a	0,341 a	0,694 bc	0,263 b	0,270 a	0,612 a	0,029 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
Umm	1,254 a	0,377 a	0,406 ab	0,125 a	0,197 a	0,767 a	0,020 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
Pr > F(MUESTRA)	0,278	0,212	<0,0001	0,017	<0,0001	0,313	0,084	<0,0001	<0,0001	0,014	0,400
Significativo	No	No	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	No

(B) Día de fermentación	Acidez total (g/100g)	Oxálico (g/100g)	Cítrico (g/100g)	Succínico (g/100g)	Láctico (g/100g)	Acético (g/100g)	Quínico (g/100g)	Tartárico (g/100g)	Glucónico (g/100g)	Málico (g/100g)	Adípico (g/100g)
Día 3	1,097 a	0,383 a	0,696 b	0,264 a	0,317 a	0,550 a	0,020 a	0,010 a	0,088 a	0,009 a	0,000 a
Día 5	1,393 b	0,337 a	0,531 ab	0,199 a	0,356 ab	0,807 ab	0,031 a	0,006 a	0,045 a	0,017 a	0,000 a
Día 6	1,430 b	0,328 a	0,430 a	0,197 a	0,462 b	0,869 b	0,038 a	0,015 a	0,095 a	0,015 a	0,000 a
Pr > F(Día/Secado)	0,003	0,549	0,013	0,079	0,025	0,045	0,532	0,369	0,386	0,887	0,388
Significativo	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	No	No	No	No	No

Cuadro 20. Resumen del análisis de medias de Tukey para acidez total y ácidos orgánicos específicos para los nibs de cacao de las cinco subvariedades (A) y los tres tipos de secador (B).

(A) Subvariedad	Acidez total (g/100g)	Oxálico (g/100g)	Cítrico (g/100g)	Succínico (g/100g)	Láctico (g/100g)	Acético (g/100g)	Quínico (g/100g)	Tartárico (g/100g)	Glucónico (g/100g)	Málico (g/100g)
CL	1,355 a	0,347 b	0,642 c	0,263 b	0,648 c	0,688 ab	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a
TU	1,130 a	0,180 a	0,167 a	0,249 b	0,335 ab	0,466 a	0,039 b	0,044 b	0,360 b	0,043 b
Uea	1,243 a	0,338 b	0,929 d	0,211 b	0,439 b	0,796 b	0,033 ab	0,000 a	0,000 a	0,000 a
Ucs	1,217 a	0,335 b	0,701 c	0,252 b	0,307 ab	0,548 ab	0,030 ab	0,000 a	0,000 a	0,000 a
Umm	1,104 a	0,329 b	0,385 b	0,119 a	0,216 a	0,655 ab	0,014 ab	0,000 a	0,000 a	0,000 a
Pr > F(MUESTRA)	0,130	0,001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,022	0,043	<0,0001	<0,0001	0,000
Significativo	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

(B) Iteracción día de fermentación/tipo de secador	Acidez total (g/100g)	Oxálico (g/100g)	Cítrico (g/100g)	Succínico (g/100g)	Láctico (g/100g)	Acético (g/100g)	Quínico (g/100g)	Tartárico (g/100g)	Glucónico (g/100g)	Málico (g/100g)
Día 3- S1	1,090 ab	0,380 a	0,697 b	0,264 a	0,318 ab	0,543 ab	0,019 a	0,010 ab	0,088 a	0,009 a
Día 3- S2	0,908 a	0,346 a	0,654 ab	0,218 a	0,299 a	0,414 a	0,020 a	0,006 ab	0,051 a	0,010 a
Día 3- S3	0,964 a	0,279 a	0,674 ab	0,233 a	0,334 ab	0,432 a	0,015 a	0,007 ab	0,071 a	0,010 a
Día 6- S1	1,420 bc	0,325 a	0,429 a	0,198 a	0,471 b	0,831 b	0,033 a	0,020 b	0,100 a	0,002 a
Día 6- S2	1,423 bc	0,242 a	0,470 ab	0,218 a	0,464 ab	0,730 ab	0,026 a	0,002 a	0,029 a	0,010 a
Día 6- S3	1,454 c	0,261 a	0,465 ab	0,182 a	0,451 ab	0,832 b	0,026 a	0,008 ab	0,093 a	0,012 a
Pr > F(Día/Secado)	<0,0001	0,039	0,002	0,187	0,003	0,000	0,866	0,050	0,788	0,966
Significativo	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	No	No

Anexo F

Ejemplo de cromatogramas obtenidos para cada subvariedad

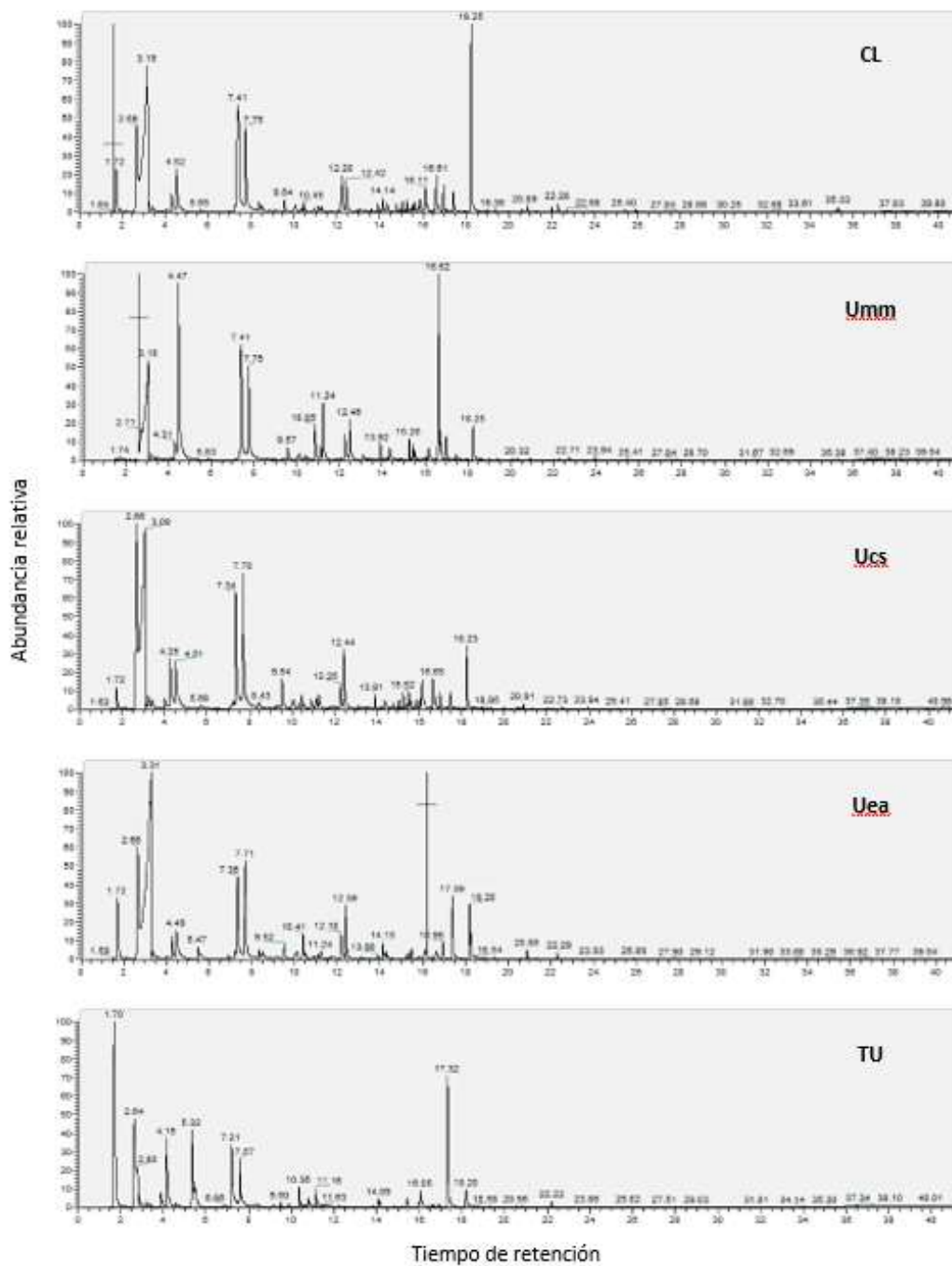


Figura 45. Ejemplo de cromatogramas obtenidos para el tercer día de fermentación en el secador

Anexo G

Áreas relativas promedio de los compuestos volátiles de las distintas subvariedades

Cuadro 21. Áreas relativas promedio de compuestos volátiles para todas las subvariedades a lo largo de la fermentación y secado por circulación continua de aire caliente (Objetivo 1) (código de compuesto disponible en anexo I).

Compuesto identificado	Al01	Es01	Es02	Es03	Al02	Es04	Al03	Al04	Ad01	Al05	Ce01	Pz01	Al06	Ac01	Al07	Ce02
ClD3S1	-	-	1,83	0,13	0,77	0,83	-	0,11	0,16	23,03	0,17	-	0,06	0,05	-	-
ClD5S1	-	-	3,46	-	0,15	0,13	-	-	0,16	34,57	0,01	-	0,19	0,02	0,46	0,09
ClD6S1	-	-	3,33	-	0,02	0,10	-	-	0,12	34,48	-	-	0,20	0,01	0,62	0,15
UmmD3S1	-	-	-	0,03	0,62	0,87	-	-	0,38	25,62	3,55	-	0,14	0,06	-	-
UmmD5S1	-	-	0,01	-	0,08	0,44	-	0,00	-	28,73	1,09	-	-	0,04	-	-
UmmD6S1	-	1,41	-	0,05	0,03	0,37	-	-	-	29,87	0,39	-	0,29	0,03	-	-
Uead3S1	-	-	-	0,08	0,68	0,61	-	-	0,02	30,68	0,16	0,03	-	2,53	-	-
Uead5S1	-	-	-	0,04	0,08	0,35	-	0,00	0,02	33,80	0,05	0,04	-	0,06	-	-
Uead6S1	-	-	-	0,05	0,06	0,46	-	-	0,01	35,01	0,16	0,01	-	0,39	-	-
Ucsd3S1	-	-	-	0,23	0,89	1,31	0,01	-	-	13,83	0,02	0,09	3,11	0,03	-	-
Ucsd5S1	-	-	2,99	0,14	0,08	0,79	0,03	-	0,01	16,93	-	0,05	0,09	-	0,36	0,04
Ucsd6S1	-	-	3,96	0,09	0,03	0,73	-	-	-	19,20	0,01	0,04	0,02	-	0,69	0,43
TUd3S1	-	-	-	-	0,12	1,01	-	-	-	14,29	-	0,05	4,96	0,05	0,73	-
TUd5S1	-	-	-	0,38	0,04	1,94	0,00	-	0,03	10,28	-	0,08	0,10	0,03	-	-
TUd6S1	-	0,04	-	0,28	0,04	1,65	-	-	-	9,04	-	0,06	0,09	-	-	-

Compuesto identificado	Al08	Ce03	Ce04	Al09	Ce05	Ce06	Es05	Al10	Al11	Am01	Al12	Ac02	Ad02	Ad03	Al13	Pz02
ClD3S1	0,31	0,13	-	-	0,29	-	1,11	0,08	0,24	-	-	0,01	0,01	-	-	-
ClD5S1	0,01	0,02	-	-	-	-	0,65	0,21	0,12	-	0,01	-	0,04	-	-	-
ClD6S1	0,08	0,01	-	-	-	-	0,65	0,38	0,28	-	-	-	0,03	-	-	-
UmmD3S1	9,87	5,65	-	0,02	2,51	0,09	2,63	0,02	-	0,02	-	0,12	0,10	0,20	0,01	-
UmmD5S1	3,33	1,64	-	0,04	1,10	0,02	1,71	0,03	-	0,02	-	0,03	0,01	-	-	-
UmmD6S1	1,86	1,08	-	-	0,75	0,02	1,37	0,06	-	0,02	-	0,02	0,01	-	-	-
Uead3S1	0,86	0,30	-	0,01	0,29	-	1,20	0,01	0,31	-	0,09	-	0,03	0,13	-	-
Uead5S1	0,45	0,08	0,03	-	-	-	1,15	0,04	0,33	-	-	0,08	0,01	0,07	-	-
Uead6S1	0,09	0,07	0,03	-	0,03	-	1,47	0,06	0,33	-	0,06	0,07	0,01	0,04	-	-
Ucsd3S1	0,94	0,68	-	-	0,75	-	1,84	0,04	-	-	0,02	-	-	0,05	-	0,29
Ucsd5S1	0,32	0,21	-	-	0,27	-	1,69	0,19	-	0,03	0,04	-	-	0,04	-	0,05
Ucsd6S1	0,12	0,15	-	-	0,20	-	1,20	0,21	0,02	0,02	0,01	0,06	-	0,03	-	0,04
TUd3S1	1,47	0,67	-	-	-	0,08	0,49	0,06	0,13	-	0,38	-	-	0,08	0,19	-
TUd5S1	0,48	0,13	0,31	-	-	0,04	0,96	0,15	-	-	0,67	-	-	0,05	-	-
TUd6S1	0,15	0,06	0,37	0,00	-	0,03	1,11	0,04	-	-	0,02	-	-	0,03	-	-

Compuesto identificado	Al14	Am02	Es06	Ac03	Al15	Am03	Et01	Ac04	Ac05	Ce07	Ce08	Et02	Tp01	Ad04	Hc01	Hc02
ClD3S1	0,85	-	-	0,03	0,41	0,01	-	30,93	2,13	4,10	0,61	0,45	-	0,04	0,02	0,44
ClD5S1	0,15	-	0,03	0,19	0,11	-	-	34,22	1,26	9,55	0,37	0,04	-	-	0,00	0,33
ClD6S1	0,01	-	-	0,06	0,14	-	-	31,67	0,47	10,71	0,24	-	-	-	0,01	0,26
UmmD3S1	-	0,09	0,06	0,01	-	0,06	-	25,81	-	4,06	0,86	0,59	-	0,05	-	-
UmmD5S1	-	0,08	0,04	0,00	-	-	0,16	39,73	-	10,20	0,27	0,18	0,01	-	-	0,30
UmmD6S1	-	0,01	0,02	-	-	0,04	0,21	40,67	0,42	14,52	0,24	0,03	0,01	-	-	0,22
Uead3S1	-	-	0,10	-	-	-	-	36,82	-	7,91	-	0,33	-	0,09	0,05	0,71
Uead5S1	0,31	-	0,10	-	-	0,07	0,10	21,47	0,03	15,16	-	16,93	-	0,69	0,02	-
Uead6S1	-	0,05	-	-	-	0,08	-	17,94	0,06	15,07	-	15,21	-	0,05	-	-
Ucsd3S1	0,00	1,82	0,04	-	-	-	-	30,31	0,06	6,43	2,51	0,60	-	0,04	0,03	-
Ucsd5S1	-	0,36	-	-	-	-	-	45,68	4,34	10,35	1,47	0,11	-	0,97	0,01	-
Ucsd6S1	-	0,16	-	-	-	-	-	41,53	4,22	10,55	1,33	0,19	-	1,55	0,02	-
TUd3S1	0,30	-	-	0,09	-	-	-	36,10	0,04	12,13	0,93	0,20	-	0,01	-	-
TUd5S1	0,29	-	-	0,09	-	0,03	-	51,28	0,24	13,30	1,09	0,24	-	0,09	0,06	-
TUd6S1	0,34	-	-	0,07	-	0,04	-	56,45	0,16	12,30	0,77	-	-	0,38	0,05	-

Cuadro 21. Continuación

Compuesto identificado	Ad05	Al16	Ac06	Es07	Ac07	Ac08	Ce09	Tp02	Hc03	Hc04	Al17	Es08	Ad06	Hc05	Ac09	Ac10
CLd3S1	0,65	0,10	0,01	0,02	0,15	0,49	0,06	0,52	-	0,13	3,82	11,42	0,04	0,21	0,04	0,01
CLd5S1	0,13	0,03	0,05	-	0,17	0,65	-	0,09	-	0,03	0,07	2,28	-	0,02	0,01	-
CLd6S1	0,09	0,05	0,06	-	0,32	0,63	-	0,08	0,00	0,03	0,02	1,41	-	0,14	-	-
Umm3S1	0,22	0,15	0,08	-	-	0,27	0,10	1,80	0,32	-	3,90	-	1,09	-	-	-
Umm5S1	0,02	0,07	0,07	-	0,20	0,11	-	0,46	-	-	0,52	3,14	-	-	-	-
UmmduS1	0,06	0,03	0,08	-	-	0,20	-	0,24	-	-	0,21	0,27	-	-	-	-
Uead3S1	0,66	0,03	-	0,04	0,02	0,41	-	-	0,00	-	3,16	7,50	0,10	-	-	-
Uead5S1	0,20	-	-	-	0,32	0,56	-	-	0,03	-	0,01	-	-	-	-	-
Uead6S1	0,16	-	-	-	0,18	0,84	-	-	0,02	-	0,02	2,07	-	-	-	-
Ucs3S1	1,18	0,52	0,05	0,05	0,38	1,02	0,05	0,10	0,18	0,04	5,37	14,93	0,26	0,34	0,01	-
Ucs5S1	0,36	0,18	0,06	0,17	0,17	0,78	0,01	-	-	-	0,18	1,24	-	0,03	0,00	-
Ucs6S1	0,31	0,16	0,06	-	0,13	1,24	0,01	-	-	-	0,06	0,29	-	0,03	-	-
TUd3S1	0,62	0,28	0,05	0,04	-	0,30	-	0,13	-	-	14,24	-	-	-	-	-
TUd5S1	0,66	0,17	0,13	0,05	0,22	0,93	0,02	0,02	0,04	-	1,89	0,19	-	-	0,05	-
TUd5S1	0,54	0,14	0,12	0,03	0,01	1,40	0,01	0,11	0,03	-	1,03	0,23	-	-	0,00	-
Compuesto identificado	Es09	Es10	Al18	Tp03	Ac11	Am04	Ad07	Hc06	Hc07	Ac12	Ac13	Ac14	Al19	Al20	Al21	Ad08
CLd3S1	0,04	0,01	-	1,28	-	0,20	0,04	0,07	0,30	0,04	3,38	-	0,41	0,02	4,63	0,05
CLd5S1	-	-	0,02	0,44	-	0,29	0,01	-	0,01	-	1,18	-	0,14	-	1,00	-
CLd6S1	-	-	-	0,38	0,26	0,30	0,02	-	0,06	-	0,84	-	0,11	-	1,14	-
Umm3S1	-	-	-	1,99	-	0,07	0,13	-	-	-	-	-	-	-	0,97	0,01
Umm5S1	-	-	-	0,89	-	0,19	0,02	-	-	-	-	-	-	-	0,38	-
UmmduS1	-	-	0,03	0,67	-	0,14	0,01	-	-	-	-	-	-	-	0,37	0,07
Uead3S1	0,07	-	-	0,03	0,60	0,07	0,11	-	-	-	-	-	0,32	-	0,60	1,03
Uead5S1	-	-	0,11	-	0,29	0,24	-	0,03	-	-	0,68	-	0,48	0,06	0,75	-
Uead6S1	-	-	0,03	-	0,26	0,28	-	0,03	-	-	-	-	0,60	0,05	0,51	-
Ucs3S1	0,01	0,02	-	-	0,90	-	0,04	-	0,35	-	-	-	-	-	5,35	0,11
Ucs5S1	-	0,32	0,00	-	0,39	0,15	0,02	-	0,11	-	-	-	-	-	1,75	0,07
Ucs6S1	-	-	-	-	0,30	0,34	-	-	0,09	-	-	-	-	-	1,57	0,13
TUd3S1	0,08	-	0,27	-	0,20	-	0,03	0,05	-	-	-	2,10	-	-	5,21	-
TUd5S1	0,17	-	0,43	0,10	0,17	0,10	0,01	-	-	-	-	1,30	-	-	4,19	-
TUd5S1	0,14	-	0,39	-	0,15	0,11	-	0,06	-	-	-	1,29	-	-	2,26	0,00
Compuesto identificado	Ac15	Ac16	Al22	Pz03	Pz04	Pz05	Pz06	Pz07	Pz08	Es11	Tp04	Tp05	Es12	Hc08	Ad09	Hc09
CLd3S1	-	-	0,16	-	0,03	-	-	1,32	0,51	-	-	-	0,02	-	0,02	0,37
CLd5S1	0,96	-	0,15	0,03	-	-	-	5,07	0,48	0,09	-	-	-	-	-	0,08
CLd6S1	1,93	-	-	-	-	0,00	-	7,51	0,45	0,09	-	-	-	-	-	0,05
Umm3S1	-	-	2,89	-	-	0,30	-	0,51	1,07	-	-	0,03	-	-	0,01	-
Umm5S1	-	0,02	-	-	0,06	-	-	3,55	0,98	-	-	0,02	0,02	-	-	-
UmmduS1	0,04	-	0,18	-	0,01	-	-	2,51	0,83	0,02	-	-	0,01	-	-	-
Uead3S1	-	-	-	-	-	-	-	0,57	0,57	-	0,03	-	0,03	0,03	0,01	-
Uead5S1	-	-	0,22	0,06	-	-	-	3,29	1,08	-	0,01	-	-	0,02	0,01	-
Uead6S1	-	-	0,15	0,07	-	-	-	6,85	0,97	-	0,01	-	0,02	-	0,01	-
Ucs3S1	-	0,47	-	-	0,07	-	0,01	1,09	0,47	-	0,18	-	0,01	-	0,06	0,38
Ucs5S1	-	-	-	0,03	0,04	-	-	5,55	0,40	0,10	0,03	0,03	-	-	0,10	0,08
Ucs6S1	0,47	-	-	0,05	0,03	-	-	6,70	0,72	0,29	0,04	0,02	-	0,00	0,08	0,05
TUd3S1	-	0,09	-	-	-	-	-	1,37	0,30	-	-	-	-	0,04	0,04	-
TUd5S1	-	0,24	-	0,09	-	0,01	-	5,42	1,03	-	-	-	-	-	-	-
TUd5S1	-	0,24	-	0,08	-	0,02	-	6,98	1,00	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 22. Áreas relativas promedio de compuestos volátiles para todas las subvariedades a lo largo de la fermentación para todos los tipos de secado (Objetivo 2) (código de compuesto disponible en anexo I).

Compuesto identificado	Al01	Es01	Es02	Es03	Al02	Es04	Al03	Al04	Ad01	Al05	Ce01	Pz01	Al06	Ac01	Al07	Ce02
ClD3S1	-	-	1,83	0,13	0,77	0,83	-	0,11	0,16	23,03	0,17	-	0,06	0,05	-	-
ClD3S2	-	-	1,47	0,11	0,41	0,74	-	0,14	0,18	27,22	1,23	-	0,13	0,05	-	-
ClD3S3	-	-	1,63	0,09	0,74	0,73	-	0,04	2,77	27,02	0,78	0,04	0,16	0,04	-	-
ClD6S1	-	-	3,33	-	0,02	0,10	-	-	0,12	34,48	-	-	0,20	0,01	0,62	0,15
ClD6S2	1,16	-	1,59	-	0,04	0,12	-	-	3,07	31,80	-	-	0,22	0,03	0,30	0,58
ClD6S3	1,10	-	1,57	-	0,25	0,25	-	-	0,10	33,00	-	-	0,22	0,01	0,40	0,14
UmmD3S1	-	-	-	0,03	0,62	0,87	-	-	0,38	25,62	3,55	-	0,14	0,06	-	-
UmmD3S2	-	-	-	0,13	1,71	1,30	-	-	0,20	23,68	2,77	-	-	0,05	-	-
UmmD3S3	-	-	-	0,07	0,76	0,77	0,08	-	0,22	23,55	2,50	-	0,06	0,05	-	-
UmmD6S2	-	1,41	-	0,05	0,03	0,37	-	-	-	29,87	0,39	-	0,29	0,03	-	-
UmmD6S2	-	1,54	0,02	0,06	0,06	0,46	-	-	-	26,23	0,71	0,02	0,12	0,02	-	-
UmmD6S3	-	1,50	0,50	0,05	0,05	0,35	-	0,01	0,01	30,76	0,39	0,03	0,43	-	-	-
Uead3S1	-	-	-	0,08	0,68	0,61	-	-	0,02	30,68	0,16	0,03	2,53	-	-	-
Uead3S2	-	-	-	0,08	0,96	0,75	-	-	0,08	29,81	-	0,04	3,42	-	-	-
Uead3S3	-	-	-	0,06	0,93	0,54	-	0,01	0,08	34,82	0,02	0,03	3,45	-	-	-
Uead6S1	-	-	-	0,05	0,06	0,46	-	-	0,01	35,01	0,16	0,01	0,39	-	-	-
Uead6S2	-	-	-	0,06	0,10	0,42	-	-	0,01	35,83	0,19	0,02	0,52	-	-	-
Uead6S3	-	-	-	0,05	0,08	0,39	-	-	0,01	36,24	0,03	0,01	0,25	-	-	-
Ucsd3S1	-	-	-	0,23	0,89	1,31	0,01	-	-	13,83	0,02	0,09	3,11	0,03	-	-
Ucsd3S2	-	-	-	0,24	0,97	1,38	0,02	-	0,06	14,97	0,01	0,10	4,18	0,03	-	-
Ucsd3S3	-	-	-	0,18	0,63	1,14	0,14	0,00	-	19,16	0,04	0,10	3,65	0,02	-	-
Ucsd6S1	-	-	3,96	0,09	0,03	0,73	-	-	-	19,20	0,01	0,04	0,02	-	0,69	0,43
Ucsd6S2	-	-	3,20	0,10	0,07	0,93	0,00	-	-	19,80	0,03	0,05	0,06	-	1,31	0,09
Ucsd6S3	-	-	3,48	0,10	0,02	0,63	-	-	0,10	20,58	0,08	0,03	0,02	-	1,35	0,08
TUd3S1	-	-	-	-	0,12	1,01	-	-	-	14,29	-	0,05	4,96	0,05	0,73	-
Tud3S2	-	0,04	-	-	0,12	1,49	-	-	0,02	10,45	-	0,06	0,95	0,03	-	-
TUd3S3	-	-	-	0,10	0,33	1,10	0,00	-	-	12,64	-	0,08	0,83	0,02	-	-
TUd6S1	-	-	-	0,28	0,04	1,63	0,00	-	0,03	9,05	-	0,07	0,09	-	-	-
TUd6S2	-	0,03	-	0,45	0,06	2,29	-	-	-	10,71	-	0,06	0,10	-	-	-
TUd6S3	-	-	-	0,32	0,25	1,39	0,00	-	-	13,25	-	0,08	0,20	-	-	-

Compuesto identificado	Al08	Ce03	Ce04	Al09	Ce05	Ce06	Es05	Al10	Al11	Am01	Al12	Ac02	Ad02	Ad03	Al13	Pz02
ClD3S1	0,31	0,13	-	-	0,29	-	1,11	0,08	0,24	-	-	0,01	0,11	-	-	-
ClD3S2	0,26	0,16	-	-	0,10	-	1,26	0,09	0,27	-	-	-	0,09	0,10	-	-
ClD3S3	0,25	0,09	-	-	0,09	-	0,84	0,07	0,29	-	-	0,01	0,09	-	-	-
ClD6S1	0,08	0,01	-	-	-	-	0,65	0,38	0,28	-	-	-	0,03	-	-	-
ClD6S2	0,02	0,01	-	-	0,04	-	0,67	0,28	0,20	-	-	-	0,03	-	-	-
ClD6S3	0,02	0,01	-	-	-	-	0,69	0,18	0,26	-	-	-	0,03	-	-	-
UmmD3S1	9,87	5,65	-	0,02	2,51	0,09	2,63	0,02	-	0,02	-	-	0,12	0,10	0,20	0,01
UmmD3S2	11,32	6,26	-	0,02	2,64	0,11	2,91	0,02	-	-	-	-	0,11	-	-	-
UmmD3S3	10,90	5,59	-	-	2,35	0,09	2,67	0,12	-	-	-	0,06	0,14	-	-	-
UmmD6S2	1,86	1,08	-	-	0,75	0,02	1,37	0,06	-	0,02	-	-	0,02	0,01	-	-
UmmD6S2	2,35	1,34	-	-	0,86	0,02	1,61	0,04	0,18	0,01	0,03	-	0,02	-	-	-
UmmD6S3	1,84	1,04	-	-	0,71	0,02	1,26	0,06	-	0,02	0,02	-	0,02	-	-	0,43
Uead3S1	0,86	0,30	-	0,01	0,29	-	1,20	0,01	0,31	-	0,09	-	0,03	0,13	-	-
Uead3S2	1,05	0,42	-	-	0,21	-	1,71	0,01	0,31	-	-	0,09	0,02	0,14	0,08	-
Uead3S3	0,81	0,30	-	0,00	0,20	-	1,34	0,01	0,20	-	0,07	0,18	0,03	0,13	0,20	-
Uead6S1	0,09	0,07	0,03	-	0,03	-	1,47	0,06	0,33	-	0,06	0,07	0,01	0,04	-	-
Uead6S2	0,11	0,09	0,02	-	0,04	-	1,49	0,03	0,26	-	0,04	0,08	-	0,04	-	-
Uead6S3	0,28	0,03	0,07	-	0,01	-	1,39	0,06	0,34	-	-	0,08	-	0,03	-	-
Ucsd3S1	0,94	0,68	-	-	0,75	-	1,84	0,04	-	-	0,02	-	-	0,05	-	0,29
Ucsd3S2	0,99	0,78	-	-	0,72	-	1,91	0,15	-	-	-	-	-	0,06	-	1,72
Ucsd3S3	0,90	0,71	-	-	0,73	-	1,57	0,13	-	-	0,06	-	-	0,12	-	0,93
Ucsd6S1	0,12	0,15	-	-	0,20	-	1,20	0,21	0,02	0,02	0,01	0,06	-	0,03	-	0,04
Ucsd6S2	0,24	0,20	-	-	0,40	-	1,25	0,16	-	0,02	0,02	0,05	-	0,05	-	0,05
Ucsd6S3	0,19	0,16	0,04	-	0,34	-	1,15	0,06	-	0,03	0,03	-	-	0,06	-	0,04
TUd3S1	1,47	0,67	-	-	-	0,08	0,49	0,06	0,13	-	0,38	-	-	0,08	0,19	-
Tud3S2	1,19	0,67	0,03	-	-	0,06	1,26	-	0,13	-	0,31	-	-	0,07	0,16	-
TUd3S3	0,84	0,31	0,11	0,15	0,17	0,05	0,61	-	0,04	-	0,17	0,01	-	0,05	-	-
TUd6S1	0,38	0,06	0,31	0,00	-	0,03	0,99	0,13	-	-	0,67	-	-	0,03	-	-
TUd6S2	0,17	0,11	0,03	-	-	0,03	1,27	0,01	-	-	-	-	-	0,04	-	-
TUd6S3	1,55	0,28	0,01	-	0,37	0,03	0,96	0,01	-	-	-	-	-	0,04	0,11	-

Cuadro 22. Continuación

Compuesto identificado	Al14	Am02	Es06	Ac03	Al15	Am03	Et01	Ac04	Ac05	Ce07	Ce08	Et02	Tp01	Ad04	Hc01	Hc02
ClD3S1	0,85	-	-	0,03	0,41	0,01	-	30,93	2,13	4,10	0,61	0,45	-	0,04	0,02	0,44
ClD3S2	1,06	-	-	-	-	-	-	18,93	2,29	2,48	0,53	0,37	0,00	0,32	0,01	0,44
ClD3S3	1,35	-	-	-	-	-	-	20,11	3,33	2,21	0,78	0,23	-	0,12	0,01	0,12
ClD6S1	0,01	-	-	0,06	0,14	-	-	31,67	0,47	10,71	0,24	-	-	-	0,01	0,26
ClD6S2	0,15	-	-	0,18	0,11	-	-	29,75	0,88	10,26	0,26	-	-	-	0,01	-
ClD6S3	0,14	-	-	0,13	0,09	0,03	-	30,52	0,86	10,79	0,24	0,05	-	-	-	-
UmmD3S1	-	0,09	0,06	0,01	-	0,06	-	25,81	-	4,06	0,86	0,59	-	0,05	-	-
UmmD3S2	-	0,07	0,09	-	-	0,16	-	24,29	-	3,78	0,42	0,62	0,05	0,07	-	0,40
UmmD3S3	-	0,08	0,06	-	-	0,03	-	27,53	-	4,50	0,39	0,62	0,05	0,03	-	0,27
UmmD6S2	-	0,01	0,02	-	-	0,04	0,21	40,67	0,42	14,52	0,24	0,03	0,01	-	-	0,22
UmmD6S2	-	0,01	0,03	0,04	0,02	-	0,13	42,53	-	14,86	0,35	0,15	0,01	-	0,00	0,15
UmmD6S3	-	-	-	0,03	0,02	-	0,14	41,39	-	13,08	0,22	-	-	-	0,01	0,22
Uead3S1	-	-	0,10	-	-	-	-	36,82	-	7,91	-	0,33	-	0,09	0,05	0,71
Uead3S2	-	-	0,01	-	0,00	0,00	-	35,56	-	7,20	-	0,95	0,04	0,18	0,03	0,24
Uead3S3	-	-	0,07	-	-	0,00	-	31,39	-	6,06	-	0,82	0,03	0,14	0,03	0,33
Uead6S1	-	0,05	-	-	-	0,08	-	17,94	0,06	15,07	-	15,21	-	0,05	-	-
Uead6S2	-	0,03	0,02	-	-	0,07	-	18,47	0,10	14,59	-	14,78	-	0,07	-	-
Uead6S3	-	-	0,08	-	-	0,08	0,09	19,60	0,06	16,15	-	14,25	-	0,06	0,00	0,18
UcsD3S1	0,00	1,82	0,04	-	-	-	-	30,31	0,06	6,43	2,51	0,60	-	0,04	0,03	-
UcsD3S2	-	-	-	-	-	-	-	31,37	1,63	4,47	2,48	0,64	0,00	0,13	0,02	-
UcsD3S3	0,01	0,44	-	-	-	-	-	28,84	1,48	4,19	2,40	0,22	0,00	0,10	0,01	-
UcsD6S1	-	0,16	-	-	-	-	-	41,53	4,22	10,55	1,33	0,19	-	1,55	0,02	-
UcsD6S2	-	0,21	-	-	-	-	-	40,18	2,98	10,38	1,43	1,98	-	1,33	-	-
UcsD6S3	-	0,19	-	-	-	-	0,03	40,64	3,86	10,02	1,22	0,16	-	1,79	-	-
TuD3S1	0,30	-	-	0,09	-	-	-	36,10	0,04	12,13	0,93	0,20	-	0,01	-	-
TuD3S2	0,24	-	-	-	-	0,12	-	37,49	0,23	15,22	1,57	0,17	-	0,16	0,03	-
TuD3S3	-	-	-	-	-	0,02	0,02	39,39	1,26	11,14	1,40	0,14	-	0,34	0,02	-
TuD6S1	0,29	-	-	0,07	-	0,03	-	57,91	0,24	12,30	0,78	-	-	0,09	0,03	-
TuD6S2	-	-	-	0,07	-	0,06	-	53,22	0,29	12,78	0,89	-	-	0,43	0,07	-
TuD6S3	-	0,40	-	-	0,06	0,09	-	52,58	0,09	8,76	1,16	0,19	0,04	0,21	0,03	-

Compuesto identificado	Ad05	Al16	Ac06	Es07	Ac07	Ac08	Ce09	Tp02	Hc03	Hc04	Al17	Es08	Ad06	Hc05	Ac09	Ac10
ClD3S1	0,65	0,10	0,01	0,02	0,15	0,49	0,06	0,52	-	0,13	3,82	11,42	0,04	0,21	0,04	0,01
ClD3S2	0,60	0,34	-	0,02	0,22	0,44	0,02	0,54	-	0,13	3,13	17,89	-	0,26	0,04	0,02
ClD3S3	0,76	0,48	-	0,01	0,16	0,48	0,01	0,46	0,02	0,10	3,03	14,90	0,10	0,14	0,03	0,01
ClD6S1	0,09	0,05	0,06	-	0,32	0,63	-	0,08	0,00	0,03	0,02	1,41	-	0,14	-	-
ClD6S2	0,10	0,03	0,06	-	0,38	0,70	-	0,10	-	0,03	0,09	2,14	-	0,02	-	-
ClD6S3	0,08	0,03	0,07	-	0,28	0,65	-	0,05	-	-	0,04	1,23	-	0,02	0,02	-
UmmD3S1	0,22	0,15	0,08	-	-	0,27	0,10	1,80	0,32	-	3,90	-	1,09	-	-	-
UmmD3S2	0,24	0,15	0,06	0,01	0,42	0,69	0,01	1,21	-	-	3,20	-	1,28	-	-	-
UmmD3S3	0,19	0,16	0,09	-	0,47	0,71	0,02	1,14	-	-	3,35	-	0,88	-	-	-
UmmD6S2	0,06	0,03	0,08	-	-	0,20	-	0,24	-	-	0,21	0,27	-	-	-	-
UmmD6S2	0,08	0,05	0,06	-	-	0,12	-	0,15	-	-	0,29	-	-	-	-	0,03
UmmD6S3	0,05	0,05	0,06	-	-	0,23	0,01	0,01	-	-	0,27	-	-	-	-	0,03
Uead3S1	0,66	0,03	-	0,04	0,02	0,41	-	-	0,00	-	3,16	7,50	0,10	-	-	-
Uead3S2	0,76	0,09	-	0,05	0,06	0,52	-	-	-	-	3,04	8,13	-	-	-	-
Uead3S3	0,65	0,07	-	0,04	-	0,34	-	-	-	-	3,81	9,00	-	-	0,01	-
Uead6S1	0,16	-	-	-	0,18	0,84	-	-	0,02	-	0,02	2,07	-	-	-	-
Uead6S2	0,19	0,03	-	-	0,20	0,96	-	-	0,05	-	0,06	1,64	-	-	-	-
Uead6S3	0,16	0,02	-	-	0,19	0,84	-	-	0,02	-	0,03	-	-	-	-	-
UcsD3S1	1,18	0,52	0,05	0,05	0,38	1,02	0,05	0,10	0,18	0,04	5,37	14,93	0,26	0,34	0,01	-
UcsD3S2	1,27	0,53	0,05	0,05	0,36	0,92	0,05	0,06	-	0,02	4,85	13,17	0,05	0,38	-	-
UcsD3S3	1,05	0,49	0,05	0,05	0,47	1,10	0,05	-	0,03	-	5,48	14,48	0,02	0,35	-	-
UcsD6S1	0,31	0,16	0,06	-	0,13	1,24	0,01	-	-	-	0,06	0,29	-	0,03	-	-
UcsD6S2	0,37	0,18	0,09	0,00	0,12	1,44	0,01	-	0,04	-	0,06	0,62	-	0,04	-	-
UcsD6S3	0,25	0,16	0,11	-	0,10	1,10	-	-	0,03	-	0,05	0,96	-	0,03	-	-
TuD3S1	0,62	0,28	0,05	0,04	-	0,30	-	0,13	-	-	14,24	-	-	-	-	-
TuD3S2	0,73	0,28	0,11	0,03	-	0,89	-	0,11	0,03	-	7,30	2,29	-	-	0,00	-
TuD3S3	0,47	0,28	0,09	0,05	0,18	0,81	0,03	-	0,08	-	9,96	3,48	-	-	-	-
TuD6S1	0,49	0,15	0,13	0,04	0,21	0,93	0,02	0,02	0,04	-	1,01	0,23	-	-	0,00	-
TuD6S2	0,68	0,17	0,11	0,05	0,22	1,52	0,01	-	0,04	-	0,54	0,19	-	-	0,02	-
TuD6S3	0,63	0,24	0,07	0,06	0,18	0,65	0,03	0,10	0,13	-	2,93	5,23	-	-	-	-

Cuadro 22. Continuación

Compuesto identificado	Es09	Es10	Al18	Tp03	Ac11	Am04	Ad07	Hc06	Hc07	Ac12	Ac13	Ac14	Al19	Al20	Al21	Ad08
ClD3S1	0,04	0,01	-	1,28	-	0,20	0,04	0,07	0,30	0,04	3,38	-	0,41	0,02	4,63	0,05
ClD3S2	0,03	-	-	1,29	-	0,16	0,04	0,03	0,30	0,06	5,11	-	0,40	-	3,94	2,75
ClD3S3	0,03	-	-	1,03	0,01	0,17	0,02	-	0,26	0,07	4,39	-	0,25	-	4,56	2,67
ClD6S1	-	-	-	0,38	0,26	0,30	0,02	-	0,06	-	0,84	-	0,11	-	1,14	-
ClD6S2	-	-	-	0,54	0,36	0,35	0,00	-	0,05	-	0,88	-	0,31	-	1,35	0,11
ClD6S3	-	-	-	0,33	0,18	0,39	-	-	0,08	-	0,69	-	0,36	-	1,14	-
UmmD3S1	-	-	-	1,99	-	0,07	0,13	-	-	-	-	-	-	-	0,97	0,01
UmmD3S2	0,07	-	-	2,49	-	0,08	0,07	-	-	-	-	-	-	-	1,44	0,01
UmmD3S3	-	-	-	2,48	-	0,16	0,05	-	-	-	-	-	-	-	0,78	0,03
UmmD6S2	-	-	0,03	0,67	-	0,14	0,01	-	-	-	-	-	-	-	0,37	0,07
UmmD6S2	-	-	0,35	0,71	0,20	0,15	0,03	-	-	-	-	-	-	0,02	0,42	0,12
UmmD6S3	-	-	0,30	-	0,26	0,12	0,04	-	-	-	-	-	-	0,02	0,37	0,12
Uead3S1	0,07	-	-	0,03	0,60	0,07	0,11	-	-	-	-	-	0,32	-	0,60	1,03
Uead3S2	0,05	0,00	-	-	0,58	0,04	0,10	-	-	-	-	-	0,53	-	1,68	0,06
Uead3S3	0,05	-	-	-	0,54	0,04	0,11	-	-	-	-	-	0,60	-	1,45	0,05
Uead6S1	-	-	0,03	-	0,26	0,28	-	0,03	-	-	-	-	0,60	0,05	0,51	-
Uead6S2	-	-	-	-	0,28	0,31	-	0,01	-	0,01	-	-	0,57	0,06	0,52	-
Uead6S3	-	-	-	-	0,25	0,26	-	0,01	-	-	-	-	0,33	0,05	0,70	-
Ucsd3S1	0,01	0,02	-	-	0,90	-	0,04	-	0,35	-	-	-	-	-	5,35	0,11
Ucsd3S2	0,05	0,03	-	-	0,94	-	0,05	-	0,48	-	-	-	-	0,02	4,97	0,05
Ucsd3S3	-	0,02	0,02	0,00	0,92	-	0,06	-	0,41	-	-	-	-	0,01	4,38	0,03
Ucsd6S1	-	-	-	-	0,30	0,34	-	-	0,09	-	-	-	-	-	1,57	0,13
Ucsd6S2	-	-	-	-	0,27	0,29	0,01	0,02	0,04	-	-	-	-	-	1,83	0,15
Ucsd6S3	-	-	-	-	0,25	0,32	0,01	0,01	0,02	-	-	-	-	-	1,61	0,12
TUd3S1	0,08	-	0,27	-	0,20	-	0,03	0,05	-	-	-	2,10	-	-	5,21	-
TUd3S2	0,64	-	4,35	-	0,25	0,10	0,05	-	-	-	-	-	-	-	3,96	-
TUd3S3	0,08	-	2,76	-	0,27	-	0,02	-	-	0,03	-	-	0,39	-	4,15	-
TUd6S1	0,15	-	0,41	0,10	0,16	0,10	0,01	-	-	-	-	1,30	-	-	2,22	-
TUd6S2	0,31	-	0,54	0,12	0,18	0,05	0,10	-	-	-	-	-	0,34	-	2,82	0,01
TUd6S3	0,11	-	0,44	-	0,37	0,01	0,08	-	-	0,01	-	-	0,30	-	2,72	0,01

Compuesto identificado	Ac15	Ac16	Al22	Pz03	Pz04	Pz05	Pz06	Pz07	Pz08	Es11	Tp04	Tp05	Es12	Hc08	Ad09	Hc09
ClD3S1	-	-	0,16	-	0,03	-	-	1,32	0,51	-	-	-	0,02	-	0,02	0,37
ClD3S2	-	0,01	-	-	-	-	-	0,99	0,29	-	0,13	-	0,02	-	0,01	0,34
ClD3S3	-	-	-	-	0,01	-	-	0,98	0,35	-	0,15	-	0,01	-	0,02	0,29
ClD6S1	1,93	-	-	-	-	0,00	-	7,51	0,45	0,09	-	-	-	-	-	0,05
ClD6S2	2,06	-	0,03	0,01	-	-	-	7,95	0,52	-	-	-	-	0,04	-	-
ClD6S3	1,98	-	0,11	-	-	-	-	10,60	0,51	0,03	-	-	-	0,02	-	-
UmmD3S1	-	-	2,89	-	-	0,30	-	0,51	1,07	-	-	0,03	-	-	0,01	-
UmmD3S2	-	-	3,56	-	0,22	-	-	0,62	0,98	-	-	0,03	-	-	-	-
UmmD3S3	-	-	3,43	-	0,22	-	-	0,95	1,30	-	-	0,03	-	-	-	-
UmmD6S2	0,04	-	0,18	-	0,01	-	-	2,51	0,83	0,02	-	-	0,01	-	-	-
UmmD6S2	-	-	-	-	-	-	-	2,41	0,74	0,07	-	0,00	-	-	-	-
UmmD6S3	-	-	0,04	-	-	-	-	2,60	0,82	0,02	-	-	-	-	-	-
Uead3S1	-	-	-	-	-	-	-	0,57	0,57	-	0,03	-	0,03	0,03	0,01	-
Uead3S2	-	-	-	-	-	-	-	0,40	0,39	-	0,02	-	0,03	0,04	0,04	-
Uead3S3	-	-	-	-	0,01	-	-	0,40	0,38	-	0,02	-	0,05	0,04	0,05	-
Uead6S1	-	-	0,15	0,07	-	-	-	6,85	0,97	-	0,01	-	0,02	-	0,01	-
Uead6S2	-	-	0,19	0,08	-	-	-	6,33	1,02	-	0,01	-	-	-	-	-
Uead6S3	-	-	0,21	0,06	-	-	-	6,01	0,93	-	0,01	-	0,01	0,01	-	-
Ucsd3S1	-	0,47	-	-	0,07	-	0,01	1,09	0,47	-	0,18	-	0,01	-	0,06	0,38
Ucsd3S2	-	0,50	-	-	0,24	-	0,01	0,78	0,38	-	0,07	0,01	0,01	-	0,26	0,37
Ucsd3S3	-	0,50	-	-	0,09	-	-	0,98	0,44	-	0,06	-	0,02	-	0,22	0,31
Ucsd6S1	0,47	-	-	0,05	0,03	-	-	6,70	0,72	0,29	0,04	0,02	-	0,00	0,08	0,05
Ucsd6S2	0,51	-	-	0,03	0,04	-	-	6,15	0,67	0,36	-	0,04	-	-	-	0,04
Ucsd6S3	0,64	-	-	0,04	0,03	-	-	6,49	0,69	0,38	-	0,03	-	-	-	0,06
TUd3S1	-	0,09	-	-	-	-	-	1,37	0,30	-	-	-	-	0,04	0,04	-
TUd3S2	-	0,30	-	0,07	-	-	-	4,90	1,25	-	-	-	-	0,03	0,06	-
TUd3S3	-	0,17	0,00	0,05	-	0,01	0,01	4,53	0,75	-	-	-	-	0,02	-	-
TUd6S1	-	0,23	-	0,09	-	0,01	-	5,42	1,01	-	-	-	-	-	-	-
TUd6S2	-	0,14	-	0,20	-	0,02	-	7,30	1,12	-	-	-	-	-	-	-
TUd6S3	-	0,20	-	0,11	-	-	-	2,22	0,69	-	-	-	-	-	-	-

Anexo H

Evidencia de los análisis estadísticos realizados a los datos de compuestos volátiles (intervalo de confianza del 95 %)

Cuadro 23. Datos del análisis de comparación de medias de Bonferroni para las áreas relativas de todos los compuestos identificados- Efecto tiempo de fermentación (Objetivo 1) (código de compuesto disponible en anexo I).

Descripción estadístico	Es01	Es02	Es03	AI02	Es04	AI03	AI04	Ad01	AI05	Ce01	Pz01	AI06	Ac01	AI07	Ce02	AI08
R ²	0,642	0,848	0,793	0,700	0,922	0,711	0,736	0,785	0,944	0,782	0,931	0,722	0,829	0,841	0,733	0,885
F	1,026	3,196	2,192	1,334	6,754	1,407	1,597	2,084	9,587	2,044	7,732	1,481	2,771	3,025	1,568	4,410
Pr > F	0,494	0,009	0,051	0,277	0,000	0,239	0,164	0,063	<0,0001	0,068	<0,0001	0,207	0,018	0,012	0,174	0,002
Subvariedad	1,168	7,288	2,287	0,632	12,761	1,734	2,041	2,779	37,420	3,911	35,349	0,894	4,458	2,306	1,395	13,507
	0,362	0,002	0,105	0,647	<0,0001	0,192	0,137	0,063	<0,0001	0,021	<0,0001	0,490	0,013	0,103	0,280	<0,0001
Día Fermentación	1,087	1,980	0,067	9,961	1,199	1,188	2,196	1,216	2,078	1,606	2,873	6,407	6,920	0,834	1,844	7,961
	0,361	0,170	0,935	0,002	0,327	0,330	0,144	0,322	0,158	0,231	0,086	0,009	0,007	0,452	0,190	0,004
Subvariedad*Día Fermentación	1,024	1,214	1,185	0,574	2,623	0,919	2,194	0,920	2,500	1,102	3,624	1,239	0,815	2,116	1,147	2,549
	0,458	0,352	0,366	0,784	0,048	0,526	0,086	0,525	0,057	0,411	0,014	0,339	0,600	0,096	0,386	0,053
Subvariedad*Repetición	0,912	3,871	4,092	1,151	12,830	1,911	1,048	2,688	9,591	2,529	4,023	0,963	3,510	3,996	1,531	3,230
	0,531	0,010	0,008	0,384	<0,0001	0,129	0,443	0,044	<0,0001	0,054	0,009	0,497	0,016	0,009	0,223	0,022

Descripción estadístico	Ce03	Ce04	AI09	Ce05	Ce06	Es05	AI10	AI11	Am01	AI12	Ac02	Ad02	Ad03	AI13	Pz02	AI14
R ²	0,878	0,814	0,671	0,898	0,920	0,787	0,711	0,844	0,853	0,637	0,702	0,863	0,720	0,818	0,588	0,724
F	4,113	2,504	1,167	5,048	6,568	2,113	1,407	3,102	3,309	1,005	1,348	3,606	1,471	2,564	0,816	1,500
Pr > F	0,002	0,029	0,382	0,001	0,000	0,060	0,239	0,010	0,007	0,512	0,269	0,005	0,211	0,026	0,691	0,199
Subvariedad	10,645	4,608	2,266	15,187	12,362	4,456	2,153	9,756	4,928	1,950	1,411	7,727	1,848	3,848	1,419	1,336
	0,000	0,011	0,107	<0,0001	<0,0001	0,013	0,121	0,000	0,009	0,151	0,275	0,001	0,169	0,022	0,273	0,299
Día Fermentación	6,210	1,292	0,553	9,068	3,675	0,950	1,825	0,504	1,051	0,721	0,150	6,824	3,393	4,607	0,654	0,573
	0,010	0,302	0,586	0,002	0,049	0,408	0,193	0,613	0,372	0,501	0,862	0,007	0,059	0,026	0,533	0,575
Subvariedad*Día Fermentación	2,241	1,050	0,867	1,282	1,660	0,854	0,639	0,448	1,068	0,787	1,013	1,478	0,761	3,939	0,597	1,037
	0,081	0,441	0,563	0,319	0,185	0,572	0,735	0,875	0,431	0,621	0,464	0,240	0,641	0,009	0,767	0,449
Subvariedad*Repetición	3,826	3,387	1,113	4,494	12,110	2,785	2,525	3,384	4,526	0,852	1,296	4,231	1,834	0,995	0,695	2,436
	0,011	0,018	0,405	0,005	<0,0001	0,039	0,055	0,018	0,005	0,573	0,312	0,007	0,144	0,476	0,691	0,062

Descripción estadístico	Am02	Es06	Ac03	AI15	Am03	Et01	Ac04	Ac05	Ce07	Ce08	Et02	Tp01	Ad04	Hc01	Hc02	Ad05
R ²	0,751	0,602	0,707	0,575	0,867	0,773	0,732	0,905	0,771	0,933	0,808	0,798	0,775	0,815	0,860	0,879
F	1,723	0,865	1,380	0,774	3,711	1,945	1,564	5,455	1,922	7,957	2,399	2,251	1,966	2,510	3,503	4,145
Pr > F	0,128	0,643	0,253	0,732	0,004	0,082	0,175	0,000	0,086	<0,0001	0,035	0,046	0,079	0,029	0,006	0,002
Subvariedad	3,510	1,372	2,292	1,925	6,000	4,811	4,744	13,847	2,999	36,115	3,710	4,076	2,264	3,852	4,134	7,071
	0,031	0,288	0,104	0,155	0,004	0,010	0,010	<0,0001	0,050	<0,0001	0,025	0,018	0,108	0,022	0,017	0,002
Día Fermentación	1,840	1,166	0,683	0,417	1,896	2,118	1,009	2,110	9,475	5,979	0,727	0,891	1,143	0,255	2,329	17,213
	0,191	0,337	0,519	0,666	0,182	0,153	0,387	0,154	0,002	0,012	0,499	0,430	0,344	0,778	0,129	0,000
Subvariedad*Día Fermentación	1,677	0,448	0,518	0,364	2,517	1,696	1,504	5,164	0,561	2,082	1,020	1,000	0,986	3,007	2,420	2,948
	0,180	0,875	0,826	0,925	0,055	0,175	0,232	0,003	0,794	0,101	0,460	0,473	0,482	0,029	0,063	0,031
Subvariedad*Repetición	1,228	0,485	2,250	0,579	5,196	1,289	0,431	5,580	1,387	5,033	3,957	3,295	2,805	2,051	6,527	2,956
	0,344	0,849	0,080	0,781	0,003	0,316	0,886	0,002	0,274	0,003	0,009	0,020	0,038	0,105	0,001	0,031

Nota: Los compuestos marcados en color verde son los que mostraron diferencia significativa (p≤0,05).

Cuadro 23. Continuación

Descripción estadístico	Al16	Ac06	Es07	Ac07	Ac08	Ce09	Tp02	Hc03	Hc04	Al17	Es08	Ad06	Hc05	Ac09	Ac10	Es09
R ²	0,935	0,827	0,665	0,728	0,873	0,659	0,832	0,674	0,818	0,778	0,910	0,668	0,804	0,559	0,633	0,906
F	8,160	2,724	1,135	1,531	3,915	1,106	2,831	1,183	2,563	2,006	5,772	1,149	2,350	0,724	0,986	5,489
Pr > F	<0,0001	0,020	0,405	0,187	0,003	0,428	0,016	0,370	0,026	0,073	0,000	0,395	0,038	0,780	0,529	0,000
Subvariedad	31,559	6,691	1,226	1,324	7,626	0,748	5,336	0,747	3,342	1,454	6,757	1,569	3,447	0,605	0,950	9,063
	<0,0001	0,002	0,339	0,303	0,001	0,574	0,006	0,574	0,036	0,262	0,002	0,231	0,033	0,665	0,461	0,001
Día Fermentación	20,011	1,863	1,000	1,278	5,637	3,359	4,672	1,821	2,271	9,932	30,248	3,838	3,979	0,603	1,042	0,088
	<0,0001	0,187	0,390	0,306	0,014	0,061	0,025	0,194	0,135	0,002	<0,0001	0,044	0,040	0,559	0,375	0,916
Subvariedad*Día Fermentación	5,138	0,659	0,894	1,683	1,711	0,844	1,515	0,981	0,961	0,587	6,902	1,253	1,798	0,783	0,982	1,493
	0,003	0,720	0,544	0,179	0,172	0,579	0,228	0,485	0,498	0,775	0,001	0,332	0,151	0,624	0,484	0,235
Subvariedad*Repetición	2,181	4,186	1,550	1,697	2,603	1,147	2,675	0,538	3,505	2,424	1,321	0,824	1,872	0,649	1,024	10,513
	0,088	0,007	0,217	0,175	0,049	0,386	0,045	0,811	0,016	0,063	0,301	0,593	0,136	0,727	0,458	<0,0001

Descripción estadístico	Es10	Al18	Tp03	Ac11	Am04	Ad07	Hc06	Hc07	Ac12	Ac13	Ac14	Al19	Al20	Al21	Ad08	Ac15
R ²	0,654	0,692	0,938	0,944	0,805	0,910	0,674	0,643	0,806	0,828	0,999	0,714	0,814	0,816	0,659	0,854
F	1,079	1,282	8,689	9,585	2,354	5,804	1,180	1,031	2,373	2,746	790,562	1,430	2,506	2,534	1,105	3,353
Pr > F	0,449	0,306	<0,0001	<0,0001	0,038	0,000	0,372	0,489	0,037	0,019	<0,0001	0,229	0,029	0,027	0,428	0,007
Subvariedad	1,110	3,221	29,323	31,710	1,667	3,066	0,927	1,438	3,577	4,133	1618,567	4,748	3,326	3,199	0,897	6,421
	0,386	0,041	<0,0001	<0,0001	0,207	0,047	0,473	0,267	0,029	0,017	<0,0001	0,010	0,037	0,041	0,488	0,003
Día Fermentación	0,960	0,330	11,374	11,984	4,035	31,997	0,499	1,419	3,926	0,869	3,971	0,061	0,279	3,672	1,297	3,702
	0,404	0,724	0,001	0,001	0,038	<0,0001	0,616	0,271	0,041	0,438	0,040	0,941	0,760	0,049	0,301	0,048
Subvariedad*Día Fermentación	1,009	0,143	3,570	8,086	0,596	3,385	0,994	0,476	3,698	1,000	3,971	0,490	1,309	0,885	1,081	2,382
	0,467	0,995	0,015	0,000	0,768	0,018	0,477	0,856	0,012	0,473	0,009	0,846	0,307	0,550	0,423	0,066
Subvariedad*Repetición	1,134	1,919	6,621	3,067	4,263	1,275	0,816	1,566	1,005	4,461	1504,273	1,522	4,252	5,176	1,071	3,520
	0,393	0,127	0,001	0,027	0,007	0,322	0,599	0,212	0,470	0,005	<0,0001	0,225	0,007	0,003	0,429	0,015

Descripción estadístico	Ac16	Al22	Pz03	Pz04	Pz05	Pz06	Pz07	Pz08	Es11	Tp04	Tp05	Es12	Hc08	Ad09	Hc09
R ²	0,951	0,655	0,814	0,819	0,747	0,633	0,772	0,783	0,775	0,774	0,746	0,663	0,745	0,864	0,869
F	10,991	1,087	2,508	2,590	1,691	0,986	1,936	2,064	1,972	1,956	1,679	1,124	1,669	3,635	3,805
Pr > F	<0,0001	0,442	0,029	0,025	0,136	0,529	0,084	0,066	0,078	0,081	0,139	0,414	0,142	0,005	0,004
Subvariedad	22,314	1,226	2,777	3,524	2,617	0,950	0,711	2,202	2,074	2,533	2,393	1,194	2,463	6,808	5,757
	<0,0001	0,339	0,063	0,030	0,074	0,461	0,597	0,115	0,132	0,081	0,094	0,351	0,087	0,002	0,005
Día Fermentación	6,049	0,947	5,073	0,777	2,126	1,042	9,688	1,171	1,649	1,403	0,283	1,794	2,873	0,210	7,172
	0,011	0,409	0,020	0,476	0,152	0,375	0,002	0,335	0,223	0,275	0,757	0,198	0,086	0,813	0,006
Subvariedad*Día Fermentación	17,204	1,019	0,824	0,921	2,434	0,982	0,405	0,751	0,999	0,923	1,000	0,946	1,500	0,516	2,371
	<0,0001	0,460	0,593	0,525	0,062	0,484	0,901	0,649	0,473	0,524	0,473	0,508	0,233	0,828	0,067
Subvariedad*Repetición	6,971	1,251	3,390	5,352	0,848	1,024	3,228	3,429	2,527	2,643	2,120	1,367	1,334	5,592	2,661
	0,001	0,333	0,018	0,002	0,576	0,458	0,022	0,017	0,054	0,047	0,096	0,282	0,296	0,002	0,046

Nota: Los compuestos marcados en color verde son los que mostraron diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Cuadro 24. Datos del análisis de comparación de medias de Bonferroni para las áreas relativas de todos los compuestos identificados- Efecto tipo de secado (Objetivo 2) (código de compuesto disponible en anexo I).

	AI01	Es01	Es02	Es03	AI02	Es04	AI03	AI04	Ad01	AI05	Ce01	Pz01	AI06	Ac01	AI07	Ce02
R ²	0,368	0,401	0,449	0,329	0,456	0,413	0,385	0,502	0,342	0,601	0,465	0,737	0,637	0,457	0,352	0,374
F	1,091	1,255	1,524	0,917	1,569	1,314	1,169	1,889	0,973	2,813	1,625	5,236	3,286	1,573	1,017	1,118
Pr > F	0,379	0,225	0,083	0,595	0,069	0,182	0,298	0,018	0,522	0,000	0,055	<0,0001	<0,0001	0,068	0,466	0,349
Subvariedad	2,087	3,819	4,867	1,821	1,210	5,360	1,455	4,818	2,302	17,665	5,942	29,124	5,618	4,664	2,026	1,506
Dia fermentacion	0,094	0,008	0,002	0,137	0,316	0,001	0,228	0,002	0,069	<0,0001	0,000	<0,0001	0,001	0,002	0,103	0,212
Tipo secado	2,116	3,268	4,528	0,029	29,383	1,979	2,675	5,319	0,016	2,904	5,726	9,121	30,218	16,356	3,841	4,078
Rep	0,151	0,076	0,038	0,865	<0,0001	0,165	0,107	0,025	0,900	0,094	0,020	0,004	<0,0001	0,000	0,055	0,048
Subvariedad*Dia fermentacion	0,517	0,005	0,240	0,111	0,200	0,800	1,847	0,353	0,456	0,372	0,073	1,175	0,061	0,713	0,010	0,325
Subvariedad*Tipo secado	0,599	0,995	0,788	0,895	0,819	0,454	0,167	0,704	0,636	0,691	0,930	0,316	0,941	0,495	0,990	0,723
Dia fermentacion*Tipo secado	1,881	3,360	4,046	2,690	0,859	3,047	0,873	1,619	0,708	3,630	3,148	1,480	5,331	2,447	2,385	2,968
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secad	0,162	0,042	0,023	0,076	0,429	0,055	0,423	0,207	0,497	0,033	0,050	0,236	0,007	0,095	0,101	0,059
Subvariedad*Tipo secado	2,181	3,391	3,217	3,432	1,416	1,790	1,440	5,115	0,022	0,743	2,840	5,609	7,013	1,054	2,799	1,687
Dia fermentacion*Tipo secado	0,082	0,015	0,019	0,014	0,240	0,143	0,232	0,001	0,999	0,567	0,032	0,001	0,000	0,388	0,034	0,165
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secad	0,550	0,004	0,120	0,043	0,477	0,229	0,791	0,554	0,498	0,082	0,173	0,536	0,618	0,235	0,224	0,662
Subvariedad*Tipo secado	0,814	1,000	0,998	1,000	0,867	0,984	0,612	0,811	0,853	1,000	0,994	0,825	0,759	0,983	0,985	0,723
Dia fermentacion*Tipo secado	0,570	0,004	0,086	0,057	0,191	0,000	1,782	0,505	1,373	0,010	0,008	0,379	0,081	0,117	0,197	0,308
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secad	0,569	0,996	0,917	0,945	0,827	1,000	0,177	0,606	0,262	0,990	0,992	0,686	0,922	0,890	0,822	0,736
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secad	0,537	0,002	0,085	0,165	0,305	0,080	0,833	0,516	1,474	0,250	0,207	0,490	0,652	0,137	0,177	0,666
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secad	0,824	1,000	0,999	0,995	0,961	1,000	0,577	0,840	0,187	0,979	0,988	0,858	0,730	0,997	0,993	0,719

	AI08	Ce03	Ce04	AI09	Ce05	Ce06	Es05	AI10	AI11	Am01	AI12	Ac02	Ad02	Ad03	AI13	Pz02
R ²	0,691	0,639	0,428	0,347	0,627	0,426	0,519	0,297	0,553	0,490	0,417	0,443	0,510	0,383	0,434	0,364
F	4,193	3,315	1,399	0,995	3,148	1,387	2,020	0,790	2,315	1,798	1,340	1,488	1,945	1,162	1,434	1,073
Pr > F	<0,0001	<0,0001	0,134	0,493	<0,0001	0,140	0,010	0,759	0,003	0,027	0,166	0,095	0,014	0,305	0,117	0,399
Subvariedad	18,858	14,806	2,563	0,977	14,828	6,495	7,051	2,722	11,929	4,477	4,047	3,523	8,052	2,128	2,779	2,319
Dia fermentacion	<0,0001	<0,0001	0,048	0,427	<0,0001	0,000	0,000	0,038	<0,0001	0,003	0,006	0,012	<0,0001	0,089	0,035	0,068
Tipo secado	17,094	13,666	1,706	1,464	11,205	3,565	6,101	3,007	0,037	6,479	0,058	0,110	11,548	8,551	3,735	1,724
Rep	0,000	0,000	0,197	0,231	0,001	0,064	0,016	0,088	0,848	0,014	0,811	0,741	0,001	0,005	0,058	0,194
Subvariedad*Dia fermentacion	0,044	0,091	0,668	0,803	0,003	0,023	1,470	0,446	0,108	0,243	1,385	0,113	0,042	0,070	0,331	0,397
Subvariedad*Tipo secado	0,957	0,913	0,517	0,453	0,997	0,977	0,238	0,643	0,898	0,785	0,258	0,893	0,959	0,933	0,720	0,674
Dia fermentacion*Tipo secado	3,046	3,865	2,528	1,105	6,053	3,245	7,211	0,285	9,122	6,067	1,308	9,184	2,374	1,592	1,499	2,491
Subvariedad*Dia fermentacion	0,055	0,027	0,089	0,338	0,004	0,046	0,002	0,753	0,000	0,004	0,278	0,000	0,102	0,212	0,232	0,092
Subvariedad*Tipo secado	7,409	5,378	0,502	0,886	3,270	1,658	2,236	1,053	0,549	3,917	0,029	0,535	2,572	0,784	1,410	2,184
Dia fermentacion*Tipo secado	<0,0001	0,001	0,735	0,478	0,017	0,172	0,076	0,388	0,700	0,007	0,998	0,711	0,047	0,540	0,242	0,082
Subvariedad*Dia fermentacion	0,068	0,021	0,754	1,000	0,153	0,010	0,096	0,267	0,131	0,213	1,211	0,749	0,103	0,839	0,568	0,443
Subvariedad*Tipo secado	1,000	1,000	0,644	0,446	0,996	1,000	0,999	0,974	0,998	0,987	0,309	0,648	0,999	0,572	0,800	0,890
Dia fermentacion*Tipo secado	0,106	0,050	1,262	0,848	0,209	0,024	0,296	0,837	0,119	0,192	0,867	0,717	0,053	0,247	0,302	0,414
Subvariedad*Dia fermentacion	0,899	0,951	0,291	0,433	0,812	0,977	0,745	0,438	0,888	0,826	0,426	0,493	0,948	0,782	0,740	0,663
Subvariedad*Tipo secado	0,110	0,025	1,808	1,053	0,030	0,020	0,081	0,139	0,258	0,122	1,048	0,472	0,061	0,662	1,895	0,423
Subvariedad*Dia fermentacion	0,999	1,000	0,094	0,408	1,000	1,000	1,000	0,997	0,977	0,998	0,412	0,871	1,000	0,722	0,078	0,902

Nota: Los compuestos marcados en color verde son los que mostraron diferencia significativa (p<0,05).

Cuadro 24. Continuación

	Al14	Am02	Es06	Ac03	Al15	Am03	Et01	Ac04	Ac05	Ce07	Ce08	Et02	Tp01	Ad04	Hc01	Hc02
R ²	0,490	0,510	0,370	0,351	0,346	0,392	0,545	0,541	0,436	0,669	0,737	0,363	0,417	0,339	0,482	0,373
F	1,796	1,949	1,098	1,011	0,991	1,209	2,242	2,207	1,448	3,783	5,244	1,066	1,336	0,961	1,737	1,115
Pr > F	0,027	0,014	0,371	0,473	0,498	0,262	0,004	0,005	0,111	<0,0001	<0,0001	0,407	0,169	0,538	0,035	0,353
Subvariedad	6,195	3,865	3,674	2,434	2,625	3,184	5,603	8,440	5,502	7,378	31,483	3,126	1,760	2,505	3,438	2,795
	0,000	0,008	0,010	0,057	0,044	0,020	0,001	<0,0001	0,001	<0,0001	<0,0001	0,021	0,149	0,052	0,014	0,034
Día fermentacion	5,504	1,109	2,661	3,301	0,001	0,439	9,300	5,943	0,081	54,078	12,525	2,627	2,514	1,921	1,875	4,282
	0,022	0,297	0,108	0,074	0,978	0,510	0,003	0,018	0,777	<0,0001	0,001	0,111	0,118	0,171	0,176	0,043
Tipo secado	0,003	1,443	0,327	0,204	0,886	0,617	0,808	0,230	0,255	0,723	0,101	0,011	2,084	0,079	0,696	0,419
	0,997	0,245	0,722	0,816	0,418	0,543	0,451	0,795	0,776	0,490	0,904	0,989	0,134	0,924	0,503	0,659
Rep	1,523	2,144	1,516	1,769	1,228	0,339	2,576	1,803	2,336	1,833	4,283	2,899	1,345	2,585	2,747	1,450
	0,227	0,126	0,228	0,180	0,300	0,714	0,085	0,174	0,106	0,169	0,018	0,063	0,269	0,084	0,072	0,243
Subvariedad*Día fermentacion	4,632	1,847	0,531	1,712	0,047	2,446	5,043	5,486	3,611	5,604	2,761	2,990	2,333	2,907	4,830	1,441
	0,003	0,132	0,713	0,160	0,996	0,056	0,001	0,001	0,011	0,001	0,036	0,026	0,066	0,029	0,002	0,232
Subvariedad*Tipo secado	0,352	1,532	0,584	0,393	1,090	0,681	0,577	0,125	0,073	0,468	0,348	0,007	0,650	0,046	1,154	0,570
	0,941	0,166	0,787	0,920	0,383	0,707	0,792	0,998	1,000	0,874	0,943	1,000	0,732	1,000	0,343	0,798
Día fermentacion*Tipo secado	0,076	1,918	0,892	0,895	0,906	1,654	0,494	0,031	0,373	0,029	0,000	0,004	1,120	0,019	0,238	0,303
	0,927	0,156	0,416	0,414	0,410	0,200	0,612	0,969	0,690	0,972	1,000	0,997	0,333	0,981	0,789	0,739
Subvariedad*Día fermentacion*Tipo secar	0,104	1,647	0,553	0,321	0,660	0,481	0,656	0,203	0,231	0,296	0,189	0,009	1,029	0,060	0,290	0,555
	0,999	0,131	0,812	0,955	0,724	0,865	0,728	0,989	0,984	0,965	0,992	1,000	0,425	1,000	0,967	0,810

	Ad05	Al16	Ac06	Es07	Ac07	Ac08	Ce09	Tp02	Hc03	Hc04	Al17	Es08	Ad06	Hc05	Ac09	Ac10
R ²	0,581	0,593	0,374	0,520	0,433	0,605	0,450	0,570	0,391	0,423	0,437	0,673	0,611	0,568	0,359	0,425
F	2,593	2,731	1,120	2,025	1,432	2,860	1,532	2,476	1,199	1,373	1,451	3,849	2,935	2,462	1,046	1,383
Pr > F	0,001	0,000	0,348	0,010	0,118	0,000	0,080	0,001	0,270	0,148	0,110	<0,0001	0,000	0,002	0,431	0,142
Subvariedad	5,766	8,858	5,851	5,103	1,852	7,919	1,755	8,068	0,899	4,310	2,343	6,943	9,413	7,155	2,571	2,566
	0,001	<0,0001	0,001	0,001	0,131	<0,0001	0,150	<0,0001	0,471	0,004	0,065	0,000	<0,0001	<0,0001	0,047	0,048
Día fermentacion	33,515	23,081	2,920	11,728	0,032	5,332	7,237	12,939	0,338	4,386	23,294	46,329	14,439	10,608	1,973	0,036
	<0,0001	<0,0001	0,093	0,001	0,859	0,025	0,009	0,001	0,563	0,041	<0,0001	<0,0001	0,000	0,002	0,166	0,851
Tipo secado	0,405	0,944	0,021	0,157	0,407	1,459	0,865	0,426	0,752	0,147	0,190	0,319	0,294	0,188	0,020	0,285
	0,669	0,395	0,979	0,855	0,667	0,241	0,426	0,655	0,476	0,864	0,827	0,728	0,746	0,829	0,980	0,753
Rep	0,270	1,768	0,493	5,766	5,806	15,207	6,471	5,062	5,114	5,139	2,960	2,576	1,447	7,755	3,860	5,261
	0,764	0,180	0,614	0,005	0,005	<0,0001	0,003	0,009	0,009	0,009	0,060	0,085	0,244	0,001	0,027	0,008
Subvariedad*Día fermentacion	5,089	3,224	0,807	4,154	4,733	2,053	1,930	4,445	0,845	2,315	1,193	8,513	7,832	4,706	1,955	3,783
	0,001	0,019	0,526	0,005	0,002	0,099	0,118	0,003	0,502	0,068	0,323	<0,0001	<0,0001	0,002	0,114	0,008
Subvariedad*Tipo secado	0,161	0,367	0,152	0,190	0,281	0,574	0,687	0,200	0,999	0,120	0,102	0,388	0,218	0,151	0,257	0,361
	0,995	0,934	0,996	0,991	0,970	0,795	0,701	0,990	0,446	0,998	0,999	0,923	0,986	0,996	0,977	0,937
Día fermentacion*Tipo secado	0,041	0,348	0,052	0,024	0,639	0,888	0,713	0,245	2,041	0,019	0,088	0,105	0,294	0,113	0,127	0,408
	0,960	0,708	0,950	0,977	0,531	0,417	0,495	0,784	0,139	0,981	0,916	0,900	0,746	0,894	0,881	0,667
Subvariedad*Día fermentacion*Tipo secar	0,090	0,523	0,350	0,076	0,256	0,466	0,488	0,090	0,758	0,011	0,033	0,256	0,218	0,119	0,285	0,330
	0,999	0,834	0,942	1,000	0,977	0,875	0,860	0,999	0,641	1,000	1,000	0,977	0,986	0,998	0,968	0,951

Nota: Los compuestos marcados en color verde son los que mostraron diferencia significativa (p≤0,05).

Cuadro 24 Continuación

	Es09	Es10	Al18	TP03	Ac11	Am04	Ad07	Hc06	Hc07	Ac12	Ac13	Ac14	Al19	Al20	Al21	Ad08
R ²	0,357	0,384	0,365	0,669	0,770	0,397	0,445	0,439	0,416	0,570	0,386	0,376	0,426	0,313	0,295	0,351
F	1,037	1,165	1,077	3,783	6,248	1,232	1,503	1,464	1,335	2,485	1,175	1,126	1,386	0,852	0,783	1,010
Pr > F	0,442	0,302	0,395	<0,0001	<0,0001	0,243	0,090	0,105	0,169	0,001	0,293	0,341	0,140	0,681	0,768	0,474
Subvariedad	2,956	2,782	2,841	17,121	22,106	2,391	1,382	0,704	4,262	6,207	4,218	2,098	6,152	1,944	2,778	1,675
Dia fermentacion	0,027	0,035	0,032	<0,0001	<0,0001	0,061	0,251	0,593	0,004	0,000	0,005	0,093	0,000	0,115	0,035	0,168
Tipo secado	0,679	4,114	1,191	13,401	10,570	11,690	9,988	0,426	6,361	8,491	2,130	0,005	0,002	1,766	8,525	2,569
Rep	0,413	0,047	0,280	0,001	0,002	0,001	0,003	0,517	0,014	0,005	0,150	0,945	0,967	0,189	0,005	0,114
Subvariedad*Dia fermentacion	1,331	0,019	0,565	0,320	0,225	0,024	0,171	1,501	0,014	0,584	0,036	2,164	0,410	0,015	0,012	0,184
Subvariedad*Tipo secado	0,272	0,981	0,571	0,728	0,800	0,977	0,843	0,231	0,986	0,561	0,965	0,124	0,665	0,985	0,988	0,832
Dia fermentacion*Tipo secado	2,886	3,948	2,610	4,761	6,960	4,024	4,337	7,677	3,640	4,023	4,190	2,402	4,949	1,226	0,150	1,804
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,064	0,025	0,082	0,012	0,002	0,023	0,018	0,001	0,032	0,023	0,020	0,099	0,010	0,301	0,861	0,174
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,057	2,908	1,459	5,625	18,645	1,894	3,581	2,538	2,481	7,164	2,040	0,005	0,129	3,098	0,922	1,891
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,994	0,029	0,226	0,001	<0,0001	0,124	0,011	0,049	0,054	<0,0001	0,101	1,000	0,971	0,022	0,457	0,124
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	1,005	0,080	0,508	0,105	0,366	0,072	0,476	0,664	0,020	0,387	0,047	2,164	0,287	0,122	0,032	0,660
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,442	1,000	0,845	0,999	0,934	1,000	0,868	0,721	1,000	0,923	1,000	0,044	0,968	0,998	1,000	0,724
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,425	0,019	0,415	0,105	0,168	0,000	0,769	1,324	0,036	0,410	0,033	0,005	0,199	0,052	0,014	0,137
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,655	0,981	0,662	0,901	0,846	1,000	0,468	0,274	0,964	0,666	0,967	0,995	0,820	0,949	0,986	0,872
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,261	0,080	0,469	0,211	0,312	0,086	0,298	0,708	0,065	0,241	0,046	0,005	0,555	0,113	0,042	0,620
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,976	1,000	0,873	0,988	0,958	0,999	0,964	0,683	1,000	0,981	1,000	1,000	0,810	0,999	1,000	0,758

	Ac15	Ac16	Al22	Pz03	Pz04	Pz05	Pz06	Pz07	Pz08	Es11	Tp04	Tp05	Es12	Hc08	Ad09	Hc09
R ²	0,564	0,756	0,383	0,457	0,450	0,548	0,369	0,402	0,327	0,381	0,329	0,419	0,437	0,501	0,424	0,632
F	2,420	5,805	1,161	1,574	1,530	2,266	1,096	1,256	0,907	1,153	0,919	1,350	1,450	1,880	1,378	3,214
Pr > F	0,002	<0,0001	0,306	0,068	0,081	0,004	0,374	0,223	0,608	0,314	0,592	0,160	0,110	0,019	0,144	<0,0001
Subvariedad	6,602	20,154	3,702	4,751	4,029	2,565	1,351	0,920	2,269	2,910	1,351	3,177	4,908	2,946	2,892	8,352
Dia fermentacion	0,000	<0,0001	0,009	0,002	0,006	0,048	0,262	0,458	0,073	0,029	0,262	0,020	0,002	0,028	0,030	<0,0001
Tipo secado	12,021	18,033	2,679	8,232	6,271	1,917	3,212	21,431	2,068	4,505	4,484	0,217	10,007	3,242	4,797	17,217
Rep	0,001	<0,0001	0,107	0,006	0,015	0,171	0,078	<0,0001	0,156	0,038	0,039	0,643	0,002	0,077	0,033	0,000
Subvariedad*Dia fermentacion	0,002	0,147	0,002	0,540	0,932	2,334	0,018	0,042	0,097	0,001	0,029	0,139	0,248	0,328	0,147	0,186
Subvariedad*Tipo secado	0,998	0,864	0,998	0,586	0,400	0,106	0,983	0,959	0,908	0,999	0,971	0,870	0,781	0,722	0,864	0,831
Dia fermentacion*Tipo secado	3,936	0,784	2,634	4,559	1,582	0,744	2,886	0,977	3,508	3,243	2,353	6,114	0,509	6,290	5,593	11,545
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,025	0,461	0,080	0,014	0,214	0,480	0,064	0,382	0,036	0,046	0,104	0,004	0,603	0,003	0,006	<0,0001
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	7,128	18,279	3,223	1,551	1,758	2,433	1,449	2,035	1,115	3,058	1,237	3,690	2,419	5,851	1,567	6,157
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	<0,0001	<0,0001	0,019	0,200	0,150	0,058	0,230	0,101	0,358	0,024	0,305	0,010	0,059	0,001	0,195	0,000
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,012	0,080	0,010	0,492	0,705	2,312	0,857	0,215	0,402	0,055	0,703	0,149	0,322	0,399	0,143	0,063
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	1,000	1,000	1,000	0,857	0,686	0,032	0,557	0,987	0,915	1,000	0,687	0,996	0,954	0,917	0,997	1,000
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,015	0,699	0,004	0,163	0,899	2,163	0,018	0,042	0,049	0,006	0,021	0,092	0,190	0,237	0,826	0,082
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,985	0,501	0,996	0,850	0,412	0,124	0,983	0,959	0,952	0,994	0,979	0,912	0,827	0,789	0,443	0,922
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	0,009	0,536	0,030	0,113	0,694	2,420	0,857	0,231	0,249	0,054	0,404	0,037	0,146	0,368	0,728	0,031
Subvariedad*Dia fermentacion*Tipo secado	1,000	0,825	1,000	0,999	0,695	0,025	0,557	0,983	0,979	1,000	0,914	1,000	0,997	0,933	0,666	1,000

Nota: Los compuestos marcados en color verde son los que mostraron diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Anexo I

Compuestos volátiles identificados con su respectivo acrónimo utilizado para la identificación en el análisis de componentes principales.

El acrónimo se estableció con base en la familia química a la que pertenece el compuesto.

Cuadro 25 Clasificación de los compuestos volátiles identificados, su respectivo acrónimo y CAS.

N°	Compuesto	Familia química	CAS	Acrónimo
1	1,3-propanodiol	Alcohol	504-63-2	Al01
2	1,3-propanediol, acetato	Éster	36678-05-4	Es01
3	1,3-propanediol, diacetato	Éster	628-66-0	Es02
4	1-butanol, 2-metil-, acetato	Éster	624-41-9	Es03
5	1-butanol, 3-metil-	Alcohol	123-51-3	Al02
6	1-butanol, 3-metil-, acetato	Éster	123-92-2	Es04
7	1-pentanol	Alcohol	71-41-0	Al03
8	1-tetradecanol	Alcohol	112-72-1	Al04
9	2,3,6-triclorobenzaldehído	Aldehído	4659-47-6	Ad01
10	2,3-butanodiol	Alcohol	513-85-9	Al05
11	2,3-butanediona	Cetona	431-03-8	Ce01
12	2,3-dietilpirazina	Pirazinas	15707-24-1	Pz01
13	2,5,8,11,14-pentaoxahexadecan-16-ol	Alcohol	23778-52-1	Al06
14	Ácido 2,6-piridinedicarboxílico	Ácido carboxílico	499-83-2	Ac01
15	2-butanol	Alcohol	78-92-2	Al07
16	2-butanona	Cetona	78-93-3	Ce02
17	2-heptanol, 3-metil	Alcohol	31367-46-1	Al08
18	2-heptanona	Cetona	110-43-0	Ce03
19	2-hexanona, 4-metil	Cetona	105-42-0	Ce04
20	2-naftalenol	Alcohol	135-19-3	Al09
21	2-nonanona	Cetona	821-55-6	Ce05
22	2-octanona	Cetona	111-13-7	Ce06
23	Acetato de 2-pentanol	Éster	626-38-0	Es05
24	2-propanol, 1-(1-metiletoxi)	Alcohol	3944-36-3	Al10
25	2-propanol, 1-(2-butoxi)etoxi-	Alcohol	124-16-3	Al11
26	2-propenamida	Amina	79-06-1	Am01
27	3,6,9,12-tetraoxahexadecan-1-ol	Alcohol	1559-34-8	Al12
28	Ácido 3-butanoico	Ácido carboxílico	625-38-7	Ac02
29	3-ciclohexeno-1-acetaldehído,α,4-dimetil-	Aldehído	29548-14-9	Ad02
30	3-furaldehído	Aldehído	498-60-2	Ad03
31	3-heptanol, 3-metil	Alcohol	5582-82-1	Al13
32	3-metilpiridazina	Pirazinas	1632-76-4	Pz02
33	3-pentanol, 3-metil	Alcohol	77-74-7	Al14
34	4,5-dimetil-orto-fenilendiamina	Amina	3171-45-7	Am02
35	4-metil-2-pentil acetato	Éster	108-84-9	Es06
36	Ácido 4-metiloctanoico	Ácido carboxílico	54947-74-9	Ac03
37	4-penten-2-ol	Alcohol	625-31-0	Al15
38	Acetaldehído dimetilhidrazona	Amina	7422-90-4	Am03
39	Acetaldehído, acetal dipropílico	Éter	105-82-8	Et01
40	Ácido acético	Ácido carboxílico	64-19-7	Ac04

Cuadro 25 (continuación).

N°	Compuesto	Familia química	CAS	Acónimo
41	Ácido acético, dietil-	Ácido carboxílico	88-09-5	Ac05
42	Acetoína	Cetona	513-86-0	Ce07
43	Acetofenona	Cetona	98-86-2	Ce08
44	Eter alílico etílico	Éter	557-31-3	Et02
45	α -Terpineno	Terpeno	99-86-5	Tp01
46	Benzaldehído	Aldehído	100-52-7	Ad04
47	Benceno, 1-propenilo	Hidrocarburo	637-50-3	Hc01
48	Benceno, etoxi	Hidrocarburo	103-73-1	Hc02
49	Bencenoacetaldehído	Aldehído	122-78-1	Ad05
50	Bencenometanol, α -metil-	Alcohol	98-85-1	Al16
51	Ácido benzoico, 4-formil	Ácido carboxílico	619-66-9	Ac06
52	Ácido benzoico, éster etílico	Éster	93-89-0	Es07
53	Ácido butanoico, 2-metil	Ácido carboxílico	116-53-0	Ac07
54	Ácido butanoico, 3-metil	Ácido carboxílico	503-74-2	Ac08
55	Cafeína	Cetona	58-08-2	Ce09
56	c-Terpineno	Terpeno	99-85-4	Tp02
57	Ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletilideno)	Hidrocarburo	27966-26-3	Hc03
58	Decano	Hidrocarburo	124-18-5	Hc04
59	Etanol	Alcohol	64-17-5	Al17
60	Acetato de etilo	Éster	141-78-6	Es08
61	Furfural	Aldehído	98-01-1	Ad06
62	Heptano, 2,2,4,6,6-pentametil	Hidrocarburo	13475-82-6	Hc05
63	Ácido heptanoico, 2-etil	Ácido carboxílico	3274-29-1	Ac09
64	Ácido hexanoico	Ácido carboxílico	142-62-1	Ac10
65	Acetato de isobutilo	Éster	110-19-0	Es09
66	Isobutil isovalerato	Éster	589-59-3	Es10
67	Alcohol isopropílico	Alcohol	67-63-0	Al18
68	Linalol	Terpeno	78-70-6	Tp03
69	Ácido L-láctico	Ácido carboxílico	79-33-4	Ac11
70	2,6-dimetilpiperidina	Amina	504-03-0	Am04
71	Nonanal	Aldehído	124-19-6	Ad07
72	Nonano	Hidrocarburo	111-84-2	Hc06
73	Octano, 3,5-dimetil	Hidrocarburo	15869-93-9	Hc07
74	Ácido octanoico	Ácido carboxílico	124-07-2	Ac12
75	Ácido octanoico, 2-butil	Ácido carboxílico	27610-92-0	Ac13
76	Ácido pentanoico, 4-oxo	Ácido carboxílico	123-76-2	Ac14
77	Fenol	Alcohol	108-95-2	Al19
78	Fenol, 2,3,5,6-tetrametil	Alcohol	527-35-5	Al20
79	Alcohol feniletílico	Alcohol	60-12-8	Al21
80	Propanal, 2-metil	Aldehído	78-84-2	Ad08
81	Ácido propanoico	Ácido carboxílico	79-09-4	Ac15
82	Ácido propanoico, 2-metil	Ácido carboxílico	79-31-2	Ac16
83	Propilenglicol	Alcohol	57-55-6	Al22
84	Pirazina, 2,3-dimetil	Pirazinas	5910-89-4	Pz03
85	Pirazina, 2,5-dimetil	Pirazinas	123-32-0	Pz04
86	Pirazina, 2,5-dimetil-3-propil	Pirazinas	18433-97-1	Pz05
87	Pirazina, 2,6-dimetil	Pirazinas	108-50-9	Pz06
88	Tetrametilpirazina	Pirazinas	1124-11-4	Pz07
89	Trimetilpirazina	Pirazinas	14667-55-1	Pz08
90	Acetato de 2-butilo	Éster	105-46-4	Es11
91	Terpinen-4-ol	Terpeno	562-74-3	Tp04
92	Timol	Terpeno	89-83-8	Tp05
93	Ácido tiocianico, éster fenilmetilo	Éster	3012-37-1	Es12
94	Tridecano	Hidrocarburo	629-50-5	Hc08
95	Undecanal	Aldehído	112-44-7	Ad09
96	Undecano	Hidrocarburo	1120-21-4	Hc09

Anexo J

Agrupamiento de los compuestos volátiles para simplificar la visualización de las relaciones en el análisis multifactorial

Para facilitar la visualización de las relaciones en el gráfico del análisis multifactorial, los compuestos volátiles significativos se agruparon en 18 grupos, según la cercanía mostrada en el análisis de componentes principales.

Cuadro 26 Agrupamiento de los compuestos volátiles para elaborar el análisis multifactorial

Acronímico	Compuesto volátil	Agrupamiento	Acronímico	Compuesto volátil	Agrupamiento
Am01	2-propenamida	Am1	Ce01	2,3-butanediona	Ce1
Am03	Acetaldehído dimetilhidrazona		Ce03	2-heptanona	
Am04	2,6-dimetilpiperidina		Ce05	2-nonanona	
Ce07	Acetoína	Ce06	2-octanona		
Ac15	Ácido propanoico	CeAc1	Es05	Acetato de 2-pentanol	
Al05	2,3-butanodiol	AlEt1	Ac01	Ácido 2,6-piridinedicarboxílico	
Et01	Acetaldehído, acetal dipropílico		Al08	2-heptanol, 3-metil	
Ac06	Ácido benzoico, 4-formil	EtPzAc1	Ac13	Ácido octanoico, 2-butil	
Pz08	Trimetilpirazina		Ac14	Ácido pentanoico, 4-oxo	
Et02	Eter alílico etílico		Es03	1-butanol, 2-metil-, acetato	
Pz07	Tetrametilpirazina	Pz1	Es04	1-butanol, 3-metil-, acetato	
Pz03	Pirazina, 2,3-dimetil		Es09	Acetato de isobutilo	
Es02	1,3-propanediol, diacetato	Es1	Ac11	Ácido L-láctico	EsAc1
Es11	Acetato de 2-butilo		Ad09	Undecanal	
Al11	2-propanol, 1-(2-butoxi)-	Al1	Al13	3-heptanol, 3-metil	
Ad04	Benzaldehído		Hc04	Decano	
Al07	2-butanol		Ac12	Ácido octanoico	
Al19	Fenol		Es08	Acetato de etilo	
Al20	Fenol, 2,3,5,6-tetrametil		Ce08	Acetofenona	
Ce04	2-hexanona, 4-metil		Hc05	Heptano, 2,2,4,6,6-pentametilo	
Ac04	Ácido acético	Ac1	Hc09	Undecano	HcAcEsCe
Ac05	Ácido acético, dietil-		Am02	4,5-dimetil-orto-fenilendiamina	
Ac08	Ácido butanoico, 3-metil	Ad1	Hc01	Benceno, 1-propenilo	
Ad01	2,3,6-triclorobenzaldehído		Ac16	Ácido propanoico, 2-metil	
Ad02	3-ciclohexeno-1-acetaldehído, α ,4-dimetil-		Al06	2,5,8,11,14-pentaoxahexadecan-16-	
Ad06	Furfural		Al16	Bencenometanol, α -metil-	
Ad07	Nonanal		Al21	Alcohol feniletílico	
Tp01	α -Terpineno	Al2	Alcohol feniletílico		
Tp02	c-Terpineno	Ad05		Bencenoacetaldehído	
Tp03	Linalol	Al02	1-butanol, 3-metil-		
Tp04	Terpinen-4-ol	Al17	Etanol		
		Pz01	2,3-dietilpirazina	Pz2	
		Pz04	Pirazina, 2,5-dimetil	Pz3	

Anexo K

Ejemplo de curva de secado

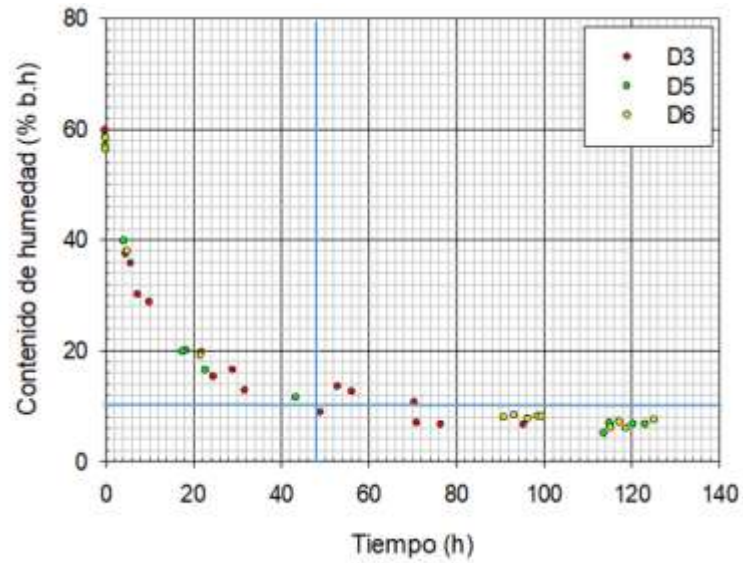


Figura 46. Ejemplo de curva de secado (secador de circulación continua, S1) de la mezcla de clones para cada tiempo de fermentación.