



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Aproximación quimiométrica del balance  
entre los compuestos neoformados y los  
responsables de la calidad desarrollados  
durante las etapas de poscosecha de  
cacaos especiales (*Theobroma cacao* L.)  
cultivados en Antioquia**

**Maritza Andrea Gil Garzón**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Medellín, Colombia  
2018



# **Aproximación quimiométrica del balance entre los compuestos neoformados y los responsables de la calidad desarrollados durante las etapas de poscosecha de cacao especiales (*Theobroma cacao* L.) cultivados en Antioquia**

**Maritza Andrea Gil Garzón**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Ciencias Agrarias**

Director:

Doctor Julián Alberto Londoño Londoño (E Portillo et al., 2011)

Codirector:

Doctor Jairo Quijano Tobón

Línea de Investigación:

Investigación, Desarrollo e Innovación de Procesos y Productos (I&D+i pp)

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación de Ingeniería de Alimentos - GRIAL

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2018



*Cada sueño tiene su momento*

*La naturaleza benigna provee de manera que  
en cualquier parte halles algo que aprender*

*Leonardo Davinci*



# Agradecimientos

A Dios, por hacer que este sueño se hiciera realidad.

Al programa “Implementación de cultivo de cacao especiales en el departamento de Antioquia”, financiado por la Gobernación de Antioquia, Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural a través del Fondo Nacional para Ciencia y Tecnología (Sistema General de Regalías. Contrato 4600003895).

A Colciencias-Colfuturo y la Universidad Nacional de Colombia, por financiar la beca para la realización de estudios de doctorado a nivel nacional (Convocatoria N° 647-2015).

A mi director de tesis, Julián Londoño Londoño, por creer en mí y hacer que mi gusto por la investigación sea cada día mayor.

A mi co-tutor, el profesor Jairo Quijano Tobón, que ha sido un maestro para mí y por segunda vez me dio la oportunidad de formarme en investigación bajo su tutoría.

A todos los profesores del Doctorado que siempre acompañaron este proceso.

A los investigadores del proyecto, los profesores Olga Martínez, Zulma Monsalve y Fernando Ruíz, y en especial a Pilar Lizarazo, por ser guía de este genial proyecto.

A los estudiantes que hacen parte del proyecto, por ser mis compañeros y darme fuerzas para creer que todo se puede: Carolina Bedoya, Yamile Jaramillo, Jessica Flórez, Danilo Porras y Vannesa Gallego, siempre incondicionales. A Marcelina Mendoza y todos los compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana y Bio-prospección.

A Sandra Llano, por ser mi polo a tierra y apoyo total.

A los directivos, compañeros de los laboratorios y mis dos grandes amigas Ana María Restrepo y Luz María Álzate de la Corporación Universitaria Lasallista, por enseñarme que el servicio es una virtud que hace más grande que cualquier conocimiento.

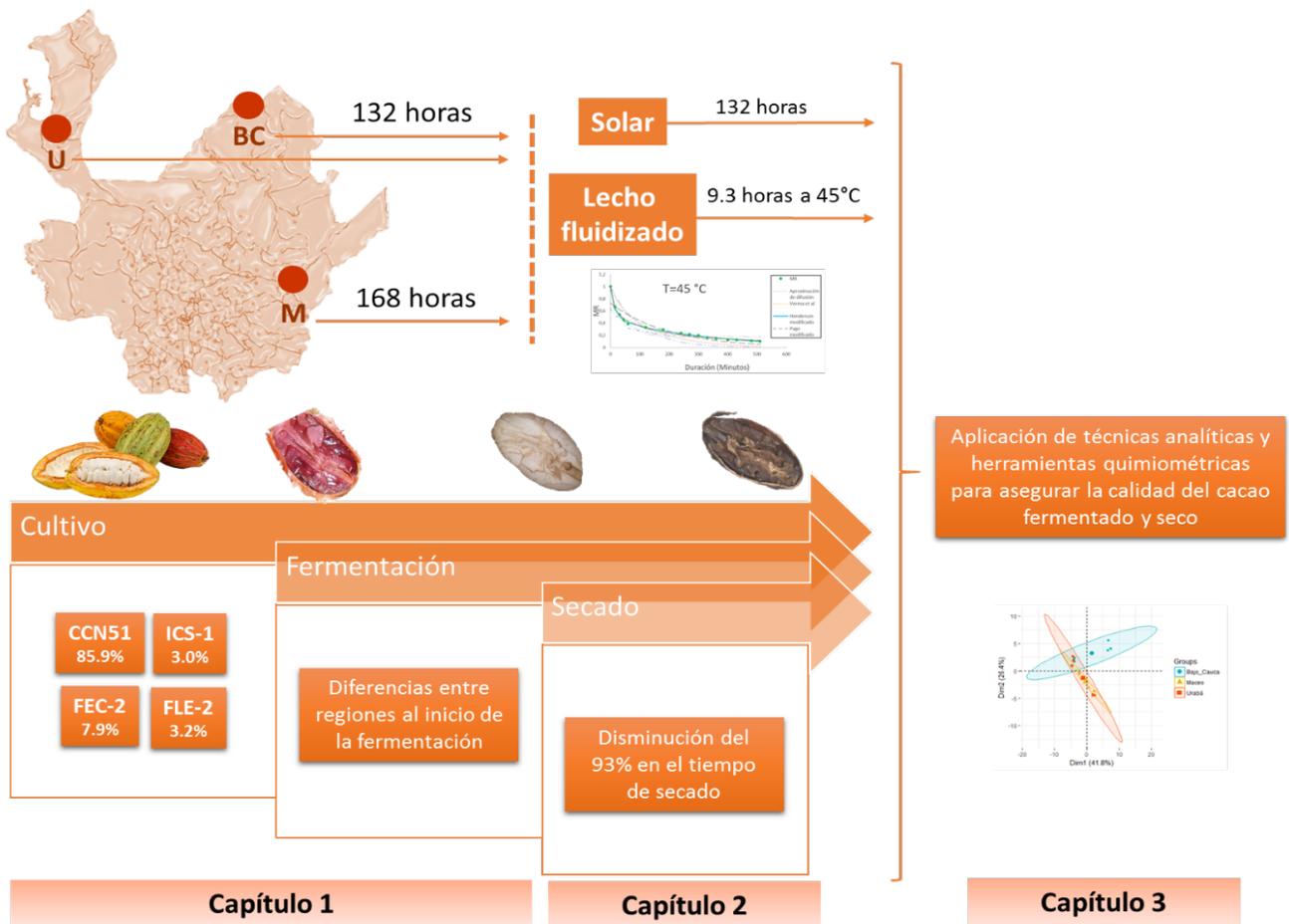
A los técnicos de Fedecacao, por todo el apoyo durante las salidas de campo y por enseñarme el mundo real del cacao.

A mi familia, mi hija y mi esposo, por enseñarme que los sueños solo son posibles con el apoyo de quienes te aman, aunque tengan que sacrificar su compañía.

A mi mamá, hermanos, hermanas y cuñadas, por sacrificar todo su tiempo para apoyarme, darme cariño y siempre desearme lo mejor para que se cumplan mis sueños; en especial Miriam Gil y a mis sobrinas Juliana Sánchez y Susana Muñoz, por siempre soñar conmigo.

A Albeiro Gil, por ser la persona más comedida por compartir su conocimiento. Omar Gil y Dario Gil por apoyarme y cuidarme siempre.

# Resumen gráfico



## Resumen

La estandarización de los procesos de poscosecha del cacao es uno de los retos prioritarios para ser competitivos en el sector productivo. Por tal razón, el objetivo de este estudio fue determinar el balance entre los compuestos de calidad desarrollados durante las etapas de poscosecha de cacaos especiales (*Theobroma cacao* L.), cultivados en Antioquia, mediante una aproximación quimiométrica. El estudio se dividió en dos etapas; la primera partió de la fermentación espontánea de una mezcla de dos clones de cacao Universales y dos regionales provenientes de tres subregiones de Antioquia (Bajo Cauca-BC, Urabá-U y Magdalena Medio-M) con una duración de 168 h en M y 132 h tanto en BC como en U. El perfil bromatológico, físico y químico se determinó bajo métodos estandarizados y validados como base para la identificación de indicadores de calidad al inicio y final del proceso. El estudio quimiométrico de esta etapa estuvo basado en el Análisis de Componentes Principales (ACP) en el cual se observó que el cacao crudo de BC fue diferente de U y M, pero después de la fermentación se definieron variables comunes en las tres subregiones a partir principalmente de aminoácidos libres, ácido acético, manitol y fibra. La segunda etapa consistió en el desarrollo de un método de secado para el cacao fermentado por Lecho Fluidizado (LF), con el fin de reducir los tiempos y estandarizar esta etapa de forma que se reflejara en la calidad del cacao seco. Las condiciones de secado óptimas fueron: temperatura de 45 °C (resultante de un estudio previo a 50, 45 y 40 °C), velocidad del aire en m/s de 6.1 (120 min), 5.1 (260 min) y 4.3 (aprox. 120 min) hasta alcanzar una humedad <7 %. Doce modelos matemáticos empíricos fueron empleados para el estudio de la cinética de secado y el modelo seleccionado fue Aproximación de Difusión ( $R^2:0.9954$ ). El perfil quimiométrico permitió analizar el secado por LF comparado con el solar, donde las dos primeras componentes fueron explicadas por una serie de compuestos volátiles, pero sin una afectación mayor

de la acidez volátil. El contenido de acrilamida, considerado un contaminante térmico neoformado relacionado con la inocuidad del cacao, solo se presentó en BC en los dos métodos de secado evaluados pero a niveles inferiores a los recomendados. La propuesta de un secado artificial por lecho fluidizado permitió la reducción del tiempo al pasar de 72 a  $7.2\pm 0.6$  h para BC, de 132 a  $7.5\pm 1$  h para U y de 182 a  $8.3\pm 0.8$  h para M. Para evidenciar los factores concluyentes que permitieran el análisis quimiométrico a partir de esas variables de mayor relevancia identificadas en el ACP para las dos etapas de poscosecha estudiadas se realizó el Análisis de Factores Comunes; del cual se extrajeron una serie de variables no observables pero deducibles de la importancia de las variables seleccionadas. Estas observaciones consistieron primordialmente en tres factores, el primero asociado a la identificación de la calidad del cacao al finalizar la fermentación y el secado, el segundo a su propiedades funcionales de interés para la industria por su valor comercial; y, finalmente, al cumplimiento de estándares establecidos por la normativa para grano de cacao seco.

**Palabras clave:** *Theobroma cacao* L., Lecho fluidizado, estadística multivariada, fermentación, secado.

## Abstract

The standardization of cocoa postharvest processes is one of the priority challenges to be competitive in the productive sector. For this reason, the objective of this study was to determine the balance between the quality compounds developed during the postharvest stages of special cocoas (*Theobroma cacao* L.), cultivated in Antioquia, through a chemometric approach. The study was divided into two stages, the first was the spontaneous fermentation of a mixture of two Universal and two regional cocoa clones from three sub regions of Antioquia (Bajo Cauca-BC, Urabá-U and Magdalena Medio-M) with a duration of 168 h in M and 132 h in both BC and U. The bromatological, physical and chemical profile was determined under standardized and validated methods as a basis for the identification of quality indicators at the beginning and end of the process. The chemometric study of this stage was based on the principal components analysis (PCA) in which it was observed that the BC raw cocoa was different from U and M, but after the fermentation, common variables were defined in the three sub regions based mainly in free amino acids, acetic acid, mannitol and fiber. The second stage consisted in the development of a drying method for the cocoa fermented by Fluidized Bed (LF), in order to reduce the times and standardize this stage so that it would be reflected in the quality of the dry cocoa. The optimal drying conditions were: 45 ° C (resulting from a previous study at 50, 45 and 40 ° C), air velocity in m / s was: 6.1 (120 min), 5.1 (260 min) and 4.3 (approx. 120 min) until reaching a humidity <7%. 12 empirical mathematical models were used for

the study of drying kinetics and the model selected was Diffusion Approach ( $R^2$ : 0.9954). The chemometric profile allowed to analyze the drying by LF compared to the solar, where the first two PCs were explained by a series of volatile compounds, but without noticing greater affectation of the volatile acidity. The content of acrylamide, considered a neoformed thermal contaminant related to the safety of cocoa, was only presented in BC by the two drying methods evaluated but at levels lower than those recommended. The proposal of an artificial drying by fluidized bed allowed the achievement of the reduction of time from 72 to  $7.2 \pm 0.6$  h in BC, from 132 to  $7.5 \pm 1$  h for U and in M it went from 182 to  $8.3 \pm 0.8$  h. To demonstrate the conclusive factors that allowed the chemometric analysis from those variables of greater relevance identified in the PCA for the two postharvest stages studied, the Common Factors Analysis was carried out; from which a series of non-observable variables were extracted, but deducible from the importance of the selected variables. These observations consisted primarily of three factors, the first associated with the identification of the quality of cocoa at the end of fermentation and drying, the second with its functional properties of interest to the industry for its commercial value; and, finally, to compliance with standards established by the regulations for dry cocoa bean.

**Keywords:** *Theobroma cacao* L., Fluidized bed, multivariate statistics, fermentation, drying.



# Contenido

	<u>Pág.</u>
<b>1. Capítulo 1. Perfil de calidad del cacao bajo métodos estandarizados para el control de su poscosecha</b> .....	<b>5</b>
1.1 Introducción.....	5
1.2 Materiales y Métodos.....	8
1.2.1 Reactivos.....	8
1.2.2 Material vegetal.....	8
1.2.3 Zona de estudio.....	9
1.2.4 Cosecha.....	9
1.2.5 Fermentación.....	11
1.2.6 Muestreo y tratamiento de la muestra.....	13
1.2.7 Parámetros para la determinación de la calidad durante fermentación.....	14
1.2.8 Caracterización bromatológica.....	15
1.2.9 Caracterización física y química.....	19
1.2.10 Análisis estadístico y quimiométrico.....	30
1.3 Resultados y Discusión.....	39
1.3.1 Clones y subregiones.....	39
1.3.2 Fermentación.....	45
1.3.3 Parámetros de calidad del grano de cacao bien fermentado de tres subregiones de Antioquia.....	49
1.3.4 Análisis estadístico multivariado del perfil bromatológico, físico y químico de cacao cosechado y fermentado en tres subregiones de Antioquia.....	60
1.3.5 Análisis de clúster.....	67
1.3.6 Aproximación quimiométrica.....	69
<b>2. Capítulo 2. Secado del cacao fermentado por lecho fluidizado: una alternativa para mejorar la efectividad</b> .....	<b>98</b>
2.1 Introducción.....	98
2.1.1 Procesos de secado (natural y artificial).....	108
2.2 Materiales y Métodos.....	111
2.2.1 Secado solar.....	111
2.2.2 Secado por Lecho Fluidizado.....	113
2.2.3 Modelo matemático de las curvas de secado.....	117
2.2.4 Difusividad efectiva, <i>Deff</i> .....	118
2.2.5 Caracterización física y química.....	119
2.2.6 Análisis estadístico y quimiométrico.....	121
2.3 Resultados y Discusión.....	123
2.3.1 Secado solar.....	123
2.3.2 Secado por lecho fluidizado.....	126

---

2.3.3	Cinética de las curvas de secado .....	128
2.3.4	Relación entre la Difusividad Efectiva (Deff) y Energía de Activación, Ea ...	134
2.3.5	Modelos matemáticos de las curvas de secado .....	135
2.3.6	Condiciones de operación de secado.....	142
2.3.7	Perfil quimiométrico.....	154
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3. Marcadores químicos como indicadores de la calidad característica de cacaos especiales.....</b>	<b>183</b>
3.1	Introducción .....	183
3.2	Métodos.....	188
3.3	Resultados y Discusión.....	188
3.3.1	Cacao crudo y fermentado .....	188
3.3.2	Cacao seco por método natural y artificial.....	190
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>193</b>
4.1	Conclusiones .....	193
4.1.1	Capítulo 1: Perfil químico de los compuestos precursores del aroma y sabor generados durante la fermentación.....	193
4.1.2	Capítulo 2. Sistema de secado.....	194
4.1.3	Capítulo 3. Marcadores químicos indicadores de calidad .....	195
4.2	Recomendaciones .....	195

## Lista de figuras

Pág.

- Figura 1-1:** Representación del porcentaje de explicación de las varianzas de las componentes resultantes ..... 61
- Figura 1-2:** Biplot del Análisis de Componentes Principales entre los parámetros bromatológicos, químicos y físicos del cacao crudo y el bien fermentado ..... 62
- Figura 1-3:** Contribución en porcentaje de las principales características que explican la Componente 163
- Figura 1-4:** Porcentaje de contribución de las propiedades que más aportaron a la segunda componente principal ..... 64
- Figura 1-5:** Contribución de cada observación muestral en el primer plano factorial, 1,2,3 (BC-SF); 4,5,6 (BC-F), 7,8,9 (U-SF); 10,11,12 (U-F); 13, 14, 15 (M-SF); 16,17,18 (M-F). 65
- Figura 1-6:** Contribución de las observaciones muestrales a las dos primeras componentes: 1,2,3 (Bajo Cauca sin fermentar), 4,5,6 (Bajo Cauca fermentado), 7,8,9 (Urabá sin fermentar), 10,11,12 (Urabá fermentado), 13,14,15 (Magdalena Medio-Maceo sin fermentar) y 16,17,18 (Magdalena Medio-Maceo sin fermentar)..... 66
- Figura 1-7:** Distribución de la variabilidad de las componentes evaluadas por subregiones antes y después de la fermentación de la mezcla de clones de cacao en Bajo Cauca (circulo azul), Magdalena Medio – Maceo (triángulo naranja) y Urabá (cuadrado rojo) 67
- Figura 1-8:** Clúster de la distribución en el primer plano factorial de cada observación muestral: 1,2,3 (Bajo Cauca sin fermentar), 4,5,6 (Bajo Cauca fermentado), 7,8,9 (Urabá

sin fermentar), 10,11,12 (Urabá fermentado), 13,14,15 (Magdalena Medio-Maceo sin fermentar) y 16,17,18 (Magdalena Medio-Maceo sin fermentar).....	68
<b>Figura 1-9:</b> Descripción de las etapas de fermentación de las poblaciones microbiológicas y enzimáticas que participan y los principales productos.....	73
<b>Figura 2-1:</b> Esquema del secador por Lecho Fluidizado y el sistema de medición.....	115
<b>Figura 2-2:</b> Perfil de temperatura, humedad relativa y luminosidad registrado durante el secado solar en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio .....	124
<b>Figura 2-3:</b> Contenido de humedad del cacao fermentado durante el tiempo de secado solar en Magdalena Medio .....	125
<b>Figura 2-4:</b> Contenido de humedad en base seca de los granos de cacao fermentados y deshidratados por lecho fluidizado a 40, 45 y 50 °C. ....	129
<b>Figura 2-5:</b> Velocidad de secado por lecho Fluidizado a 40, 45 y 50 °C vs contenido de humedad en base seca de granos de cacao fermentados .....	130
<b>Figura 2-6:</b> Cambio al interior y exterior del grano de cacao durante el secado por Lecho Fluidizado de acuerdo con los cambios de período de secado destacados.....	131
<b>Figura 2-7:</b> Relación de Arrhenius entre el logaritmo de la difusividad efectiva de la humedad (Deff) y el inverso de la temperatura absoluta para granos de cacao .....	135
<b>Figura 2-8:</b> Comparación entre datos experimentales y predichos.....	141
<b>Figura 2-9:</b> Dispersión para el tiempo de secado en horas en función de la temperatura y las concentraciones de ácido acético y láctico, discriminada por temperatura	145
<b>Figura 2-10:</b> Clasificación según el LDA.....	148
<b>Figura 2-11:</b> Perfil del delta de presión durante los períodos de fluidización en el secado de granos de cacao a 45 °C durante los primeros 120 min de secado .....	149
<b>Figura 2-12:</b> representación termodinámica y psicrométrica del tratamiento térmico realizado sobre 5 kg de cacao fermentado y seco por Lecho Fluidizado a 45 °C.....	153
<b>Figura 2-13:</b> Distribución del número de picos correspondientes a cada compuesto volátil presente en las muestras de secado y organizados con GCalignR.....	163
<b>Figura 2-14:</b> Distribución de los picos cromatográficos de los compuestos volátiles presente en las muestras de secado.....	164
<b>Figura 2-15:</b> Alineamiento de los picos cromatográficos en función de la mayor similitud	165
<b>Figura 2-16:</b> Porcentaje de la variación explicada para cada componente .....	166

- 
- Figura 2-17:** Contribución a las dos primeras componentes de cada compuesto o parámetro en el cacao seco por método solar o LF ..... 167
- Figura 2-18** Contribución de las variables (compuestos)..... 174
- Figura 2-19:** Contribuciones por las subregiones de BC – solar (1,2 y 3), BC – LF (4, 5 y 6), U-solar (7, 8 y 9), U-LF (10, 11 y 12), M- solar (13, 14 y 15) y M-LF (16, 17 y 18). 174
- Figura 2-20:** Distribución de la variabilidad de las dos primeras componentes para cada subregión 177
- Figura 2-21:** Partición de Clúster por subregiones: BC-solar (1, 2, 3), BC-LF (4, 5, 6), U-solar (7, 8, 9), U-LF (10, 11, 12), M-solar (13, 14, 15), M-LF (16, 17, 18) ..... 178

## Lista de tablas

### Pág.

<b>Tabla 1-1:</b> Municipios, fincas y productores seleccionados como proveedores de cacao en las tres subregiones del departamento de Antioquia (Bajo Cauca, Magdalena Medio y Urabá) objeto de estudio.....	10
<b>Tabla 1-2:</b> Condiciones óptimas del monitoreo de reacción seleccionada (SRM) para la identificación y cuantificación de alcaloides y monómeros de procianidinas por UHPLC-MS/MS	29
<b>Tabla 1-3:</b> Descripción sucinta de los parámetros, matriz, método, optimización, diseño de experimento y referencia empleada en cada análisis bromatológico, físico y químico realizado a las muestras analizadas durante la fermentación incluidos en el capítulo 1....	35
<b>Tabla 1-4:</b> Índices de calidad agronómica (índice de semilla, índice de mazorca y número de almendras por mazorca) de los clones (FEC-2, FLE-2, ICS-1 y CCN-51) evaluados en poscosecha en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio .....	40
<b>Tabla 1-5</b> Parámetros ambientales (temperatura y humedad relativa) registrados en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio durante la fermentación de 112.5±4.80 kg.....	46
<b>Tabla 1-6:</b> Temperatura y pH de 112.5±4.80 kg de la mezcla de clones de cacao (CCN-51, ICS-1, FLE-2 y FEC-2) registrados en cada unidad experimental o cajón durante la fermentación en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio.....	48
<b>Tabla 1-7:</b> Perfil bromatológico, físico y químico de los mezcla de clones de cacao (CCN-51, ICS-1, FLE-2 y FEC-2) antes y después de la fermentación en Bajo Cauca (BC), Urabá (U) y Magdalena Medio (M).....	51

---

<b>Tabla 1-8:</b> Ecuación de la curva de calibración, límite de cuantificación y porcentaje de recuperación de los métodos empleados en la caracterización del perfil químico del cacao sin fermentar y fermentado en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio.....	57
<b>Tabla 1-9.</b> Descripción del comportamiento de la acidez total expresada en miliequivalentes de cada ácido orgánico como acético, cítrico, láctico, málico, oxálico y succínico evaluado y su respectiva concentración en % p/p en la mezcla de clones evaluados cada 24 horas durante la fermentación en Bajo Cauca (0 a 132 h), Urabá (0 – 132 h) y Magdalena Medio (0-168 h). .....	77
<b>Tabla 1-10:</b> Descripción del comportamiento a lo largo de la fermentación del contenido de alcaloides y la relación Teobromina/Cafeína.....	81
<b>Tabla 1-11:</b> Descripción del comportamiento a lo largo de la fermentación del contenido de polifenoles totales, la relación del contenido de antocianinas (460/530), capacidad antioxidante, contenido de alcaloides y monómeros de procianidinas.....	86
<b>Tabla 1-12:</b> Contenido de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) y aminoácidos presentes el cacao sin fermentar y seco.....	91
<b>Tabla 2-1:</b> Resultado de algunas investigaciones relacionadas con el secado del cacao publicados entre 2007 y 2018. ....	101
<b>Tabla 2-2:</b> Dimensiones de marquesina para el secado solar en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio .....	112
<b>Tabla 2-3:</b> Parámetros de secado por Lecho Fluidizado en un equipo (Actum, modelo Secador LF, serie 0193).....	116
<b>Tabla 2-4:</b> Parámetros cinéticos calculados a 40, 45 y 50 °C durante el secado por Lecho Fluidizado.....	133
<b>Tabla 2-5:</b> Modelos simplificados de secado (semi-empírico y empíricos) a 40, 45 y 50 °C	138
<b>Tabla 2-6:</b> Tiempo de secado y concentración de ácido acético y láctico después del secado por Lecho Fluidizado a 40, 45 y 50 °C. ....	144
<b>Tabla 2-7:</b> Valores de estadísticos del análisis de varianza de una sola vía para tres niveles de temperatura.....	146
<b>Tabla 2-8:</b> Pares de comparaciones múltiples de acuerdo a la variación de la temperatura con un nivel de confianza del 95 %.....	147
<b>Tabla 2-9:</b> Descriptores quimiométricos del cacao sometido a un secado por Lecho Fluidizado y solar en tres subregiones de Antioquia .....	155

---

<b>Tabla 2-10:</b> Estructura y descriptor de los compuestos volátiles identificados en las muestras de cacao fermentado en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio y sometidas a secado solar y por Lecho Fluidizado.....	168
<b>Tabla 2-11:</b> Distribución de variables entre individuos (subregiones).....	175
<b>Tabla 3-1:</b> Análisis de Factores Principales para cacaos antes y después de la fermentación en tres subregiones de Antioquia .....	189
<b>Tabla 3-2:</b> Descripción de las variables que conforman los factores comunes del ADF a partir del ACP. ....	191

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$A$	Área	$m^2$	$\iint dx dy$
$A_{BET}$	Área interna del sólido	$\frac{m^2}{g}$	ver DIN ISO 9277
$A_g$	Área transversal de la fase gaseosa	$m^2$	Ec. 3.2
$A_s$	Área transversal de la carga a granel	$m^2$	Ec. 3.6
$A$	Coefficiente	1	Tabla 3-1
$IC$	El índice de color		Ec 1.1
$\%C$	Porcentaje de Cenizas		Ec 1.2
$\%F$	Porcentaje de Fibra		Ec 1.3
$X_{bh}$	Contenido de humedad <sub>bh</sub>	$\frac{Kg_{agua}}{Kg_{cacao}}$	Ec 1.4
$\%N$	Porcentaje de Nitrógeno		Ec 1.5
$\%P$	Porcentaje de proteína		Ec 1.6
$\%EE$	Porcentaje extracto etéreo		Ec 1.7
$GAE_{mg/g_{seco}}$	Miligramo de equivalentes de ácido gálico por gramo seco	$\frac{mg}{g}$	Ec 1.8
$AUC$	Área de fluorescencia bajo la Curva		Ec 1.9
$ORAC$	Capacidad de absorción de		Ec 1.10

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
	radicales libres		
	Contenido de humedad		Ec 2.1
MR	<i>Moisture Ratio</i>		Ec 2.2-2.6
RMSE	<i>Root Mean Square Deviation</i>		Ec 2.4
$D_{eff}$	Difusividad Efectiva		Ec 2.7

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\alpha_{BET}$	Factor de superficie	$\frac{m^2}{g}$	$(W_{F,waf})(A_{BET})$
$\beta_i$	Grado de formación del componente i	1	$\frac{m_j}{m_{bm} \varrho}$
$\gamma$	Wandhafbawinkel (Stahlblech)	1	Sección 3.2
$\varepsilon$	Porosidad de la partícula	1	$1 - \frac{\rho_s}{\rho_w}$
$H$	mittlere Bettneigungswinkel (Stürzen)	1	Figura 3-1
$\chi^2$	Chi-cuadrada		Ec 2.3
$\mu_i$	Media general de la población		Ec 1.11
$\alpha_i$	Efecto del i-ésimo tratamiento		Ec 1.11
$\varepsilon_i$	Desviación de la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento con respecto a la media, $\mu_i$ , del i-ésimo tratamiento.		Ec 1.11

## Subíndices

Subíndice	Término
-----------	---------

---

Bm	Materia orgánica
DR	Dubinín-Radushkevich
E	Experimental

## Superíndices

Superíndice	Término
-------------	---------

---

N	Exponente, potencia
Ea	Energía de activación

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
-------------	---------

---

LT	Primera ley de la termodinámica
DF	Dimension fundamental
RFF	Racimos de fruta fresca
CNN	Collection Castro Naranjal
ICS	Imperial Clone Selection
FEC	Fedecacao El Carmen, Santander
FLE	Fedecacao Lebrija, Santander
C*	Croma
L*	Luminosidad
ACP	Análisis de Componentes Principales
ADC	Análisis de Clúster
ADF	Análisis de Factores
AT	Acidez Total
CPT	Contenido de Polifenoles Totales

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
ORAC	Capacidad de absorción de radicales libres
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihidrocloruro
Trolox	6-hidroxi-2, ácido 5,7-tetrametilcroman-2-carboxílico
B	Buffer fosfato
I	Número de ciclos
F	Unidades de fluorescencia
CT	Tiempo de cada ciclo en minutos
AUC neta	Área neta bajo la curva
ET	Equivalentes de Trolox
ABC AH	Área bajo la curva en presencia de antioxidante
ABC Trolox	Área bajo la curva de Trolox
[Trolox]	Concentración de Trolox
[AH]	Concentración de Antioxidante
SPE	Solid Phase Extraction
C-CAD	Detector de aerosol con carga corona
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
HS-SPME	<i>Head Space – Solid Phase Micro-extraction</i>
RSH	<i>Robotic Sample Handling</i>
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenceno
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
MS/TQD	Espectrómetro de Masas de Triple Cuadrúpulo
SRM	Monitoreo de reacción seleccionada

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
N	Normalidad de la solución tituladora
AFP	Análisis de Factores Principales
BHT	Bosques Húmedos Tropicales
ZA	Zona Andina
HR	Humedad Relativa
SPME	Microextracción en fase sólida
GRG	Gradiente generalizado reducido
ADL	Análisis Discriminante Lineal de Fisher
DCC	Diseño central compuesto
GC/HS-SPME	<i>Gas chromatography solid phase microextraction</i>
HPLC-DAD	<i>High-performance liquid chromatography-diode array detector</i>
BC	Bajo Cauca
U	Urabá
M	Magdalena Medio
CFC	Cotiledon fermentado crudo
CS	Cotiledon seco
LF	Lecho fluidizado
RMSR	<i>Root Mean Square Residuals</i>
DCA	Diseño Completamente Aleatorizado
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ACN	Acetonitrilo
UHPLC-C-CAD	<i>Ultra high performance liquid chromatography corona- charge aerosol detector</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
UHPLC-TQD/ESI	<i>Ultra high performance liquid chromatography triple quadrupole detector electrospray ionization</i>
Oxalic	Ácido oxálico
Succ	Ácido succínico
Caf	Cafeína
Theo	Teobromina
Fiber	Fibra
Lys	Lisina
Epi	Epicatequina
Anto	Antocianinas
Suc	Sacarosa
TA_Lac	Acidez total expresada como ácido láctico
TA_Mal	Acidez total expresada como ácido málico
TA_Oxa	Acidez total expresada como ácido oxálico
TA_Cit	Acidez total expresada como ácido cítrico
TA_Suc	Acidez total expresada como ácido succínico
TPC	Contenido de polifenoles totales
Citric	Cítrico
Glu	Glucosa
XP	Porcentaje de Proteína
XH	Porcentaje de Humedad
CP	Componente Principal
C <sub>i</sub>	Clase o grupo de clasificación
P	Probabilidad a priori

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
$X_i$	Condiciones iniciales
$X_c$	Condiciones críticas
$X_r$	Condiciones requeridas
$X_e$	Condiciones en equilibrio

## Introducción

En el mundo, el cacao es reconocido por ser una materia prima de alto valor comercial. En Colombia existen condiciones naturales competitivas para su producción, pero no en todas las zonas productivas se alcanza el nivel de calidad necesario para estar entre los principales oferentes de los mercados internacionales. Esto se debe a factores que van desde la clasificación del material genético hasta la pre-industrialización, proceso previo a su exportación o transformación. Entre los aspectos que más afectan la calidad del cacao se encuentra la estandarización de dos etapas fundamentales de la poscosecha: la fermentación y el secado. Ambas son importantes para obtener un producto que cumpla con las condiciones requeridas por el sector industrial con respecto al desarrollo de los precursores de aroma y sabor, así como el control de la formación de compuestos nocivos debido a las reacciones de *Maillard* presentes en el secado.

El departamento de Antioquia, por su cultura agrícola y diversidad agroclimática, ha sido uno de los beneficiarios de los apoyos gubernamentales enfocados en apoyar el crecimiento del cultivo de cacao con calidad competitiva a nivel mundial. De allí que pasará de ocupar el quinto lugar de productividad en el año 2012 en Colombia, al tercero en 2018 y específicamente Urabá ocupó el segundo lugar en esta misma clasificación (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Centro de Investigaciones Agropecuarias, 2012). Entre las zonas más productivas, de interés para el departamento, se encuentran Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio. En cada una de ellas se espera encontrar un sello y un perfil característico, derivados de la composición química, física y bromatológica que se obtiene por la topografía y las prácticas culturales agrícolas.

Para caracterizar el cacao en las zonas de estudio, se requiere implementar técnicas soportadas por tecnología robusta y métodos adaptados para el análisis de una matriz de alta complejidad por su composición y condiciones de evaluación durante la trazabilidad

de las etapas de poscosecha, que va desde un amplio rango de humedad hasta la apariencia física, lo cual se convierte en un reto. Esta exigencia metodológica hace necesaria la estandarización y validación de los métodos para garantizar los resultados y, a futuro, que estos puedan ser reconocidos como un sello de calidad en cualquier parte del mundo. Por esta razón, el primer capítulo aborda la metodología implementada para la obtención de los perfiles de mezclas de clones presentes en las tres zonas de estudio, tanto crudos como fermentados, respondiendo así al alcance del objetivo específico inicial.

Si bien es conocido que la fermentación es la etapa decisiva para la obtención de los principales precursores de aroma, como se mencionó antes, los retos con el secado son de gran interés. Factores como los largos períodos de lluvia, en épocas del año en las que se presentan picos de cosecha del cacao, afectan la estandarización de esta etapa, en la que se busca la disminución de tiempos y de factores de riesgo como la proliferación de hongos en las primeras etapas, entre otras. Es así como la propuesta de un tratamiento térmico artificial, como lo sugieren varios estudios, puede ser una alternativa para contrarrestar los problemas presentes en la poscosecha. Sin embargo, en este caso surgen nuevos desafíos como disminuir la acidez volátil, que ha sido identificada como uno de los principales defectos de esta opción tecnológica.

La fluidización es la técnica que se ha elegido como alternativa por el tratamiento térmico uniforme que ofrece a partir de un volumen de aire a velocidades que favorecen la suspensión y constante movimiento del grano, aumentando la superficie de secado. De esta manera, la exigencia en altas temperaturas se puede reducir, lo que ayuda a la conservación de compuestos termolábiles y la posterior obtención de un producto homogéneo. Desde el punto de vista energético, se espera que su eficiencia térmica sea semejante a la del secado por aspersión o de banda (Yang, 2003; Senadeera y col., 2006). De esta técnica solo se tiene reporte de un estudio con cacao, con resultados que pueden ser tomados como referencia y optimizados. Además, este tipo de tecnología es producida a nivel local, lo que facilitaría su transferencia a un costo competitivo y el acceso al acompañamiento técnico.

La optimización de este tratamiento térmico exige un estudio de la cinética de secado basado en modelos teóricos y semi-empíricos, propiedades termoquímicas y de fluido-

dinámica, que permita la definición de los parámetros de operación, reproducibles y adaptables a las condiciones de cada subregión. El segundo capítulo detalla precisamente la viabilidad de adoptar esta tecnología bajo una metodología que busca facilitar las condiciones técnicas para el sector productivo, sin dejar de lado la calidad del producto que se logra con el balance, por un lado, de la disminución de la acidez volátil y la formación de contaminantes térmicos neoformados como la acrilamida, y por el otro, con la maximización de la formación de compuestos volátiles responsables del aroma y control de otros asociados al sabor.

La trazabilidad de la calidad del cacao en las diferentes etapas objeto de estudio exige el establecimiento de un sinnúmero de parámetros, que es proporcional al volumen de la información, lo cual requiere una disciplina de apoyo para el tratamiento de datos que facilite la toma de decisiones de acuerdo con el interés de cada actor de la cadena productiva. En este punto, la Quimiometría basada en modelos estadísticos y matemáticos aparece como una alternativa para facilitar el acceso a sistemas de reducción de la información multidimensional, de tal manera que se pueda agrupar y crear perfiles para la toma de decisiones e interpretación de datos, un proceso que se da con el conocimiento de la matriz desde el punto de vista químico, físico, biológico, entre otros. Para la obtención de los perfiles, que son el insumo para el análisis multivariado, se requirió del apoyo de la química analítica y varias técnicas instrumentales, que en este estudio partieron del uso de cromatografía con detectores robustos para la identificación y cuantificación, así como la adaptación de los métodos implementados (Bader et al., 2009).

El resultado del análisis quimiométrico se presenta en el último capítulo, el cual acerca al futuro usuario de la información a una herramienta o ruta de trabajo que le permitirá la caracterización del cacao dependiendo de la subregión, la etapa de trabajo y su interés sobre la calidad productiva o funcional. Esta información se obtiene a través de un análisis de factores comunes determinados a partir de las componentes principales identificadas en cada etapa de estudio.

Es importante señalar que esta investigación hace parte del proyecto macro “Implementación de modelos para garantizar la calidad del grano de cacao en poscosecha: Estrategias sostenibles enmarcadas en el comercio internacional”, el cual tiene como objeto principal aportar al desarrollo del aparato productivo en Antioquia y responder a una de las principales demandas del sector, relacionada con el establecimiento de “Métodos

estandarizados de los procesos de beneficio y calidad de grano de cacao”, confirmada en la actualización de la Agenda de Investigación Nacional de Cacao y Chocolate de 2015.

Finalmente, cada capítulo se estructuró a partir de los siguientes tres objetivos específicos respectivamente. Juntos, responden al objetivo general del proyecto: “Aproximación quimiométrica del balance entre los compuesto de calidad desarrollados durante las etapas de poscosecha de cacaos especiales (*Theobroma cacao* L.), cultivados en Antioquia”:

- Determinar el perfil químico de los compuestos precursores del aroma y sabor generados durante la fermentación de cuatro clones de cacao cultivados en diferentes subregiones de Antioquia para su trazabilidad.
- Establecer un sistema de secado de cacaos fermentados, basado en una tecnología que permita la disminución de la humedad del grano, sin afectar el equilibrio entre los compuestos responsables del aroma y de aquellos neoformados.
- Definir los marcadores químicos como indicadores de la calidad sensorial característica de cacaos especiales, mediante un análisis quimiométrico.

# **1. Capítulo 1. Perfil de calidad del cacao bajo métodos estandarizados para el control de su poscosecha**

## **1.1 Introducción**

Se han publicado numerosos estudios para caracterizar el cacao tanto crudo como fermentado. Sin embargo, no existe un consenso procedimental para su tratamiento, lo cual dificulta la estandarización o normalización de métodos que permitan la implementación de una rutina para el control de calidad. También se dificulta la toma de decisiones frente a la amplia oferta de materiales vegetales que existe y la trazabilidad de los compuestos precursores de aroma formados durante la fermentación (Gil, Orrego, Cadena, Alegria, & Londono-londono, 2016; Ching Lik Hii, Menon, Chiang, & Sharif, 2017; Hue et al., 2016; Pereira, Soccol, & Soccol, 2016).

Las etapas de la poscosecha, principalmente fermentación y secado, son decisivas como fases iniciadoras de estos precursores y compuestos responsables de las características sensoriales del cacao como materia prima de calidad para procesos industriales y sus productos derivados. Por esta razón, ambas etapas han motivado amplios estudios y representan un punto de partida para la obtención de Cacaos Corrientes de alta calidad y en especial Cacaos Finos de Aroma.

Es así como se ha reportado un amplio número de compuestos relacionados con atributos o defectos en el perfil sensorial que son indicadores del correcto procedimiento, ya sea durante la fermentación o el secado (Frauendorfer & Schieberle, 2006; Elvis Portillo et al., 2009; Rodriguez-Campos et al., 2012a; Rodriguez-Campos, Escalona-Buendía, Orozco-Avila, Lugo-Cervantes, & Jaramillo-Flores, 2011; Saltini, Akkerman, & Frosch, 2013). Algunos de estos compuestos son identificados como precursores que aparecen en la

fermentación, a los que se les ha atribuido una serie de reacciones bioquímicas, enzimáticas y microbiológicas alternas que conducen a la formación de metabolitos determinantes en el desarrollo balanceado, no solo para el aroma sino también para el sabor; incluso con propiedades funcionales (Adeyeye, Akinyeye, Ogunlade, Olaofe, & Boluwade, 2010; Emmanuel Ohene Afoakwa, Quao, Takrama, Budu, & Saalia, 2013; Illegghems, Weckx, & De Vuyst, 2015; Kratzer et al., 2009; Leal, Gomes, Efraim, De Almeida Tavares, & Figueira, 2008; Ohene, E., Quao, J., Takrama, J., Simpson, A. and Kwesi, 2011; Rohsius, Matissek, & Lieberei, 2006). La mayoría de estos metabolitos aportan al perfil sensorial global para la diferenciación de la calidad. Además, pueden ser característicos de cacaos especiales, ya sea por su aparición o disminución (Bertoldi, Barbero, Camin, Caligiani, & Larcher, 2016; Y. Gu, Hurst, Stuart, & Lambert, 2011; S. Jinap, Jamilah, & Nazamid, 2004; Krähmer et al., 2015; Noor-Soffalina, Jinap, Nazamid, & Nazimah, 2009).

Además de los aminoácidos y azúcares reductores, principalmente fructosa y glucosa, los ácidos orgánicos, alcaloides, monómeros de procianidinas, antocianinas, péptidos y otras macromoléculas se han estudiado a profundidad, con el fin de profundizar en el entendimiento del comportamiento al interior del cotiledón de cacao y hacer seguimiento a su influencia sobre la calidad al final de la fermentación (E. O. Afoakwa, Quao, Takrama, Budu, & Saalia, 2012; Ortega et al., 2010; Sandhya et al., 2016; Jürgen Voigt, Janek, Textoris-Taube, Niewienda, & Wöstemeyer, 2016).

En cuanto al secado, la mayor parte de los estudios se ha centrado en realizar una descripción detallada de los compuestos resultantes de la reacción de *Maillard*, la cual es reconocida como la principal serie de transformaciones químicas a partir de azúcares reductores y aminoácidos libres para la producción de compuestos volátiles de alto valor en el perfil de calidad de varias matrices alimentarias, en especial del cacao. Este proceso inicia en la poscosecha y se desarrolla completamente en las etapas que comprenden su industrialización (Bustamante, Tamayo Tenorio, & Rojano, 2015; Farah, Zaibunnisa, & Misnawi, 2012; Kocadağlı, Göncüoğlu, Hamzalıoğlu, & Gökmen, 2012; Martins, Jongen, & Van Boekel, 2000).

La identificación de la composición química para la trazabilidad expone varios retos en cuanto a las metodologías a seguir que deben estar apoyadas por tecnologías robustas

para el estudio de concentraciones bajas y métodos diferenciados de acuerdo a la matriz del cacao a estudiar (pulpa, cotiledón) y el grado de humedad por el avance que tenga la fermentación (Bertoldi et al., 2016; Marseglia, Sforza, et al., 2014; Ortega et al., 2010).

Los resultados de esta compleja caracterización pueden apoyar la toma de decisiones al realizar el análisis de los resultados por cada uno de los métodos aplicados. Este proceso parte del análisis estadístico que soporta la fundamentación quimiométrica para definir los compuestos significativos para la toma de decisiones sobre el perfil de precursores de aroma y responsables de sabor que se forman después de la fermentación del cacao. Entre las técnicas de análisis descriptivas de mayor apoyo se encuentra el Análisis de Componentes Principales (ACP), la cual reduce la dimensión de los datos en función de sus similitudes y diferencias sin perder información con base en las combinaciones lineales de variables que son definidas como componentes principales (Kaiser, 1961).

Así mismo, el análisis de Clúster (ADC) puede ser útil para realizar la agrupación en clases homogéneas que permiten diferenciar entre la evolución de la fermentación (inicio-fin) y diferentes orígenes, entre otros. En definitiva, el análisis de Factores Principales (ADF) a partir del ACP, hace parte de los métodos de ordenación de variables con una estructura de alta correlación que conlleva a la determinación de pocos factores subyacentes. Cada uno de los factores apoyados en el conocimiento de los usuarios de la información permitirá hacer una clasificación con diferentes alcances de interés, que para los datos recolectados durante la fermentación podrían explicar aspectos productivos, de calidad, funcionalidad, entre otros (Wold, 1995).

Por lo anterior, el alcance de este estudio se estableció en la aproximación quimiométrica de una mezcla de cacaos cultivados en tres subregiones de Antioquia, basada en la caracterización de los perfiles físico, químico y bromatológico de las muestras, lo cual implicó la estandarización de métodos que permitieran la obtención de información confiable acerca de las características propias de los materiales evaluados de acuerdo a la zona donde se obtuvo la cosecha y la identificación de la calidad al finalizar su fermentación; pero con el beneficio de identificar los parámetros acotados y concluyentes para obtener una caracterización descriptiva e inferencial a partir de herramientas estadísticas.

## 1.2 Materiales y Métodos

### 1.2.1 Reactivos

Se emplearon los siguientes reactivos clasificados como ácidos: acético (US *Pharmacopeia Convention* - Rockville, USA), cítrico, láctico, málico (Supelco, North Harrison, USA), oxálico y succínico (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemania). Sacáridos: fructosa (Chromadex, Irvine, CA, USA), glucosa, sacarosa (Supelco, North Harrison, USA) maltosa y poliol manitol (*European Pharmacopoeia Reference Standard*). Alcaloides: cafeína y teobromina. Monómeros de procianidinas (epicatequina y catequina). Aminoácidos (asparagina, cisteína, fenilalanina, leucina, lisina, metionina y valina).

Los reactivos y solventes grado analítico, cromatográfico o de masas empleados para la extracción y cuantificación de compuestos de estudio fueron: acetona, ácido orto-fosfórico, sulfúrico y clorhídrico, ciclohexano, cloroformo, dietil éter, éter de petróleo, indicadores Tashiro y fenolftaleína, fosfato de sodio di-básico dodecahidratado, hexano, hidróxido de sodio, metanol, n-octanol, sulfato de cobre, oftalato ácido de potasio, (Merck, Darmstadt, Germany). 6-hidroxi-2, ácido 5,7-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), fluoresceína, y 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), ácido fórmico y formiato de sodio obtenidos de Sigma Chemical Co. (Missouri; USA).

El agua ultrapura empleada en la mayoría de las pruebas presentó una resistividad de 18.2 M $\Omega$ .cm Purelab Ultra ELGA (Celle, Alemania).

### 1.2.2 Material vegetal

El material vegetal empleado en el presente estudio consistió en una mezcla de dos clones internacionales: CCN-51 (*Collection Castro Naranjal*), ICS-1<sup>1</sup> (*Imperial College Selection*);

---

<sup>1</sup> Resolución Minagricultura 0329 de 17 de noviembre de 2009. Materiales de cacao introducidos en Colombia

y dos nacionales: FEC-2<sup>2</sup> (Fedecacao El Carmen, Santander) y FLE-2<sup>3</sup> (Fedecacao Lebrija, Santander), seleccionados por la Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia – Fedecacao, ya que están presentes en las tres subregiones y como oportunidad para evaluar el desempeño en las etapas de poscosecha de dos de los 8 clones regionales aprobados en 2014 por el Instituto Colombiano Agropecuario.

### 1.2.3 Zona de estudio

El estudio fue realizado en tres de las principales subregiones productoras de cacao en el departamento de Antioquia, Colombia. Las unidades experimentales fueron ubicadas en las siguientes localidades:

- Bajo Cauca (BC): Hacienda La Candelaria, ubicada sobre la vía que conduce de Caucaasia a Nechí en el Bajo Cauca, en las coordenadas geográficas correspondiente a N 08°40'6,57'; W 75°10'9,74'; 76,3 msnm.
- Urabá (U): Centro de Desarrollo Agrario y Sede de Estudio para la Región de Urabá de la Universidad de Antioquia – Granja Tulenapa, ubicada en el municipio de Carepa en las coordenadas geográficas N 07°46'4,51'; W 76°39'8,90'; 14,7 msnm.
- Magdalena Medio (M): Finca Cannes, ubicada en la vereda Betulia del municipio de Maceo (N 06°31'6,52'; W 76°49'4,89'; 1048,0 msnm).

### 1.2.4 Cosecha

Los cuatro clones fueron cosechados a partir de la producción de la cosecha travesía o secundaria de 2017 en el departamento de Antioquia. En el Bajo Cauca se llevó a cabo al inicio de marzo, en Urabá los primeros días de mayo y en el Magdalena Medio a mediados del mismo mes.

---

<sup>2</sup> Resolución ICA 4180 de Dic 2 de 2014. Registro comercial FEC-2 (Fedecacao El Carmen, Santander)

<sup>3</sup> Resolución ICA 4181 de Dic 2 de 2014. Registro comercial FLE-2 (Fedecacao Lebrija, Santander)

Las mazorcas fueron colectadas cuando alcanzaron el grado de maduración requerido para llevar a cabo la fermentación, de acuerdo con el criterio de los productores de cada unidad productiva.

En la Tabla 1-1 se listan los municipios seleccionados por Fedecacao para el muestreo en cada subregión.

**Tabla 1-1:** Municipios, fincas y productores seleccionados como proveedores de cacao en las tres subregiones del departamento de Antioquia (Bajo Cauca, Magdalena Medio y Urabá) objeto de estudio.

<b>Bajo Cauca</b>		
<b>Municipio</b>	<b>Finca</b>	<b>Productor</b>
Valdivia Vereda La Paulina	Nápoles	Edilson Andrés Rodríguez
	La Primavera	Darío Escobar
Cáceres Isla La Dulzura	Dios con Nosotros	Alidia María López
	Los Placeres	Eusebio Terán
<b>Magdalena Medio</b>		
<b>Municipio</b>	<b>Finca</b>	<b>Productor</b>
Caracolí Cascarón	La Quebra	Isidoro Bedoya
	La Parcelita	Norbey Pulgarin
	Vista Hermosa	María Dolly Zapata García
Yalí Montebello	Chaparral	Yanira Ortiz Linero
Yolombó Vereda Caramanta	Hacienda Buenos Aires	Darío Betancur Sánchez
Maceo Vereda Betulia	Cannes	Evelio González Agudelo
<b>Urabá</b>		
<b>Municipio</b>	<b>Finca</b>	<b>Productor</b>
Apartadó Apartadó	No hay como Dios	Julio César Álvarez
		Luz Dary Pérez

**Tabla 1-1:** (continuación)

Carepa Chigorodó Chigorodó - Vereda Negritos Chigorodó - Vereda Veracruz Chigorodó Chigorodó		Gerardo Antonio Gómez
		Albeiro Peña
	El Potrerito	Fanny Usuga
	La Suiza #3	Gilberto Peña Guzmán
		Luis Carlos Peña
Chigorodó		Víctor García
Champitas- Chigorodó	La Linda	Luis Albeiro Cuesta
El Bijao – Chigorodó Turbo Turbo	Hasta aquí	Antonio Muñetón
	Agropajares	Lino Antonio Ramírez
	La Coquera	Ismael Flórez

### 1.2.5 Fermentación

La cosecha fue realizada en las tres subregiones y las etapas de poscosecha se llevaron a cabo en las zonas descritas en el ítem 1.2.3. Antes de iniciar este estudio, se desarrolló un montaje preliminar para realizar un seguimiento a una fermentación espontánea como referencia en 2015 (Anexo 1.1). En diciembre de 2016 se ejecutó un piloto de la fermentación y el proceso de secado solar en dos de las subregiones, Urabá y Magdalena Medio, para prever las condiciones logísticas.

La apertura de las mazorcas se realizó, como máximo, 36 h después de la cosecha. Cada una de las partes del fruto (cáscara, placenta y granos en baba) se pesó de forma individual por clon, para calcular posteriormente el respectivo índice de mazorca y rendimiento. A partir del desgrane, el cacao en baba tuvo un tiempo de escurrido entre 4 y 6 h antes del pesaje para la obtención de la mezcla de los clones en las siguientes proporciones: CCN-51 (85.9 %), ICS-1 (3.0 %), FLE-2 (3.2 %) y FEC-2 (7.9 %).

El fermentador empleado tuvo un diseño tipo escalera con tres niveles, cada uno de ellos con tres compartimentos y una capacidad máxima de 149 kg y 153 kg de llenado por cajón, para facilitar la agitación. Se emplearon los tres cajones horizontales centrales y se identificaron como cajón 1, cajón 2 y cajón 3. Las dimensiones de los cajones son: ancho: 0,65 m; largo: 0,7 m y alto: 0,65 m, con perforaciones en el fondo de 0,8 cm de diámetro, separadas 15 cm entre ellas para facilitar el drenaje de las exudaciones de la parte

mucilaginosas de las almendras frescas de cacao (ver Foto (1-1)). En las tres subregiones se empleó el mismo tipo de fermentador, construido a partir de madera blanca tipo Roble (*Quercus*).

**Foto 1-1:** Estructura del fermentador tipo escalera construido en madera de roble, con capacidad máxima por cajón de 153 kg, empleado para realizar la fermentación en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio.



La mezcla fue depositada en las proporciones y orden mencionado en cada uno de los compartimentos, y luego se homogeneizó de forma manual con agitadores de madera de Roble dispuestos para cada cajón. Posteriormente se introdujo una sonda para la medición cada hora del pH y temperatura de la superficie de los granos usando un pH metro (3310 WTW, Alemania), y se procedió a cubrir los cajones con hoja de bijao y costal de fique.

Durante las primeras 48 h se propiciaron las condiciones micro-aerobias sin realizar ningún tipo de agitación de la mezcla. A partir del segundo día de fermentación se da inicio a la etapa aerobia con el volteo de la mezcla llevada a cabo con agitadores de madera de roble. Este procedimiento se repitió cada 24 h hasta que el productor en cada zona de estudio indicó que había alcanzado las condiciones de fermentación, siendo 132 h en Bajo Cauca y Urabá y 168 h en Magdalena Medio.

### **1.2.6 Muestreo y tratamiento de la muestra**

La toma de muestra para el seguimiento de la evolución de la mezcla se realizó en varios momentos: i) a cada clon antes de realizarse la mezcla, ii) a la mezcla homogeneizada antes de iniciar la fermentación de la muestra (tiempo cero de fermentación), y iii) cada 24 h una vez iniciada la fermentación (antes de realizar los volteos) hasta finalizar esta etapa. El muestreo se realizó de acuerdo con la práctica recomendada por Perú & Costa (2009) con algunas modificaciones: se extrajeron, de forma aleatoria, 300 g aproximadamente por cajón de la masa en fermentación en tres alturas (fondo, medio y superficie) (Perú & Costa, 2009).

La muestra se dividió en dos para su debida conservación, siempre teniendo en cuenta los requerimientos normativos de algunas de las posteriores pruebas de análisis o los procedimientos establecidos durante la estandarización o validación de los métodos cromatográficos. La primera consistió en tomar de la muestra extraída 100 g de los granos frescos (aproximadamente 50 granos), a los cuales se les retiró el mucílago y se empacó separado del cotiledón en un tubo cónico para su congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su respectivo análisis (acidez total, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos). La segunda porción de 200 g se dispuso sobre una marquesina en un área de 0.6 cm por 0.6 cm, distribuida en una capa delgada que ocupaba el 70 % del área, con el fin de realizar un secado solar de la muestra en los diferentes tiempos de muestreo de la fermentación, para aquellos análisis que exigían bajos contenidos de humedad, como: pruebas bromatológicas, polifenoles totales, ORAC, alcaloides y monómeros de procianidinas. Esta última práctica se establece como alternativa para evitar errores en el análisis químico por incluir tratamientos térmicos como secado por horno o liofilización, lo que puede afectar la composición con respecto a la que regularmente se emplea en campo, que es el secado natural.

Los granos de cacao sin mucílago y congelados se sometieron a la reducción de tamaño en un molino (Modelo N° 80370 - Hamilton Beach, USA) y el tamaño de partícula fue seleccionado entre 594 y 420  $\mu\text{m}$  al pasarlo por tamiz N° 40.

El cacao molido fue almacenado así: un gramo fue dispuesto en un vial para cromatografía gaseosa de 20 mL y sellado herméticamente con tapa de septa blanca recubierta en teflón (Thermo, Fisher, USA) y almacenado a temperatura de refrigeración (entre 8 y 12 °C) hasta su análisis cromatográfico. La muestra restante se dispuso en un recipiente de polipropileno de alta densidad con tapa de rosca y a su vez este empaque se conservó dentro de una caja plástica que contenía silica gel para evitar la absorción de humedad de la muestra durante su reposo bajo congelación a -20 °C.

### 1.2.7 Parámetros para la determinación de la calidad durante fermentación

- **Índice de fermentación (antocianinas totales):** este parámetro fue determinado mediante el cálculo de la relación de absorbancia a 460 nm y 530 nm, a partir de 100 mg del cotiledón molido y tamizado sometido a una extracción con 10 mL de mezcla de metanol:HCl (97:3) en un tubo de reacción de 20 mL. La mezcla se agitó en un vórtex durante 2 min y se dejó reposar a (8 °C) de 16 a 19 h; 200 µL del sobrenadante fue retirado con una micropipeta para ser llevado a una microplaca de poliestireno de 96 pozos (Costar, USA) para la lectura de la absorbancia en un espectrofluorómetro Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Las lecturas se realizaron por triplicado (Bedoya, 2016).

- **Color:** la medición del color del grano del cacao fermentado y seco se realizó con colorímetro (PCE-CSM 4, España). El índice de color (IC) se calculó a partir de la ecuación 1-1:

$$IC = \frac{a^* \cdot 1000}{L^* \cdot b^*} \dots \dots \dots \text{Ec. 1-1}$$

a\*, b\* y L\* son los parámetros del sistema color CIELAB, los cuales se utilizaron para calcular el croma (C\*) y los valores de ángulo de tono (hab). L\* indica la luminosidad de 0 (negro) a 100 (blanco). Valores de a\* positivos y negativos representan tonalidades rojo y verde, respectivamente, mientras que resultados positivos y negativos de b\* representan amarillo y azul, respectivamente. C\* denota la saturación o la pureza del color, así los valores cercanos al centro (mismo valor de L\*) indican colores apagados o grises, mientras que valores cercanos a la circunferencia representan colores vivos o brillantes. Los valores

del ángulo Hue representan: 0 correspondiente a enrojecimiento, 90 de amarillez, 180 de verdor y 270 azules (Vignoni, Césari, Forte, & Mirábile, 2006).

### 1.2.8 Caracterización bromatológica

El análisis proximal de los granos de cacao se llevó a cabo bajo los métodos oficiales AOAC y consistió en la determinación del contenido de nitrógeno total y proteína (970.22), fibra cruda (930.20), cenizas (972.15), humedad (931.04) y el contenido de extracto etéreo (925.07); cada análisis requirió de algunas modificaciones descritas a continuación (Abbasipour, Mahmoudvand, Rastegar, & Hosseing, 2011).

- **Cenizas:** los crisoles vacíos fueron sometidos a un calentamiento de 550 °C durante 2 h y se equilibró la temperatura hasta ± 40 °C dentro de la mufla (Terrígeno, Colombia), seguido por un enfriamiento hasta alcanzar la temperatura ambiente en un desecador. Luego se registró el peso del crisol previamente marcado (**C0**). 2 g de muestra fue pesado en el crisol previamente tarado y deshumedecido (**C1**). La muestra fue calcinada a 550 °C durante 1 h, se retiró y dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se adicionaron tres gotas de agua destilada sobre la muestra y se volvió a calcinar durante 5 h hasta obtener cenizas blancas o grisáceas. Se realizó el enfriamiento hasta alcanzar la temperatura ambiente, igual que el crisol vacío, y se prosiguió con el registro del peso del crisol con la muestra calcinada (**C2**). Si el residuo al terminar la incineración presentaba un color negro, se solubilizaba con 2 mL de agua destilada para volver a calcinar.

Para calcular el porcentaje de cenizas (% p/p) se aplica la ecuación 1-2:

$$\text{Porcentaje de Cenizas (\%C)} = \frac{C_2 - C_0}{C_1} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec: 1-2}$$

- **Fibra cruda:** se partió de la muestra sometida a calentamiento a 105 °C durante 1 h hasta alcanzar peso constante o hasta 5-10 % de humedad final. Se pesó exactamente 0.3 ± 0.02 g de muestra en cada uno de los crisoles, valor registrado como (**F0**). Se aseguraron los crisoles con la muestra en el equipo (Serie Fiwe 6, VELP Scientifica, Italia) y se adicionaron 125 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.25%) previamente calentados hasta ebullición. Se

adicionaron 3-5 gotas de n-octanol como agente antiespumante. Una vez la mezcla alcanzó la ebullición, se dejó la digestión durante 30 min. El ácido sulfúrico fue drenado y la muestra se lavó 3 veces con 30 mL de agua caliente. Luego de drenar el último lavado, se adicionaron 150 mL de KOH (1.25%) en ebullición y se repitió el mismo procedimiento realizado con el ácido. El último lavado se realizó con agua fría destilada seguido por 25 mL de acetona fría. Se repitió por triplicado el lavado agitando cada vez con aire comprimido. Los crisoles se pesaron una vez se evaporaron las trazas de acetona, después de secarlos en el horno a 105 °C durante 1 h, o hasta alcanzar peso constante, y de llevarlos al desecador para enfriar. Este peso representa la fibra cruda más el contenido de cenizas en comparación al peso inicial **(F1)**.

Para cuantificar las cenizas restantes en la muestra, que no fueron removidas por la digestión ácido-básica, se llevaron los crisoles a la mufla a 550 °C durante 3 h, y se enfriaron en el desecador antes de ser pesados nuevamente **(F2)**. Para calcular el porcentaje de fibra cruda se aplicó la ecuación 1-3:

$$\text{Porcentaje de Fibra } (\%F) = \frac{F_1 - F_2}{F_0} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec: 1-3}$$

**Humedad:** el contenido de humedad se determinó por el método gravimétrico que consistió en el registro del peso de 2 g del cotiledón molido y tamizado o mucílago **(P0)** y se llevó a secado en estufa con convección (Memmert, modelo UN55) a 105±0.2 °C hasta alcanzar un peso constante **(P1)**. El resultado se reporta como el contenido de humedad en base húmeda ( $X_{bh}$ ), según la ecuación 1-4:

$$\text{Contenido de humedad}_{bh} (X_{bh}) = \left| \frac{P_1 - P_0}{P_0} \right| \dots\dots\dots \text{Ec: 1-4}$$

- **Proteína:** el contenido de nitrógeno total y porcentaje de proteína fue determinado por el método de Kjeldahl, el cual consta de tres etapas, que se dividen en la digestión de la muestra, la destilación con arrastre de vapor del amoniaco producido y la valoración ácido base de este amoniaco.

La digestión partió del registro del peso del cotiledón, previamente homogeneizado entre 0,1000 g - 0,3000 g. Luego se llevó al tubo digestor, seguido por la adición de 10 mL de

ácido sulfúrico (96%) y 4,0 g de catalizador, que consta de una mezcla previa de 100 g de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y 1,6 g de sulfato de cobre ( $CuSO_2$ ). La mezcla fue dispuesta en el equipo de digestión de nitrógeno (Velp Scientific modelo DK 20, Italia) con una rampa previa que inició en 120 °C, con aumento hasta 200 °C y 310 °C, permaneciendo 5 min al alcanzar cada temperatura hasta finalizar en 420 °C por 45 min. La destilación fue realizada en un equipo (modelo UDK 142, Italia) de manera automática antes de la titulación, para la cual se adicionaron 3 gotas de indicador mixto o de Tashiro (solución verde) antes de valorar el borato de amonio formado con HCl 0.1 N. La titulación finalizó cuando la solución viró a color violeta y este permaneció por 30 segundos.

Para calcular el contenido de nitrógeno total y el porcentaje de proteína se aplicaron las siguientes ecuaciones 1-5 y 1-6:

$$\text{Porcentaje de Nitrógeno (\%N)} = \left\{ \frac{[(14^{mg}/meq) \times (V_m - V_b) \times N] \times 100}{W} \right\} \dots\dots\dots \text{Ec:1-5}$$

$$\text{Porcentaje de proteína (\%P)} = \%N \times F \dots\dots\dots \text{Ec: 1-6}$$

Donde:

%N= Porcentaje de Nitrógeno total

N= Normalidad de la solución tituladora

14 mg= Peso de un mili-equivalente de Nitrógeno

Vb= Volumen en mL de HCl 0.1N gastados por el blanco de reactivos

Vm= Volumen en mL de HCl 0.1N gastados por la muestra en la titulación

W= Peso en mg de la muestra de cacao

F= Factor de cálculo para hallar el porcentaje de proteína de acuerdo con la muestra analizada. Para cacao 6.25.

%P= Porcentaje de proteína en base húmeda.

**Extracto etéreo obtenido por Soxhlet:** 2 a 3 g de muestra tamizada (**P2**) se transfirió a un dedal de celulosa. Los vasos para la recolección del extracto etéreo fueron sometidos a calentamiento a 105 °C por 2 h aproximadamente y enfriados en desecador previo al registro de su peso vacío (**P0**), para luego ser llenados con 90 mL del solvente empleado

en el estudio para la extracción del contenido etéreo (cloroformo-metanol, diclorometano, ciclohexano, dietil éter y hexano).

La muestra en el dedal y los vasos de recolección fue llevada al equipo Soxhlet (Velp Scientific SER 148, Italia), en el cual se programaron tres etapas que iniciaron una vez alcanzada la temperatura de trabajo a 130 °C. La primera duró 180 min para extracción (*Inmersion*), la segunda consistió en 60 min de lavado (*Washing*) y por último 25 min para recuperar el solvente (*Recover*).

Finalizadas las etapas, los vasos receptores fueron sometidos a secado a 105 °C y enfriados a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante (**P1**). Las anteriores etapas fueron repetidas cuatro veces sobre el cacao inicial y el % EE fue calculado mediante la ecuación 1-7:

$$\text{Porcentaje extracto etéreo (\%EE)} = \frac{P_1 - P_0}{P_2} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec: 1-7}$$

- **Extracto etéreo obtenido por Ultrasonido:** la cuantificación del %EE a bajas temperaturas fue llevada a cabo de acuerdo con el método reportado por Carrillo et al. (2014) con algunas modificaciones. Los resultados fueron comparados con los obtenidos por Soxhlet. 100 mg de muestra fueron pesados en un tubo de reacción plástico (P2) y 1.5 mL del solvente seleccionado como óptimo mediante la extracción por Soxhlet fueron adicionados. La mezcla fue agitada 30 s en un vórtex a 3000 rpm y luego fue llevada a un baño de ultrasonido por 10 min a 25 Hz y una frecuencia del 99 % a 25 °C. El extracto fue centrifugado a 14000 rpm, por 15 min, a 10 °C; luego, el supernadante fue removido y llevado a un tubo de reacción de vidrio previamente pesado (P0). El procedimiento completo fue repetido cuatro veces sobre el cacao inicial. El extracto disuelto en el solvente orgánico fue retirado en un evaporador con nitrógeno (Thermo Scientific™ Reacti-Vap™ Evaporator) para registrar finalmente el peso (P1). El contenido de EE fue calculado con la ecuación 7 (Carrillo, Londoño-Londoño, & Gil, 2014).

### 1.2.9 Caracterización física y química

- **Acidez total (AT) y pH:** la concentración total de los ácidos orgánicos presentes en el cotiledón y mucílago por medio del método potenciométrico requirió de la estandarización de la obtención de la solución de análisis para el cotiledón.

La estandarización del método consistió, primero, en la técnica de separación del sólido del sobrenadante al emplear centrifugación en lugar de filtración después de la extracción, como se reporta en las normas internacionales y publicaciones indexadas. Segundo, en la forma de preparar la muestra a analizar (cotiledón o mucílago) en las diferentes etapas de poscosecha.

La extracción se realizó, por un lado, sobre una mezcla del cotiledón molido y tamizado con agua a temperatura de ebullición, en una relación sólido:solvente (1:9), que después fue agitada en un vórtex durante 30 s a 3000 rpm. Posteriormente, fue llevada a un baño maría programado a 85 °C por 60 min, con agitación media. Por otro lado, el mucílago seleccionado de una muestra obtenida a partir de 10 granos fue disuelto en agua a ebullición en una relación (1:4). La mezcla fue licuada a velocidad media durante 20 s.

Para separar los sólidos del extracto ácido, cada una de las mezclas fue centrifugada a 5000 rpm a 15 °C durante 25 min. Una alícuota de 5 mL fue retirada para la medición del pH con un potenciómetro (InoLab® pH 7110 New) a 20 ±5 °C. Una vez registrado este valor, la muestra fue titulada con NaOH (0.01 N) hasta alcanzar la neutralización de todos los ácidos orgánicos presentes a un pH entre 8.27 a 8.33, de acuerdo el métodos internacional A.O.A.C 970.21, con algunas modificaciones sugeridas por Nazzaduri (2006) y Guehi (2010) (Guehi, Dabonne, Ban-Koffi, Kedjebo, & Zahouli, 2010; Nazaruddin, Seng, Hassan, & Said, 2006; Official Methods of Analysis, 2016).

- **Contenido de polifenoles totales (CPT):** el contenido de compuestos fenólicos fue analizado mediante el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Se realizó una dilución de 30 µL de ácido gálico (10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) y 30 µL de la muestra previamente diluida con agua destilada en una relación (1:60) respectivamente.

La mezcla fue adicionada a un microplato de poliestireno con 96 pozos (Costar, United States). Después de 6 min, se adicionaron 30 µL de carbonato de sodio (10 % p/v), y a continuación 15 µL del reactivo Folin-Ciocalteu, excepto por el blanco (agua). Luego, la mezcla fue incubada a 25 °C por 60 min y la absorbancia fue registrada a 760 nm en el lector de placas del espectrofluorómetro (Synergy HT, United States). El CPT fue expresado como equivalente de ácido gálico en miligramos por gramo de muestra seca (mg GAE/g muestra seca). Todas las medidas se realizaron por triplicado (Kahkonen *et al.*, 1999). La curva de calibración fue construida mediante una ecuación de regresión lineal. Los valores interpolados corresponden a la concentración en µg/mL equivalentes de ácido gálico en la muestra. El modelo de cálculo para expresar los resultados como GAE (mg/g) o (mg/100mL) fue expresado por la ecuación 1-8.

$$GAE_{mg/g_{seco}} = \frac{\left(\frac{\mu g}{mL} \text{ de la curva}\right) \left(\frac{1 mg}{1000 \mu g}\right) (FD)}{g_{muestra}} \dots\dots\dots Ec 1-8$$

Los valores de GAE de los tres experimentos independientes se expresaron como la media ± desviación estándar.

- **Capacidad de absorción de radicales libres (ORAC):** el método se basó en reportes previos de Ou y otros (2001) con algunas modificaciones. Trolox fue usado como estándar para la construcción de la curva de calibración de concentraciones a 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 µM, en búfer fosfato 10 mM, pH 7.4. En una microplaca de 96 pozos (Costar, USA) se adicionaron en estricto orden fluoresceína, buffer fosfato, la dilución respectiva de Trolox (5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 µM) y la muestra previamente extraída por el mismo método empleado para la determinación del CPT, que se diluyó en un buffer fosfato en una relación (1:200). La mezcla se llevó al plato del lector de placas donde se incubó durante 30 min a 37 °C. Pasado este tiempo se le adicionó a cada pozo la solución de AAPH y se procedió a la medición por triplicado de la intensidad de la fluorescencia cada 2 min durante 2 h, con una longitud de onda de excitación a 485 nm con una abertura de 5, emisión a 520 nm y abertura de 13, así como un atenuador de 1 % (Ou, B., Hampsch-Woodill, M. and Prior, 2001).

La protección del antioxidante se midió a partir del área de fluorescencia bajo la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, donde el antioxidante no está presente. La AUC se calculó mediante la ecuación 1-9.

$$AUC = \left( 0,5 + \left( \sum_{i=1}^{31} \frac{f_i}{f_1} \right) \right) \times CT \dots \dots \dots \text{Ec: 1-9}$$

I: número de ciclos, F: unidades de fluorescencia, CT: tiempo de cada ciclo en minutos (CT = 2)

El área neta bajo la curva (AUC neta) se encontró por diferencia entre el AUC de la muestra y el AUC del blanco. Esta AUC neta (Y) se expresó con respecto a la concentración de Trolox como patrón (X), obteniendo una ecuación de comportamiento lineal; a partir de ésta, se calcularon las moles equivalentes de Trolox (ET) por litro de muestra y el resultado se expresó en micromoles de Trolox por gramo de muestra ( $\mu\text{mol Tx/g muestra}$ ), de acuerdo con la ecuación 1-10:

$$ORAC = \frac{ABC_{AH}}{ABC_{Trolox}} * \frac{[Trolox]}{[AH]} \dots \dots \dots \text{Ec:1-10}$$

ABC AH: Área bajo la curva en presencia de antioxidante, ABC Trolox: Área bajo la curva de Trolox, [Trolox]: Concentración de Trolox y [AH]: Concentración de Antioxidante.

La caracterización analítica comprendió la identificación y cuantificación de azúcares, manitol, aminoácidos, ácidos volátiles y no volátiles, así como alcaloides y monómeros de procianidinas a partir del cacao fermentado y sin fermentar, previamente molido, tamizado y en algunos casos desengrasado por el método asistido por ultrasonido.

- **Cuantificación de azúcares:** el método para la cuantificación de los disacáridos: sacarosa y maltosa y, de sus respectivos monómeros glucosa y fructosa, así como el poliol manitol, fue validado a partir de las condiciones de operación reportadas por Márquez-Sillero y colaboradores con modificaciones para el análisis del cacao (cotiledón y mucílago en diferentes etapas de poscosecha)(Márquez-Sillero, Cárdenas, & Valcárcel, 2013). La curva de calibración partió de las soluciones stock de cada compuesto a una concentración

de 1000 mg L<sup>-1</sup> en MilliQ H<sub>2</sub>O. Estas fueron estables durante 1 mes a 3 ° C en el refrigerador.

Para evaluar el efecto matriz, se prepararon tres curvas de calibración en las siguientes concentraciones: 0.1, 0.5, 1.5, 10, 20 y 30 mg L<sup>-1</sup> de fructosa, glucosa, sacarosa y manitol y dos concentraciones más para maltosa (40 y 50 mg L<sup>-1</sup>). La primera curva fue disuelta en solvente, en este caso acetonitrilo, y en las otras dos curvas se adicionaron 200 µL de las soluciones matriz (A: cacao en fermentación y B: cacao seco) y se aforaron hasta 1 mL con acetonitrilo.

La obtención de la matriz A se realizó a partir de una mezcla de 1 g de cotiledón sin mucílago molido y tamizado de cada muestra recolectada, todos los días durante la fermentación. La matriz B se preparó con la mezcla de 1 g del cotiledón de las muestras recogidas cada día de secado solar. Ambas mezclas se sometieron a la extracción por SPE antes descrita, pero los extractos empleados como matriz A y B fueron obtenidos después de eluir en un tubo de microcentrífuga 1 mL adicional de agua Tipo I (después de pasar por el cartucho los 80 µL de muestra y 720 µL de agua Milli Q). Ambas soluciones se usaron como blanco de fermentación y secado, por separado.

El análisis cromatográfico se realizó usando un UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific™ Dionex™ Corona™ Veo™). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna Shodex Asahipak NH2 P-50 4E (5 µm, 150 mm por 4,6 mm) a 30 ° C y se definieron 10 µL de muestra como volumen de inyección. La composición de la fase móvil fue acetonitrilo: agua 75:25 (v / v) y el caudal se fijó a 1 mL min<sup>-1</sup> durante 19 minutos para cada muestra.

El detector de aerosol con carga corona (C-CAD) se configuró de la siguiente manera: el generador de nitrógeno (Peak Scientific, EE. UU.) se seleccionó como gas nebulizador a una presión de 60 ± 7 psi (pureza del gas ≥ 99%) y una velocidad de recolección de 10 Hz.

Se evaluaron tres temperaturas de la cámara evaporativa (35, 40 y 45 °C) usando una combinación de estándares, seguida por una prueba del filtro de la señal a niveles bajo,

medio y alto (0.2, 3.6 y 10 s). El análisis de datos cromatográficos se llevó a cabo utilizando un software Chromeleon 7.0

El método de validación propuesto se aplicó a muestras fermentadas y secas de cacao. Todas las muestras se analizaron siguiendo los conjuntos de datos de validación llevados a cabo según las directrices europeas SANTE / 11975/2015 (European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, 2015). Se evaluaron especificidad o selectividad, efecto de matriz, linealidad, precisión y rango de trabajo, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

- **Extracción de azúcares y ácidos orgánicos:** los azúcares presentes en el cacao, tales como la sacarosa, maltosa, fructosa y glucosa, así como el poliol y manitol, acompañados de los ácidos orgánicos no volátiles como el cítrico, málico, oxálico y succínico (de gran importancia durante la etapa de fermentación), pudieron ser extraídos bajo el mismo método asistido, como se describe a continuación bajo el método validado para azúcares.

20 mg del cotiledón fermentado con un alto grado de humedad (> 10 %) o 10 mg de este pero seco (< 10 %) fueron disueltos con 600  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O de MilliQ en un tubo de microcentrifuga de 2 mL. Luego, la suspensión se mezcló 5 min durante 3000 rpm en vórtex y se suspendió en un baño de ultrasonidos (15 min, 25 Hz, 25 ° C, 99%), seguido de una centrifugación a 10000 rpm durante 15 min.

La eliminación de los compuestos coloreados por presencia de polifenoles, entre otros, se realizó mediante una extracción en fase sólida, SPE por sus siglas en inglés, con el uso de cartuchos Vac SePak C18 1 cc 50 mg (Waters, EE. UU.), previamente activados con metanol y agua Tipo I instalados en una cámara con vacío o Manifold. 80  $\mu$ L del sobrenadante obtenido se pasó a través de un cartucho seguido por 720  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MilliQ.

El extracto obtenido fue llevado a un vial bajo las siguientes condiciones: para el análisis de los ácidos se tomaron 400  $\mu$ L del extracto y 200  $\mu$ L de buffer fosfato pH 2.8 (20 mM). Para el estudio de azúcares y manitol se emplearon 400  $\mu$ L del extracto y 200  $\mu$ L de

acetonitrilo. Ambas preparaciones se agitaron en vórtex a 3000 rpm por 30 s, antes de proseguir con la separación cromatográfica.

Finalmente, los compuestos de análisis presentes en el mucílago se extrajeron directamente de la mezcla obtenida para determinar la acidez total, de la cual se tomaron 400  $\mu$ L y se diluyeron con 3600  $\mu$ L de acetonitrilo. La mezcla diluida se filtró a través de una membrana de 0.45  $\mu$ m para ser llevada a un vial para el análisis cromatográfico.

▪ **Cuantificación de ácidos orgánicos no volátiles:** la cuantificación de los ácidos orgánicos a partir del extracto obtenido por SPE, se basó en un método cromatográfico. Para esto, se empleó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia UHPLC Ultimate 3000 Thermo Scientific™ (Sunnyvale, CA, EE. UU.) acoplado a un detector Dionex™ Corona™ Veo RS™. Los datos cromatográficos fueron registrados y analizados con el software Chromeleon versión 7.0.

Las condiciones cromatográficas se basaron en el procedimiento descrito por Regueiro y colaboradores con algunas modificaciones (Regueiro, Vallverdú-Queralt, Simal-Gándara, Estruch, & Lamuela-Raventós, 2013). La fase móvil consistió en una solución acuosa de ácido fórmico 20 mM con un pH 2.8 (A) y acetonitrilo (B). La temperatura de la columna Acclaim™ 120 C18 (4,6 mm por 150 mm, 5  $\mu$ m) se mantuvo a 40 °C y el volumen de inyección se estableció en 10  $\mu$ L. El flujo de la fase móvil fue de 0.7 mL/min y para la elución se usó un programa de gradiente que inició con 95 % A y 5 % B, seguido por una primera disminución lineal a 90 % A 10 % B desde 0 a 3.5 min y se mantuvo hasta 4.5 min, y una segunda hasta 75 % A 25 % B, 4.5-5.0 min, donde se mantuvo 2 min y finalizó con un incremento lineal de 7.0-8.0 min hasta alcanzar las condiciones iniciales y se sostuvo de 8.0 a 8.5 min. La temperatura del detector fue 35 °C, con un filtro de 2 s y una velocidad de colección de datos de 10 Hz.

La cuantificación de los ácidos se llevó a cabo mediante curva de calibración con estándar externo a partir de una solución stock de cada ácido solubilizado en agua Tipo I. Las condiciones de rango de concentración estuvieron comprendidas entre 0.1 y 70 mg/L. Cada una de las soluciones consistió en una solución compuesta por 300  $\mu$ L de extracto y aforado hasta 1000  $\mu$ L con acetonitrilo, con el fin de corregir el efecto matriz. La matriz fue

obtenida de la recolección del extracto de cacao obtenido por SPE, como se mencionó antes, de una muestra tratada que se preparó con la mezcla de 1 g de cada uno de los cotiledones molidos y tamizados colectados todos los días de fermentación.

Los valores de las curvas de calibración presentaron un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) desde 0.995 a 0.999 con valores de residuales inferiores a 20%. La verificación del método de extracción se realizó mediante el dopaje de la muestra antes de ser sometida a la extracción a un nivel medio de concentración de la curva de calibración de cada ácido, para la determinación del porcentaje de recuperación o precisión intermedia.

- **Cuantificación de ácidos volátiles por HPLC:** se implementó una metodología cromatográfica para la cuantificación de ácido acético y láctico. Para esto, se empleó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC UltiMate™ 3000 Dionex, Thermo Scientific (Sunnyvale, CA, EE. UU.) acoplado a un detector de arreglo de diodos y múltiple longitud de onda DAD-3000RS. Los datos cromatográficos fueron registrados y analizados con el software Chromeleon versión 7.2.

Las condiciones cromatográficas se basaron en el procedimiento descrito por S Doores y colaboradores con algunas modificaciones (Doores, 1993). La columna empleada fue YMC™ ODS-AQ S-5 120Å (4.6 por 250 mm) que se mantuvo a 30 °C. El volumen de inyección de la muestra fue 20 µL, el cual fue eluido con la fase móvil, conformada por A: buffer fosfato de sodio pH 2.8 (20 mM) y B: agua ultra pura programada en modo isocrático a un flujo de 0.7 mL/min, durante 10 min.

El análisis se realizó a una longitud de onda de 220 nm y la cuantificación de cada ácido se llevó a cabo mediante una curva de calibración con estándar externo, en un rango de concentración de entre 0.3 ppm - 20 ppm y coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para ácido acético de 0.99952 y láctico 0.99915 mg L<sup>-1</sup>, con residuales por debajo del 20 %.

- **Extracción y cuantificación de ácido acético por GC-MS:** la cuantificación del ácido acético en concentraciones inferiores a 10 mg L<sup>-1</sup> se determinó en un equipo Tri Plus Cromatógrafo de Gases, modelo Trace GC 1300/1310 acoplado a un detector de masas de Triple cuadrúpulo TSQ Duo y olfatómetro, GC-MS/MS-O, aplicando una microextracción

en fase sólida en espacio de cabeza HS-SPME, por sus siglas en inglés *Head Space - Solid Phase Micro-extraction* de acuerdo al método reportado por Oliveira y colaboradores, con algunas adaptaciones a partir de la optimización del tiempo y temperatura de extracción (L. F. Oliveira et al., 2016a).

Una vez la muestra fue adecuada, se mantuvo reservado en un vial 1 g de cacao molido y tamizado sin mucílago, para el cacao crudo, o sin testa, para los granos secos, para cromatografía gaseosa de 20 mL. El vial fue sellado con una tapa de septa blanca recubierta con teflón. Antes del análisis cromatográfico se adicionó 1 mL de una solución saturada de NaCl y se mezcló en un vórtex por 10 s. La extracción se realizó directamente en el puerto de inyección con auto muestreador robótico Triplus RSH (*Robotic Sample Handling*) Olfatómetro - G300022 PHASER System, 600 mm TL, *Voice software*, acoplado al cromatógrafo, el cuál mejora el rendimiento del inyector automático y garantiza el manejo adecuado para ejecutar la técnica de introducción de muestra *Head Space* y el sistema de extracción en fase sólida (SPME).

La extracción fue evaluada a tres temperaturas de estudio (40, 50 y 60 °C) y tiempo de extracción (10, 30 y 50 min) durante la incubación de la muestra expuesta a una fibra polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB) de 65 µm (Supelco, USA), parámetros previamente reportados (A. M. de Oliveira, Rosa Pereira, Marsaioli, & Augusto, 2004; Diab, Hertz-Schünemann, Streibel, & Zimmermann, 2014; Ducki, Miralles-Garcia, Zumbé, Tornero, & Storey, 2008; Misnawi & Ariza, 2011a; Perego, Fabiano, Cavicchioli, & Del Borghi, 2004; Pini, De Brito, García, Valente, & Augusto, 2004; Rodriguez-Campos et al., 2012a).

La fibra fue activada, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, a 250 °C por 30 min, y luego se adecuó durante 15 min a 48.6 °C. La extracción de los compuestos volátiles presentes en cacao molido y tamizado inició al exponer la fibra en el espacio de cabeza del vial (profundidad de la fibra en el vial 10 mm) con agitación inicial por 2 minutos, seguido por una incubación sin movimiento a las condiciones óptimas encontradas a 48.6 °C hasta finalizar el ciclo de 50 min, con 45 s de agitación y 120 s de reposo.

La separación cromatográfica y detección espectrométrica comenzó con la desorción de los compuestos volátiles concentrados en la fibra en el puerto de inyección a 250 °C por 10 min. La separación de un volumen de muestra de 1000 µL se produjo en modo *Splitless* en una columna Trace TR-WAXMS 60 m por 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de la película (Thermo Scientific, USA). La temperatura de la línea de transferencia y del inyector se mantuvo a 250 °C y el flujo del gas de arrastre para la elución se estableció en 1 mL/min de He con una rampa programada a 40 °C por 5 min, que se incrementó hasta 180 °C a una velocidad de 4 °C min<sup>-1</sup> y finalmente hasta 260 °C a una velocidad de 10 °C min<sup>-1</sup> donde se sostuvo por 2 min. La detección en el espectrómetro de masas empezó con la ionización en la fuente a 230 °C y la temperatura del cuadrúpolo estuvo a 150 °C. El modo de detección se estableció en *Scan* cada 0.2 s en un rango de masas de 30-500 uma.

La cuantificación se realizó con dos curvas de calibración a partir de un estándar externo de ácido acético con una pureza de 99.99 %. Cada concentración se preparó a partir de una solución stock y se aforó hasta 1 mL con la solución saturada de NaCl para cubrir un rango desde 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 10 mg L<sup>-1</sup> con R<sup>2</sup> (0.999), y la segunda curva 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg L<sup>-1</sup> con R<sup>2</sup> (0.9994) y residuales inferiores a 20 %.

- **Extracción y cuantificación de aminoácidos:** la cuantificación de los aminoácidos se evaluó en el extracto obtenido de la dilución de 1 g de muestra con 5 mL de agua MilliQ a temperatura de ebullición en un tubo de reacción tipo Falcon de 15 mL. La mezcla fue agitada en vórtex durante 5 min a 3000 rpm antes de ser sometida a calentamiento en un baño ultrasonido por 5 min, 25 Hz de frecuencia, 25 °C y 99 % potencia. La decantación de la fase sólida se realizó por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min a 15 °C. Luego, 800 µL del sobrenadante se mezclaron en un tubo de reacción de 2 mL con la misma cantidad de la solución acuosa de ácido trifluoroacético al 1 %, y la agitación en vórtex se repitió bajo las mismas condiciones (3000 rpm por 5 min), seguido de la centrifugación a 10000 rpm por 15 min. Posteriormente, 500 µL del extracto final o sobrenadante se mezclaron con 500 µL de ácido trifluoroacético al 1 % y se filtró por una membrana de Nylon de 0.22 µm antes de pasar a un vial para continuar con el análisis cromatográfico.

La separación de compuestos por cromatografía líquida y condiciones del detector se realizó de acuerdo al método reportado por Voigt y colaboradores con algunas modificaciones para la adaptación requerida por la fase móvil permitida en el equipo empleado UHPLC, Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 Charged Aerosol Detector (Jürgen Voigt et al., 2016). La columna Intrada *amino acid*, Imtakt (5 por 3 mm) se mantuvo a 37 °C y la fase móvil consistió en A: acetonitrilo/formiato de amonio 100mM (20/80) y B: acetonitrilo/ácido fórmico (100/0.3), con un gradiente de elución que inicia con 70 % A durante 4 min, una disminución lineal hasta 30% A de 4 a 19 min y finalmente regresa a las condiciones iniciales con 70% A en un tiempo desde 19 hasta 23 min. El flujo establecido fue de 0.5 mL/min y el volumen de inyección 10 µL. Los parámetros del detector consistieron en una temperatura de evaporación de 35 °C, con un filtro programado en 5.0 s y velocidad de colección de datos en 20 Hz.

Los resultados de concentración obtenidos de cada muestra fueron adquiridos mediante el software Chromeleon 7.0 a partir de la curva de calibración con estándar externo de las soluciones stock de cada aminoácido objeto de estudio (fenilalanina, cisteína, asparagina, metionina, isoleucina e lisina) que se prepararon a una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup> en agua Tipo I. La curva de calibración comprendió las concentraciones de: 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 y 60.0 µg/mL en las que se empleó como solvente el ácido trifluoroacético al 1%. Las soluciones stock pudieron ser almacenadas máximo por cuatro semanas en recipientes ámbar, a una temperatura de -20°C, y las demás soluciones de estándares una semana en las mismas condiciones. Los valores de las curvas de calibración presentaron coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) desde 0.99554 a 0.9989 con valores de residuales inferiores a 20%.

- **Extracción y cuantificación de alcaloides y monómeros de procianidinas:** los alcaloides (cafeína, teofilina y teobromina) y los monómeros de procianidinas (catequina y epicatequina) fueron extraídos y cuantificados bajo el mismo método basado en algunos parámetros reportados por Ortega y sus colaboradores (Ortega et al., 2010).

La extracción se llevó a cabo a partir de 50 mg de cacao previamente desengrasado, por el método asistido con ultrasonido, a los cuales se le adicionaron 2 mL de una solución de NaOH en agua ultra pura pH 10 a 90 °C. La solución se llevó a vórtex por 15 min a 3000

rpm y los compuestos fueron extraídos por ultrasonido a 40 min, 25Hz y 50 °C, condiciones optimizadas después de evaluar la temperatura (20, 30 y 50 °C) y frecuencia (25, 40 y 59 Hz). La separación de la fase sólida se realizó por centrifugación a 14000 rpm por 15 min y el sobrenadante se retiró. El procedimiento se repitió sobre el sólido restante, 3 veces más. Se aforó el sobrenadante recogido de las cuatro extracciones hasta un volumen de 8 mL y éste fue filtrado por una membrana de 0.22 µm de Nylon. Por último, 400 µL del extracto final se disolvió en un vial con la misma cantidad de solvente, que en este caso consistió en la fase móvil del método cromatográfico (solución de ácido fórmico al 0.1 % y acetonitrilo en una relación 95:5, respectivamente).

Las condiciones de separación cromatográfica de los compuestos se realizó en una columna Acquity BEH C18 (ø: 2.1 mm por 100 mm por 1.8 mm) (Waters, Milford, MA, EEUU) a una temperatura de 30 °C, con una fase móvil con A: Agua MilliQ:Ácido fórmico (95:5, v/v) y B: Acetonitrilo, programada con un gradiente de elución: 0-0.5 min, 95:5 (A:B), 0.5 a 3.0 min, 80:20 (A:B) y 3.0 a 3.1 min, 95:5 (A:B) a un flujo de 0.2 mL min<sup>-1</sup>. La muestra estuvo a 20 °C y el volumen de inyección fue de 20 µL.

Las condiciones de detección MS/MS se llevaron a cabo en un Espectrómetro de Masas de Triple Cuadrúpulo (MS/TQD) (Waters, Milford, MA, EE. UU.), utilizando una ionización por Electrospray (ESI) fuente Z-spray<sup>TM</sup>. Para la identificación de los estándares y las muestras, la detección se realizó en modo positivo. Las transiciones se evaluaron por el monitoreo de reacción seleccionada (SRM) por sus siglas en inglés *Selected Reaction Monitoring* (Tabla 1-2).

**Tabla 1-2:** Condiciones óptimas del monitoreo de reacción seleccionada (SRM) para la identificación y cuantificación de alcaloides y monómeros de procianidinas por UHPLC-MS/MS

Compuesto	SRM 1 (cuantificación)	Voltaje del cono	Energía de colisión	SRM 2 (confirmación)	SRM 3 (confirmación)	Voltaje del cono	Energía de colisión
Catequina	290.983>138.924	45	10	290.983>122,923	290.983>167,938	45	15
Epicatequina	290.983>138.924	45	10	290.983>122,923	290.983>164.939	45	15
Cafeína	194.985>137.97	45	15	194.985>41.879	194.985>109,929	45	20
Teobromina	180.905>162.922	45	15	180.905>66.917	180.905>107,573	45	10
Teofilina	180.841>123.898	45	15	180.841>68.87	180.841>95,865	45	10

Los parámetros de la fuente de ionización para la detección en el triple cuadrúpolo se resumen en: tensión capilar (3 kV), temperatura de la fuente (150 °C), temperatura de solvatación (400 °C), velocidad de flujo del gas de solvatación (Nitrógeno a 800 L h<sup>-1</sup>) y del gas de ionización (Argón a 80 L h<sup>-1</sup>).

La solución stock de la cafeína, teofilina, catequina y epicatequina se disolvieron en acetonitrilo con una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup>. Para la preparación de la curva de calibración en un rango de 0.02 a 50 mg L<sup>-1</sup>, se adicionaron 600 µL de la fase móvil para corregir el efecto matriz y se aforó con fase móvil (solución de ácido fórmico al 0.1 % y acetonitrilo en una relación 95:5, respectivamente), con un coeficiente de determinación para cafeína (0.999282), teofilina (0.998650) y epicatequina (0.999637). La teobromina requirió de una preparación de la solución a una concentración máxima de 500 mg L<sup>-1</sup> en agua Tipo I a 90 °C, dada su solubilidad, con agitación de 1 h en un baño maría a 90 °C y sonicación a 25 Hz por 5 s a los 30 min. El rango de trabajo de la curva de calibración del estándar 2.5 fue de 100 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> 0.999457)

Se empleó un material de referencia de chocolate SRM 2384 - *Baking Chocolate* (NIST, USA) para la estandarización de los siguientes métodos: extracto etéreo, teobromina, cafeína y teofilina.

### **1.2.10 Análisis estadístico y quimiométrico**

El análisis estadístico consistió en varios estudios que se pueden agrupar así: a) optimización de los métodos de análisis (selección del solvente para la obtención del extracto etéreo por Soxhlet y optimización de la extracción de alcaloides y procianidinas) y b) validación de métodos de análisis (azúcares y manitol). Los resultados de este análisis estadístico se encuentran detallados en los Anexos 1-2 y 1-3.

El análisis estadístico apoyado por la fundamentación quimiométrica se basa en el Análisis de Componentes Principales (ACP), Análisis de Clúster y Análisis de Factores (ADF) para evidenciar los cambios de la mezcla de clones cosechada en las tres subregiones de

estudio que fueron sometidas a fermentación para la formación de precursores de aroma y sabor.

A continuación, se detalla el principio de cada análisis mencionado:

- **Selección solvente para la obtención del extracto etéreo por Soxhlet:** el diseño experimental consistió en un esquema completamente aleatorizado (DCA) y un análisis de varianza de una sola vía con seis niveles, que corresponde a la evaluación de la capacidad máxima de extracción del contenido etéreo sin afectar la calidad del extracto (color) y con los costos más bajos. La matriz del diseño de experimentos, el análisis de datos y el proceso de optimización fueron realizados con el paquete estadístico R Studio (Versión 0.98.1103 GNU Affero General of Public Licenses). Las comparaciones múltiples de los tratamientos con diferencias significativas se realizó por medio de una prueba de Tukey's con un nivel de confianza de 95% ( $p < 0.05$ ) (Douglas Montgomery, 2004).

La evaluación de los efectos entre los tratamientos se realizó a partir de la ecuación 1-11:

$$X_{ij} = \mu_i + \alpha_i + \varepsilon_i \quad i = 1, 2, \dots \text{Ec: 1-11}$$

Donde,  $X_{ij}$ : j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento,  $\mu_i$ : media general de la población,  $\alpha_i$ : efecto del i-ésimo tratamiento,  $\varepsilon_i$ : desviación de la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento con respecto a la media,  $\mu_i$ : i-ésimo tratamiento.

- **Optimización de la extracción de alcaloides y monómeros de procianidinas por ultrasonido:** el análisis estadístico se realizó utilizando el software R Studio (Versión 0.98.1103 GNU Affero General of Public Licenses), el cual se basó en el estudio del efecto de los factores tiempo y frecuencia durante la extracción de alcaloides y monómeros de procianidinas, por medio del uso de ultrasonido, a partir de cacao tomado de diferentes etapas de la poscosecha. Para tal fin, se definió un esquema completamente aleatorizado DCA de la mano de un análisis de varianza ANOVA de dos vías de clasificación (multifactorial) para estudiar simultáneamente los efectos de las dos fuentes de variación y su interacción. De esta forma se identificó si existieron diferencias con un nivel de significancia de 95%.

El modelo propuesto consistió en (ver Ecuación (1-12)):

$$X_{ij} = \mu_i + \alpha_i + \beta_i + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_i \quad i = 1, 2, \dots \text{Ec: 1-12}$$

Donde,  $X_{ij}$ : la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento,  $\mu_i$ : media general de la población,  $\alpha_i$ : efecto del i-ésimo tratamiento Tiempo,  $\beta_i$ : efecto del i-ésimo tratamiento, Frecuencia  $(\alpha\beta)_{ij}$ : efecto de la interacción la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento,  $\varepsilon_i$ : desviación de la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento con respecto a la media,  $\mu_i$ , del i-ésimo tratamiento.

- **Validación del método para cuantificar azúcares y manitol:** los análisis estadísticos para verificar la precisión inter-día se llevaron a cabo mediante la prueba F, mientras que el límite de cuantificación (LOQ) y la diferencia entre el tiempo de retención durante el análisis del efecto de matriz, se evaluó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA). Se realizaron comparaciones de medias para analizar el tiempo de retención de los compuestos con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los tratamientos se realizaron utilizando el software R (Versión 0.98.1103 GNU Affero General Public License; <https://cran.r-project.org>)
- **Análisis de Componentes Principales:** uno de los métodos multivariados descriptivos en los que se fundamenta la aproximación quimiométrica del presente estudio del cacao, para la identificación de las variables, se basó en la técnica de Análisis de Componentes Principales (ACP). Esta técnica explica, de forma satisfactoria, las diferencias entre las tres subregiones productoras de este material vegetal en Antioquia y la distinción entre los perfiles de los precursores de sabor y aroma más representativos, formados antes y después de la fermentación.

Las componentes principales fueron calculadas a partir de la selección de variables que maximizaron la variabilidad entre todas las respuestas de los análisis realizados, lo cual mediante una combinación lineal permitió reducir la dimensión de los datos en función de sus similitudes y diferencias sin perder información (Shin et al., 2010, Hottelling) (Kaiser, 1961).

El ACP partió del análisis de una matriz de datos rectangular (18 por 38) que consistió en 18 muestras (filas) comprendidas por las mezclas de clones: a) crudos, es decir, el día cero de fermentación evaluado en cada zona, codificados como 0CF-BC, 0CF-U y 0CF-M; y b) bien fermentados, identificados por el número de horas que tardó la fermentación en cada sub-región, así: 132CF-BC, 132CF-U y 168CF-M (análisis realizado por triplicado). Las columnas (38) conformaron variables entre las cuales se encuentran: acidez total expresada como ácido acético (TA\_AC), láctico (TA\_Lac), cítrico (TA\_Cit), málico (TA\_Mal), oxálico (TA\_Oxa) y succínico (TA\_Suc), pH, porcentaje de humedad (% H), cenizas (Ash), fibra cruda (Fiber), porcentaje de proteína (% P), extracto etéreo (Ext\_E), antocianinas (Anto), color, contenido de polifenoles totales (TPC), Orac, concentración expresada en %p/p de ácido acético (Acetic), láctico (Lactic), cítrico (Citric), oxálico (Oxalic), succínico (Succ), fructosa (Fru), glucosa (Glu), sacarosa (Suc), maltosa (Malto), manitol (Manni), fenilalanina (Ph-Al), leucina (Leu), metionina (Met), valina (Val), cisteína (Cys), asparagina (Asp), lisina (Lys), teobromina (Theo), cafeína (Caf), epicatequina, catequina (Cat) y relación de teobromina y cafeína (Theo/Caf).

En este estudio, el análisis multivariado se realizó con R (Versión 0.98.1103 GNU Affero General Public License; <https://cran.r-project.org>).

- **Análisis de clúster:** con el fin de interpretar los datos, específicamente alcanzar el entendimiento del significado de las componentes, como variables compuestas, se empleó el *clúster* en los datos para contrastar similitudes o diferencias entre los individuos, en este caso, las muestras antes y después de la fermentación. De esta forma, se elimina información redundante del conjunto de observaciones y se propician estructuras más simples de analizar, si existen, patrones de comportamiento (Robert Gentleman, Kurt Hornik, 2011).

En la Tabla 1-3 se resume los principales aspectos de los métodos antes descritos:



**Tabla 1-3:** Descripción sucinta de los parámetros, matriz, método, optimización, diseño de experimento y referencia empleada en cada análisis bromatológico, físico y químico realizado a las muestras analizadas durante la fermentación incluidos en el capítulo 1

Tipo de análisis	Parámetro	Matriz	Referencia	Método	Optimización	Diseño de experimentos
Físico y Químico - seguimiento fermentación	Grado de fermentación	Cotiledón bien fermentado seco	Norma Técnica Colombiana NTC 1252 de 2003. Cacao en grano	Peso	N/A	N/A
	Índice de fermentación (antocianinas totales)	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	Gourieva y Tserrevitinov, 1979	Espectrofotométrico	Estandarización (R2, residuales < 20 %)	N/A
	Color	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	Vignoni et al. 2006	Colorímetro	N/A	N/A
Bromatológico	Cenizas	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	AOAC 972.15	Gravimétrico	N/A	N/A
	Fibra cruda	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	AOAC 930.20	Digestión ácida y básica	N/A	N/A
	Humedad	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	AOAC 931.04	Gravimétrico – Peso constante	N/A	N/A
	Nitrógeno total y porcentaje de proteína	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	AOAC 970.22	Kjeldahl	N/A	N/A
	Extracto etéreo por Soxhlet	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	AOAC 925.07	Soxhlet	Selección del solvente Ciclos y tiempo de extracción	Análisis de varianza de una sola vía (Factor: solventes) con seis niveles
	Extracto etéreo asistido por ultrasonido	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	Carrillo y otros, 2014	Ultrasonido	N/A	
Físico y Químicos	Acidez total y pH	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	AOAC 970.21 Nazzaduri y otros., (2006) Guehi y otros., (2010)	Potenciométrico	Método de separación del sólido por centrifugación	
	Contenido de polifenoles totales	Cinética de fermentación	Singleton & Rossi, (1965)	Espectrofluorómetro	Estandarización (residuales < 20 %)	
	Capacidad atrapadora de radicales de oxígeno ORAC	Cinética de fermentación	Ou y otros (2001)	Espectrofluorómetro	Estandarización (R2, residuales < 20 %)	

**Tabla 1-3:** (Continuación)

Tipo de análisis	Parámetro	Matriz	Referencia	Método	Optimización	Diseño de experimentos
Analítico – cromatográficos	<b>Azúcares</b> Fructosa Glucosa Sacarosa Maltosa <b>Poliol</b> Manitol	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	Ibañez y otros	SPE UHPL-C-CAD	Validación (SANTE 2015)	Precisión intermedia (Prueba t)
	<b>Ácidos orgánicos no volátiles</b> Cítrico Málico Oxálico Succínico	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	S Doores y otros (2007)	SPE UHPLC-C-CAD	Estandarización (% de recuperación, R2 y residuales < 20 %)	
	Ácido Acético y Láctico	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	(Gil, 2018; Koutsidis et al., 2009; Rodríguez-Campos et al., 2012b)	SPE UHPLC-DAD	Estandarización (% de recuperación, R2 y residuales < 20 %)	
	Ácido Acético	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	(Gil, 2018; Koutsidis et al., 2009; Rodríguez-Campos et al., 2012b)	HS-SPME GC-MS/MS-O	Estandarización del tiempo y temperatura de extracción (R2, residuales < 20 %)	

**Tabla 1-3:** (Continuación)

Tipo de análisis	Parámetro	Matriz	Referencia	Método	Optimización	Diseño de experimentos
Analítico – cromatográficos	<b>Aminoácidos</b> Fenilalanina Leucina Metionina Valina Cisteína Asparagina Lisina	Cotiledón crudo Cotiledón bien fermentado	(Jürgen Voigt et al., 2016)	SPE UHPLC-C-CAD	Estandarización (% de recuperación, R2 y residuales < 20 %)	
	<b>Alcaloides</b> Cafeína Teofilina Teobromina	Cinética de fermentación	Ortega y otros (2010)	UHPLC-MS/MS- QqQ/ESI	Estandarización (% de recuperación, R2 y residuales < 20 %)	Diseño factorial de 2 vías (temperatura de extracción y frecuencia) con 3 niveles
	<b>Monómeros de procianidinas</b> Catequina Epicatequina	Cinética de fermentación	Ortega y otros (2010)	UHPLC-MS/MS- QqQ/ESI	Estandarización (% de recuperación, R2 y residuales < 20 %)	Diseño factorial de 2 vías con 3 niveles (temperatura de extracción y frecuencia)



## 1.3 Resultados y Discusión

### 1.3.1 Clones y subregiones

La selección de los clones se definió por la recomendación de la Federación Nacional de Cacaoteros Fedecacao. Se tomó en cuenta la disponibilidad, en las tres subregiones productoras de Antioquia que fueron objeto de estudio, de dos tipos principales: clones reconocidos a nivel mundial, llamados Universales, y clones empleados localmente, clasificados como Regionales y que provienen del departamento de Santander en Colombia.

Fedecacao también tuvo en cuenta, para realizar su recomendación, la información que se tiene de algunas características identificadas en estudios previos realizados al material vegetal, como su desempeño agronómico y su calidad física, química y sensorial. Estos datos fueron recopilados, en el caso de los clones Universales, en el período de observación al que fueron sometidos antes de aprobarse su introducción al país (CCN-51 y ICS-1) y a través de los procesos de la aprobación del registro de los dos clones regionales (FEC-2 y FLE-2) (Fedecacao, 2015; Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, 2014a, 2014b; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2009).

Entre los aspectos que se destacan en los clones seleccionados se encuentran: su alta productividad con respecto al rendimiento, como la del CCN-51; el perfil sensorial similar a cacaos Trinitarios relacionados al clon ICS-1, asociado al valor de su relación teobromina/cafeína (~3), característico de esta variedad; el alto contenido de cafeína del FLE-2, que lo identifica como un atributo funcional por la presencia de este alcaloide con propiedades antioxidantes, sin que afecte su relación teobromina /cafeína que se conserva por debajo de 2, referente de cacaos Criollos denominados Finos o de Aroma; y, por último, el clon FEC-2 distinguido por su alta resistencia a enfermedades como *Monilophthora roreri* (Fedecacao, 2015).

Después de seleccionar los materiales vegetales, se procedió a determinar las proporciones de los clones a emplearse en la mezcla, un paso importante que dependió de la distribución poblacional, que varió por subregión. La verificación de la disponibilidad de cada clon se llevó a cabo a finales de 2016 en las unidades productoras acompañadas por Fedecacao, en las cuales se identificaron las limitantes de disponibilidad de los clones. Es así como FEC-2 presentó baja abundancia en Urabá, mientras que en Bajo Cauca y Maceo fue FLE-2. Por su parte, los clones Universales presentaron la mayor producción en las tres subregiones siendo el CCN-51 el que se encontró en mayor cantidad. Esta distribución puede ser explicada debido a que clones regionales y del ICS-1 solo fueron aprobados para su propagación en 2009 (ICS-1) y en 2014 (FEC-2 y FLE-2) (Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, 2014a, 2014b; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2009). A partir de la identificación de este perfil productivo, las cantidades fermentadas consistieron en unidades experimentales o cajones fermentadores con  $112.5 \pm 4.80$  kg, distribuidos así: FEC-2 ( $8.9 \pm 0.35$  kg), FLE-2 ( $3.6 \pm 0.14$  kg), ICS-1 ( $3.4 \pm 0.15$  kg) y CCN-51 ( $96.6 \pm 4.16$  kg).

La disponibilidad de los clones seleccionados, hallada en los lugares de estudio del departamento de Antioquia, está también relacionada con los parámetros de calidad de la semilla y frutos de cacao asociados al tipo de clon, los cuales son determinantes para los productores, ya que repercute en la calidad de los granos a comercializar y su rentabilidad. En la Tabla 1-4 se detallan los índices de calidad más relevantes de los clones evaluados.

**Tabla 1-4:** Índices de calidad agronómica (índice de semilla, índice de mazorca y número de almendras por mazorca) de los clones (FEC-2, FLE-2, ICS-1 y CCN-51) evaluados en poscosecha en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio

Bajo Cauca				
Parámetro	FEC-2	FLE-2	ICS-1	CCN-51
Índice de semilla	1.7	1.6	1.2	1.7
Índice de mazorca	14	16	20	14
Número de almendras por mazorca	42	39	42	43

**Tabla 1-4:** (Continuación)

Urabá				
Parámetro	FEC-2	FLE-2	ICS-1	CCN-51
Índice de semilla	1.5	1.4	1.5	1.6
Índice de mazorca	16	21	16	13
Número de almendras por mazorca	40	35	40	48
Magdalena Medio				
Parámetro	FEC-2	FLE-2	ICS-1	CCN-51
Índice de semilla	1.4	2.3	1.4	1.4
Índice de mazorca	17	11	20	13
Número de almendras por mazorca	41	38	36	53

Valores clasificados como excelentes (Proexport Colombia, 2012)

De acuerdo a los valores encontrados, se puede observar que existe variabilidad por subregión. Esto se hace aún más evidente en el informe presentado por Proexport Colombia, actualmente Procolombia, en el que se tiene en cuenta los criterios establecidos por Fedecacao para clasificar los índices evaluados en una escala cualitativa: excelente, bueno y malo-regular. Estos rangos fueron tomados en cuenta para la clasificación de nuevos materiales en evaluación y se emplearon en su estudio a largo plazo (10 años) para ser considerado para su registro, como ocurrió con los clones regionales utilizados en esta investigación (Grupo de Análisis Sectorial. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2013; Proexport Colombia, 2012).

En la Tabla 1-4 se encuentran resaltados en verde los valores que se ubicaron en la categoría de *Excelente* por ser: Índice de mazorca <15 (menor número de mazorcas para obtener 1kg de cacao seco bien fermentado), Índice de semilla (mayor peso por unidad) >1.6, y Número de almendras por mazorca >46. De acuerdo con los valores encontrados, es evidente porque el CCN-51 es un clon reconocido de alto rendimiento.

Se registraron valores sobresalientes para FLE-2 y FEC-2 en Bajo Cauca y Magdalena Medio. En el caso de FLE-2 en Bajo Cauca, presentó el mejor peso por semilla; esto a pesar de no ser el clon de mayor propagación. Este resultado puede estar asociado a los demás parámetros clasificatorios, como la resistencia a enfermedades como *Monilia*, aspecto mencionado anteriormente y al número de frutos por árbol (índices no evaluados

en este estudio). En este caso, se puede esperar un satisfactorio rendimiento durante la poscosecha e industrialización. Los demás valores registrados en la Tabla 1-4, los que no están resaltados, estuvieron en el rango de índices considerados como Bueno: Índice de mazorca (16-20), Índice de semilla (1.4-1.5) y Número de almendras por mazorca (36-45).

Ahora bien, las diferencias en los rendimientos o perfiles esperados para un mismo clon, pueden estar relacionadas con cambios en las locaciones de producción, que están estrechamente vinculados con las condiciones agronómicas y climáticas en las que se desarrollan los frutos (Badrie, Bekele, Sikora, & Sikora, 2015). Estos factores perturbadores no controlables (parámetros climáticos) y controlables (manejo agronómico), que no fueron incluidos en el alcance de este estudio, se contrarrestaron con la selección de las fincas productivas a las cuales se les hace un seguimiento constante por parte de Fedecacao. Esta entidad ejecuta actividades de localización, trazabilidad, acompañamiento y asesoría a los productores de las tres subregiones con los técnicos de la Federación.

Los criterios para la selección de las fincas productoras partieron de la capacidad productiva de los clones de interés, que como primera condición implicaba tener, como mínimo, 1 hectárea con cultivos mayores a 5 años y menores a 11, edad considerada dentro del período óptimo de los árboles de cacao (3 a 18 años) (Kongor et al.; 2016). Como primer criterio de selección, se realizó un reconocimiento de los perfiles de los suelos para que cumplieran con los rangos o valores de los parámetros recomendados para mantener la calidad del cultivo. Entre los aspectos en seguimiento se encuentran: ( $4 < \text{pH} < 8$ ), intercambio catiónico (35 % asociado a la relación de Calcio, Magnesio y Azufre), materia orgánica (3.5 %) y relación entre Nitrógeno y Potasio (N/K) de 1.5 (Argüello-Navarro & Moreno-Rozo, 2014; Arturo et al., 2014; Badrie et al., 2015; International Cocoa Organization (ICCO), 2009; Kongor et al., 2016; Ramírez, Sigarrosa, & Del Valle, 2014).

Como segundo criterio de selección, y para lograr un equilibrio en las condiciones requeridas descritas para el suelo de cultivo de cacao, Fedecacao realizó la selección según las buenas prácticas en el manejo del cultivo desde el punto de vista agronómico con el control de la poda, eliminación de maleza, disposición de sombrero y drenaje, tipo y frecuencia de fertilización e intervención preventiva y correctiva de los riesgos

fitosanitarios, entre otros (Kongor et al., 2016; Douglas Montgomery, 2004). Como último criterio, se tomó en cuenta el cumplimiento de los altos o medianos estándares de calidad del fruto, evaluados por medio de su índice de mazorca y grano que antes fueron mencionados para cada clon ((ver Tabla (1-4)), características que le permitía a Fedecacao evaluar el resultado directo del cumplimiento de los dos aspectos anteriores.

El proceso de selección finalizó con la compilación de información de cada finca productiva seleccionada para la cosecha a evaluar en el presente estudio, sobre los parámetros agronómicos y climáticos más significativos, como se describe en el Anexo 1-4.

Entre los aspectos más relevantes se destacan algunas diferencias que podrían ser causales de variabilidad no controladas:

— Zona agroecológica: se identificaron dos. La primera corresponde a Bosques Húmedos Tropicales (BHT) donde se encuentran ubicados Bajo Cauca y Urabá; la segunda a Zona Andina (ZA), donde se ubica Magdalena Medio.

— Altitud: esta varió dependiendo de la zona, ya que Magdalena medio presenta altitudes que oscilan entre los 900 y los 1230 m.s.n.m. mientras que Urabá está ubicado en un territorio más llano, con alturas entre los 2 y los 34 m.s.n.m. En el caso de Bajo Cauca, esta subregión tiene dos perfiles extremos: el primero se presenta por las unidades productivas ubicadas en un terreno en medio del río Cauca, donde la altura máxima es de 90 m.s.n.m. y las demás fincas se encuentran a una altitud de 340 m.s.n.m.

— Tipo de suelo: Bajo Cauca tiene un tipo de suelo en relación arcilla/limoso en terrenos pendientes y el correspondiente al inundable es arcilla/arenoso, siendo esta última característica la más predominante. Por su parte, Urabá presenta un suelo de tipo Franco-Arcilloso (35 % Arenoso, 25 % Limoso, 40 % Arcilloso) y Magdalena Medio Arcilloso con pH 6.2.

— Humedad relativa: en Bajo Cauca y Urabá es más elevada al estar ubicados en zonas cercanas a ríos y el mar. sus rangos oscilan entre 70-85 % en Urabá y 60-89 % en

Bajo Cauca. Para Magdalena Medio el registro estuvo entre 80-85 % debido a los altos niveles de precipitación con los que cuenta durante el año.

— Temperatura ambiental: la más alta se registró en Urabá (38 °C), seguido por Bajo Cauca (35 °C) y Magdalena Medio (25 °C). En Bajo Cauca estuvo por encima de 30 °C.

De acuerdo con el seguimiento iniciado desde 2016, los factores agronómicos relacionados con las unidades productoras seleccionadas para la cosecha se caracterizaron por tener un plan de fertilización de una vez al año posterior a la poda con machete, mientras que el control de maleza y de enfermedades se realizó entre 3 y 4 veces por año de forma manual. Cada uno de estos procedimientos fue acompañado por Fedecacao. El aspecto que más cambios presentó fue el sombrero: en Bajo Cauca se encontraron unidades productoras sin sombrero (La Primavera) que requirieron una mayor frecuencia de fertilización (hasta tres veces en el año), mientras que en las demás regiones se reportaron entre 10 y 30 % de sombrero por tratarse de cultivos permanentes (mayor a 5 años), el cual se genera con cedro rojo y acacia.

Para tener un mayor acercamiento a la influencia del comportamiento de los parámetros asociados a los factores perturbadores, dentro de la definición del problema, desde la planeación previa, se realizó en diciembre de 2016 un experimento exploratorio completamente aleatorizado en Urabá y Magdalena Medio, dada la disponibilidad de la cosecha. Bedoya y colaboradores (2016) identificaron mediante un Diseño de Bloques al Azar y Análisis de Varianza realizado sobre una mezcla, con los mismos clones evaluados en el presente estudio, cambios bromatológicos, físicos y químicos asociados al uso de material cosechado en terreno pendiente o plano, entre materiales o zona productiva. En el mismo sentido, este estudio previo permitió definir las etapas con un enfoque secuencial donde se determinaron: a) los tiempos y movimientos del proceso en cada localidad, b) cantidades representativas por árbol para el muestreo de acuerdo a un Diseño Anidado, c) la estandarización sobre el manejo de las muestras y de los métodos adaptados a los requerimientos de las diferentes partes del grano de cacao que se estudiarían (cotiledón y mucílago) con sus variaciones dependiendo de la etapa del proceso (crudo, fermentado o seco).

A partir de estos resultados, se estableció un esquema completamente aleatorizado para el análisis del perfil bromatológico, físico y químico de la mezcla de clones antes y después de ser sometida a fermentación en las tres subregiones.

### **1.3.2 Fermentación**

La etapa de fermentación se da inicio con  $112.5 \pm 4.80$  kg de la mezcla de clones dispuesta en cada uno de los cajones fermentadores, distribuidos en las proporciones de CCN-51 (85.9 %), ICS-1 (3.0 %), FLE-2 (3.2 %) y FEC-2 (7.9 %) en Tulenapa-Urabá, Hacienda La Candelaria-Bajo Cauca y la finca Cannes en Maceo-Magdalena Medio.

Durante esta etapa se calcularon las pérdidas desde la cosecha hasta la mezcla en cada fermentador y se encontró que el clon de menor porcentaje de pérdidas fue el CCN-51 ( $73.3 \pm 3.25$ ), seguido del FEC-2 ( $76.8 \pm 0.52$ ), FLE-2 ( $78.8 \pm 2.81$ ) y el mayor porcentaje se registró con el ICS-1 ( $82.4 \pm 3.95$ ), siendo Urabá la subregión con mayor rendimiento y Magdalena Medio con menor. La mayor pérdida, estimando el peso desde el fruto en mazorca, se dio al retirar la cacota o cáscara, valor que osciló entre 69.6 a 74.8 %; la placenta representó pérdidas comprendidas entre 1.9 y 4.0 % y, por último, durante el envasado, proceso en el que existen perdidas por eliminación de la pulpa mucilaginosas, se perdió 1.20 % para CCN-51 y 3.56 % para FEC-2 (valor máximo).

La fermentación de los  $112.5 \pm 4.80$  kg en cada unidad experimental se realizó a lo largo del año 2017. Tuvo una duración de 132 h en Bajo Cauca, comprendida entre el 7 y el 13 de marzo; 132 h en Urabá entre el 2 y el 8 de mayo y 168 h en Magdalena Medio entre el 13 y el 19 de mayo. Aunque no hace parte del alcance de este estudio, vale la pena anotar que la variación pudo estar relacionada con las condiciones ambientales que se presentaron en las tres localidades, lo que probablemente propició que el conjunto de reacciones bioquímicas y microbiológicas responsables de la fermentación se dieran a diferentes velocidades, además de la diversidad en las poblaciones de la microbiota que puede cambiar según la subregión.

En las Tablas 1-5 y 1-6 se detalla el promedio de la temperatura ambiente y la humedad relativa en cada subregión durante la fermentación y el comportamiento diario de la temperatura y pH promedio de cada unidad experimental conformada por  $112.5 \pm 4.80$  kg de la mezcla de cacaos, variables registradas en campo para evidenciar la relación mencionada entre la duración de la fermentación con las condiciones ambientales y medibles directamente durante el proceso.

**Tabla 1-5** Parámetros ambientales (temperatura y humedad relativa) registrados en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio durante la fermentación de  $112.5 \pm 4.80$  kg

Sub-región de Antioquia	Humedad relativa -HR $\text{kg}_{\text{agua}}/\text{kg}_{\text{aire}}$		Temperatura ambiente $T_{\text{amb}}$ (°C)		Presión atmosférica $P_{\text{atm}}$ (kPa)	
	Promedio	$\Delta$ HR	Promedio	$\Delta T_{\text{amb}}$	Promedio	$\Delta P_{\text{atm}}$
Bajo Cauca	$0.73 \pm 0.16$	0,59	$29.06 \pm 3.9$	13,9	$99.96 \pm 0.2$	0,8
Urabá	$0.90 \pm 0.09$	0,33	$26.8 \pm 2.8$	10,4	$100.8 \pm 0.15$	0,7
Magdalena Medio	$0.88 \pm 0.13$	0,56	$22.38 \pm 3.13$	17,5	$90.03 \pm 0.31$	0,5

Bajo Cauca fue la única subregión que no presentó precipitaciones durante los días de fermentación. En Urabá llovió 2 días (10,2 mm) y en Magdalena Medio se registraron 4 días (primer, segundo, tercer y cuarto día de fermentación) con períodos de 20 a 30 min (90.6 mm), lo cual produjo valores de humedad relativa superiores a 90 %. En esta subregión también se presentaron, sin excepción, disminuciones en la temperatura entre las 5.30 p.m y las 6:45 a.m. De acuerdo con lo reportado en la Tabla 1-6, la HR más baja correspondió a la temperatura ambiente más alta como se evidencia en Bajo Cauca, contrario a lo que se reflejó en Magdalena Medio, que además de tener una HR alta, similar a la de Urabá, alcanzó la temperatura más baja. Por otra parte, en Urabá, que reportó el mismo tiempo que Bajo Cauca a pesar de tener una HR alta, se alcanzó una temperatura máxima de 37.2 °C, mientras que la mínima no fue inferior a 24 °C.

Por lo anterior, se puede inferir del comportamiento de estos parámetros ambientales que la temperatura podría influir en la fermentación, específicamente en la duración del proceso, y de forma más directa la humedad relativa, la cual tiene mayor incidencia sobre el secado e impide lograr las condiciones óptimas requeridas para promover el desempeño

del consorcio microbiano que interviene en el desarrollo pleno de las fermentaciones en estado sólido, como ha sido definida esta etapa para el cacao (Schwan, 2015).

La temperatura ambiental es un factor relevante para propiciar condiciones óptimas de fermentación, en especial al inicio del proceso, cuando se requiere de un rango que favorezca el desarrollo de levaduras entre los 25 y 30 °C para la producción de etanol; aunque 25 °C puede favorecer el crecimiento competitivo y no dominante de algunas levaduras como *Saccharomyces*, *Hanseniaspora (anamorph Kloeckera)* y *Pichia*, asociadas a la producción de algunos compuestos volátiles característicos de los atributos deseables en chocolate (Batista, Ramos, Ribeiro, Pinheiro, & Schwan, 2015).

De igual forma, en las primeras 48 h de fermentación se requiere disponer de condiciones no solo micro-anaerobias para la acción de las bacterias ácido-lácticas sino también llevarlas a un óptimo de temperatura de 30 °C. Adicional al consorcio mencionado, las enzimas son las encargadas, en esta fase inicial, de ejercer su actividad sobre la pectina y algunos compuestos insolubles presente en el mucílago y testa, como las pectinasas que actúan en un rango entre 30 y 40 °C (Crafack et al., 2014; Gil et al., 2016; Leal, Gomes, Efraim, de Almeida Tavares, & Figueira, 2008).

Por ende, entre más baja sea la temperatura ambiente se dificultará más obtener los valores mencionados, ya que al empezar no tiene aún la capacidad de aumentar progresiva y rápidamente la temperatura de la masa en fermentaciones espontáneas a causa de las reacciones exotérmicas esperadas. Lo contrario ocurre con los estudios controlados reportados, en los cuales se ha establecido un ritmo térmico en el que comienzan mínimo en 25 °C las primeras 12 h, aumenta hasta 30 °C a las 24 h y a 35 °C entre las 24 y 36 h prolongado hasta las 72 h, tiempo crucial para la producción de etanol y ácido láctico, seguido por un aumento deseable entre 45 y 50 °C, estos últimos valores solo alcanzados en campo cuando se presentan las condiciones aerobias al iniciar los volteos (Ho, Zhao, & Fleet, 2014).

El seguimiento de la temperatura de la mezcla de cacao durante los días de fermentación, como se describe en la Tabla 1-7, es un parámetro de control recomendado en diversos

estudios como medida indirecta de la velocidad del proceso al interior de los cajones de fermentación (Kadow, Niemenak, Rohn, & Lieberei, 2015).

**Tabla 1-6:** Temperatura y pH de 112.5±4.80 kg de la mezcla de clones de cacao (CCN-51, ICS-1, FLE-2 y FEC-2) registrados en cada unidad experimental o cajón durante la fermentación en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio

<b>Bajo Cauca</b>		
<b>Tiempo</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura</b>
0	3.4±0.02	33.6±0.35
24	3.9±0.13	33.5±0.12
48	3.9±0.11	33.7±0.3
72	4.0±0.12	40.0±1.65
96	4.1±0.18	42.3±0.86
120	4.5±0.51	43.3±0.98
132	5.2±0.52	43.5±0.99
<b>Urabá</b>		
<b>Tiempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura</b>
0	3.5±0.03	31.2±0.0
24	3.7±0.03	33.1±0.15
48	3.5±0.03	33.8±0.7
72	3.8±0.07	42.0±0.78
96	4.0±0.07	44.6±2.16
120	4.3±0.08	46.5±1.27
132	4.4±0.05	45.4±0.93
<b>Magdalena Medio</b>		
<b>Tiempo (horas)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura</b>
0	3.5±0.02	23.5±0.26
24	3.4±0.01	23.6±0.30
48	3.4±0.05	25.6±0.7
72	3.5±0.15	30.3±1.91
96	3.6±0.24	38.1±5.96
120	3.9±0.19	43.6±1.42
144	4.1±0.27	46.4±0.58
168	4.9±1.02	45.0±2.4

Se espera el desarrollo pleno de las poblaciones de levaduras y bacterias ácido lácticas a medida que se aseguran las condiciones micro-anaerobias las primeras 48 h y de bacterias ácido acéticas en presencia de oxígeno a partir del segundo día que se inician los volteos cada 24 h hasta el final de la fermentación, para que se produzca algunas reacciones exotérmicas durante la generación de alcohol, ácido láctico y acético, principalmente, pero que van acompañados de la formación de otros ácidos orgánicos volátiles y la degradación

de proteínas en oligopéptidos hidrofílicos y aminoácidos hidrofóbicos (Kongor et al., 2016; Saltini et al., 2013).

La sinergia entre altas temperaturas y acidez lleva a la muerte al embrión de la semilla de cacao, transformación que se caracteriza por un aumento de temperatura superior a 40 °C, condición que se alcanzó, en este estudio, a las 72 h y coincide con los valores de pH más bajos en Bajo Cauca y Urabá, en donde se terminó, en ambos casos, la fermentación a las 132 h. Un comportamiento diferente se observó en Magdalena Medio donde superó los 40 °C después de 120 h con un registro de pH menor a 4, aspecto que sirve como indicio del cambio de velocidad en las reacciones prolongando el tiempo para alcanzar el final de la fermentación 27.7 % por encima de las otras dos subregiones y, por consiguiente, retardando la formación de los precursores de aroma y sabor, característicos de esta etapa de poscosecha.

La variación en el perfil bromatológico físico y químico, definida por un amplio grupo de pruebas, se empleó como indicador para el seguimiento y verificación de la formación de compuestos deseables como atributos de calidad de la mezcla de clones. La variación esperada de los perfiles, además de estar influenciada por los parámetros previamente descritos, se considera que puede estar relacionada con las distintas subregiones seleccionadas para la fermentación, así como el resultado de la calidad del cacao al finalizar la etapa de poscosecha. Los criterios escogidos para el seguimiento fueron evaluados mediante métodos estandarizados o validados concatenados por un análisis multivariado que permitiera el entendimiento global de los cambios evidenciados, como se describe a continuación:

### **1.3.3 Parámetros de calidad del grano de cacao bien fermentado de tres subregiones de Antioquia**

En la Tabla 1-7 se listan los resultados de los análisis bromatológicos, físicos y químicos, realizados a la mezcla de clones, tanto antes de iniciar la fermentación como al final de esta etapa, llevada a cabo en cada subregión.



**Tabla 1-7:** Perfil bromatológico, físico y químico de los mezcla de clones de cacaos (CCN-51, ICS-1, FLE-2 y FEC-2) antes y después de la fermentación en Bajo Cauca (BC), Urabá (U) y Magdalena Medio (M)

Parámetro	Inicio-BC	Final-BC	Inicio-U	Final-U	Inicio-M	Final-M
Acidez expresada en ácido acético % p/p	0.16±0.06	1.56±0.25	0.35±0.04	0.85±0.37	0.30±0.03	0.76±0.02
Acidez expresada en ácido láctico % p/p	3.72±0.91	1.58±0.15	0.52±0.06	1.27±0.55	0.45±0.04	1.13±0.03
Acidez expresada en ácido cítrico % p/p	2.65±0.65	1.12±0.10	0.37±0.04	0.91±0.39	0.32±0.03	0.81±0.02
Acidez expresada en ácido málico % p/p	2.77±0.68	1.18±0.11	0.39±0.05	0.95±0.41	0.34±0.03	0.85±0.02
Acidez expresada en ácido oxálico % p/p	1.86±0.46	0.79±0.08	0.26±0.03	0.64±0.28	0.23±0.02	0.57±0.01
Acidez expresada en ácido succínico % p/p	4.88±1.20	2.07±0.19	0.68±0.08	1.67±0.73	0.60±0.05	1.49±0.03
pH	6.27±0.15	4.46±0.08	6.22±0.23	5.1±0.11	6.23±0.15	5.23±0.25
Humedad (kg agua/kg cacao húmedo)	0.66±0.02	0.38±0.01	0.59±0.01	0.41±0.02	0.66±0.02	0.42±0.01
Cenizas, %	1.8±0.4	1.1±0.5	2.3±0.1	1.2±0.5	2.0±0.00	1.4±0.1
Fibra cruda, %	7.2±0.3	11.8±0.2	8.9±0.2	13.3±1.3	9.9±2.7	11.1±1.4
Proteína, %	14.01±0.27	10.23±0.11	12.7±0.3	10.34±0.06	10.24±0.32	8.19±0.75
Extracto etéreo, %	49.0±1.8	45.6±1.0	46.6±4.2	44.7±4.3	47.3±4.0	52.1±1.4
Antocianinas (Relación 430/530)	2.12±0.15	0.73±0.02	1.84±0.30	0.59±0.02	2.63±0.12	0.84±0.04
Color	21.95±1.04	19.62±2.10	16.75±0.89	32.31±1.70	20.90±2.47	55.71±9.38

**Tabla 1-7:** (Continuación)

<b>Parámetro</b>	<b>Inicio-BC</b>	<b>Final-BC</b>	<b>Inicio-U</b>	<b>Final-U</b>	<b>Inicio-M</b>	<b>Final-M</b>
Polifenoles totales (Equivalente en ácido Gálico/g x100)	16,843.67±2,087.7	13,973.03±4,225.9	58,185.23±7,710.5	16,289.87±6,645.6	31,162.33±2,085.2	22,663.60±4,111.5
Orac (Equivalente en Trolox/g x100)	122,460.80±13,945.6	95,308.53±10,785.9	299,486.33±19,243.3	40,616.43±52,723.9	160,941.87±6,375.6	129,193.47±8,866.0
Ácido acético % p/p	0.37±0.30	2.11±1.16	0.42±0.05	0.78±0.16	0.04±0.01	1.97±1.12
Ácido Láctico % p/p	0.90±0.02	0.06±0.00	0.82±0.11	0.78±0.16	0.87±0.10	0.78±0.20
Ácido cítrico % p/p	0.28±0.03	0.09±0.02	0.63±0.10	0.25±0.07	0.53±0.05	0.18±0.10
Ácido oxálico % p/p	4.05±0.27	2.20±0.08	3.36±0.29	1.41±0.02	3.68±0.43	2.35±0.17
Ácido succínico % p/p	12.92±0.88	7.01±0.27	10.92±0.97	4.34±0.06	11.99±1.44	7.49±0.58
Fructosa % p/p	2.12±0.49	0.48±0.09	0.48±0.36	0.64±0.01	0.64±0.04	0.24±0.03
Glucosa % p/p	2.09±0.46	0.16±0.03	0.30±0.51	0.79±0.03	0.06±0.02	0.25±0.03
Sacarosa % p/p	4.74±2.19	0.15±0.12	6.79±0.65	0.27±0.07	3.22±0.38	0.02±0.00
Maltosa % p/p	n.d	0.11±0.02	n.d	0.09±0.03	n.d	0.02±0.01
Manitol % p/p	n.d	0.02±0.02	n.d	0.24±0.22	n.d	n.d
Fenilalanina % p/p	n.d	0.08±0.01	n.d	0.00±0.00	n.d	0.04±0.00

**Tabla 1-7:** (Continuación)

Parámetro	Inicio-BC	Final-BC	Inicio-U	Final-U	Inicio-M	Final-M
Leucina % p/p	0.03±0.03	0.05±0.01	n.d	0.11±0.02	n.d	0.05±0.00
Metionina % p/p	0.02±0.01	0.02±0.00	0.01±0.00	0.04±0.01	0.02±0.03	0.01±0.00
Valina % p/p	0.08±0.01	0.09±0.02	0.10±0.01	0.14±0.03	0.11±0.06	0.06±0.00
Cisteína % p/p	n.d	0.08±0.03	n.d	0.17±0.01	0.03±0.05	0.06±0.02
Asparagina % p/p	n.d	0.04±0.02	n.d	0.08±0.03	n.d	n.d
Lisina % p/p	0.01±0.00	0.10±0.01	0.02±0.00	0.18±0.01	n.d	0.08±0.00
Teobromina % p/p	0.65±0.10	0.12±0.02	0.18±0.004	0.10±0.01	0.17±0.03	0.11±0.01
Cafeína % p/p	0.24±0.03	0.05±0.01	0.08±0.003	0.05±0.001	0.07±0.02	0.05±0.01
Teofilina % p/p	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Relación teobromina/cafeína % p/p	2.69±0.16	2.52±0.21	2.34±0.10	2.30±0.18	2.33±0.13	2.29±0.14
Epicatequina % p/p	0.25±0.01	0.06±0.003	0.07±0.003	0.06±0.009	0.08±0.002	0.05±0.000
Catequina % p/p	0.023±0.01	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

% p/p: porcentaje de mg de la relación entre los mg del analito evaluado por un miligramo de muestra en base seca  
n.d: no detectado, de acuerdo con límite de cuantificación de los métodos empleados para el análisis



A continuación, se describen los parámetros determinados para la estandarización de los métodos cromatográficos con los que se obtuvieron los resultados antes descritos. Los parámetros calculados fueron: la ecuación que describe la relación lineal entre la respuesta de intensidad con la concentración de cada estándar externo preparado en solvente y en la matriz del cacao en diferentes etapas de poscosecha (fermentado o seco) para verificar el efecto de esta última en la cuantificación de los compuestos de interés. Otro aspecto verificado fueron los porcentajes de recuperación como medida de aseguramiento de la efectividad del método de extracción de los analitos a partir de las muestras de cacao, y por último, los rangos de cuantificación que define el límite mínimo en el cual se podrá detectar cada compuesto en la matriz (ver Tabla (1-8)).



**Tabla 1-8:** Ecuación de la curva de calibración, límite de cuantificación y porcentaje de recuperación de los métodos empleados en la caracterización del perfil químico del cacao sin fermentar y fermentado en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio

Compuesto	Técnica	Solvente para la preparación de la curva	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	Rango concentración curva (mg/L)	Porcentaje de recuperación
Fructosa	UHPLC-C-CAD	Solvente: ACN	0.1261	0.0452	0.998	01 - 30.0	N/A
		Matriz (cacao fermentado crudo)	-0.0006	0.0424	0.998	0.2 - 30.0	Nivel bajo: 117.0 Nivel intermedio: 112.2 Nivel alto: 108.4
		Matriz (cacao seco)	0.0138	0.0431	0.996	0.4 - 30.0	Nivel bajo: 113.9 Nivel intermedio: 111.8 Nivel alto: 117.7
Glucosa	UHPLC-C-CAD	Solvente: ACN	0.0964	0.0389	0.999	0.1 - 30.0	N/A
		Matriz (cacao fermentado crudo)	0.015	0.0424	0.997	0.5 – 30	Nivel bajo: 87.3 Nivel intermedio: 77.8 Nivel alto: 103.4
		Matriz (cacao seco)	0.0101	0.0432	0.997	0.6 – 30	Nivel bajo: 104.0 Nivel intermedio: 79.6 Nivel alto: 95.6
Sacarosa	UHPLC-C-CAD	Solvente: ACN	0.1516	0.0534	0.998	0.1 - 30.0	N/A
		Matriz (cacao fermentado crudo)	0.0111	0.0457	0.998	0.4 - 30.0	Nivel bajo: 120.2 Nivel intermedio: 110.2 Nivel alto: 116.4
		Matriz (cacao seco)	0.0288	0.0437	0.997	0.4 - 30.0	Nivel bajo: 84.8 Nivel intermedio: 111.2 Nivel alto: 111.1
Maltosa	UHPLC-C-CAD	Solvente: ACN	0.0444	0.0373	0.999	0.1 – 50	N/A
		Matriz (cacao fermentado crudo)	0.0188	0.0314	0.996	5.0 - 50.0	Nivel bajo: 112.8 Nivel intermedio: 102.0 Nivel alto: 118.1
		Matriz (cacao seco)	-0.0396	0.0347	0.998	5.0 - 50.0	Nivel bajo: 113.2 Nivel intermedio: 91.0 Nivel alto: 119.7

**Tabla 1-8:** (Continuación)

Compuesto	Técnica	Solvente para la preparación de la curva	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	Rango concentración curva (mg/L)	Porcentaje de recuperación
Manitol	UHPLC-C-CAD	Solvente: ACN	0.0888	0.0515	0.999	0.1 - 30.0	N/A
		Matriz (cacao fermentado crudo)	-0.0161	0.0473	1.000	0.4 – 30	Nivel bajo: 106.4 Nivel intermedio: 84.7 Nivel alto: 90.6
		Matriz (cacao seco)	-0.0146	0.0491	0.998	0.3 – 30	Nivel bajo: 110.9 Nivel intermedio: 104.6 Nivel alto: 110.0
Fenilalanina	UHPLC-C-CAD	Matriz (cacao fermentado crudo y seco)	-1.0253	0.0761	0.999	1.0 – 60	68
Leucina			0.1257	0.0627	0.998	1.0 – 60	96.2
Metionina			-0.2386	0.1547	0.996	1.0 – 60	<70
Valina			-0.7939	0.1069	0.998	1.0 – 60	75.2
Cisteína			0.1923	0.0631	0.998	1.0 – 60	116.3
Asparagina			-0.0707	0.077	0.999	1.0 – 60	114.6
Lisina			-0.4354	0.1158	0.999	1.0 – 60	79.9
Cítrico			0.105	0.0382	0.996	0.1 – 70	117.9
Málico			0.0897	0.0428	0.997	0.1 – 70	> 120
Oxálico			-0.015	0.0405	0.995	0.1 – 70	< 70
Succínico			0.0462	0.0121	0.999	0.1 – 70	79.2
Acético	HPLC-DAD	Matriz (cacao fermentado crudo y seco)	-0.0034	0.0161	0.992	3.0 - 20.0	85
	GC-MS	Matriz (cacao bien fermentado y seco)	215916.7125	1341.7457	0.999	0.5 – 100	72
Láctico	HPLC-DAD	Matriz (cacao fermentado crudo y seco)	-0.0253	0.0145	0.995	3.0 - 20.0	86

**Tabla 1-8:** (Continuación)

Compuesto	Técnica	Solvente para la preparación de la curva	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	Rango concentración curva (mg/L)	Porcentaje de recuperación
Teobromina	UHPLC-TQD/ESI	Matriz (cacao bien fermentado y seco)	425.072	1945.29	0.999	2.5 – 100	103.9
Cafeína	UHPLC-TQD/ESI	Matriz (cacao bien fermentado y seco)	-2541.82	13804.2	0.999	0.02 – 50	106.3
Teofilina	UHPLC-TQD/ESI	Matriz (cacao bien fermentado y seco)	-970.582	10170.6	0.999	0.02 – 50	103.9
Epicatequina	UHPLC-TQD/ESI	Matriz (cacao bien fermentado y seco)	-468.281	1546.46	1.000	0.02 – 50	92.5
Catequina			-209.54	198.18	0.995	0.02 – 50	
Polifenoles totales	Espectrofluorómetro	Solvente	-0.0044	0.0037	0.999	10 – 100	N/A
Orac	Espectrofluorómetro	Solvente	2.8258	0.0838	0.994	10 – 600	N/A

En el Anexo 1-2 se describen los resultados analíticos obtenidos de la estandarización (extracto etéreo, acidez total, alcaloides y monómeros de procianidinas). Además, el Anexo 1-3 recoge los resultados obtenidos de la validación de los métodos para la determinación de azúcares y manitol, en los cuales se corrigió el efecto matriz para cacao fermentado (humedad superior al 30 %) y cacao seco bajo un método de extracción en fase sólida y cuantificados por cromatografía líquida acoplada a un detector de carga por aspersion, Corona.

Debido al número de parámetros evaluados, el análisis estadístico multivariado se orientó a uno por Componentes Principales, seguido por un Análisis de Clúster, como se describe a continuación:

#### **1.3.4 Análisis estadístico multivariado del perfil bromatológico, físico y químico de cacao cosechado y fermentado en tres subregiones de Antioquia**

Los 38 parámetros evaluados al cacao van más allá de los descritos en la Norma Técnica Colombiana 1252 de 2003 en la cual se definen las exigencias mínimas del grano de cacao fermentado y seco. La amplitud del rango de análisis hace parte de la compilación de los aspectos considerados en varios estudios a razón de los requerimientos identificados por expertos encargados de la trazabilidad de la calidad del cacao desde su cosecha hasta la etapa final de poscosecha para la obtención de un producto competitivo que supla los requerimientos de los mercados nacionales e internacionales de las compañías encargadas de la industrialización del cacao (Araujo et al., 2014; Badrie et al., 2015; Kongor et al., 2016; Saltini et al., 2013; Wollgast & Anklam, 2000).

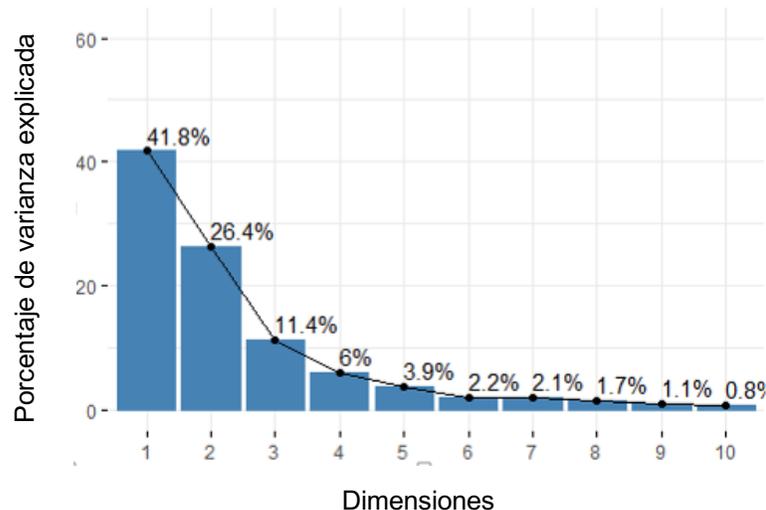
Cada uno de los análisis fueron incluidos en este estudio por la importancia de cada compuesto con respecto a criterios como: su aporte en el sabor (alcaloides y monómeros de procianidinas), aroma (azúcares reductores y aminoácidos libres), indicador del progreso de la fermentación (antocianinas, proteína, acidez y pH), propiedades funcionales (capacidad antioxidante y polifenoles totales) y comerciales (contenido de extracto etéreo).

Estudios previos reportan una alta correlación entre algunos de los análisis mencionados, como la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles o entre los atributos

sensoriales asociados al sabor amargo o astringente con la concentración de los alcaloides, entre otros (Carrillo et al., 2014; Crafacck et al., 2014; Rodriguez-Campos et al., 2012a, 2011). Este tipo de hallazgos allanó el camino para realizar un análisis bajo un tratamiento estadístico multivariado con el propósito de simplificar el conjunto de resultados obtenidos en múltiples variables para organizar las entidades muestrales. Para alcanzar el objetivo, el análisis se enfocó en las muestras recopiladas y de esta forma se definieron los gradientes por combinaciones de variables interrelacionadas, sin mayor pérdida de información, mediante la explicación de la variabilidad exhibida por los datos (Aculey et al., 2010a; Wehrens, 2011).

Como resultado de la aplicación del estudio estadístico multivariado elegido, el cual consistió en una de las técnicas de ordenación más empleadas denominada Análisis de Componentes Principales, se pudo extraer y describir los mayores gradientes independientes en datos multivariados como se refleja en la Figura (1-1). En términos de la distribución de varianza, permitió la identificación de la *redundancia*, es decir, la cantidad de información similar compartida entre los resultados de los análisis bromatológicos, físicos y químicos (ver tabla (1-7)) para las muestras, tanto al inicio como al final de la fermentación en las tres subregiones.

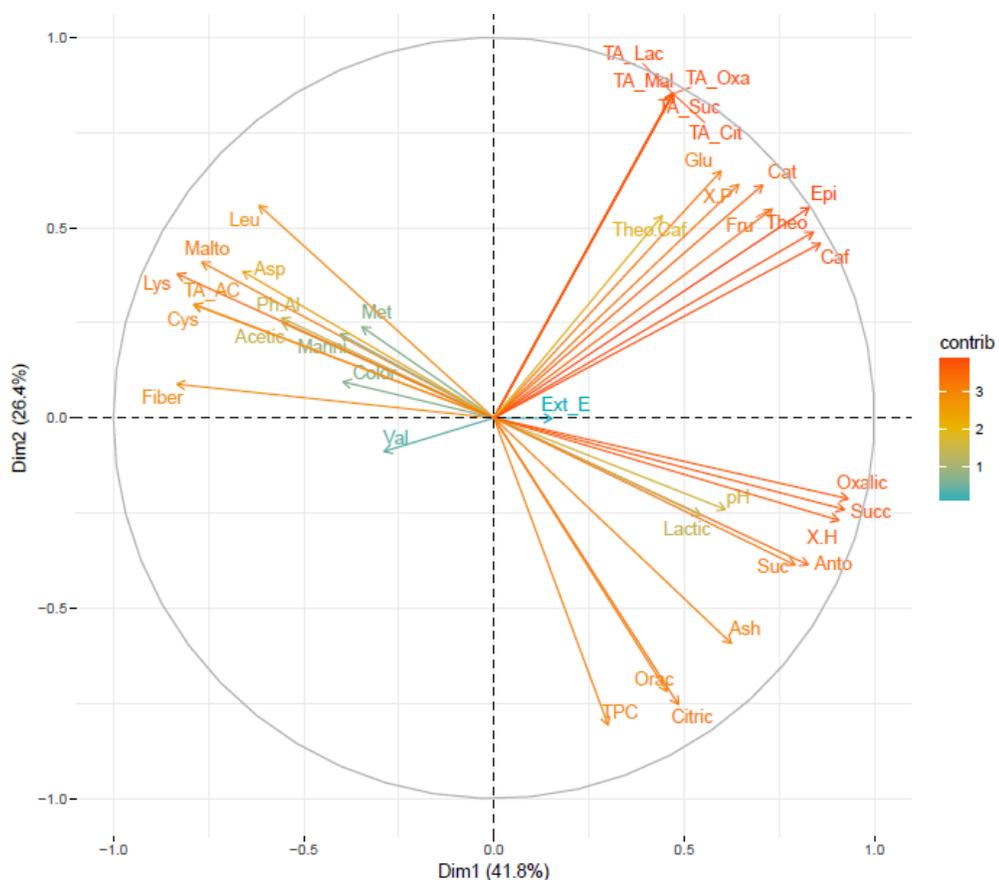
**Figura 1-1:** Representación del porcentaje de explicación de las varianzas de las componentes resultantes



De la Figura 1-1 se puede identificar que las tres primeras componentes principales explican el 79,6 % de la variación máxima en todas las observaciones muestrales analizadas. Adicionalmente se observa que las dos primeras componentes principales explican aproximadamente 68.2 % de la variación total, con las cuales se realizó el análisis de forma descriptiva. Ya el aporte de la tercera componente es solo de 11.4% de la variación total.

Las contribuciones de los parámetros que aportan a la variabilidad en las dos primeras componentes principales se pueden apreciar gráficamente a partir del *biplot* y el círculo de correlaciones en el primer plano factorial, los cuales se presentan a continuación (ver Figura (1-2)).

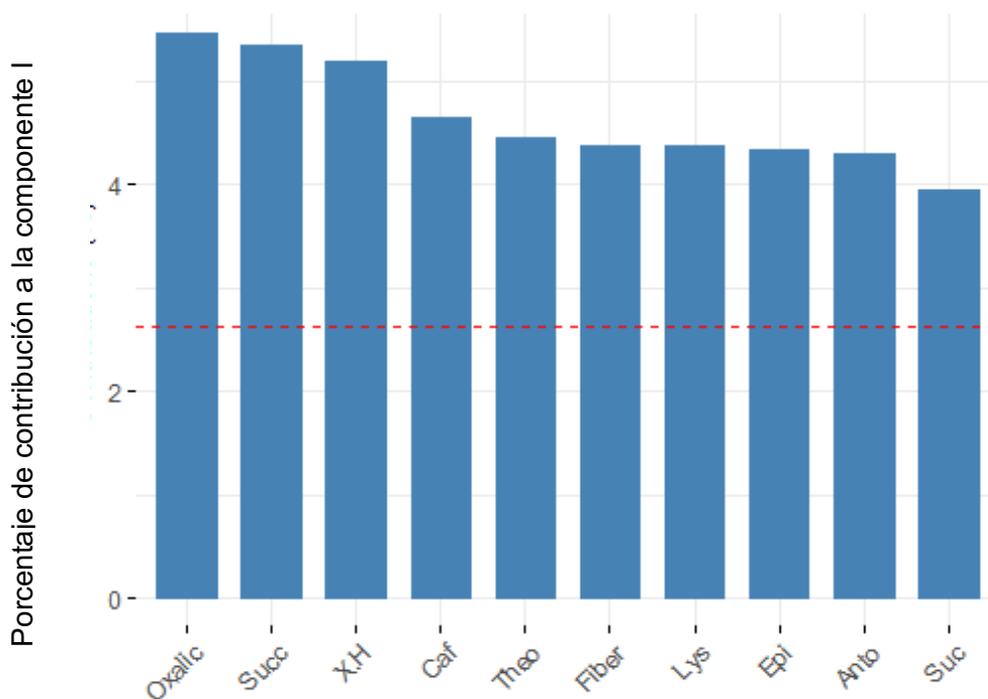
**Figura 1-2:** Biplot del Análisis de Componentes Principales entre los parámetros bromatológicos, químicos y físicos del cacao crudo y el bien fermentado



Las variables que están correlacionadas con la primera y la segunda componente principal son las más importantes para explicar la variabilidad en el conjunto de datos. Las variables que no se correlacionan con ninguna de las componentes principales, o que están correlacionadas con las demás componentes, presentaron poca contribución.

Los compuestos con mayor contribución a la primera componente principal en el eje positivo corresponden al porcentaje de humedad, fibra cruda, ácido oxálico y succínico, lisina, sacarosa, teobromina, cafeína, epicatequina y antocianinas. En el eje negativo los compuestos con mayor contribución fueron la acidez total expresada en ácido acético, leucina, lisina, cisteína, maltosa y fibra cruda (ver Figura (1-3)).

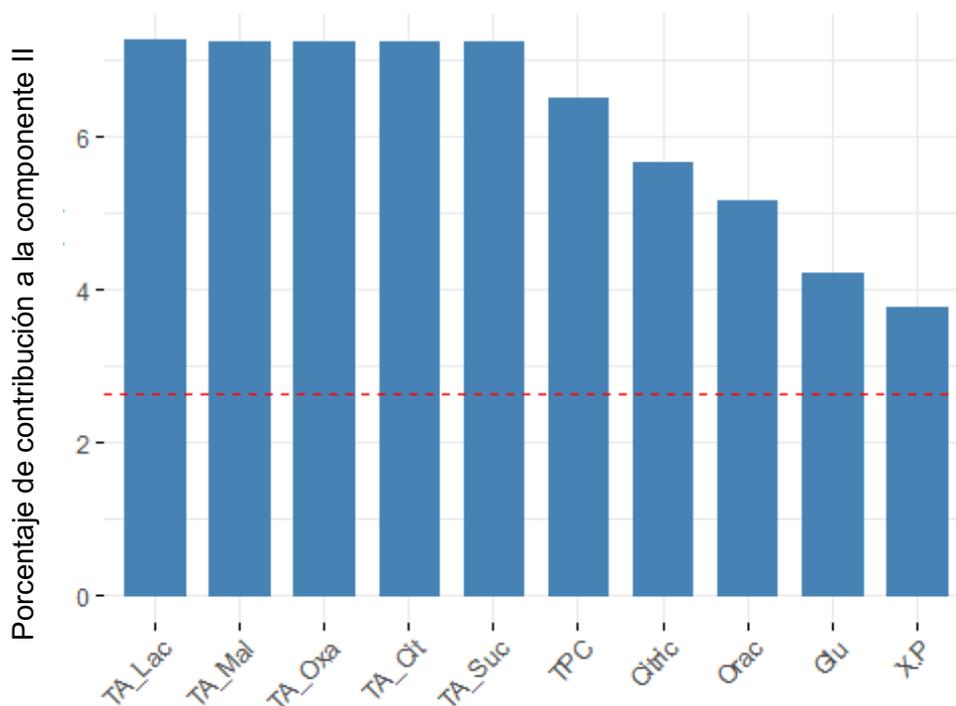
**Figura 1-3:** Contribución en porcentaje de las principales características que explican la Componente 1



Los compuestos con mayor contribución a la segunda componente principal corresponden a la acidez expresada en términos de ácido láctico, oxálico, cítrico, succínico, concentración expresada en %p/p de ácido cítrico, glucosa, porcentaje de proteína, contenido total de polifenoles y ORAC. En particular, estos compuestos presentan la mayor

contribución en el eje positivo de la segunda componente. En el eje negativo los de mayor contribución fueron: ácido oxálico, succínico, cítrico, antocianinas, cenizas, sacarosa, contenido total de fenoles y ORAC (ver Figura (1-4)).

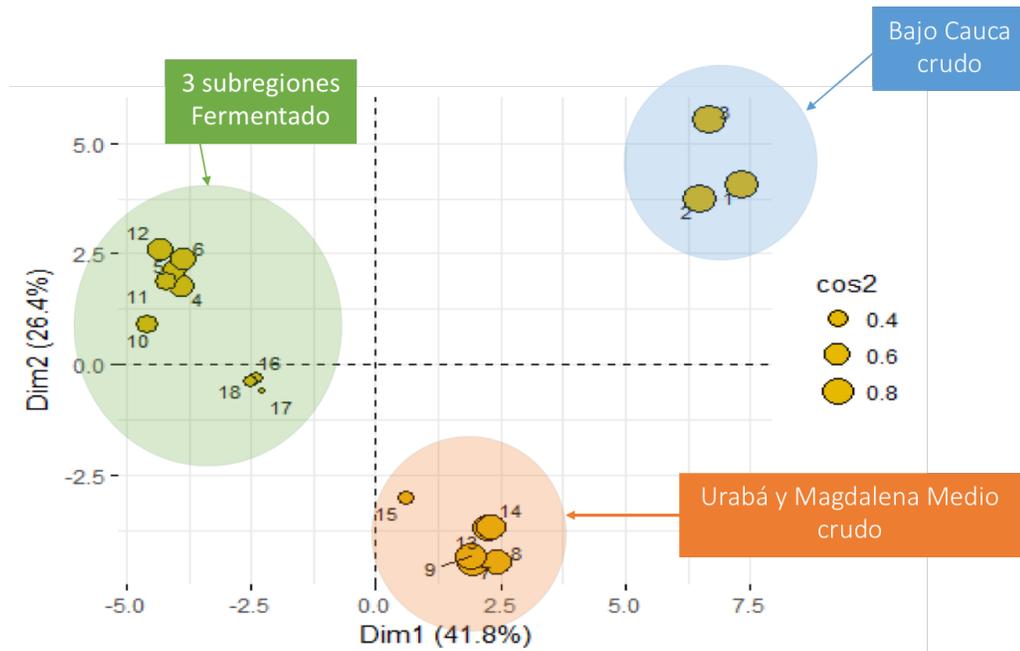
**Figura 1-4:** Porcentaje de contribución de las propiedades que más aportaron a la segunda componente principal



Las contribuciones de las variables en CP1 y CP2 permitieron distinguir entre el cacao sin fermentar y bien fermentado, como se evidencia en las variables que representan el eje positivo de la CP1:

Además, se puede analizar la calidad de representación de las observaciones muestrales utilizando como medida el coseno cuadrado, el cual, para valores altos, da indicios de una buena representación de la variable en la componente principal. En la Figura 1-5 se presenta la contribución de cada observación muestral de los cacaos al iniciar y finalizar la fermentación en cada subregión, ubicada en el primer plano factorial.

**Figura 1-5:** Contribución de cada observación muestral en el primer plano factorial, 1,2,3 (BC-SF); 4,5,6 (BC-F), 7,8,9 (U-SF); 10,11,12 (U-F); 13, 14, 15 (M-SF); 16,17,18 (M-F).

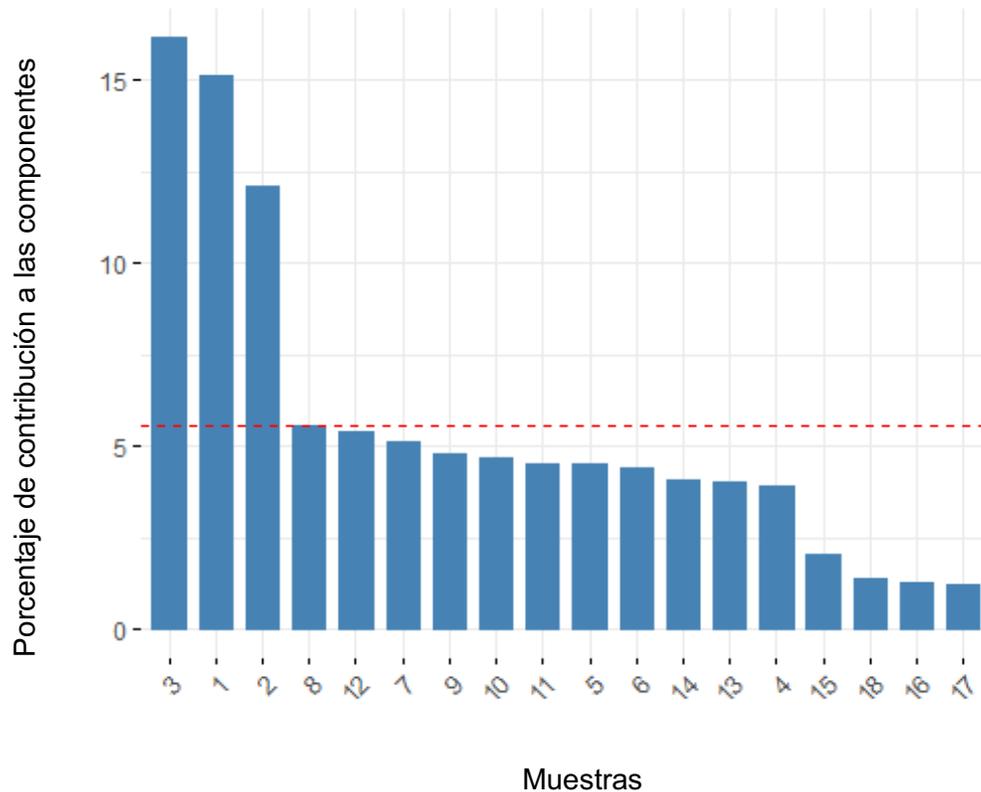


Se puede apreciar que los cotiledones provenientes de Bajo Cauca, antes de entrar al proceso de fermentación (1, 2 y 3), son los que presentan mayor contribución a las primeras dos componentes principales caracterizándose por tener niveles altos de acidez total expresada en ácidos láctico, málico, oxálico, succínico y cítrico; y niveles altos de epicatequina, teobromina y cafeína. Los cotiledones de la región de Urabá (7, 8 y 9) y Magdalena Medio (13, 14 y 15) se caracterizan por presentar valores altos de ácido cítrico, ORAC, polifenoles totales y cenizas, característicos de cacaos sin fermentar.

Se distingue una agrupación de los cacaos sin fermentar de Bajo Cauca, aparte de la asociación de los cacaos crudos de Urabá y Magdalena Medio. Después de la fermentación se identificó el grupo de Bajo Cauca y Urabá con alta asociación en la contribución mencionada y la última asociación con una baja contribución con cacao fermentado de Magdalena Medio.

Las contribuciones de las observaciones muestrales a las dos primeras componentes principales se presenta en el siguiente diagrama de barras, en el cual se puede observar el alto aporte de los cotiledones de la región del Bajo Cauca a cero horas del proceso de fermentación (0 CF) (ver Figura (1-6)).

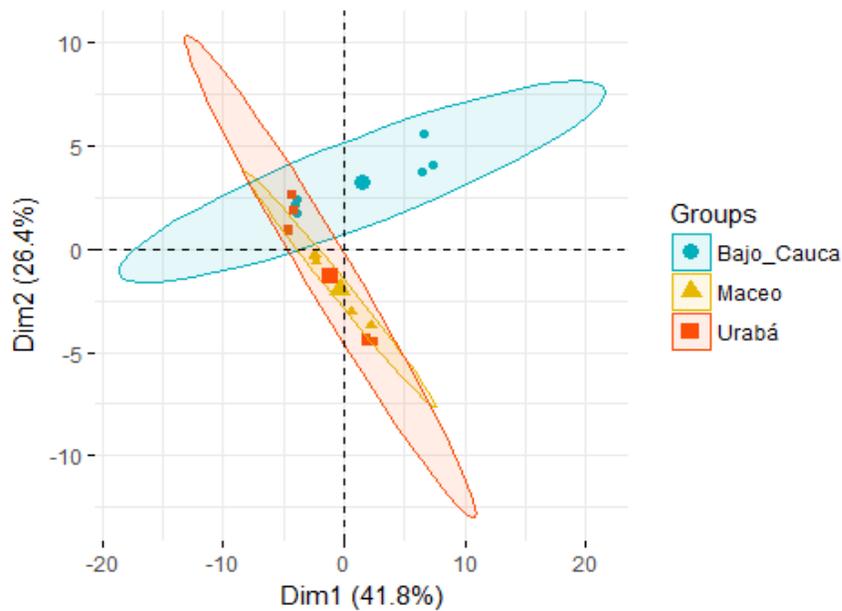
**Figura 1-6:** Contribución de las observaciones muestrales a las dos primeras componentes: 1,2,3 (Bajo Cauca sin fermentar), 4,5,6 (Bajo Cauca fermentado), 7,8,9 (Urabá sin fermentar), 10,11,12 (Urabá fermentado), 13,14,15 (Magdalena Medio-Maceo sin fermentar) y 16,17,18 (Magdalena Medio-Maceo sin fermentar)



Por subregiones, se puede apreciar que en Magdalena Medio la distribución de las observaciones en el primer plano factorial fue más homogénea entre sí, es decir, la variación de la distribución de las observaciones es baja y quedó contenida en la de Urabá, razón por la cual quedan descritas antes y después de la fermentación por las mismas combinaciones lineales de las variables. La variación en Urabá fue inversamente proporcional en términos de distribución, diferenciando claramente el proceso de

fermentación. Por último, en el Bajo Cauca se observó la mayor variabilidad (ver Figura (1-7)).

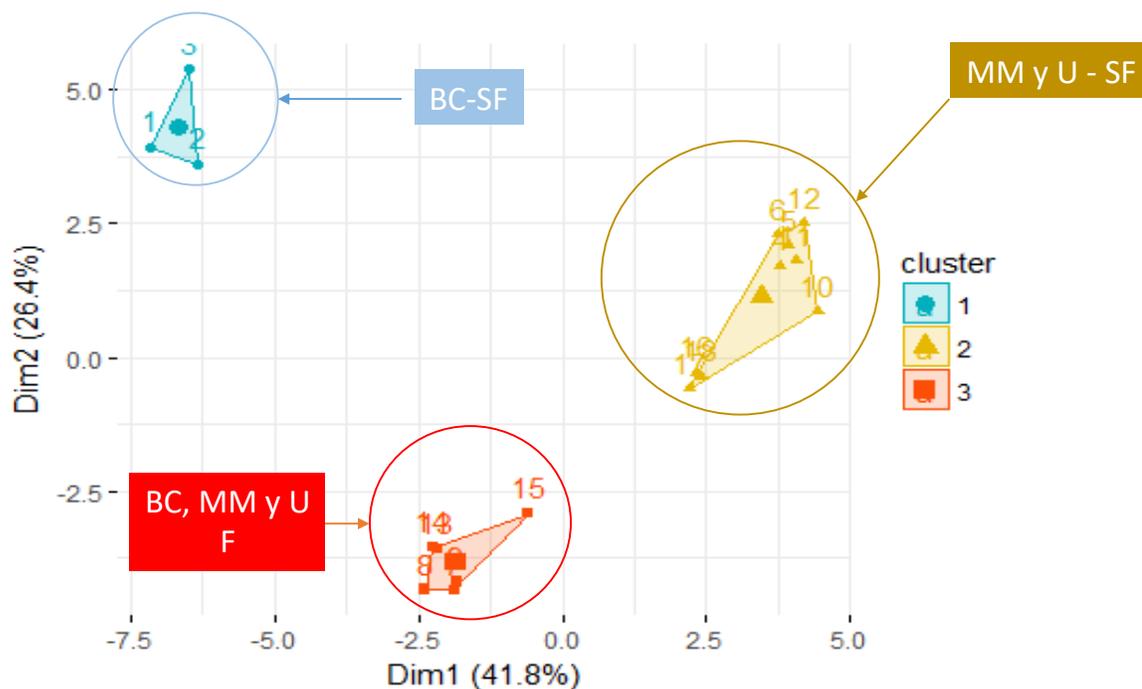
**Figura 1-7:** Distribución de la variabilidad de las componentes evaluadas por subregiones antes y después de la fermentación de la mezcla de clones de cacao en Bajo Cauca (circulo azul), Magdalena Medio – Maceo (triángulo naranja) y Urabá (cuadrado rojo)



### 1.3.5 Análisis de clúster

En términos de clúster tenemos la siguiente distribución en el primer plano factorial que explica 68.2 % de las similitudes en dos factores o dimensiones: Dim1 (41.8 %) y Dim2 (26.4 %), donde se observa la conformación de tres grupos que son, dentro de sí, lo más homogéneo posible (ver Figura (1-8)).

**Figura 1-8:** Clúster de la distribución en el primer plano factorial de cada observación muestral: 1,2,3 (Bajo Cauca sin fermentar), 4,5,6 (Bajo Cauca fermentado), 7,8,9 (Urabá sin fermentar), 10,11,12 (Urabá fermentado), 13,14,15 (Magdalena Medio-Maceo sin fermentar) y 16,17,18 (Magdalena Medio-Maceo sin fermentar)



A diferencia del ACP, el análisis de clúster permitió confirmar, de forma contundente, la distribución por subregiones antes de la fermentación, ya que se aparta claramente en el plano factorial el perfil de la mezcla de cacao obtenida en Bajo Cauca, que se agrupa en un primer clúster identificado con color azul en el eje superior positivo izquierdo. Los perfiles de las mezclas que provienen de Urabá y Magdalena Medio coinciden en el segundo clúster rojo, distribuido en el eje inferior en la escala negativa.

Después de finalizar la fermentación, momento indicado por los productores de cada localidad, e independiente de las condiciones iniciales de los cacaos cultivados en diferentes sitios, las tres subregiones fueron agrupadas en un mismo clúster identificado por el color amarillo y ubicado en el eje superior derecho en medio de los anteriores clústeres. Esta última agrupación permitió confirmar la asociación de las tres subregiones al finalizar la fermentación de acuerdo con la máxima variabilidad de las variables

identificadas, que explica la componente de estas observaciones a pesar de señalar dos vectores en la segunda componente principal cercana al eje X.

Las diferencias entre las subregiones al inicio de la fermentación podrían atribuirse a condiciones agroecológicas mencionadas previamente. Bajo Cauca fue la única zona que contaba con dos clases de terrenos que comprendían La Isla, rodeada por el río Cauca que presentó unas características de suelo con un pH alto (6.7) comparado con las demás zonas productivas donde se realizó la cosecha (4.7 - 5.0) y un índice de conductividad (21) y porcentaje de materia orgánica superior (94), a diferencia de los demás suelos (12 a 18) y (37 a 87) respectivamente, siendo además un suelo de textura arenosa en el cual se obtuvo aproximadamente 50 % de los clones regionales para esta subregión.

De igual forma, Bajo Cauca fue la zona con menor altitud (90 – 340 msnm), mayor temperatura ambiental y menor humedad relativa con respecto a Urabá y Magdalena Medio como se describió en el ítem 1.3.1 (ver Tabla (1-6)).

### **1.3.6 Aproximación quimiométrica**

Los hallazgos obtenidos del análisis estadístico multivariado brindaron información útil para identificar variables que pueden asociarse a las zonas productoras, las cuales poseen características específicas, como se evidencia en la diferencia entre Bajo Cauca con Urabá y Magdalena Medio cuando los granos de cacao no han sido sometidos a un proceso de poscosecha, específicamente la fermentación. Estos resultados pueden ser empleados como herramienta para el constante seguimiento en el que se ve inmerso el sector productivo, ya que cada vez se amplían más las áreas de cultivo en respuesta a políticas gubernamentales que apuestan por esta promisoriosa materia prima. Es así como, en el caso de Colombia, se pasó de 151.844 hectáreas sembradas (83.472 toneladas) en 2012, antes del inicio del Plan Decenal de Cacao 2012-2022, a 170.106 hectáreas (87.266 toneladas) en 2016, lo que demuestra avances en el cumplimiento de las metas establecidas en el sector, que en términos generales apuntan a aprovechar las áreas efectivas del país para su cultivo y posicionarse en el mercado de cacao, aumentando los volúmenes de

producción, pero siempre con calidad (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2012; Proexport Colombia, 2012).

Con el propósito de obtener un cacao con calidad, es importante resaltar que en el sector de materias primas agrícolas es fundamental la asociación del producto a una zona productiva, ya que es uno de los primeros pasos para dar valor agregado que sea avalado por certificaciones de *denominación de origen*. Donde esta forma, se apoya el posicionamiento del producto en mercados internacionales, como se ha evidenciado con el café. De igual forma, es fundamental el acceso a concursos de alto reconocimiento como el certamen organizado en el marco del Salón del Chocolate de París, *Concurso Cocoa Of Excellence*, donde los departamentos de Colombia, Santander y Arauca, han sido finalistas en 2010, 2011, 2015 y 2017 con cacaos identificados por las municipalidades de origen específicas.

Para validar la información estadística, fue necesario profundizar en el entendimiento del papel que juega la combinación lineal de las variables extraídas, identificando cómo cada análisis bromatológico, físico y químico seleccionado aporta de manera significativa en la diferenciación del perfil del cacao crudo proveniente de las tres subregiones productoras estudiadas de Antioquia, Colombia, como parte de la aproximación quimiométrica de esta fase del proyecto.

Se han reportado otros estudios que comparan países o subregiones de un mismo país, con miras a identificar diferencias en el contenido de aminoácidos libres, polifenoles totales, alcaloides, contenido de extracto etéreo, compuestos volátiles, entre otros. Sin embargo, el análisis y el tratamiento estadístico se ha realizado de forma individual, y en el caso de estudios a partir de estadística multivariada, solo se ha abarcado un número limitado de los parámetros considerados en este estudio, que dada su relevancia en poscosecha, y soportados en esa vigilancia tecnológica, se incluyó dentro del alcance de esta investigación, que busca aportar al sector productivo de cacao con la generación de nuevo conocimiento relevante para Antioquia y posiblemente proyectable a otras zonas del país (Counet, Ouwerx, Rosoux, & Collin, 2004; Esatbeyoglu, Wray, & Winterhalter, 2015; F. Gu et al., 2013; Harrington, 2011; Marseglia, Palla, & Caligiani, 2014; Menezes et al., 2016; L. F. Oliveira et al., 2016a; Pino, Ceballos, & Quijano, 2010; Rohsius et al., 2006).

Las variables características del cacao sin fermentar en Bajo Cauca fueron la acidez total expresada en ácido cítrico, láctico, oxálico y succínico, el contenido de glucosa, fructosa, proteína total, teobromina, catequina, relación teobromina/cafeína, catequina y epicatequina, es decir 12 de las 38 analizadas. De otro lado Urabá y Magdalena Medio fueron descritos por 11 variables: ácido cítrico, láctico, oxálico y succínico, pH, sacarosa, antocianinas, cenizas, contenido de humedad y polifenoles totales y capacidad antioxidante por Orac.

Nótese que la mayoría de las características podrían ser aprovechadas o controladas para obtener óptimos resultados en la siguiente etapa de fermentación, aprovechando el conocimiento *a priori* de las transformaciones que puede ocurrir con cada compuesto a través del manejo de las condiciones agronómicas y buenas prácticas agrícolas, que son consideradas como algunas de las causas a las cuales se le atribuyen en gran medida el perfil del grano de cacao crudo, pero que son susceptibles de cambio y continuo mejoramiento (Bedoya, 2016; Hashim, Selamat, Kharidah, & Ali, 1998; L. F. Oliveira et al., 2016b).

De igual forma, el estudio quimiométrico permitió la distinción de la combinación lineal de 13 variables asociadas al cacao después de ser sometido al proceso de fermentación que consolida ocho aminoácidos libres, la acidez expresada en ácido acético y su respectiva concentración determinada, manitol, fibra cruda total y color, explicadas principalmente por la componente principal del eje izquierdo, siendo la valina, metionina, manitol y color las variables de menor contribución, seguido por el ácido acético y la fenilalanina con un aporte medio y los demás con un aporte alto (ver Figura (1-2)).

Los resultados del análisis estadístico multivariado del perfil del cacao después de la fermentación, están marcados por una dinámica que se puede dividir en dos partes. En primera instancia, por una serie de reacciones sinérgicas que se producen en la pulpa mucilaginosa que rodea el grano y, segundo, de forma paralela, las reacciones de hidrólisis que se producen en el interior del cotiledón (Moreira, Miguel, Duarte, Dias, & Schwan, 2013). Ambas transformaciones son gobernadas por un consorcio de microorganismos y enzimas que, al propiciar reacciones exotérmicas para la formación de ciertos compuestos que aumentan la acidez y la temperatura, logran la inhibición de la germinación del embrión

y propician la hidrólisis de macromoléculas en precursores de aroma, entre ellos los aminoácidos libres que aparecen como principales parámetros descriptivos del cacao.

La secuencia comienza en la parte externa o pulpa rica en azúcares y ácido cítrico a pH bajo: i) las levaduras comienzan la fermentación alcohólica al actuar sobre los azúcares reductores para la producción de alcohol etílico, lo que conduce al crecimiento secuencial de *Kloeckera* y las especies *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Kluyveromyces*, estas últimas determinantes en la posterior producción de compuestos volátiles y enzimas con actividad pectiliasa (Ardhana & Fleet, 2003; Leal, Gomes, Efraim, De Almeida Tavares, et al., 2008) (Batista et al., 2015) ii). A la par, el ácido cítrico es sustrato para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas en condiciones micro-anaerobias hasta las primeras 48 h.

Como consecuencia de la primera fase, el pH aumenta ligeramente al disminuir el ácido cítrico y producirse ácido láctico que tiene una menor capacidad de donar protones a la del ácido cítrico. Bajo las condiciones de pH bajos y ausencia de oxígeno, la actividad enzimática se modifica de forma que las pectinasas con actividad pectiliasa actúan sobre la pectina y compuestos ligníticos presentes en el mucílago y testa, degradándolos y permitiendo el drenaje y disminución de la humedad en el exterior del grano (Gil et al., 2016). Por lo contrario, la polifenoloxidasas se reduce más de 80 % antes de las primeras 48 h, por lo que la oxidación de los *o*-dihidroxifenoles a *o*-benzoquinonas se disminuye, esto es, las antocianinas libres y flavan-3-ol (De Brito, García, & Amancio, 2004; Noor-Soffalina et al., 2009; Wollgast, 2004; Wollgast & Anklam, 2000), iii).

Al iniciarse el volteo, es decir, incorporar oxígeno por agitación manual homogénea, se produce la oxidación del etanol hasta ácido acético por la acción de las bacterias del ácido acético como *Acetobacter* y *Gluconobacter* spp. Entre las 72 y 96 h de fermentación, se ha dado el mayor avance de la hidrólisis de las antocianinas por la acción de las enzimas glucosidasas y la hidrólisis enzimática de los azúcares por la acción de las invertasas, aunque en menor proporción que el rompimiento del enlace glucosídico por el efecto de las condiciones ácidas del medio, ya que la temperatura y pH inhiben las invertasas. En estas instancias, se ha dado un aumento de la temperatura y una suficiente disminución de la acidez como para darse la muerte del embrión, rompimiento de la vacuola central para iniciar la acción hidrolítica de las proteínas y difusión u oxidación no enzimática de los

polifenoles. Finalmente, varias especies de *Bacillus* se desarrollan cuando el pH aumenta, comienzan las reacciones no enzimáticas y se producen otras reacciones microbiológicas para generar alcoholes primarios y secundarios, ésteres de bajo peso molecular y algunos compuestos volátiles relevantes como la acetoína y linalool.

En la Figura 1-9 se describen, de manera general, los pasos antes descritos de la marcha microbiológica de la fermentación de cacao.

**Figura 1-9:** Descripción de las etapas de fermentación de las poblaciones microbiológicas y enzimáticas que participan y los principales productos.



Para el entendimiento global de las variables distribuidas en cada componente, se discute a continuación el aporte de su perfil químico del cacao antioqueño con tres de sus zonas productivas y proceso espontáneo de fermentación.

— **Acidez y pH:** este parámetro puede ser seguido por la determinación de la acidez total expresada en cada ácido orgánico característico del procesamiento del cacao, dependiendo de su desarrollo a medida que interviene (formación o disminución) en diferentes etapas de la poscosecha.

La acidez total permite obtener el perfil general, pero es necesario conocer cuál es el ácido predominante para su expresión en cada equivalente, ya que esta medida indica únicamente la suma de los ácidos libres sin tener en cuenta su fuerza en la mezcla. Por tal

razón, se determina en un pH entre 7.8 y 8.2 cuando todos los ácidos orgánicos se encuentran en equilibrio, principalmente los débiles (Brown, 2004).

Entre los ácidos esperados en el cacao crudo se destaca el ácido cítrico, un oxiácido que aporta en mayor medida al aumento de la acidez del medio en los frutos frescos, ya que es bio-sintetizado durante la maduración del fruto y se localiza principalmente en el mucílago. Su capacidad acidulante, superior a la de los demás ácidos orgánicos presentes en el cacao, se debe a los tres grupos donadores de hidrógenos (E. O. Afoakwa et al., 2012; Emmanuel Ohene Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2009a; Emmanuel Ohene Afoakwa et al., 2013). Otros de los oxiácidos que se distinguen por tener un grupo alcohol, y pueden presentarse junto con el ácido cítrico, son el málico y láctico, aunque en las mezclas de cada subregión se detectó solo la presencia del ácido láctico en bajas concentraciones y el málico no fue detectado a una concentración superior a 0.1 mg/L (Vian Ortuño, 1998).

Es importante resaltar que en la transformación química que sufre el cacao durante la poscosecha, el ácido acético y láctico sobresalen por su desempeño al encargarse de generar las condiciones propicias para inhibir la germinación del embrión al interior del cotiledón, lo que posteriormente influye para que se produzcan los precursores de aroma durante la fermentación (Saltini et al., 2013; Schwan, 2015). Además, son considerados indicadores de la calidad del secado al caracterizarse por su volatilidad: el ácido acético es un compuesto volátil y el láctico tiene un carácter semi-volátil al poseer un grupo alcohol. Estos son los ácidos más relevantes en el aporte de acidez en esta etapa (Vian Ortuño, 1998).

El ácido acético estuvo presente solo en concentraciones cercanas al límite mínimo de cuantificación en el cotiledón crudo (0.5 mg/L) (ver Tabla (1-8)) lo que puede atribuirse al conocimiento de su ruta metabólica, que no se espera principalmente durante la maduración del fruto en el cacao sino durante la fermentación, en la cual se forma a partir de una serie de reacciones que consisten en una oxidación del etanol para producir acetaldehído mediante un alcohol deshidrogenasa específico de la coenzima nicotilamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), seguido por una hidratación para finalizar con una segunda oxidación hasta formar el ácido acético, siempre en presencia de oxígeno y bacterias

acetobacter. Aunque también es conocida la producción de ácido acético en condiciones de oxidación del ácido láctico, en ausencia o bajas concentraciones de glucosa en el medio (Moreira et al., 2013).

Por lo anterior, se puede entender la respuesta del análisis multivariado en el cual el ácido acético fue el único de los ácidos orgánicos que no aportó en la explicación de la variabilidad de los cacaos crudos de las tres localidades, diferente al ácido láctico que estuvo en bajas concentraciones  $0.86 \pm 0.04$  % p/p suficiente para ser parte de la combinación lineal de las componente que agrupa las observaciones de cacao crudo provenientes de Urabá y Magdalena Medio con una contribución media (entre 2 y 3).

En paralelo a los ácidos antes mencionados, es posible encontrar algunos de los ácidos dicarboxílicos como el ácido oxálico y succínico, este último presente en los frutos de cacao fresco en mayor proporción, tal como se comportó en las unidades experimentales evaluadas.

La comparación de las concentraciones entre subregiones es más pertinente aún si se hace referencia a la concentración real de cada ácido para asegurar la asociación de cada ácido orgánico con la acidez total, dinámica relevante en el seguimiento diario de la fermentación o secado para llegar al entendimiento de sus correlaciones. En este sentido, la diferenciación de Urabá y Magdalena Medio de Bajo Cauca en granos crudos se basó en la concentración del ácido cítrico, oxálico y succínico, así como el pH, métodos complementarios y más robustos, homólogos de la acidez total que explicaron la variabilidad de los perfiles de estas dos zonas. Las diferencias pueden ser evidenciadas por el comportamiento de la concentración del ácido cítrico, que en Urabá y Magdalena Medio fue más alta y, por el contrario, oxálico y succínico más baja que en Bajo Cauca.

El pH es igual de determinante para su análisis de agrupación de Urabá y Magdalena Medio, ya que fue incluido en la asociación de variables explicativas de la varianza a pesar de que su aporte estuvo en una escala de intensidad media (ver Figura (1-2)).

El aporte del pH puede ser relevante para emplearse como indicador de calidad ya que puede ser una medida indirecta de aspectos como la relación que tiene con la estabilidad

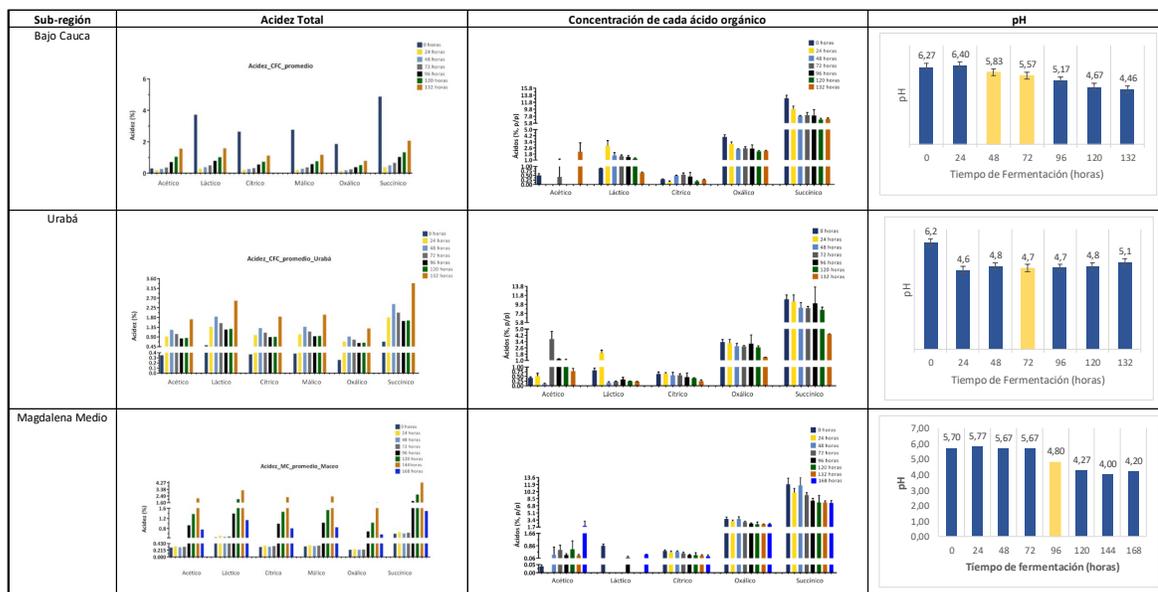
de los componentes. Un ejemplo de este efecto es la estabilidad de las antocianinas dependiendo del rango de pH, lo que propicia la permanencia del color violeta a pH entre 6 y 7, rango en el cual se encontraban los cotiledones crudos, pero que a pH de 5 pueden ser incoloras y a pH más bajos presentan un viraje a tonos rojizos a lo largo del proceso fermentativo donde hay un cambio en este valor (Belitz and Grosch 1999). No obstante, como se aprecia en la Figura (1-2), solo será explicativo para diferenciar cacaos crudos provenientes de Urabá y Magdalena Medio con respecto a Bajo Cauca, o en su defecto, regiones similares a las evaluadas en este estudio. Otra interpretación de los valores de pH encontrados es la asociación a su efecto sobre la activación o inhibición de las enzimas, como la polifenol oxidasa que se inhibe a bajos valores de pH y evita la oxidación de polifenoles, y por lo tanto, influye en los atributos sensoriales como el sabor astringente o amargo (Kongor et al., 2016; Noor-Soffalina et al., 2009).

Por último, como se discutió en el apartado 1.3.4., el Análisis de Componentes Principales permitió diferenciar entre el cacao crudo de cada zona productiva y del cacao al finalizar la fermentación.

Dentro de la categoría de ácidos orgánicos que aportaron a los cambios de acidez y pH en el medio, durante la fermentación, se hace evidente la forma en la que se alcanza la concentración final de ácido acético, que fue el compuesto volátil incluido en las variables para explicar lo sucedido en las tres subregiones después del proceso.

En la Tabla 1-9 se describe el comportamiento de la acidez total expresada en miliequivalentes de cada ácido orgánico evaluado, como acético, cítrico, láctico, málico, oxálico y succínico, y su respectiva concentración en % p/p en la mezcla de clones estudiados cada 24 horas durante la fermentación en Bajo Cauca (0 a 132 h), Urabá (0 – 132 h) y Magdalena Medio (0-168 h).

**Tabla 1-9.** Descripción del comportamiento de la acidez total expresada en miliequivalentes de cada ácido orgánico como acético, cítrico, láctico, málico, oxálico y succínico evaluado y su respectiva concentración en % p/p en la mezcla de clones evaluados cada 24 horas durante la fermentación en Bajo Cauca (0 a 132 h), Urabá (0 – 132 h) y Magdalena Medio (0-168 h).



Después de la fermentación, la concentración del ácido acético finalizó por debajo de 2.1 % p/p, siendo la calculada en Urabá la más baja y del Bajo Cauca la más alta, lo cual se refleja en el comportamiento del pH que finaliza más alto en Urabá. Para la comparación de los rangos de referencia, es importante destacar que la mayoría de los estudios reportan es el pH del exterior del grano, el cual se aconseja como indicador de buena calidad entre 5 y 5.5 para evitar excesivas fermentaciones con valores por encima del rango o fermentaciones incompletas por debajo de 5 (E Portillo et al., 2011). Por el contrario, en esta investigación se analizó el cotiledón sin testa ni pulpa, que es la parte del grano que ingresa a las formulaciones para la obtención de los derivados de cacao, es decir, la materia prima a la que se le debe hacer las verificaciones de calidad. Por esto, el rango de 4.20 a 5.1 podrá ser tenido en cuenta en futuros estudios como un indicador de calidad, aunque es necesario su evaluación posterior en el cacao seco que es la presentación en la que se comercializa y se evalúa bajo la norma vigente de cada país.

Con respecto al comportamiento de los demás ácidos después de la fermentación, se observa en la Tabla (1-9) que el mucílago fue la matriz del grano de cacao que presentó mayor contenido de ácido cítrico (aprox. 10 veces más que el cotiledón en Bajo Cauca y Urabá, y 23 veces más que en Magdalena Medio); pero, aún bajo esta condición, a las 48 h de fermentación se evidenció una disminución superior al 50 % de su concentración, resultados similares a los reportados por Rodríguez y colaboradores (Rodríguez-Campos et al., 2011). Esto puede explicarse con la metabolización hasta ácido acético y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por la acción competitiva del *Lactobacillus plantarum* (Schwan, 2015). Los incrementos en algunos momentos del seguimiento pueden deberse a su continua biosíntesis durante la fermentación en presencia de *Lactobacillus plantarum* en co-cultivo *Saccaromyce cerevisiae*, en donde predomina en el aprovechamiento de la glucosa para producir más ácido cítrico, bajando el pH y produciendo menos ácido láctico.

La acción de consorcios bacterianos ácidos lácticos y acéticos acompañados de condiciones aerobias y altas temperatura, propician la formación de otros ácidos como succínico, oxálico, entre otros, en concentraciones menores (E. O. Afoakwa et al., 2012; Emmanuel Ohene Afoakwa et al., 2009a, 2013), aunque el perfil reportado al final de la fermentación difiere a lo reportado por Rodríguez y colaboradores (Rodríguez-Campos et al., 2012a).

— **Alcaloides y relación Teobromina/Cafeína:** la teobromina (3,7-dimetilxantina), cafeína (1,3,7-timetilxantina) y teofilina (1,3 dimetilxantina) presentes en el cacao son los alcaloides derivados de nucleótidos tipo purinas de la familia de las metilxantinas (Zulak et al., 2006). La biosíntesis de la teobromina y cafeína está asociada a diferentes partes de la mazorca en sus diferentes etapas de maduración que inicia por el pericarpio, pero que al alcanzar su madurez óptima, la principal síntesis y acumulación se encuentra en la vacuola central de la semilla de cacao, razón para evaluar el material vegetal en estudio solo en el cotiledón sin pulpa y sin testa.

De acuerdo con estudios previos, la teofilina presentó sitios de acumulación diferentes al cotiledón y solo se cuantificó en bajas concentraciones en la testa y placenta (Zheng, 2003). Resultados similares identificados en la mezcla evaluada en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio donde no se detectó la teofilina en el cotiledón evaluado por UHPLC-

TQD (tecnología dispuesta de una alta sensibilidad para la cuantificación con un límite mínimo de cuantificación desde 0.02 mg/L).

Carrillo y colaboradores (2011) utilizaron la cuantificación de las principales metilxantinas presentes en cacao para verificar su asociación con 11 diferentes zonas geográficas de Colombia y establecieron que la cafeína y la relación teobromina/cafeína pueden ser utilizadas para la identificación de las regiones evaluadas y esta última a la agrupación por variedades. Entre las relaciones reportadas se encuentra la respuesta de las concentraciones de la teobromina con la altitud de los suelos. Es así como a menor altitud, mayor contenido del alcaloide (Carrillo et al., 2014). Estas aproximaciones coinciden con los resultados obtenidos en Bajo Cauca, zona productiva de cacao ubicada entre 90 y 340 msnm de altitud y que correspondió al valor más alto de teobromina ( $0.65 \pm 0.10$  % p/p), mientras que las concentraciones en Urabá y Magdalena Medio representan aproximadamente el 26 % (teobromina) y 33 % (cafeína) de la concentración en Bajo Cauca (ver Tabla (1-7)). De allí que no se hayan diferenciado entre Urabá y Magdalena Medio por esta variable. Caso contrario para Bajo Cauca, que al presentar una concentración superior y significativa ( $p < 0.05$ ) hizo parte de la CP1 en el eje positivo donde representan un contenido inicial elevado característico de cacaos sin fermentar y puede ser un indicador químico característico para esta subregión.

La relación teobromina/cafeína es una aproximación empleada en estudios previos para la agrupación de los cacaos según la variedad de acuerdo con una escala donde valores de relación inferiores a 3 corresponden a cacaos tipo Criollos, de 3 a 9 corresponde a un rango para clasificar a los Trinitarios y por último de 9 a 11 se ubican los Forasteros. En la mezcla evaluada la relación Teobromina/Cafeína fue similar aunque las concentraciones variaran entre las tres localidades. A pesar de que la principal proporción de la mezcla la aportó un clon tipo Forastero (CCN-51), 14.1 % fue representado por los clones con características relacionada con las variedades Trinitario (ICS-1) y Criollos (FEC-2 y FLE-2) lo que conllevó probablemente a que a relación se mantuviera por debajo de 3.

La relación tiene una importancia desde el punto de vista funcional, ya que se le han atribuido beneficios sobre la salud. A pesar de esta ventaja, los atributos sensoriales proporcionados por estos alcaloides sobre el cacao han sido parte de estudio para lograr

disminuirlos, puesto que se les atribuye un aporte significativo al sabor astringente, lo que conlleva al reto de alcanzar un equilibrio (E. O. Afoakwa et al., 2012; Brunetto, Gutiérrez, Delgado, & Al, 2007). Esta variable hace parte del conjunto de parámetros que explican la variabilidad del cacao crudo cosechado en Bajo Cauca con una contribución media que se diferencia de las demás subregiones al ser la más alta ( $2.69 \pm 0.16$ ) debido a la mayor concentración de teobromina.

Una de las estrategias para disminuir la concentración inicial de los alcaloides en cacaos crudos, e influir en el decrecimiento de su sabor astringente calificado como un defecto, es modificar el medio del tiempo de almacenamiento de las mazorcas después de la cosecha y el drenaje de la pulpa después del desgrane en la etapa previa a la fermentación, de forma tal que la concentración presente en el pericarpio, placenta y testa puede disminuir con el drenaje de las mismas al ser solubles en agua, como se refiere en estudios realizados en cacao de Ghana , (hasta 21 días de aguante) y Venezuela (5 días). La desventaja que ofrece este procedimiento es que posiblemente propicia granos germinados, por lo que el tiempo de almacenamiento de la mazorca puede variar hasta lograr concentraciones que respondan a los requerimientos de la industria, ya sea en cacao crudo seco al que le han atribuido importantes beneficios por la presencia de altos contenidos de alcaloides y polifenoles, y se han incorporado en mezclas especiales con el cacao bien fermentado donde se espera una disminución considerable (E. O. Afoakwa et al., 2012; Emmanuel Ohene Afoakwa et al., 2013; E Portillo et al., 2011).

La verificación del comportamiento del contenido de los alcaloides y su respectiva relación Teobromina/Cafeína se muestra en la Tabla 1-10. También se ilustra la concentración al inicio y final de la fermentación del contenido de alcaloides y la relación entre Teobromina y Cafeína.

**Tabla 1-10:** Descripción del comportamiento a lo largo de la fermentación del contenido de alcaloides y la relación Teobromina/Cafeína.

Sub-región	Alcaloides	Relación Teobromina/Cafeína
Bajo Cauca		
Urabá		
Magdalena Medio		

Como se observa en la Tabla 1-10, la disminución en las tres municipalidades es baja con respecto a la relación Teobromina/Cafeína, ya que Urabá y Magdalena Medio presentaron un decrecimiento de 1.7 % y solo en Bajo Cauca alcanzó 6.3 %. La diferencia entre subregión guarda relación con el comportamiento del cambio entre los alcaloides después de la fermentación que está en una relación aproximada 2:1 en Bajo Cauca con respecto a las otras dos zonas. Así, su disminución fue 81.5 % para Teobromina y 79.2 % de Cafeína, en Urabá 44.4 % y 37.5 %, seguido por Magdalena Medio con 35.3 % y 28.6 %, respectivamente para cada alcaloide. Se nota un decrecimiento similar en las dos metilxantinas y de ahí que la relación se mantuviera sin mayores cambios.

La disminución superior al 20 %, valor de referencia de otros estudios previos para cacaos Forasteros, pudo darse por los días de almacenamiento previo, así como también la posible permeabilidad de la testa, mayor en los clones de tipo Criollo y Trinitario empleados en la mezcla de cacaos evaluada comparado con el CCN-51 (Carrillo et al., 2014).

— **Polifenoles y Capacidad Antioxidante:** el contenido total de polifenoles presente en el cacao está relacionado con la calidad del fruto y sus futuras aplicaciones en la industria de chocolates, en la que cada día se orienta el desarrollo de productos con un alto contenido de cacao que poseen propiedades funcionales como la capacidad antioxidante, la cual es atribuida a los compuestos fenólicos presentes en el grano de cacao.

La distribución de los polifenoles en el cacao ha sido objeto de un sinnúmero de estudios, desde la clasificación (Patras, Milev, Vrancken, & Kuhnert, 2014)(Vázquez-Ovando, Molina-Freaner, Nuñez-Farfán, Betancur-Ancona, & Salvador-Figueroa, 2015a), la biosíntesis (Badui Dergal, 2006), la variación de la concentración como resultados de las diferentes transformaciones a lo largo de todas las etapas de la cadena productiva, que abarcan aspectos como el tipo de genotipo (Elwers, Zambrano, Rohsius, & Lieberei, 2009; Jonfia-Essien, West, Alderson, & Tucker, 2008; Oracz, Zyzelewicz, & Nebesny, 2015), hasta el manejo de cultivo y condiciones agronómicas (Oracz et al., 2015), las variables que los afectan durante la fermentación, secado e industrialización (Di Mattia et al., 2013; Esatbeyoglu et al., 2015; Ioannone et al., 2015b; Tomas-Barberán et al., 2007; Zapata Bustamante, Tamayo Tenorio, & Alberto Rojano, 2013), y los métodos para la cuantificación (Mari et al., 2015; Ortega et al., 2010), entre otras.

Existen diversos estudios que buscan evaluar la misma variedad de cacao en diferentes zonas de cultivo para explicar la variación del contenido de polifenoles totales y su capacidad antioxidante. Sin embargo, aún no se ha alcanzado un consenso para llegar a un modelo predictivo (Elwers et al., 2002; Niemenak et al., 2006). En gran medida, esto podría explicarse por la cantidad de aspectos controlables, como se mencionó antes, que pueden influenciar los resultados, y porque existen otras variables que hacen parte de lo intrínseco de la planta o fruto, como su interacción con otros componentes de azúcares, ácidos y aminoácidos precursores, adicional a factores climáticos no controlables.

Barberán y colaboradores (2007) sugieren que el entendimiento de la fuente de variabilidad del contenido de polifenoles totales y su capacidad antioxidante requiere de un estudio más integrador, ya que al evaluar el efecto individual de un factor puede conllevar a discrepancias y dificultar un alcance más preciso de los objetivos, lo cual trae como consecuencia la estandarización de la calidad para su reconocimiento y el posterior posicionamiento en el mercado de acuerdo a la funcionalidad que proporcionan los polifenoles totales, o facilitar la toma de decisiones en el mejoramiento productivo y garantía de la homogeneidad de las características del producto (Tomas-Barberán et al., 2007). De allí que este estudio se basó en el análisis multivariado para obtener una información útil en la diferenciación de cada subregión productiva en Antioquia, ya que se evidenció que las variables correspondientes al contenido total de polifenoles y capacidad antioxidante hicieron parte de aquellas que definen, en combinación lineal con otros parámetros, a las muestras evaluadas en Urabá y Magdalena Medio. Ambas zonas se caracterizaron por tener un contenido superior al reportado en Bajo Cauca, expresión que pudo estar dada por las condiciones agronómicas. Por ejemplo, en Magdalena Medio los cultivos variaron entre 900 y 1230 msnm y el sistema de fertilización depende en gran medida de la inclinación del terreno e influye en la absorción de nutrientes (Bedoya, 2016). Por otro lado, el sombrero y control de riego son dos factores asociados con el estrés oxidativo, que activa la producción de polifenoles como mecanismo de defensa y control (Tomas-Barberán et al., 2007; Zuidema, Leffelaar, Gerritsma, Mommer, & Anten, 2005).

En Bajo Cauca las unidades productivas ubicadas en zonas alejadas del río Cauca contaban con sombrero inferior a 10 % (radiación máxima 1032.7 W/m<sup>2</sup> Solar), pero la finca Dios con Nosotros (radiación máxima 1188.4 W/m<sup>2</sup> Solar) que se encuentra rodeada por el río, tiene una mayor protección con cultivos transitorios y permanente (41 %) y coincide con la unidad de donde se cosecharon mayor cantidad de frutos de cacao. En la comparación de Bajo Cauca con Magdalena Medio (radiación máxima 1118.8 W/m<sup>2</sup> Solar) y Urabá (radiación máxima 1181.03 W/m<sup>2</sup> Solar) se encontraron más unidades productoras con solo 10 % de sombrero o sin esta protección a pesar de ser cultivos con más de 4 años en las que se espera una proporción de 30 % de sombrero permanente (ver Anexo (1-4)). Estas observaciones, alineadas con las teorías anteriores, pueden explicar por qué la planta y el fruto son inducidos a producir mayores cantidades de polifenoles, lo que se convierte en una posible causa para encontrar mayor cantidad. Aunque no se puede olvidar

que en Urabá la radiación solar es mayor que en Magdalena Medio, de acuerdo a los resultados, las observaciones no llevaban suficiente variabilidad para separarlos entre la componente, pero si fue necesario hacerlo con Bajo Cauca, que estuvo entre 46 % y 71 % por debajo de las condiciones presentes en las otras dos subregiones (ver Tabla (1-7)).

El comportamiento de los polifenoles y la capacidad antioxidante estuvieron coordinados en las mismas proporciones, pero es importante resaltar el atributo de la capacidad atrapadora de radicales de oxígeno que presenta la mezcla propuesta en las tres subregiones, ya que los valores están por encima de algunos materiales de diversas variedades y orígenes (Cádiz-Gurrea et al., 2014; Carrillo et al., 2014; T. B. de Oliveira, Rogero, & Genovese, 2015; Jacquot et al., 2016; Wang et al., 2016; Zapata Bustamante et al., 2013). Por lo que se puede resaltar que una alternativa de cacaos con propiedades funcionales de este tipo puede tener como origen las subregiones de Urabá o Magdalena Medio o, por lo contrario, para evitar un impacto directo sobre el perfil sensorial, la opción puede ser el material vegetal proveniente de Bajo Cauca. No obstante, después de la fermentación, no existe una variabilidad significativa que requiera de una distinción de este tipo, ya que la disminución fue proporcional a la cantidad inicial después del proceso, lo que dio como resultado un decrecimiento de la capacidad antioxidante en Urabá de 86.4 %, valor superior comparado con Bajo Cauca (22.2 %) y Magdalena Medio (19.7 %).

Con la intención de hacer de la descripción de los polifenoles un análisis pertinente, como señalizadores químicos de calidad, se hizo un seguimiento directo de los flavonoides, una subclase de polifenoles presentes en el cacao que se distinguen por su estructura de dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos dispuestos en un anillo heterocíclico que contiene un oxígeno y, dependiendo de la orientación del anillo central, se divide en seis clases: flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonoles, flavanoles (catequina y proantocianidinas) y antocianinas.

La trazabilidad fue realizada a los flavonoles del tipo flavan-3-ol más importantes, tanto para la planta como para el fruto de cacao, como la (-)-epicatequina, que se encuentra en mayor concentración, seguida por la (+)-catequina, presente en menores cantidades. Los enantiómeros de la catequina, que comprenden la (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina y (-)-epicatequina-3-O-gallate, son monómeros de procianidinas que se encuentran en

magnitudes de trazas y no fueron objeto de estudio, pero aportan a esa proporción de polifenoles totales que no son explicados. Estos últimos pueden ser considerados en futuros estudios para el entender, de manera global, el aporte directamente proporcional que tuvo el contenido de fenoles totales a la actividad antioxidante evaluada por la capacidad de atrapar radicales de oxígeno ORAC. A este listado se puede adicionar los dímeros derivados del flavan-3.4-diol (leucoantocianidinas) formados por uniones entre epicatequina y catequina en las posiciones C4-C8 o C4-C6, que se caracterizan por ser de bajo peso molecular y continuar su polimerización hasta grandes oligómeros insolubles a los que se les relaciona con el sabor amargo, especialmente de aquellos que forman enlaces con proteínas, además de afectar su estabilidad y digestibilidad (Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, 2004; Oracz et al., 2015) (Ioannone et al., 2015a).

El comportamiento en Bajo Cauca de la relación (-)-epicatequina y (+)-catequina en cacaos crudos fue similar al reportado por Niemenak y colaboradores (2006), en el cual la cantidad de catequina es aproximadamente 10 veces menor a la epicatequina (0.25 a 0.023 mg/100mg). El valor alcanzado por la sumatoria de los dos monómeros en esta subregión ( $2.73 \pm 0.01$  mg/g en base seca) fue el más alto de los tres territorios evaluados. De igual manera, los alcaloides están dentro del rango publicado para cacaos de Nueva Guinea (1.5 a 8.3 mg/g) y Costa de Marfil (1.1 a 7.6 mg/g). Urabá y Magdalena Medio presentaron valores inferiores a los rangos mencionados.

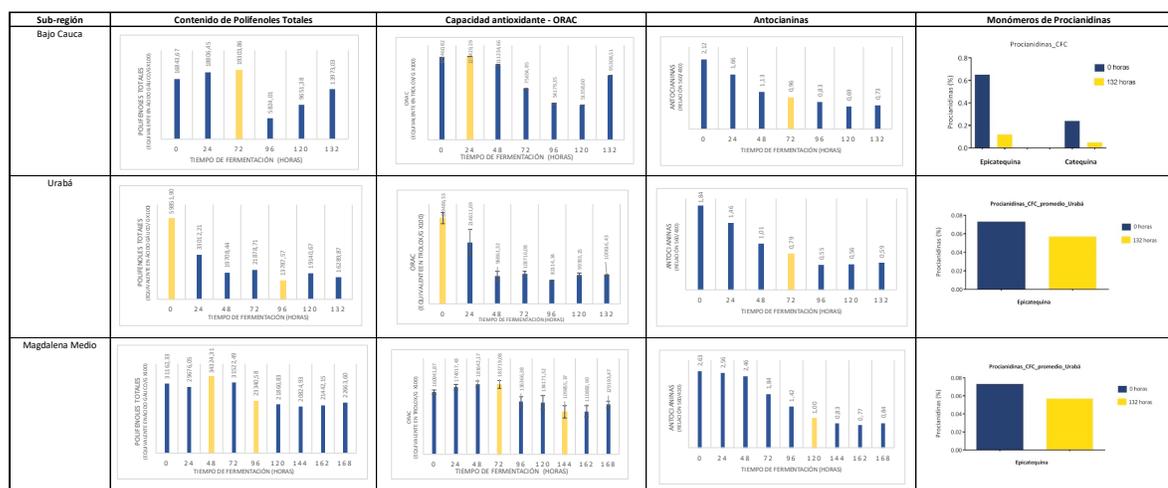
Otro de los flavonoles abundantes en el cacao son las antocianinas, que son un indicador práctico para los productores porque les permite de una forma visual diferenciar entre las variedades de cacaos o hacer seguimiento de la evolución de la fermentación. Se ha establecido que altos contenidos de antocianinas, calculados por la relación entre la absorción en la región ultravioleta visible a 460 (violetas) y 530 (verde-amarilloso) se asocia con cacaos de la variedad Forasteros ( $>1$ ) aunque con algunas excepciones provenientes por cruces genéticos (Phillips-Mora, Arciniegas-Leal, Mata-Quirós, & Motamayor-Arias, 2012). Por el contrario, la variedad de cacaos Criollos se caracteriza por una relación que tiende a cero y los Trinitarios en una escala intermedia. En general, el comportamiento de las antocianinas, en cacao crudo, para las tres subregiones, correspondió a valores por encima de 1, un dato relacionado con altos contenidos de antocianinas totales que se

evidenciaron por el color púrpura del grano en su interior. El valor más alto se encontró en Magdalena Medio, seguido por Bajo Cauca y Urabá.

En cacaos crudos, el contenido de este tipo de polifenoles puede incrementarse a medida que aumenta la intensidad de radiación solar y la ausencia de irrigación durante el desarrollo del fruto, como parte de un mecanismo de protección (Beer, 1987)(Oracz & Nebesny, 2014). Bajo Cauca es la zona con menor frecuencia en precipitaciones con respecto a Urabá y Magdalena Medio, lo que podría inducir a un estrés oxidativo en las unidades productivas que no contaban con un sistema de riego, generando una concentración más alta de antocianinas ( $2.12 \pm 0.15$ ). Este comportamiento se pudo presentar solo en las zonas que corresponden a las unidades productivas diferentes a las ubicadas en La Isla o aquella rodeada del Río Cauca, que no sufre problemas de riego. Por esta razón, no fue superior al Magdalena Medio y tampoco influyó, de manera significativa, en el contenido total de polifenoles ( $2.12 \pm 0.15$ ).

En la tabla 1-11 se describe el comportamiento a lo largo de la fermentación del contenido de polifenoles totales, la relación del contenido de antocianinas (460/530), capacidad antioxidante y los monómeros de procianidinas.

**Tabla 1-11:** Descripción del comportamiento a lo largo de la fermentación del contenido de polifenoles totales, la relación del contenido de antocianinas (460/530), capacidad antioxidante, contenido de alcaloides y monómeros de procianidinas.



El perfil del contenido de polifenoles totales muestra cómo la posible inactivación parcial de la enzima polifenol oxidasa, encargada de la oxidación de estos compuestos que conllevan a una polimerización con ligandos como azúcares, aminoácidos, proteínas y flavonoides, permite la disminución del sabor astringente y aporta al color café-rojizo deseado al final de la fermentación que se da al inicio del proceso por el aumento de la acidez, disminución del pH y al estar en ausencia del oxígeno (Brunetto et al., 2007; Li et al., 2012). En Bajo Cauca a las 72 h y Urabá con Magdalena Medio fue más rápido a las 24 y 48 h, respectivamente.

En este estudio, se puede identificar una disminución mayor de la epicatequina en Bajo Cauca (77.3%) con respecto a Urabá (21.4 %) y Magdalena Medio (35.7 %). Nótese que después de la fermentación, el contenido de ambos alcaloides y epicatequina no difieren (ver Tabla (1-8)), de allí que se encuentren en la misma CP1 en el eje positivo donde representan un contenido inicial elevado característico de cacaos sin fermentar. El tiempo de almacenamiento de las mazorcas puede afectar también el contenido de los flavan-3-ol, al igual que con los alcaloides, un rango entre 5 y 15 días puede reflejar una disminución considerable (Nazaruddin, et al., 2006; Afoakwa, et al., 2013).

La capacidad antioxidante, aunque guarda un perfil similar al del contenido de polifenoles totales, no se comporta del todo igual debido a que pueden existir otros compuestos de estructura fenólica que aporten a esta propiedad funcional.

El contenido de antocianinas se vio afectado durante la fermentación debido a que el enlace glucosídico de las dos principales fracciones de antocianinas presentes en el cacao, esto es, cianidin-3-O-galactosida y cianidin-3-O-arabidosida, son hidrolizadas hasta antocianidinas por la acción de la enzima glucosidasa que a condiciones óptimas de 45°C y pH entre 3.8 – 4.5 alcanzadas en Bajo Cauca (24-120 h), Urabá (72-132 h) y Magdalena Medio (96–144 h) produce su disminución en promedio de 67.2±0.01 %, comportamiento distintivo del estado inicial y final de la fermentación.

En el Anexo 1-2, se describe cómo valores por debajo de 1, en la relación de absorbancia de antocianinas, son característicos de cacaos bien fermentados, lo que coincide con los resultados reportados en este estudio para las tres subregiones en el cual la relación

(530/430) para el contenido de antocianinas, disminuyó por debajo de 1 a las 72 h para Bajo Cauca y Urabá, donde demoró el mismo tiempo todo el proceso de fermentación (132 h); en cambio en Magdalena Medio alcanzó esta referencia 24 horas después (96 h), igual que el tiempo requerido para finalizar como bien fermentado (E. O. Afoakwa et al., 2012). Este resultado no se vio afectado por el hecho de que a las 96 h ya el mayor porcentaje de antocianinas ha sufrido una hidrólisis por encima del 80 %, a pesar de que la mayor proporción de la mezcla de clones evaluados estén representados por CCN-51, del cual se espera el más alto contenido de antocianinas, característico de los cacaos Forasteros (Elwers et al., 2009).

— **Contenido de extracto etéreo:** este es uno de los parámetros de mayor importancia a nivel comercial y es una de las propiedades reológicas requeridas para el control de la cristalización en los derivados de cacao (F. Gu et al., 2013)(Araujo et al., 2014). A pesar de ser una variable incluida en el análisis de componentes, su vector se encuentra sobre el eje de las equis con una corta longitud, lo que induce a identificar el parámetro con poco aporte a la explicación de la diferencia entre subregiones. Los valores reportados estuvieron por encima del valor promedio sugerido como índice de calidad establecido por un grupo de expertos en la cadena productiva (> 37 %) (Araujo et al., 2014) y de clones de diferentes variedades y países asiáticos (F. Gu et al., 2013).

Según estudios previos, en el contenido de extracto etéreo en monocultivos influyen el efecto de la región del cultivo sobre el contenido de extracto etéreo y las variedades, ya sea Criollo, Trinitario o Forastero, donde un valor de alta calidad es considerado por encima de 56 % en base seca, contenido que no fue alcanzado en ninguna de las subregiones, a pesar de ser Bajo Cauca la más elevada  $49.0 \pm 1.8$  %, resultado debido posiblemente a las condiciones microclimáticas que pueden conllevar a un proceso de acumulación de compuestos lípidos diferentes y a la mezcla de clones (Vázquez-Ovando et al., 2015a).

— **Cenizas:** este es uno de los análisis bromatológicos de menor atención y es una medida que hace referencia a la cantidad de materia inorgánica (minerales), pero que debería ser de mayor interés para correlacionar con algunos compuestos indicadores de una correcta fertilización o uso controlado de pesticidas o compuestos nocivos residuales como el cadmio o plomo. Un estudio realizado por Afoakwa y colaboradores (2013) reporta

el efecto del tiempo de almacenamiento de las mazorcas antes de la fermentación, donde se evidenció que 7 días de aguante ayuda a disminuir la concentración, pero entre 7 y 21 días su comportamiento no es homogéneo (Emmanuel Ohene Afoakwa et al., 2013).

En cada una de las muestras evaluadas en Urabá y Magdalena Medio el contenido de cenizas estuvo por encima de 2 %p/p y Bajo Cauca se mantuvo debajo de este valor.

— **Porcentaje de humedad:** este parámetro es superior en el cacao crudo por el aumento de la temperatura durante la fermentación, que alcanzó hasta 47.6 °C (ver Tabla (1-7)) debido a las reacciones exotérmicas producidas por la acción de las levaduras, bacterias ácido lácticas y acéticas, lo que pueden disminuir el contenido de agua libre hasta en 36.6 ±0.02 % (Sandhya et al., 2016).

— **Azúcares:** su contenido está influenciado con la variedad, el tipo de clon y el grado de madurez (Beer, 1987; Kongor et al., 2016). La mayoría de los azúcares se encuentran en la pulpa mucilaginoso que rodea el cotiledón de los granos crudos, con una proporción de los azúcares reductores entre 10 y 15 % (Schwan, 2015).

La hidrólisis de la sacarosa para producir sus respectivos monómeros (glucosa y fructosa) o azúcares reductores, requeridos como precursores de aroma, se pueden presentar en el cacao por la acción de las invertasas o sacarasa, enzima asociada a esta reacción de hidrólisis sobre el enlace glucosídico. Estudios previos han reportado una baja presencia de esta enzima en el cotiledón crudo, aunque significativa para iniciar su acción; pero esta puede disminuir considerablemente con el aumento de la temperatura generado durante la fermentación (Schawn, 2015). Jinap y otros (2002) reportaron cómo la actividad de las invertasas disminuyó hasta niveles de traza desde las primeras 4 h de fermentación, pero aún bajo estas condiciones los azúcares reductores continúan formándose (M. S. Jinap, Nazamid, & Jamilah, 2002). La continuidad en la hidrólisis puede estar dada por una reactivación de la actividad remanente de enzima aunque, en este caso, debido a las condiciones ácidas de la pulpa por la presencia inicial del ácido cítrico y la subsecuente formación de otros ácidos orgánicos durante la fermentación, los cuales penetran al interior del cotiledón. Esta puede ser la otra fuente causal de la ruptura del enlace acetal, el cual requiere una energía mínima (25.6 kcal/mol) para que se produzca en presencia de bajas

concentraciones de ácidos orgánicos y el aumento progresivo de la temperatura puede ser relacionado al cambio (Badui Dergal, 2006).

El comportamiento de los azúcares reductores y los disacáridos de donde provienen, principalmente sacarosa y maltosa, han sido objeto de un extenso número de investigaciones. No obstante, es necesario incluirlo como un parámetro fijo para el entendimiento del desarrollo de aroma y sabor, ya que son considerados parte de uno de los principales precursores al intervenir en el conjunto de las reacciones de *Maillard* en las que se centra la ruta de formación de los principales compuestos responsables del aroma. Su relevancia en cada estudio depende del alcance del caso. Es así como en este trabajo se pudo determinar que la maltosa no fue significativa, y por eso no hace parte de las dos primeras componentes seleccionadas para explicar la variabilidad entre cacaos de diferente procedencia o después de ser sometido a la fermentación.

Uno de los aspectos a incluir en la trazabilidad de los azúcares es la reactividad que ha sido propuesta en este orden: pentosas, hexosas, aldosas y cetosas; de allí que para el cacao el azúcar más activo sería la glucosa, luego la fructosa, luego los disacáridos maltosa y la sacarosa una vez son hidrolizados (Badui Dergal, 2006). Cabe anotar que este orden no es estricto y depende de las variables que intervengan en proceso que se esté llevando a cabo. De esta forma, en la poscosecha del cacao será determinante entender el desempeño durante la fermentación para conocer su concentración al final de estos precursores que intervendrán en la formación de aromas o contaminantes térmicos como la acrilamida, que en el secado solar se presenta con mayor fuerza al propiciarse las condiciones para la reacción de *Maillard*, aspectos que serán revisados a profundidad en el Capítulo II.

El perfil de azúcares durante la fermentación en las tres subregiones se detalla en la Tabla 1-13. Como punto de partida de la fuente de mayor contenido de azúcares, que es la pulpa mucilaginoso, se determinaron en las tres zonas de estudio los contenidos de fructosa y glucosa y se encontró que en Bajo Cauca la concentración fue  $18.6 \pm 0.83$  y  $16.6 \pm 0.55$  %p/p, Urabá  $12.8 \pm 2.4$  y  $11.6 \pm 2.4$  %p/p y en Magdalena Medio  $14.9 \pm 1.2$  y  $13.9 \pm 1.7$  %p/p, respectivamente. Se observa que Bajo Cauca presentó el contenido más alto posiblemente

debido a la presencia más elevada de ácido cítrico, el cual puede aportar a la hidrólisis de la sacarosa en unión con la acción de la invertasa que tiende a aumentar con el grado de maduración del fruto (Kongor et al., 2016).

Tabla 1-12: Contenido de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) y aminoácidos presentes el cacao sin fermentar y seco.

Sub-región	Azúcares	Aminoácidos
Bajo Cauca	<p>Azúcares_CFC_promedio</p>	<p>Aminoácidos (mg aminoácido/mg seca)</p>
Urabá	<p>Azúcares_CFS_promedio_Urabá</p>	<p>Aminoácidos (mg aminoácido/mg seca)</p>
Magdalena Medio	<p>Azúcares_CFC_promedio_Maceo</p>	<p>Aminoácidos (mg aminoácido/mg seca)</p>

En el cotiledón crudo, la relación de sacarosa con los azúcares reductores fue 2:1 en Bajo Cauca, seguido por Urabá en una relación menor (sacarosa:  $6.79 \pm 0.65$ , fructosa:  $0.48 \pm 0.36$ , glucosa:  $0.30 \pm 0.51$  %p/p) y en Magdalena Medio se registraron los valores más

bajos (ver Tabla (1-8)). La marcha de cada azúcar a lo largo de la fermentación no tuvo un comportamiento generalizado en las tres subregiones, de allí que se note que la sacarosa no tuvo cambios mayores hasta las 144 h. Sin embargo, el último día (168 h) disminuye y se evidencia su efecto de hidrólisis en el aumento en proporciones similares en sus dos azúcares reductores. En Urabá se nota el principal aumento de la glucosa a las 72 h, que puede coincidir con la muerte del embrión por las condiciones de acidez y temperatura alcanzadas en esa instancia, produciendo una mayor hidrólisis, no solo de la sacarosa sino también de la maltosa, que en ese punto de reacción desaparece. Los disacáridos permanecieron al final en concentraciones bajas, excepto en Urabá donde no se detectó al final maltosa.

Finalmente, como reporte del comportamiento del perfil obtenido al terminar la fermentación, se puede observar que la fructosa se encuentra en mayor concentración que la glucosa en Bajo Cauca y Urabá y se nota la disminución de la sacarosa, como reflejo posiblemente de la reactividad mayor de este último monosacárido, perfil similar reportado por Rodríguez y colaboradores con cacao cultivado en México; aunque el perfil fue diferente al inicio, ya que la concentración de los azúcares reductores son altas en el cacao crudo, pero a partir de las 24 h y hasta las 120 h el comportamiento fue similar, donde el aumento de la fructosa y glucosa se produce aproximadamente en un 60 % (Rodríguez-Campos et al., 2011). En cuanto a Magdalena Medio, el comportamiento fue contrario.

Otro compuesto que hizo parte del perfil evaluado fue el manitol, que resulta de la reducción de la fructosa (Schwan, 2015). Sin embargo, tampoco fue significativo en el análisis multivariado a pesar de que sería una posible fuente de explicación de la disminución de la fructosa. En general, se puede evidenciar que tanto la maltosa como el manitol no aportaron a la aproximación quimiométrica esperada para este estudio.

**Proteína y aminoácidos:** este tipo de macromoléculas será el punto de partida de uno de los principales precursores de los compuestos de aroma que están asociados a los aminoácidos. La subregión con mayor porcentaje de proteínas fue Bajo Cauca ( $14.01 \pm 0.27$  %), fenómeno que pudo estar marcado de forma directa por el sistema de nutrición vegetal, de acuerdo con el tipo de fertilizante y frecuencia de esta actividad. Esta última se resalta, ya que concuerda con la periodicidad de fertilización en Bajo Cauca, que al tener menor

sombrío en las zonas alejadas al río Cauca y alta radiación (máximo 1032.7 W/m<sup>2</sup> Solar) realizaban esta práctica tres veces al año.

A partir del seguimiento del desarrollo del contenido de proteína total antes y después de la fermentación, se pudo identificar que Bajo Cauca fue la subregión donde se encuentra la mezcla de los clones estudiados con los contenidos más altos (13,8 ±0,2; Acosta, et al, 2001) y estuvo expuesto a mayor hidrólisis si se asocia con la disminución del contenido en un 27 % después de la fermentación. El de menor contenido de proteína fue Magdalena Medio y esto se ve reflejado en la concentración de aminoácidos final que fue menor y con una hidrólisis que alcanzó 20 %. Por último, el de menor hidrólisis fue Urabá con 18 %.

Para el entendimiento del comportamiento en cada subregión es necesario resaltar la importancia del cambio del pH en el medio, ya que este parámetro está directamente relacionado con la activación de las enzimas encargadas de la hidrólisis de las proteínas, las cuales se distinguen por ser del tipo endoproteasa aspártica (EC 3.4.23) y carboxipeptidasa serina (EC 3.4.16).

Los valores de pH determinan la secuencia de acción, lo que es de utilidad para obtener los aminoácidos resultantes de la hidrólisis de manera selectiva. De esta manera, se puede estimular la producción de aquellos que son determinantes en la formación de compuestos responsables del aroma. De esta forma se ha estudiado que a un pH entre 5.5 y 5, la endoproteasa aspártica actúa efectivamente para producir aminoácidos hidrofílicos y péptidos hidrofóbicos, pero al disminuir el pH en un rango entre 4.8 y 5.8 se propicia la actividad de la carboxipeptidasa serina la cual se distingue por realizar una hidrólisis lenta liberando principalmente aminoácidos hidrofóbicos y péptidos hidrofílicos derivados de las proteínas globulares de almacenamiento Vicilin-clase (7S) (Jürgen Voigt et al., 2016). Su efectividad depende de los grupos carboxi-terminal y de los aminoácidos cercanos residuales, por lo contrario los péptidos con los grupos carboxi-terminal provenientes de la arginina, lisina o prolina son menos susceptibles a la hidrólisis por parte de esta enzima (Schwan, 2015; J. Voigt, Heinrichs, Voigt, & Biehl, 1994; Jürgen Voigt et al., 2016). Al ser la enzima endoproteasa aspártica activa en un rango de pH tan amplio es posible que sea dominante, pero su acción individual no es suficiente para alcanzar a desarrollar los

aromas específicos a chocolate y, además, puede desencadenar en compuestos volátiles no agradables (J. Voigt et al., 1994).

En el cacao crudo en las tres subregiones se encontraron dos aminoácidos en común: la valina y la metionina. El primero se reconoce porque podría dar, como compuestos de degradación, isobutilamina, 2-metil propanal, ácido butírico que genera notas a herbal o frutal. La metionina por otra parte se puede degradar a 2-propenal, ácido acético que produce notas a herbal (Badui Dergal, 2006). Este aminoácido fue encontrado en un estudio sobre cacaos crudos en tres de 27 países evaluados de una lista de 17 aminoácidos analizados, lo que puede ser considerado como un aspecto diferenciador de los cacaos de Antioquia (Rohsius et al., 2006). Contrario a lo anterior, la lisina fue el aminoácido distintivo de Bajo Cauca y Urabá, pero en Magdalena Medio fue la cisteína.

Se hace necesario destacar antes de profundizar en el siguiente análisis de los aminoácidos libres, cuantificados después de la fermentación, que estos fueron determinantes para describir la variabilidad distintiva de este proceso a partir de los cacaos cultivados en cada subregión, asociación que se explica principalmente con la componente 1 en el eje izquierdo, junto a otros pocos parámetros como el ácido acético y color, que han sido objeto de estudio en investigaciones previas (Álvarez et al., 2012; Andreoli et al., 2017). Por lo anterior, es conveniente discutir el perfil aminolítico correspondiente a los aminoácidos libres obtenidos al final de la fermentación como resultado de la acción enzimática ya descrita.

Entre los aminoácidos de interés en términos de inocuidad del cacao se encuentran la lisina y la asparagina, los cuales han sido identificados como precursores de compuestos neoformados nocivos, razón por la cual deberían ser objeto de control en especial al final de esta etapa de poscosecha, ya que constituye la materia prima de entrada para el primer tratamiento térmico que en presencia de azúcares reductores podría propiciar la generación de carboximetil lisina (CML) o acrilamida, respectivamente (Loaëc, Jacolot, Helou, Niquet-Léridon, & Tessier, 2014a).

En las tres subregiones se evidencia un aumento de la concentración de lisina, siendo Urabá la zona de mayor registro (ver Tabla (1-8)). Su presencia en concentraciones altas, aumenta la posibilidad de reacción no solo para la formación de CML sino también otros compuestos, ya que la lisina es uno de los aminoácido más reactivo en el complejo glucosa-aminoácido debido a la minimización del efecto estérico por poseer la cadena más larga y a tener el grupo amino alejado del carboxilo (posición épsilon) (Jumnongpon et al., 2012; Nguyen, van der Fels-Klerx, & van Boekel, 2016). Por su parte la asparagina no fue registrada en Magdalena Medio. La implicación de la presencia de la asparagina en la formación de acrilamida será objeto de estudio en el Capítulo II.

Los demás aminoácidos presente en las tres subregiones al final de la fermentación, ya sea porque se fueron desarrollando o disminuyendo a lo largo del proceso, consisten en: leucina, metionina, valina y cisteína. Solo la fenilalanina no se detectó en Urabá. El perfil desarrollado puede ser el precursor de propiedades relacionadas al aroma o propiedades reológicas, como la que se asocia a la cisteína por su capacidad de formar puentes S-H y afectar su textura. Por otro lado, los compuestos volátiles relacionados con aldehídos aromáticos se desarrollan a partir de aminoácidos hidrofóbicos como la valina, la leucina, que sufre una degradación hasta formar 3-metil butanal con descriptor a malta, y la fenilalanina, que produce fenil acetaldehído, que se relaciona a un descriptor floral y miel. Todas las transformaciones mencionadas se dan bajo la reacción de Strecker (Emmanuel Ohene Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2009b; Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009). La formación de estos compuestos se convertirá en los precursores en etapas posteriores de aminocetonas, reactante principal para la formación de pirazinas, compuestos de gran relevancia en el aroma de chocolate (Owusu, Petersen, & Heimdal, 2013)

En conclusión, la aproximación quimiométrica de esta primera fase permitió el análisis de las variables seleccionadas, que definen el perfil del cacao sin fermentar según la procedencia de tres de las principales zonas productivas en el departamento de Antioquia y a partir de una mezcla de clones distribuidos, lo cual facilita a futuro el uso de las técnicas de análisis significativas y específicas para cada región con el fin determinar sus atributos por medio de técnicas estandarizadas o validadas. Segundo, poder identificar atributos propios que le permitan compararse con otras zonas que hacen parte de su sana

competencia, así como el posicionamiento del material vegetal que a futuro facilite el desarrollo de estudios de denominación de origen. Tercero, definir estrategias productivas para promover los atributos o mitigar aspectos que sobresalgan o que puedan afectar las transformaciones posteriores a la poscosecha, como se mencionó antes. Por último, extrapolar este estudio a partir de las variables seleccionadas para evaluar otro tipo de mezclas.

El segundo alcance plantea la obtención de los perfiles del cacao fermentado de manera espontánea en las tres subregiones, proceso que fue validado de acuerdo a la experticia de los técnicos de cada zona, lo cual tuvo como hallazgo principal un grupo de variables asociadas mediante una combinación lineal que permitió reducir la información a los análisis realmente significativos para distinguir entre el cacao sin fermentar de aquel que llega hasta el final de este proceso. Como respuesta, se confirmó la importancia de uno de los precursores de aroma que son los aminoácidos libres de la mano de acidez volátil como expresión del contenido de ácido acético, entre otros. Estos resultados ayudan a establecer un punto de partida para el desarrollo del siguiente objetivo, relacionado con la posterior etapa de secado, primordial en el tratamiento de poscosecha sobre la calidad de grano de cacao comercializado directamente por los productores que dependerá del perfil de esta materia prima obtenida después de la transformación microbiológica y bioquímica que implica la fermentación. Resultado de este trabajo se pudo exponer en un congreso internacional (Anexo 1-5).

De esta manera, se aporta a la generación de nuevo conocimiento al tener perfiles específicos obtenidos bajo métodos cuidadosamente establecidos para cada matriz de cacao evaluada, debido a su alta complejidad, seguido por un análisis de forma global mediante las herramientas que ofrecen la estadística multivariada sin caer en percepciones subjetivas o individualistas que no permitan la aproximación pertinente de la realidad evaluada. No obstante, con miras a proyectar la información obtenida a futuros estudios y que proporcionen un análisis más allá del perfil definido que sea práctico para todos los actores de la cadena productiva, se evaluaron las variables de las dos primeras componentes principales para extraer unos factores no observables pero que la experiencia permite clasificarlos según el grado de importancia mediante un Análisis de Factores Principales que parte del Análisis de Compuestos Principales como se describirá en el Capítulo III. Se espera con estos resultados apoyar el análisis descriptivo de tres

subregiones productoras que se dedican a la transformación preliminar del cacao con una necesidad continua de mejorar y contribuir al sector cacaotero de Antioquia, Colombia siempre con la meta de cumplir los estándares de excelencia exigidos en el ámbito nacional o internacional.

## **2. Capítulo 2. Secado del cacao fermentado por lecho fluidizado: una alternativa para mejorar la efectividad**

### **2.1 Introducción**

El secado, etapa posterior al proceso fermentativo, es una de las operaciones unitarias críticas dentro de las etapas de poscosecha del cacao, tanto para el productor como para los actores que intervienen en la posterior industrialización (Icco, 2005; Yogendrasasidhar & Pydi Setty, 2018). Sus alcances van más allá de disminuir la humedad del cacao, ya que tiene efectos determinantes para garantizar su calidad sensorial, química y microbiológica; de allí que la normativa a nivel mundial haya determinado unos estándares de calidad de poscosecha que sólo pueden verificarse una vez finalizada esta etapa, como es la prueba de corte o medición del grado de fermentación, considerados controles para realizar su trazabilidad y viabilidad comercial (International Cocoa Organization (ICCO), 2009).

El principal indicador de la finalización del secado es la reducción de la humedad del grano de cacao hasta alcanzar porcentajes entre 6 % y 7 %. Valores superiores podrían llevar a una contaminación microbiana por el crecimiento de hongos y pérdida de compuestos relevantes en su perfil de aromas (ICONTEC Internacional, 2003; International Cocoa Organization (ICCO), 2009). Es así como un estudio previo realizado por Humston y colaboradores (2010), en el que se evaluó, por medio de una prueba robusta

cromatográfica, el efecto de la humedad del grano sobre la calidad del cacao provenientes de seis países Latinoamericanos, logró demostrar el deterioro de la calidad por la pérdida de 29 analitos de interés en el aroma, debido a un aumento en la humedad del grano por encima de los valores recomendados, a pesar de que estos no presentaran daño superficial debido a contaminación por hongos (Humston, Knowles, McShea, & Synovec, 2010).

Los valores de humedad inferiores a los límites recomendados conllevan a una afectación directa sobre la apariencia del grano de cacao, ya que el producto es más susceptible a quebraduras y pesos bajos, el cual es uno de los criterios principales para distinguir entre las categorías de calidad del cacao al finalizar la poscosecha (Comisión venezolana de Normas Industriales - COVENIN, 1995; Dirección General de Normas, 1980; ICONTEC Internacional, 2003; Secretaría de Estado de Salud Pública de Argentina, 2013). Ahora bien, los rangos de pesos de los granos varían en cada país productor. Por ejemplo, en Colombia el peso de 100 granos superior a 120 g corresponde a la máxima clasificación que es de cacao *Premio* y tiene un valor comercial más elevado que el *Corriente* (100 granos entre 105 y 119 g), mientras que aquellos que pesan menos de 105 g tienen una menor valoración y se les incluye en la categoría de *Pasilla*. Aunque el peso del grano al finalizar el secado también puede estar relacionado con el tamaño de la semilla, que varía según la distinción genética, un tratamiento térmico excesivo contribuye de manera negativa a obtener un grano de bajo peso (Fedecacao, 2005, 2015; ICONTEC Internacional, 2003).

Desde el punto de vista químico y sensorial, el secado ha sido ampliamente estudiado con el objetivo de entender el efecto del tratamiento térmico en la composición del grano de cacao. Los estudios han encontrado efectos de algunos parámetros relacionados al secado como la temperatura, duración, tipo de tratamiento (natural o artificial), grosor de la capa de secado, entre otros, con factores causales del cambio en el perfil del cacao, definido por el contenido de azúcares reductores y aminoácidos, que a su vez son considerados como los iniciadores de las principales reacciones no enzimáticas de Maillard. Cabe aclarar que este último proceso, que se da en la poscosecha, es importante

porque da paso al desarrollo de compuestos de aroma. De igual forma, el comportamiento de los alcaloides, polifenoles y, ácidos orgánicos y grasos, compuestos a los que se les puede atribuir una correlación importante con el sabor, se pueden asociar al avance en la calidad del cacao después de la poscosecha. En la Tabla 2-1 se relacionan algunos de los principales hallazgos de investigaciones previas sobre el papel del secado en la calidad del cacao.

**Tabla 2-1:** Resultado de algunas investigaciones relacionadas con el secado del cacao publicados entre 2007 y 2018.

Artículo	Origen	Matriz	Objetivo	Metodología	Técnicas de análisis	Estadística	Conclusión
2018 Convective drying of fermented Amazonian cocoa beans (Theobroma cacao var. Forasteiro). Experiments and mathematical modeling	Amazonas	Cacao fermentado y seco por método convectivo-Forasteiro	Contribuir a la caracterización y el modelado matemático del secado convectivo de granos de cacao amazónicos fermentados (Theobroma cacao var. Forasteiro).	Se utiliza un enfoque combinado que incluye el análisis de las características físicas del grano, la determinación de las isoterms de sorción del grano, la realización de experimentos de secado en un secador convectivo (para diferentes condiciones de operación) y el desarrollo de un modelo matemático, basado en los diferentes fenómenos de transporte (calor y masa) involucrados dentro y fuera de los granos durante su secado.	Concentración volumétrica inicial de agua. En segundo lugar, al comienzo del secado, la velocidad de secado se controla mediante fenómenos de transporte internos y externos, mientras que, en la segunda parte del secado (para el contenido de humedad del grano por debajo de 0,5 kg de agua / kg de materia seca), está totalmente controlado por la difusión del agua dentro del grano. El modelo se compara con los resultados experimentales para caracterizar el coeficiente de difusión efectiva del agua dentro de un frijol. Se muestra que este coeficiente de difusión se duplica aproximadamente cuando la temperatura aumenta de 30 a 60 °C. Está cerca de $1.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{sa}$ a 60 °C.		Al considerar el análisis sensorial y la calidad organoléptica del chocolate producido, el secado de los granos de cacao amazónicos se debe realizar a una temperatura moderada (30-40 °C) del aire de secado. Se están llevando a cabo más investigaciones para comprender los complejos mecanismos bioquímicos responsables de la transformación de los polifenoles durante el secado.

Artículo	Origen	Matriz	Objetivo	Metodología	Técnicas de análisis	Estadística	Conclusión
(Dina, Ambarita, Napitupulu, & Kawai, 2015a) Study on effectiveness of continuous solar dryer integrated with desiccant thermal storage for drying cocoa beans.	Deli Serdang, Indonesia.	Cacao fermentado en cajas de poliestireno	Evaluar la eficacia de un secador solar continuo integrado con desecante para granos de cacao.	Dos tipos de desecantes se pusieron a prueba, tamiz molecular 13 x (Na <sub>8</sub> [(AlO <sub>2</sub> ) 86 x (SiO <sub>2</sub> ) 106] x 264H <sub>2</sub> O) como un tipo adsorbente y CaCl <sub>2</sub> como un tipo de absorbente.	Efectividad de secado. Seguimiento de humedad en equilibrio.	No realizaron tratamiento estadístico.	Durante las horas de sol, la T <sub>máx</sub> dentro de la cámara de secado varió de 40°C a 54°C. En promedio, fue 9-12°C superior a la T <sub>amb</sub> , rangos adecuados para el secado de los granos de cacao. Durante horas fuera del sol, la humedad del aire dentro de la cámara de secado fue inferior a la del ambiente a causa del almacenamiento térmico desecante. Los tiempos de secado para: el secado solar (55 h), secador solar integrado con adsorbente (41 h) y secador solar integrado con absorbente (30 h), con consumos energéticos de 60,4 MJ/kg húmedo, 18,94 MJ/kg húmeda, y 13,29 MJ/kg húmedo, respectivamente.
(Rodríguez-Campos et al., 2012a) Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa.	Cunduacan, Tabasco, México.	Cacao Forastero	Evaluar los efectos del tiempo de fermentación y la temperatura de secado sobre el perfil de compuestos volátiles.	Los compuestos volátiles fueron evaluados después de 2, 4, 6 y 8 días de fermentación y secados por horno convencional a 60°C, 70°C y 80°C, durante 12, 8 y 6 horas respectivamente, con agitación constante. El cacao bien fermentado se sometió a tres tratamientos térmicos: el secado de estudio en un horno convencional Samoa con aire caliente a 65°C x 12 h y agitación constante del cacao dispuesto sobre bandejas con perforaciones y dos secados control (solar y sobre plancha de cemento).	Acidez volátil: por SPME-HS usando una fibra 50/30 um (divinilbenceno/carboxeno/poli-dimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Extracción durante 15, 30 y 45 min a diferentes temperaturas (40, 50 and 60°C). Identificación de compuestos por GC-MS	ANOVA 2X2 Diferencias por Tukey Análisis por Componentes Principales	Un total de 58 compuestos volátiles fueron identificados por SPME-HS / GC-MS y se clasificaron: ésteres (20), alcoholes (12), ácidos (11), aldehídos y cetonas (8), pirazinas (4) y otros compuestos (3). Seis días de fermentación fueron suficientes para producir compuestos volátiles con notas deseables en los granos de cacao de sabor, así como para evitar la producción de compuestos con notas de mal sabor. El secado a 70 y 80° C, después de 6 días de fermentación presentó un perfil volátil similar al obtenido por secado al sol. Sin embargo, el secado a 70 °C representa un menor costo.
(Misnawi, 2012) Effect of cocoa bean drying methods on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contamination in cocoa butter	Bali, Indonesia.	Manteca de cacao	Evalúo la contaminación y / o formación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en la manteca de proveniente de granos de cacao	Se evaluaron tres métodos: 1. Secado al sol 2. Secado artificial completo 3. Combinación de secado al sol seguido de secado artificial. Para este proceso, el secado al sol se realizó sobre cemento, capa plástica sobre la tierra y sobre el cemento y capa de madera sobre la tierra. El secado artificial se realizó entre 65 °C	LC-LC	No aplicaron	La contaminación de HAP en la manteca de cacao se originó en su mayoría de la contaminación de humo durante el secado. Un mayor tiempo de secado promovió una mayor concentración de HAP, aunque todavía por debajo del límite máximo. La concentración de HAP fue mayor al extraer la manteca a partir de la semilla completa comparada con la extracción solo del cotiledón de cacao, lo que indica el contaminante se concentró en la cáscara de cacao. El uso de secadores artificiales con madera como combustible mostró un mayor riesgo de

Artículo	Origen	Matriz	Objetivo	Metodología	Técnicas de análisis	Estadística	Conclusión
			sometidos a tres métodos de secado.	y 85 °C y se utilizaron cuatro tipos de combustibles (queroseno, madera, diesel y residuos vegetales)			contaminación en comparación con los usos de queroseno y Diesel. El mayor riesgo de contaminación se presentó durante el secado artificial al producirse una fuga de gas.
(Guehi, Irie, et al., 2010) Effect of Drying Methods on the Chemical Quality Traits of Cocoa Raw Material.	Sur de Costa de Marfil	Cacao fermentado y sin fermentar (cosecha de febrero de 2005-09)	Comparar tres métodos de secado en función del desarrollo de la acidez volátil, formación de nitrógeno de amonio y ácidos grasos	<b>Aguante de mazorcas:</b> 4 días <b>Fermentación:</b> durante seis días en cajas de madera cubiertas con hojas de plátano y sin agitación. <b>Métodos de secado</b> <b>Primero:</b> secado solar de 9 a.m. a 6 p.m. durante dos semanas sobre bandejas de madera levantadas un metro del suelo y con un área de 30 x 90 cm <sup>2</sup> , a partir de cacao fermentado (1 bache de 20 kg) y no fermentado (2 bache de 20 kg), con una hora inicial de agitación. <b>Segundo:</b> en iguales condiciones al anterior pero el tratamiento térmico se realizó de 2 a 6 p.m. <b>Tercero:</b> secado artificial en horno convencional con aire forzado a 60 °C, con la muestra dispuesta en bandejas y un espesor de 2 cm, con agitación cada 2 h. El calentamiento duró diariamente 8 h y se dejaba toda la noche a temperatura ambiente. Cuarto: combinación de secado solar hasta 25 % de humedad seguido por el primer tratamiento (1 bache) y segundo tratamiento (2 bache).	Humedad, Acidez (pH y titulación) Ácidos grasos (Soxhlet)	Por triplicado. Sin tratamiento estadístico	El método natural y combinado produce una acidez por encima de pH 4 y por el método artificial en 3.7. El contenido de Nitrógeno de Amonio fue alto (590 a 630 ppm) independiente del método de secado, y es un indicador de sabor indeseable en productos finales.

Artículo	Origen	Matriz	Objetivo	Metodología	Técnicas de análisis	Estadística	Conclusión
(H. Tinoco & Ospina, 2010). Análisis del proceso de deshidratación de cacao para la disminución del tiempo de secado.	Brasil	Cacao fermentado	Optimizar el proceso de secado mediante pruebas experimentales y utilizar el método de elementos finitos para evaluar y analizar el secado artificial	<b>Prueba 1:</b> horno de gas con disposición para siete bandejas perforadas de 40 por 60 cm ubicadas verticalmente; controlador de temperatura, registrador de temperatura de bulbo seco, registrador de tiempo de secado. <b>Prueba 2:</b> horno con controlador de temperatura programable, flujo de aire en la entrada y extractor de aire; fue programada a 55 °C durante 12 horas.	Velocidad de secado Humedad en base seca Análisis computacional (COSMOSWorks a 55°C con aire caliente)	No se aplicó	El cacao debe ser agitado dentro del horno para facilitar el proceso de secado y evitar quemaduras. Un factor crítico en el proceso de secado es la humedad de aire. No es recomendable remover grandes cantidades de vapor de agua del aire, ya que el aire seco deshidrata la superficie de los granos. La prueba 1 presentó un buen aspecto y leves quemaduras, considerando que la prueba se realizó sin flujo de aire. Si no hay un control de humedad adecuado, no es posible mantener la velocidad de secado constante.
(Páramo et al., 2010) Mass transfer of water and volatile fatty acids in cocoa beans during drying.	Tabasco, México	Cacao fermentado	Elucidar el fenómeno que involucra la acidez remanente, la difusividad del agua y los ácidos grasos volátiles (VFAs: acético, propiónico, butírico e isobutírico) en los granos de cacao secos artificialmente	Secado a 40 y 60°C de semillas con y sin cáscara	VFA: GC en extractos metanólicos Humedad: horno con vacío Difusividad de masa: cinética experimental ajustada al modelo teórico suponiendo una forma circular	Dispersión $p < 0.05$	La difusividad de los ácidos fue menor que la del agua en las dos muestras evaluadas con y sin cáscara. La difusividad de los VFA fue 1/6 y 1/22 veces más baja que la del agua. La simulación del proceso de secado permite acercarse a las condiciones óptimas de secado de mínima energía.
(Fagunwa, Koya, & Faborode, 2009). Development of an Intermittent Solar Dryer for Cocoa Beans.	Nigeria	Cacao fermentado	Diseño de un secador solar con almacenamiento o de energía térmica para el secado intermitente de granos de cacao.	El prototipo fue construido con materiales locales disponibles (madera). El mecanismo se basa en una combinación de calentamiento por convección y radiación directa por 72 horas a 25-30°C y HR=58-98%, con un controlador de velocidad del flujo de aire a través de los granos de cacao para disminuir el contenido de humedad de	Cinética de secado	No se realizó análisis estadístico	La evaluación de la calidad de las semillas de cacao secas mostraron atributos de buena calidad: pH de 6,35, índice de acidez de 3,40 mg / g, granos con sabor ligeramente amargo se obtuvieron bajo secado convectivo libre; mientras que, el aumento de la reabsorción de humedad y sabor ácido se presentó con el secado por convección forzada.

Artículo	Origen	Matriz	Objetivo	Metodología	Técnicas de análisis	Estadística	Conclusión
				53,4 a 3,6% en base húmeda.			
(Chinenye, 2009) Cocoa bean ( <i>Theobroma cacao</i> L.) drying kinetics.	Nigeria	Cacao Forastero fermentado en bolsas de yute	Establecer unas características de las semillas de cacao secas obtenidas por calentamiento por baches y agitadas uniformemente para determinar la uniformidad del secado y la difusividad efectiva. Bajo esta condición, ajustar los resultados a un modelo de secado por capa delgada para predecir el comportamiento de la humedad.	Secado a Temperatura: 55, 70, 81 °C Velocidad de aire de 2,51 m s <sup>-1</sup> Agitación constante hasta alcanzar una humedad de 6% (inició con 56%) Modelamiento con aire caliente y frío en una misma dirección sobre lechos de capa delgada (supone una forma circular y usa la ley de difusión Fick para estados no estacionarios)	Modelo de secado	$\chi^2$ : mejor ecuación que describe la curva de secado Raíz cuadrada de la media del error (RMSE) Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	Existe un incremento con la temperatura de los parámetros estudiados. La constante de Arrhenius predicha fue $8,64 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , mientras que la energía de activación fue de $39,94 \text{ kJ mol}^{-1}$ .
(García-Alamilla et al., 2007) Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying	Tabasco México	Cacao fermentado (Cosecha de octubre de 1996 y mayo de 1997)	Crear un modelo que tenga en cuenta la humedad, acidez y transferencia de calor durante el secado, con el mínimo	Secado de granos fermentados con un secador convectivo con regulador de velocidad del aire, temperatura y humedad relativa. Las muestras fueron dispuestas en un cilindro (19 x 26 cm)	Acidez volátil: método Mothe-Efter. Modelo: método lineal usando esquema longitudinal con diferencia central finita para derivadas por espacio según Ruiz-López et al.	No aplica por el tipo de modelo	Se demostró que con el modelo mecanicista propuesto se puede reproducir la evolución experimental de la humedad y la temperatura durante el secado de cacao con un error promedio máximo de 17,3% para la humedad y 4,15% para la temperatura. Este modelo propuesto puede ser utilizado para la optimización de secado cacao con respecto al consumo de energía a la humedad y la acidez. Sin embargo, se requieren más datos experimentales de la cinética de acidez durante el secado del cacao, con el fin de obtener una mejor representación de la difusividad acidez.

Artículo	Origen	Matriz	Objetivo	Metodología	Técnicas de análisis	Estadística	Conclusión
			consumo de energía.		(2004). Temperatura: 42, 60, 70 y 80°C.		

La “reacción de *Maillard*” no sólo ha sido objeto de estudio, por ser el principal conjunto de reacciones responsables de la producción del aroma y color característico del cacao, sino que en contraste, ha suscitado un interés en el sector alimentario por su posible efecto nocivo derivado de la acción de algunos compuestos neoformados, que han sido identificados para productos sometidos a tratamientos térmicos similares al cacao, como el café, y se han generalizado para una serie de alimentos sometidos a procesos de fritura, ahumado, cocción, asado, entre otros (Loaëc, Jacolot, Helou, Niquet-Léridon, & Tessier, 2014b).

Este es el caso de la acrilamida, que se forma en los alimentos a partir de la reacción de Maillard por la participación de azúcares reductores como fructosa y glucosa, y el aminoácido asparagina, que es descarboxilado y desaminado. Otros reactantes han sido identificados como precursores de la acrilamida como: 3-aminopropiamida, alanina, producto de Amadori descarboxilado y Base Schiff. Así mismo, mecanismos menos probables son reconocidos como rutas de formación; por ejemplo, la pirólisis del gluten (una proteína del trigo), y descarboxilación enzimática de la asparagina.

La acrilamida, como compuestos neoformado, es propiciada principalmente en diversas matrices alimentarias que son sometidas a altas temperaturas y largos períodos de exposición, lo que promueve la presencia de este compuesto, identificado por primera vez en el 2002. Entre los alimentos en los que ha se han realizado hallazgos de acrilamida están: las patatas chips, patatas fritas, pan, café, chocolates, entre otros (Dybing, 2005).

A partir de los reportes realizados sobre la presencia de la acrilamida en alimentos, se iniciaron estudios sobre los efectos de esta y su principal metabolito, el epóxido glicidamida, sobre la salud (Bermudo, Moyano, Puignou, & Galceran, 2008; Bullock, Burnett, & Kerr, 1971; Chapiro & Percec, 1971; FAO/WHO, 2004; Farah et al., 2012; Granvogl & Schieberle, 2007; Loaëc, Niquet-Léridon, et al., 2014; Loaëc, Jacolot, et al., 2014a, 2014b; Oracz, Nebesny, & Żyżelewicz, 2011). Dentro de las conclusiones a las que se ha llegado es que solo una dosis oral superior a 100 mg/kg podría ser tóxico, y la dosis letal 50 (DL50) se encuentra, por norma general, por encima de los 150 mg/kg, pero el promedio está expuesto a concentraciones entre 0.2 y 1.0 µg/kg en base húmeda por día para población adulta y 4 µg/kg para niños. La Organización Mundial de la Salud considera que la acrilamida pertenece al grupo de los productos químicos que a una baja

concentración conlleva un bajo riesgo, aunque su toxicidad siga latente (Comisión del Codex Alimentarius, 2009; Dybing, 2005; Oracz et al., 2011).

En la actualidad existe una comisión designada desde 2007 para el monitoreo de los niveles de acrilamida en alimentos y la *European Food Safety Association* – EFSA ha compilado y publicado los hallazgos periódicamente para su consulta y control de las diferentes industrias involucradas en la responsabilidad evitarlos, aunque no exista un nivel máximo recomendado para que se defina como una regulación general (EFSA/DATEX/002, 2008).

Entre las recomendaciones a las que se ha llegado están: mejorar los métodos cromatográficos para la detección a bajas concentraciones que exige una mayor robustez de la tecnología y simplicidad en la implementación de los métodos, como se ha venido realizando en los últimos años en diversas matrices (Granvogl & Schieberle, 2007; Loaëc, Jacolot, et al., 2014a); realizar estudios de biodisponibilidad y mecanismos de acción y adsorción de la acrilamida y sus metabolitos; someter los alimentos a procesos térmicos controlados, para reducir la concentración de los precursores de la acrilamida en las formulaciones (contenido de azúcar) o modificar el contenido del principal aminoácido por adición de enzima asparraginasa, adición de sales y finalmente controlar la humedad y pardeamiento en el producto final (Comisión del Codex Alimentarius, 2009).

### **2.1.1 Procesos de secado (natural y artificial)**

Existen diversos métodos de secado, que se han aplicados alrededor del mundo para cumplir con las finalidades descritas. El método más usado en la deshidratación del grano de cacao es el *secado natural*, el cual consiste en someter el cacao fermentado a un calentamiento solar sobre diferentes plataformas de madera (marquesinas o casa Elba), aluminio o (Pierucci et al., 2017). Las altas temperaturas que pueden ser alcanzadas sobre la superficie de las plataformas han sido objeto de estudio debido a las altas temperaturas no controladas que alcanza la semilla de cacao por este método, afectando compuestos termolábiles, claves en la formación de aroma en etapas posteriores. Además, produce una calidad heterogénea del grado durante las épocas de lluvia (Guehi, Irie, et al., 2010; Rodriguez-Campos et al., 2012b).

A pesar de las desventajas mencionadas, por economía y algunos atributos sensoriales deseables propiciados por la eficacia en la eliminación de la acidez volátil, el secado natural sigue siendo el proceso más empleado (Pierucci et al., 2017). No obstante, la búsqueda de alternativas mediante tratamientos térmicos artificiales con miras a la estandarización, seguirá siendo requerida debido a las condiciones ambientales como los rangos de temperatura entre 29°C – 32°C y humedad relativa de 65 % hasta un valor crítico máximo de 80%, en la mayoría de los países productores. Otro aspecto influyente es el fenómeno climático actual caracterizado por largos períodos de precipitaciones, lo cual prolonga los tiempos regulares de secado de  $5 \pm 2$  días hasta 11 y puede desencadenar en efectos negativos sobre la calidad del cacao al finalizar las etapas de poscosecha (Andreoli et al., 2017)(Pierucci et al., 2017).

Lo anterior, puede explicar la cantidad de trabajos de investigación relacionados con secado artificial que datan desde 1974 (Bravo & McGraw, 1974); que han dado a conocer resultados relacionados con el desarrollo, innovación y optimización de este proceso, basados en pruebas experimentales que han a diversos diseños de equipos (prensas, máquinas centrífugas, secado por medios térmicos con aire caliente por tiro natural o forzado) (H. Tinoco & Ospina, 2010), así como métodos adaptados a las condiciones de cada región, material y los requerimientos de calidad de la semilla (Alma et al., 2011; Bharath & Connor, 2008; Bonaparte, Alikhani, Madramootoo, & Raghavan, 1998; Chinenye, 2009; Gabriel Henrique Horta de Oliveira, Corrêa, de Souza Santos, Treto, & Diniz, 2011; Dina et al., 2015a; Faborode, Favier, & Ajayi, 1995; H. A. Tinoco & Ospina, 2010; van Deventer & Heijmans, 2001).

Las investigaciones de las últimas décadas han considerado con mayor rigor la relación entre las propuestas de secado con los parámetros de calidad, como la contaminación microbiológica (Dano et al., 2013), la acidez volátil vinculada a los ácidos orgánicos y ácidos grasos volátiles (Araujo et al., 2014; García-Alamilla et al., 2007; Guehi, Irie, et al., 2010; Páramo et al., 2010; Rodríguez-Campos et al., 2012a) y la formación de compuestos potencialmente nocivos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (Wandan, Elleingand, & Ndouba, 2011).

Es necesario resaltar la acidez total, ya que es uno de los parámetros que está estrechamente relacionado con la velocidad de secado. De esta forma, para la propuesta de mejoramiento del proceso es necesario tenerla en consideración para la obtención de los atributos de calidad requeridos y para disminuir las pérdidas de poscosecha que pueden llegar hasta 1000 millones de dólares, como ocurre en Brasil (Chávez & Mansilla, 2004).

La modelación y simulación también han jugado un papel importante en el desarrollo de alternativas de secado artificial, debido a que proveen información útil para el diseño o predicción del comportamiento de los parámetros de calidad de las semillas de cacao dependiendo de ciertas variables controladas como: temperatura, velocidad de secado, humedad, condiciones del aire, cantidad y disposición del material. Entre los modelos empleados se puede anotar el de Lewis, los modelos logarítmicos, diferenciales, entre otros, para obtener resultados en la simulación de capa fina de los materiales biológicos de secado, así como el método de elementos finitos para evaluar y analizar el secado artificial (G. H H de Oliveira, Corrêa, de Souza Santos, Treto, & Diniz, 2011; C.L. Hii, Law, & Cloke, 2009; Incropera, DeWitt, Bergman, & Lavine, 2007; Páramo et al., 2010; Rodriguez-Campos et al., 2012a).

Hasta la fecha los estudios sobre el uso de una de las tecnologías más eficientes para el secado de granos, como es la aplicación de lecho fluidizado, han sido incipientes en la aplicación para el cacao. Solo una aplicación reportada por González (2015) avanzó en el diseño de un equipo para el tratamiento térmico de cacao fermentado, pero su resultado requirió un secado previo para reducir la humedad superficial y lograr la fluidización (González, 2015). Este tipo de medidas no son las más adecuadas para una tecnología como lecho fluidizado y además es el primer período de secado el de mayor control, en especial para que no se produzca un alto contenido de acidez en el producto final y de esta forma obtener un equilibrio entre la formación de compuestos volátiles y contaminantes térmicos como la acrilamida. Por esta razón, existe una oportunidad de profundizar en la aplicación de esta tecnología hasta alcanzar condiciones de operación adaptables a los requerimientos técnicos y de calidad.

Otro de los grandes retos de esta etapa de poscosecha es la selección de pruebas para evaluar su calidad química y la robustez de las técnicas empleadas que permitan la reproducción de datos confiables por su capacidad de identificación y límites mínimos de cuantificación, para la toma de decisiones que conlleven a la futura estandarización del perfil de un cacao que cumpla con los estándares nacionales e internacionales y puedan aportar de manera más cualificada a la caracterización subjetiva que actualmente se realiza. Entre algunas técnicas se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución o de gases acoplada a detectores basados en la ionización o carga de las moléculas que confluyen en la identificación de sus espectros de masas.

La combinación de una tecnología efectiva de secado combinada con métodos de análisis confiables conduce al manejo de un alto volumen de información que, administrado con herramientas de estadística multivariada y algoritmos especializados, permite la simplificación para concluir en un análisis quimiométrico de última generación reconocido mundialmente para el control de calidad, en este caso, del cacao.

Por lo anterior, el objetivo del estudio presentado a continuación es desarrollar un método de secado estandarizado como alternativa para el sector productivo de cacao en tres subregiones de Antioquia, que permita la reducción del tiempo de secado y la obtención de un balance óptimo en el producto final entre el desarrollo de compuestos volátiles y formación de contaminantes térmicos, alcance basado en el uso de la tecnología de lecho fluidizado y apoyado por un análisis quimiométrico para la definición del perfil de calidad.

## **2.2 Materiales y Métodos**

### **2.2.1 Secado solar**

El cacao fermentado obtenido según el procedimiento descrito en el Capítulo 1, proviene de Bajo Cauca, con una humedad de  $0.38 \pm 0.01 \text{ kg}_{\text{agua}}/\text{kg}_{\text{producto}}$ ; de Urabá, con  $0.41 \pm 0.02$

$\text{kg}_{\text{agua}}/\text{kg}_{\text{producto}}$  (Urabá); y Magdalena Medio,  $0.42 \pm 0.02 \text{ kg}_{\text{agua}}/\text{kg}_{\text{producto}}$ , para luego ser sometido a secado solar en una marquesina construida con una capacidad máxima de 450 kg para capa gruesa (altura: 5 cm), dividida en dos módulos con las dimensiones que se describen en la Tabla 2-2.

**Tabla 2-2:** Dimensiones de marquesina para el secado solar en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio

Característica	Descripción
Material de construcción de la estructura externa	Caña de Guadua
Material de construcción de base de la marquesina	Madera blanca (Roble)
Material de cubierta	Plástico en polipropileno calibre 6 mm
Distancia entre la base y el piso	1.0 m
Altura de la columna soporte en el centro	2.0 m
Altura de las bases externas	0.5 m
Altura del desfogue	0.2 m

La masa de cacao fermentada fue dispuesta en una capa delgada sobre la marquesina, en cuadrículas dispuestas para los 300 g de muestra correspondiente a cada unidad experimental. La masa de granos fermentada sobrante fue dispuesta en el otro compartimento como se muestra en la Foto 2-1. Los volteos se realizaron con un rastrillo de madera, el primer día cada 2 h, y a partir del segundo día cada 4 h, hasta finalizar el secado (humedad inferior a 7 % bh). Las muestras fueron recolectadas cada 24 h, almacenadas al vacío y luego mantenidas en un recipiente cerrado con sílica gel con indicador de cobalto, hasta su procesamiento.

**Foto 2-1:** Estructura tipo marquesina en Roble dispuesta para el secado solar en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio.



Durante el secado se llevó el registro de: i) humedad relativa y de temperatura con *Datalogger*, de ambos parámetros con registros en ciclos de 2 s (CEM, Modelo DT172, USA), ii) luminosidad con un Luxómetro (LightScout DLI 100 Meter. Ref. 3405, USA) iii) las horas de precipitación y iv) el seguimiento de la humedad de los granos que se midió cada mañana y tarde con una balanza (Mini GAC PLUS, USA). Los datos fueron corroborados por el método AOAC (931.04) (Official Methods of Analysis, 2012). Los datos ambientales, como temperatura ambiente, presión atmosférica, humedad relativa, nivel de precipitación y radicación solar fueron registrados en una estación meteorológica (Atmus 14, USA) ubicada en cada sitio de estudio.

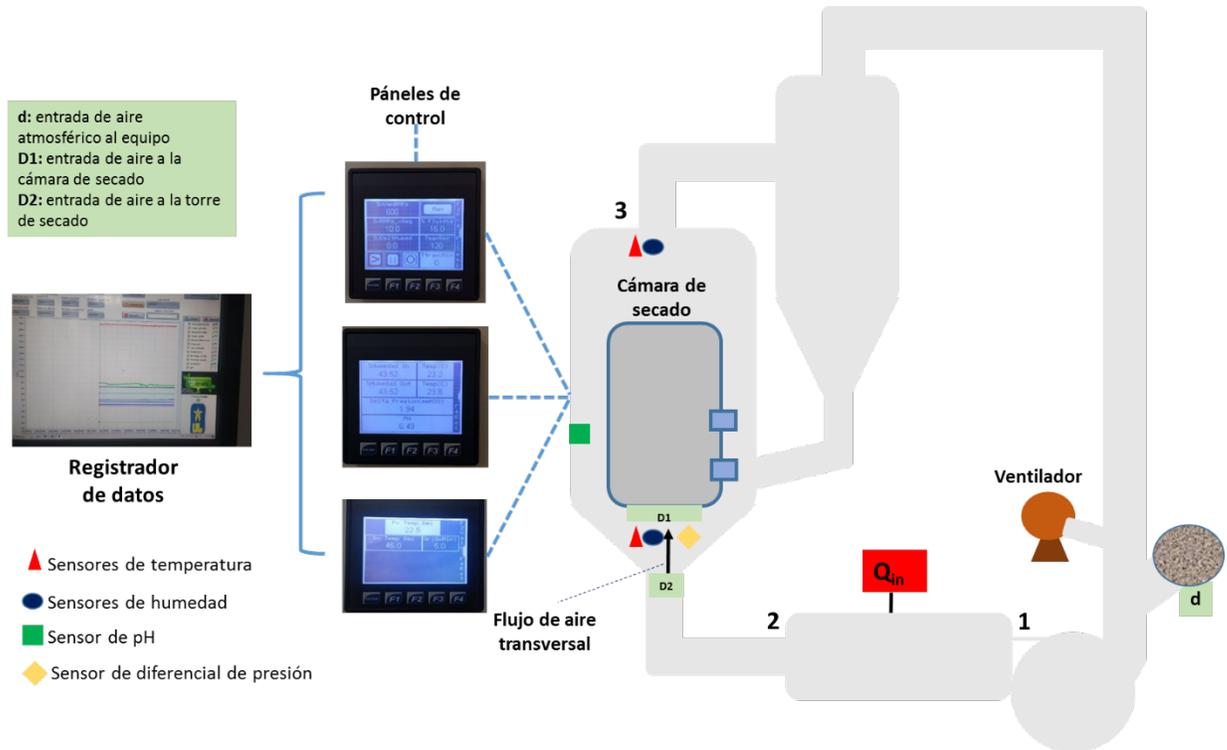
### 2.2.2 Secado por Lecho Fluidizado

- **Equipo de secado y sistema de medición:** el secado artificial propuesto en este estudio para granos de cacao fermentados fue conducido en un deshidratador discontinuo de lecho fluidizado (Actum - modelo Secador LF, serie 0193, Colombia). El equipo fue automatizado por la empresa *Intelligent Solutions*, Colombia, para el control de algunas de las variables del proceso y obtener el registro de datos.

La cámara de secado consistió en una columna cilíndrica de acrílico de 0.39 m de diámetro y una altura de 0,180 m, dotada de dos termocuplas de bulbo recto con conexión de proceso tipo J (Modelo 18005, USA) para el registro de la humedad relativa (HR) y la temperatura bulbo seco (Tbs) ubicadas cada una antes de la entrada del aire a la cámara de secado y al finalizarla a una altura de 0.160 m. Adicionalmente, el equipo contó con un sensor para el seguimiento de la caída de presión ( $\Delta P$ ) localizado antes de la entrada a la cámara y un sensor de pH análogo (Gravity - DFRobot, China).

Los medidores de HR y Tbs empleados fueron provistos de un controlador I/O que, al igual que la señal de  $\Delta P$ , debieron ser transferidos a un circuito Arduino para convertirlos en un serial tipo Modbus RTU antes de pasar a un Programador Lógico Controlable, PLC (Delta, USA), el cual recibe directamente la señal del sensor de pH. Finalmente, todas las señales son convertidas a un lenguaje tipo escalera en el que se basa la herramienta *Labview National Instrument* instalada en un sistema de adquisición de datos para generar los reportes de los registros realizados cada segundo de todas las variables agrupadas por lote: i) temperatura de bulbo seco ii) humedad relativa, ambas variables a la entrada y salida a la cámara, iii) Diferencial de presión en mm H<sub>2</sub>O y iv) fluidización equivalente a la velocidad del aire a la entrada del equipo, de secado. Cada reporte estaba dado en el valor promedio, mínimo y máximo. El esquema del secador por lecho fluidizado y los sistemas de medición de datos se muestran en la Figura 2-1.

**Figura 2-1:** Esquema del secador por Lecho Fluidizado y el sistema de medición



- **Establecimiento de las variables de operación durante el secado por lecho fluidizado:** los parámetros en los que se basa la operación del secado por lecho fluidizado son: la altura y la velocidad mínima de fluidización, la caída de presión, la temperatura de secado y la masa de secado. Las tres primeras son determinantes para la toma de decisión sobre la mínima cantidad de cacao fermentado adecuado para el secado.

A partir de valores teóricos del grano de cacao tomados de Colina (2015) se extrajeron los valores de las propiedades fisicoquímicas del grano de cacao y con los datos de las dimensiones reales del equipo se calculó: diámetro de partícula ( $D_p$ ), aparente ( $D_a$ ) y efectivo ( $D_e$ ), factor de forma ( $\phi$ ), densidad aireada ( $\rho_{aireada}$ ), aparente ( $\rho_{aparente}$ ) y de partícula ( $\rho_{particula}$ ), porosidad mínima del lecho ( $\epsilon$ ) y de fluidización ( $\epsilon_{mf}$ ), área de la superficie ( $A_p$ ) y la masa de la partícula ( $m_p$ ). Estos valores sumados a las propiedades del aire (viscosidad y densidad a  $45 \pm 5$  °C y una presión de 1.105 mmH<sub>2</sub>O) y las dimensiones del equipo (diámetro de entrada del aire atmosférico al equipo (d)), de la entrada a la torre vertical (D2) y entrada a la cámara de secado (D1), se determinó realizando secados

previos a las condiciones teóricas que con 5 kg de cacao crudo, cantidad viable por la masa fermentada resultante (65% de  $112.4 \pm 4.8$  kg) fue suficiente para generar una mínima fluidización distinguible de un lecho fijo y homogéneo. Adicionalmente se establecieron los valores reales de las variables mencionadas para la operación de secado.

En el Anexo 2-1 se describen las fórmulas y el tratamiento de los datos para obtener los valores teóricos, ajustados y finales de los parámetros de operación del equipo de secado por Lecho Fluidizado. Las variables definidas para la puesta en marcha del secado por lecho fluidizado de cacao fermentado se describen en la Tabla 2-3.

**Tabla 2-3:** Parámetros de secado por Lecho Fluidizado en un equipo (Actum, modelo Secador LF, serie 0193)

Parámetro		Unidades	Valor
Cantidad de cacao fermentado		kg	5
Altura del lecho inicial		m	$0.075 \pm 0.005$
Velocidad del aire atmosférico a la entrada del equipo*	Etapa 1	m/s	15
	Etapa 2		13
	Etapa 3		10
Velocidad mínima de operación**	Etapa 1	m/s	6.2
	Etapa 2		5.4
	Etapa 3		4.3
Rampa de aumento de las revoluciones por minuto para alcanzar la velocidad mínima de fluidización		rpm/s	10
Temperatura de secado		°C	45***
Rampa de calentamiento del aire		°C/min	5
Tiempo de secado	Etapa 1	min	120
	Etapa 2		240
	Etapa 3		120****
Temperatura de enfriamiento		°C	30
Tiempo de enfriamiento		min	10

\*Velocidad del aire a la entrada del equipo

\*\*Velocidad de operación=3\*Velocidad mínima de fluidización

\*\*\*Las temperaturas evaluadas para la optimización fueron 40, 45 y 50 °C y la seleccionada fue 45 °C

\*\*\*\*Depende de la humedad inicial del cacao y hasta que alcance la humedad requerida final (<7%) en equilibrio (hasta que no pierda más peso)

- **Cinética de secado:** el estudio de la cinética se llevó a cabo a 40, 45 y 50 °C por triplicado a partir de unidades experimentales independientes obtenidas después del proceso de fermentación realizado en tres cajones, con material vegetal cosechado en Urabá en diciembre de 2016 bajo las mismas condiciones descritas en el ítem 2.2.1.

El seguimiento del proceso de secado para determinar la humedad se hizo con respecto a la pérdida de peso. Una muestra comprendida por 100 granos de cacao fermentados recolectados aleatoriamente de la masa total a secar fue dispuesta en una malla de polipropileno de baja densidad flexible. La muestra se pesó cada 15 min la primera hora y después cada 30 min. El registro se realizó en una balanza analítica y la toma de datos tardó 10 s entre cada medida. El procedimiento finalizó cuando la muestra alcanzó la humedad en equilibrio, es decir, se observó un peso constante entre las últimas tres medidas y que correspondieron a  $3.0 \pm 0.4 \%$ ,  $4.4 \% \pm 0.3$  y  $5.0 \pm 0.3 \%$  a 50, 45 y 40 °C, respectivamente.

- **Optimización de la temperatura de secado:** a partir de las muestras obtenidas de la cinética se evaluó el tiempo de secado en horas y las concentraciones de ácido acético y láctico en los granos de cacao, con el fin de determinar un balance entre el menor tiempo y concentración de ambos ácidos.

### 2.2.3 Modelo matemático de las curvas de secado

La descripción de la cinética del cacao fermentado se realizó a través de trece modelos de secado simplificados (C.L. Hii et al., 2009; Meziane, 2011). La relación de humedad (MR) por sus siglas en inglés, está definida por la ecuación 2.1:

$$MR = \frac{m_t - m_e}{m_0 - m_e} \quad \text{Ec.- (2.1)}$$

Donde  $m_t$  es la humedad en el tiempo  $t$  y  $m_0$  y  $m_e$  corresponden a los contenidos de humedad en equilibrio en base seca. Los parámetros estadísticos tales como chi-cuadrada (ver Ecuación (2.2)), la raíz del cuadrado medio RMSE (ver Ecuación (2.3)) y el coeficiente

de determinación ( $R^2$ ) fueron usados para determinar el ajuste de bondad, que tuvo como criterios el valor más alto de  $R^2$  y el más bajo de  $\chi^2$  y RMSE.

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (MR_{exp_i} - MR_{cal_i})^2}{N-z} \quad \text{Ec. (2.2)}$$

$$RMSE = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (MR_{exp_i} - MR_{cal_i})^2 \right]^{1/2} \quad \text{Ec. (2.3)}$$

Donde  $MR_{exp_i}$  es la relación de humedad en cada tiempo (t),  $MR_{cal_i}$  es la relación de humedad calculada teóricamente mediante cada modelo, N es el número de observaciones y z es el número de constantes en cada modelo. La modelación fue llevada a cabo usando el método de mínimos cuadrados y el complemento de Excel, SOLVER, basado en el método de iteración gradiente generalizado reducido (GRG).

### 2.2.4 Difusividad efectiva, $Deff$

La difusividad efectiva del agua en los granos de cacao fue determinada de acuerdo con la segunda Ley de Fick de difusión para materiales de forma esférica, que está definida por la siguiente ecuación 2.4:

$$\frac{\partial m}{\partial t} = Deff \left[ \frac{\partial^2 m}{\partial A^2} + \frac{C}{A} \frac{\partial m}{\partial A} \right] \quad \text{Ec. (2.4)}$$

Donde m está definido por el contenido de humedad en base seca y C y A son iguales a 2 y r, respectivamente, para una forma geométrica esférica. A partir de las condiciones de borde establecidas, los valores fueron:  $m(r; t=0) = m_0$  y  $m(r=R; t=t) = X_E$  y la solución aportada por Crank (1975), se puede determinar el contenido de humedad promedio en un tiempo (t) (ver Ecuación (2.5)).

$$MR = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} * \exp \left( -\frac{n^2 \pi^2 Fom}{r_0^2} \right) \quad \text{Ec. (2.5)}$$

Donde el número de Fourier de transferencia de masa ( $F_{0m}$ ) está definido por  $F_{0m} = \frac{Deff * t}{R^2}$ .

El término de sumatoria fue estimado usando 20 iteraciones hasta encontrar un valor de la convergencia  $\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2}$  con un valor de 1.00459262895664.

Se estimó además el coeficiente de difusión en función de la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius (ver Ecuación (2.6)):

$$D_{eff} = D_{eff_0} * \exp\left(-\frac{E_a}{R_g T_a}\right) \quad \text{Ec. (2.6)}$$

Donde  $E_a$  es la energía de activación (kJ/mol),  $T_a$  es la temperatura absoluta (K),  $D_0$  es el coeficiente de difusión efectiva de humedad de referencia (para una temperatura infinita) y  $R_g$  es la constante de gases universal ( $8.314 \times 10^{-3}$  kJ/mol K).

## 2.2.5 Caracterización física y química

- **Contenido de humedad:** el método aplicado se describe en el Capítulo 1, ítem 1.2.7.
- **Acidez total (AT) y pH:** el método aplicado se describe en el Capítulo 1, ítem 1.2.8.
- **Extracción de ácidos orgánicos:** el método aplicado se describe en el Capítulo 1, ítem 1.2.9.
- **Cuantificación de ácidos volátiles por HPLC:** el método aplicado se describe en el Capítulo 1, ítem 1.2.9.
- **Extracción y cuantificación de ácido acético y compuestos volátiles por GC-MS:** la cuantificación del ácido acético en concentraciones inferiores a 10 mg L<sup>-1</sup> se determinó en un equipo Tri Plus Cromatógrafo de Gases, modelo Trace GC 1300/1310 acoplado a un detector de masas de Triple cuadrúpulo TSQ Duo y olfatómetro, GC-MS/MS-O, aplicando una microextracción en fase sólida en espacio de cabeza HS-SPME, de sus siglas en inglés *Head Space - Solid Phase Micro-extraction*, de acuerdo al método reportado por Oliveira y colaboradores con algunas adaptaciones a partir de la optimización del tiempo y temperatura de extracción (L. F. Oliveira et al., 2016a).

Una vez la muestra fue adecuada, 1 g de cacao molido y tamizado sin mucílago para el cacao crudo o sin testa para los granos secos se mantuvo reservado en un vial para cromatografía gaseosa de 20 mL. El vial fue sellado con una tapa de septa blanca recubierta con teflón. Antes del análisis cromatográfico se adicionó 1 mL de una solución saturada de NaCl y se mezcló en un vórtex por 10 s. La extracción se realizó directamente en el puerto de inyección con auto muestreador robótico Triplus RSH (*Robotic Sample Handling*) Olfatómetro - G300022 PHASER System, 600 mm TL, *Voice software*, acoplado al cromatógrafo, el cuál mejora el rendimiento del inyector automático y garantiza el manejo adecuado para ejecutar la técnica de introducción de muestra Head Space y el sistema de extracción en fase sólida (SPME).

La extracción fue evaluada a tres temperaturas de estudio (40, 50 y 60 °C) y tiempos de extracción (10, 30 y 50 min) durante la incubación de la muestra expuesta a una fibra polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB) de 65 µm (Supelco, USA), parámetros previamente reportados (A. M. de Oliveira et al., 2004; Diab et al., 2014; Ducki et al., 2008; Misnawi & Ariza, 2011a; Perego et al., 2004; Pini et al., 2004; Rodriguez-Campos et al., 2012a).

La fibra fue activada de acuerdo con las recomendaciones del proveedor a 250 °C por 30 min, seguida de la adecuación de la misma durante 15 min a 48.6 °C. La extracción de los compuestos volátiles presentes en cacao molido y tamizado comenzó con la exposición de la fibra en el espacio de cabeza del vial (profundidad de la fibra en el vial 10 mm) con agitación inicial por 2 minutos, proceso seguido por una incubación sin movimiento a las condiciones óptimas encontradas a 48.6 °C hasta finalizar el ciclo de 50 min, con 45 s de agitación y 120 s de reposo.

La separación cromatográfica y detección espectrométrica comenzó con la desorción de los compuestos volátiles concentrados en la fibra en el puerto de inyección a 250 °C por 10 min. La separación de un volumen de muestra de 1000 µL se produjo en modo *Splitless* en una columna Trace TR-WAXMS 60 m por 0.25 mm diámetro interno, 0.25 µm espesor de la película (Thermo Scientific, USA). La temperatura de la línea de transferencia y del

inyector se mantuvo a 250 °C y el flujo del gas de arrastre para la elución se estableció en 1 mL/min de He con una rampa programada a 40 °C por 5 min, que se incrementó hasta 180 °C a una velocidad de 4 °C min<sup>-1</sup> y finalmente hasta 260 °C a una velocidad de 10 °C min<sup>-1</sup> donde se sostuvo por 2 min. La detección en el espectrómetro de masas empezó con la ionización en la fuente a 230 °C y la temperatura del cuadrúpolo estuvo a 150 °C El modo de detección se estableció en modo *Scan* cada 0.2 s en un rango de masas de 30-500 uma.

La cuantificación se realizó con dos curvas de calibración a partir de un estándar externo de ácido acético con una pureza de 99.99 %. Cada concentración se preparó a partir de una solución stock y se aforó hasta 1 mL con la solución saturada de NaCl para cubrir un rango desde 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10 mg L<sup>-1</sup> con un R<sup>2</sup> (0.999) y la segunda curva 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg L<sup>-1</sup> con R<sup>2</sup> (0.9994) y residuales inferiores a 20 %.

- **Extracción y cuantificación de la acrilamida:** la descripción del método de extracción y cuantificación de la acrilamida se detalla en el Anexo 2-2.

## 2.2.6 Análisis estadístico y quimiométrico

El análisis estadístico consistió en la optimización de la temperatura de secado por lecho fluidizado, seguido por el análisis quimiométrico basado en análisis estadístico multivariado que comprende la comparación entre la caracterización del cacao obtenido por secado solar y artificial, como se describe a continuación:

- **Optimización de la temperatura de secado por lecho fluidizado:** se realizó un diseño unifactorial a una vía de clasificación, bajo una estructura de tratamientos completamente aleatorizado, para la evaluación de la temperatura de secado con tres niveles (40, 45 y 50 °C) donde las variables respuesta fueron el tiempo de secado y la concentración de los ácidos acético y láctico, con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ . Se verificaron los principales supuestos asociados a los residuales y posteriormente se realizó

una prueba de comparación múltiple para establecer qué grupo de tratamientos (niveles de temperatura) difirieron significativamente por cada una de las variables respuestas mediante una prueba honesta de Tukey, controlando la tasa de error por familia en un nivel especificado.

Se realizó un Análisis Discriminante Lineal de Fisher (ADL) con dos fines. El primero fue clasificar una muestra dada con variables predictoras (o variables discriminantes) en la clase (o grupo de clasificación)  $C_i$  con mayor probabilidad a priori  $P(y = C_i|x)$ . Para calcular  $P(y = C_i|x)$  se utilizó la regla de Bayes asumiendo que  $P(x|y = C_i)$  sigue una distribución Gaussiana con media específica  $\mu_i$  y matriz de covarianza común. El segundo propósito fue determinar una combinación lineal de las variables predictoras que proporcionaran la máxima separación entre los centros de los datos y, al mismo tiempo, minimizaron la variación dentro de cada grupo de datos (Bader et al., 2009).

▪ **Optimización del tiempo y temperatura de extracción de compuestos volátiles:** la definición de la temperatura y tiempo de extracción de compuestos volátiles se realizó por medio de un diseño central compuesto (DCC) con dos factores, cada uno con dos niveles. Las dos variables independientes estudiadas fueron la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) ( $X_1$ ) y el tiempo de extracción (min) ( $X_2$ ). El nivel mínimo y máximo de las variables fueron 40 y 60  $^{\circ}\text{C}$  y 10 y 50 min, respectivamente. El diseño de experimentos consistió en 9 tratamientos con tres réplicas al centro, el cual fue realizado de forma aleatorizada y se repitió el tratamiento tres veces. La variable respuesta consistió en el seguimiento de 13 compuestos (Acetoína, 1.2-Acetoxi-3-butanona, 2-nonanona, trimetil pirazina, ácido acético, 2-etil-3,5-dimetil- Pirazina, tetrametil pirazina, 2,3,5-trimetil-6-etilpirazina, benzaldehído, Linalool, 1-metoxi-2-propil acetato, ácido isobutírico y hexanedioico, bis(2-etilhexil) éster.

Para determinar si el modelo se ajustaba y describía la variable dependiente, se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) con una distribución de Fisher (F-test). Los coeficientes no significativos ( $p > 0,05$ ) fueron eliminados del modelo de regresión y la eficiencia de este fue estudiada según el valor P de la ecuación de regresión y el valor del coeficiente de regresión ( $R^2$ ).

Las condiciones óptimas de extracción de compuestos volátiles fueron determinadas por el análisis de resultados de las variables dependientes, que fueron estadísticamente afectadas por los factores estudiados. Para esto, se hizo uso de la función de deseabilidad con valores entre 0 a 1 de acuerdo a la aproximación de la respuesta a su valor objetivo (D. Montgomery, 2001). Finalmente, la extracción y cuantificación de compuestos volátiles, bajo las condiciones óptimas halladas, se realizó por triplicado.

- **Alineamiento de los picos.** Para el análisis quimiométrico del perfil de compuestos volátiles por estadística multivariada, primero se procedió al alineamiento de los picos cromatográficos en términos de los tiempos de retención y área, mediante el uso de la librería GCalignR del software estadístico R (Wehrens, 2011).

- **Análisis de componentes principales.** En la aplicación del método de componentes principales intervinieron las variables de interés para la comparación de los dos tipos de secado (solar y por lecho fluidizado en tres subregiones de Antioquia): tiempo de secado, acidez expresada en ácido acético y láctico, cuantificación cromatográfica de estos dos ácidos, acético por GC/HS-SPME y láctico por HPLC-DAD, pH, perfil de los compuestos volátiles identificados por GC/MS).

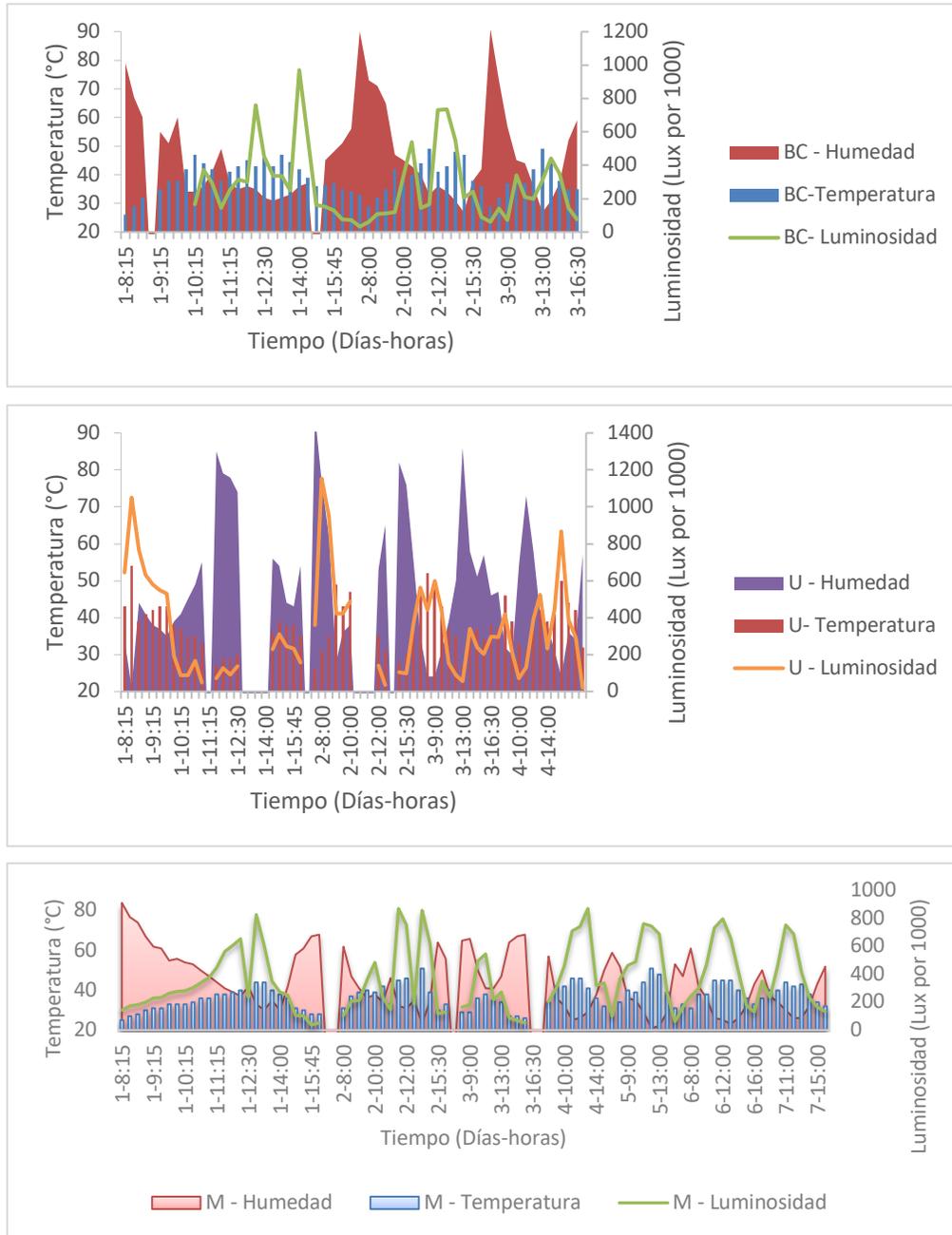
Por último, se realizaron dos análisis multivariados complementarios. Un análisis de Clúster para establecer el grado de asociación de las características que mejor explican las diferencias entre zonas de estudio y tratamiento térmico.

## 2.3 Resultados y Discusión

### 2.3.1 Secado solar

El tiempo del secado solar varió de forma tal que Bajo Cauca requirió el menor tiempo (72 h), seguido por Urabá (132 h) y Magdalena Medio (184 h). La variabilidad estuvo posiblemente determinada, entre otros factores, por las condiciones climáticas (temperatura, humedad, luminosidad y precipitaciones) de cada localidad donde se llevó a cabo la deshidratación de los granos de cacao fermentados en marquesina (ver Figura (2-1)).

**Figura 2-2:** Perfil de temperatura, humedad relativa y luminosidad registrado durante el secado solar en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio



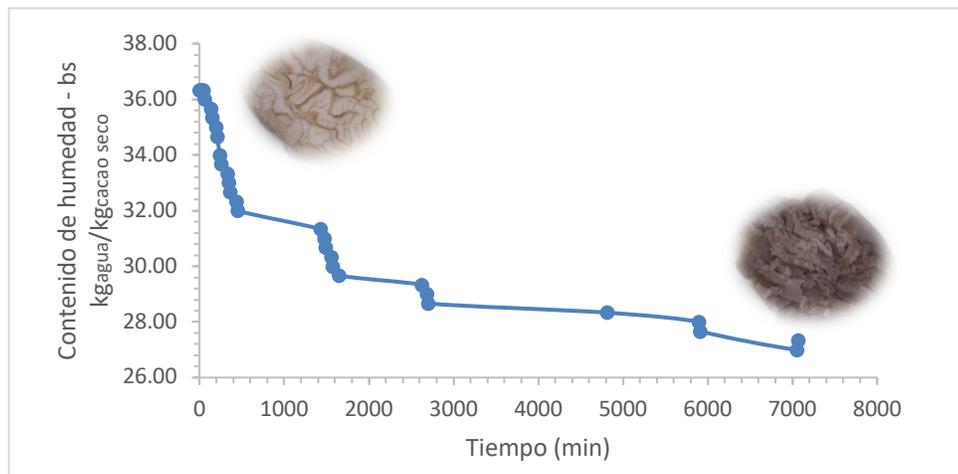
BC- Bajo Cauca; U: Urabá, M: Magdalena Medio

La mayor temperatura promedio en el interior de la marquesina se registró en Bajo Cauca  $39.1 \pm 5.6$  °C, seguido por Urabá  $37.9 \pm 6.6$  °C y por último Magdalena Medio con

36.7±6.0°C, valores superiores a la temperatura ambiente reportada para cada subregión. Este comportamiento puede ser propiciado por el diseño de la marquesina que es cubierta con un material en polipropileno que concentra la temperatura y, al mismo tiempo, permite el paso del flujo luminoso que cubría con mayor intensidad (496 a 1154 lux) toda el área superficial específicamente entre las 11:00 a. m y 14:00 p. m. Los mejores niveles de iluminancia se registraron en Urabá, y los más bajos coinciden con la temperatura (Magdalena Medio) (Lide, 2005). A pesar de Urabá presentar condiciones de temperatura y flujo luminoso suficientes para que se realizara el secado en menor tiempo, la poca capacidad del aire para retirar humedad por sus altos valores porcentuales de vapor de agua presentes en el aire, característico de esta zona, hicieron que se aumentara 45.4 % más el tiempo de secado con respecto a Bajo Cauca.

La presencia de precipitaciones es una de las situaciones más críticas durante el secado solar. Es así como en Bajo Cauca se registró el segundo día lluvias en la mañana, en Urabá el segundo día de 10 a 12 m., y en Magdalena Medio llevó la trazabilidad de cuatro jornadas de lluvia (mañana y tarde) comprendidas entre los siete días de secado. En la Figura 2-3 se puede observar el comportamiento de la pérdida del contenido de humedad de las tres subregiones

**Figura 2-3:** Contenido de humedad del cacao fermentado durante el tiempo de secado solar en Magdalena Medio



Los primeros 15 min corresponden a la fase de calentamiento y hasta las 7.5 h (primer día de secado) se puede observar un comportamiento lineal característico del período constante de secado o de evaporación del agua libre, seguido por la etapa de decrecimiento.

El estudio del cacao, resultado de este tratamiento de secado natural, se realizó con respecto a análisis quimiométrico, ya que fue considerado una referencia para la comparación con el secado artificial en lecho fluidizado. De otro lado, los aspectos termoquímicos no fueron del alcance de este estudio por ser un tratamiento no controlado.

### **2.3.2 Secado por lecho fluidizado**

Las proyecciones de los valores teóricos, basados en los datos reportados por Colina (2014), y según la Ecuación de Ergún para flujos de lecho turbulento, correspondientes al paso de la corriente en forma ascendente a través del lecho estático inicialmente de granos de cacao fermentados, permitieron estimar la caída de presión en el momento de la fluidización ( $\Delta P=51.27$ ), la velocidad mínima de fluidización ( $V_{mf}=2.63$  m/s), la velocidad de operación fue  $3 \cdot V_{mf}=7.9$  m/s, así como la altura mínima de fluidización, ( $L_{mf}=0,12$  m) resultados presentados en el Anexo 2-1.

Los resultados descritos se pueden considerar un acercamiento importante a las condiciones reales porque, comparados con lo obtenido durante los ensayos previos, se encontró que la caída de presión fue  $\Delta P=45.2$  mm H<sub>2</sub>O con los datos reales de las propiedades del cacao y  $38 \pm 3.6$  mm H<sub>2</sub>O con el valor registrado por el equipo mediante el sensor diferencial de presión.

Nótese que el valor de  $\Delta P$  fue menor y luego se mantuvo constante, lo que puede ser un indicador de la efectividad de operación del equipo, con la potencia suministrada por el ventilador, a las temperaturas de estudio. Esto a pesar de estar trabajando sobre una semilla recubierta de una pulpa que tiende a ser pegajosa, inicialmente por el alto contenido de azúcar y pectina, y que no es esférica en su totalidad. Este resultado se

corroboró con la velocidad mínima de fluidización  $V_{mf}=2.04$  m/s y de operación 6.12 m/s, variable que depende de la forma y densidad de la partícula, así como de la densidad y viscosidad del aire. Pero, según los resultados obtenidos, ambas velocidades también estuvieron por debajo sin afectar la altura mínima de fluidización ( $L_{mf}=0.10$  m) (Colina, 2014; Lim & Mujumdar, 2006; Turchiuli, Eloualia, El Mansouri, & Dumoulin, 2005).

Una altura mínima de fluidización diferenciable de la altura del lecho fijo de los granos de cacao, que se caracterizó por tener un movimiento homogéneo suficiente para mover todas las partículas, permitió aprovechar una de las ventajas más importantes de esta tecnología que es la homogeneidad del secado, al estar los granos suspendidos evitando el sobrecalentamiento de las partículas y sin disminuir su eficacia frente a los tiempos de secado, favoreciendo el gasto energético (Colina, 2014).

Al poner a prueba los parámetros, que se corroboraron con una cantidad de  $5 \pm 0.1$  kg en la cabina de secado diseñada con un diámetro de 0,39 m y 1.80 m de altura, se evitó la generación de un flujo turbulento no controlable que arrastrara las partículas a la parte superior de la cabina sin que se conservara la uniformidad. Por el contrario, estas cantidades permitieron evidenciar que la caída de presión a través del lecho equilibraba la fuerza de gravedad sobre las partículas o carga del lecho, provocando un mínimo movimiento de los granos de cacao.

Así como con para los parámetros antes mencionados se pudo probar su efectividad técnica, otras variables técnicas descritas en la Tabla 2-3 fueron establecidas a partir de la practicidad operativa, como el gradiente con el que se aumentó la temperatura. Esta velocidad se definió por ser el tiempo aproximado en que se presentaba la fluidización para garantizar que los granos de cacao estuvieran sometidos, en el flujo transversal, a la temperatura de estudio en el momento que estuviera fluidizando. La temperatura y tiempo de enfriamiento fueron evaluados de forma tal que la misma velocidad disminuyera la temperatura hasta un valor cercano a las atmosféricas para evitar que el producto absorbiera, humedad una vez finalizado el secado.

Por último, la velocidad del aire de secado, denominada en la interfaz del equipo porcentaje de fluidización, varió por el peso de las partículas al disminuir su humedad, lo que podría conducir a un flujo turbulento, causando daños en el grano (Neuhaus, 2014; Ríosi et al., 2011). La verificación de las velocidades de secado y los tiempos que permanecería en cada condición será objeto de discusión más adelante ya que fue optimizado a la temperatura de secado seleccionada en el estudio.

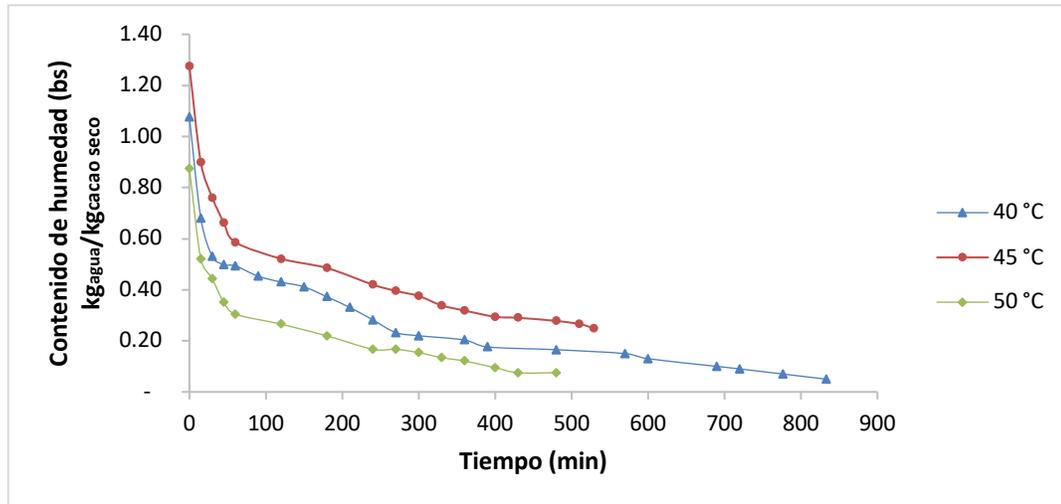
### **2.3.3 Cinética de las curvas de secado**

La cinética del secado del cacao fermentado mediante lecho fluidizado a 40, 45 y 50 °C permitió observar los cambios en la cantidad promedio de humedad removida en el tiempo, lo cual se convierte en un punto de partida para un futuro análisis del consumo energético, ya que la disminución de la humedad, operación unitaria vital en la calidad de la poscosecha del cacao, dependerá de la transferencia de calor y de masa entre la superficie y el interior del grano, así como las condiciones ambientales que variaron en cada subregión donde se realizó el secado solar y el secado artificial.

Por lo anterior, en este estudio se evaluó la intensidad del secado por la variación de la temperatura que se reflejó en el cambio en la cantidad de humedad del grano de cacao a través del tiempo.

La cinética de secado se realizó mediante el seguimiento cada 15 min en la primera hora, y después por períodos de 30 min durante la deshidratación en baches por Lecho Fluidizado de los granos de cacao fermentados a 40 °C, 45 °C y 50 °C (ver Figura (2-4)).

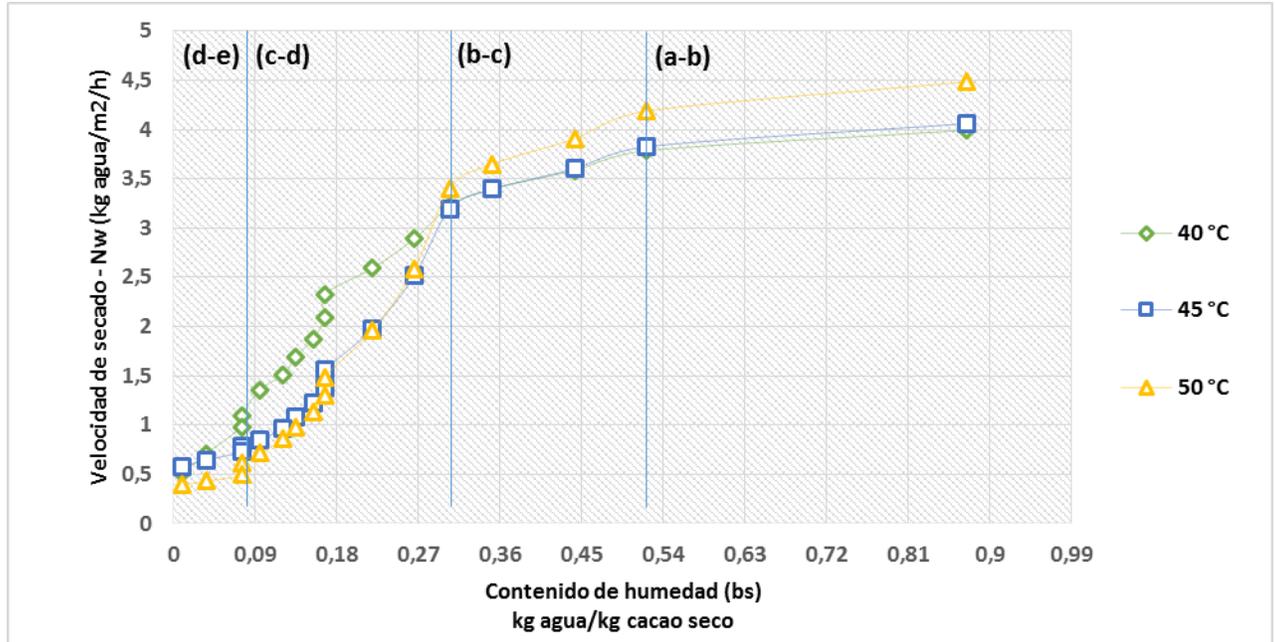
**Figura 2-4:** Contenido de humedad en base seca de los granos de cacao fermentados y deshidratados por lecho fluidizado a 40, 45 y 50 °C.



El secado respondió a una relación directa con la temperatura, es decir, que disminuyó el tiempo de secado al aumentar la temperatura: (40 °C), 556 min (45 °C) y 534 min (50 °C). Este comportamiento coincide con estudios en secado en capa delgada en horno por convección para este mismo material vegetal, aunque el tiempo del tratamiento duró aproximadamente 1800 min a pesar de evaluar temperaturas más altas, un comportamiento característico del secado en horno (C.L. Hii et al., 2009). Este aspecto fue mejorado por un estudio previo realizado en el marco de este proyecto por Gil y colaboradores (2015) que también secaron por una tecnología de horno de tiro con un distribuidor de aire interno, pero adicionaron enzimas pectilinasas, mejorando no solo la fermentación sino también la reducción del tiempo de secado (Gil et al., 2016) como se explica en el Anexo 1-1.

Para cada uno de los tratamientos se pudieron distinguir los tres períodos característicos de secado. Este comportamiento se vio reflejado en el seguimiento de la velocidad de secado (Nw) (ver Figura (2-5)).

**Figura 2-5:** Velocidad de secado por lecho Fluidizado a 40, 45 y 50 °C vs contenido de humedad en base seca de granos de cacao fermentados

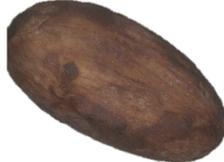


En el primer periodo (a-b), no se observaron parámetros característicos para ninguno de los tratamientos, por lo que el seguimiento se pudo realizar a partir del segundo (b-c), conocido como el período constante, el cual se dio a una velocidad de  $3.45 \pm 0.20.3$  y  $3.50 \pm 0.2$  kg<sub>agua</sub>/m<sup>2</sup>/h hasta alcanzar 60 min para las temperaturas de 40 y 45 °C, respectivamente, lapso correspondiente a la evaporación del agua (27 a 34.8 %) en la superficie saturada, la cual depende en gran medida de la velocidad de transferencia de calor del aire a los granos de cacao, que para 50 °C solo fue hasta 15 min. Por último, se logra distinguir un cambio decreciente de la velocidad de secado en el período (c-e) hasta alcanzar el contenido de humedad en equilibrio, que está regido por una transferencia de masa interna llevada a cabo por difusión (Lim & Mujumdar, 2006). Hallazgos similares han sido reportados para una serie de materiales vegetales de diferente naturaleza (Kaleta, Górnicki, Winiczenko, & Chojnacka, 2013).

Por otro lado, y con la finalidad de asociar los cambios superficiales de la estructura del cotiledón con la pérdida de agua en el tiempo, fueron capturadas fotografías por medio de un estereoscopio SteREO Discovery.V12 con objetivo de 1.0X (Carl Zeiss, Alemania). De esta forma, en la Figura 2-6 se describe el cambio del interior y exterior del grano de cacao

durante el secado por lecho fluidizado, y se compara al final con un control (cacao seco por método natural).

**Figura 2-6:** Cambio al interior y exterior del grano de cacao durante el secado por Lecho Fluidizado de acuerdo con los cambios de período de secado destacados.

Fluidización	Período de secado	Tiempo (min)	Contenido de humedad (bs) Kg agua/kg cacao seco	Interior	Exterior
6.2 m/s (0 a 120 min)	Calentamiento o $X_0 - X_{15}$ (a-b)	0	0.94		
		15	0.899		
	Constante - Finalización ( $X_c$ ) (b-c)	60	0.56		
	Decreciente	120	0.51		
5.1 m/s (120 a 380)	Decreciente	380	0.23		

**Figura 2-6:** (Continuación)

Fluidización	Período de secado	Tiempo (min)	Contenido de humedad (bs) Kg agua/kg cacao seco	Interior	Exterior
4.3 m/s (380 a 500)	Decreciente, $X_r$ (c-d)	495	0.08		
	Decreciente, $X_E$ Finalización (c-e)	500	0.05		
Solar - 168 h	Finalización	Control	0,07		

A partir de las fotografías se pueden detallar los siguientes aspectos: la estructura en el tiempo inicial es compacta y su superficie externa está cubierta en su totalidad por el mucílago, el cual posee una humedad superior a 30 % (bh) para las tres subregiones y repeticiones. A partir de esta observación se puede plantear que, desde el inicio hasta la finalización del período constante (60 min), la superficie está saturada y por esto corresponde es a la evaporación de agua libre. Por esta razón, el interior del cotiledón sufre cambios mínimos y solo hasta este punto ( $X_c$ ) inicia la deformación de la estructura interna por encogimiento, lo que da paso a un nuevo mecanismo de reducción de la humedad, la cual es dominada por la difusión, que al final concluye con una estructura con surcos profundos que dan paso a un material más poroso (> 30.4 %) y menos denso al pasar de 1090.9 kg/m<sup>3</sup> fermentado a 887±53.6 kg/m<sup>3</sup> (Torrez Irigoyen, 2013) (Bart-Plange & Baryeh, 2003).

En la Tabla 2-4 se describen los valores de humedad, velocidad de secado y difusividad efectiva de cada uno de los momentos característicos (principio y fin) de cada período, lo que permiten evidenciar el comportamiento antes descrito.

**Tabla 2-4:** Parámetros cinéticos calculados a 40, 45 y 50 °C durante el secado por Lecho Fluidizado

Parámetro	Temperatura	Condiciones iniciales, Xi	Condiciones críticas, Xc	Condiciones requeridas, Xr	Condiciones en equilibrio, Xe
Tiempo de secado (min)	40 °C	0	60	720±33.5	832.7±33.5
	45 °C	0	60	529±9.5	555.7±9.5
	50 °C	0	60	480±5.6	534±5.6
Contenido de humedad (bh) kg agua/kg cacao	40 °C	0.558±0.006	0.192±0.003	0.063±0.002	0.055±0.001
	45 °C	0.561±0.005	0.259±0.005	0.062±0.001	0.044±0.007
	50 °C	0.467±0.005	0.266±0.006	0.065±0.001	0.035±0.006
Contenido de humedad (bs) kg agua/kg cacao seco	40 °C	1.08	0.49	0.07	0.055
	45 °C	1.276	0.586	0.160	0.152
	50 °C	0.875	0.305	0.010	0.003
Relación de humedad, MR	40 °C	1.00	0.43	0.02	-
	45 °C	1.00	0.39	0.01	-
	50 °C	1.00	0.346	0.008	-
Velocidad de secado, Nw (kg agua/m <sup>2</sup> /h)	40 °C	3.99	3.22	0.30	0.10
	45 °C	4.1	3.2	0.45	0.44
	50 °C	4.5	3.4	0.49	0.39
Difusividad efectiva, Deff m <sup>2</sup> /s	40 °C	1.7 3x 10 <sup>-8</sup>			
	45 °C	2.52 por 10 <sup>-8</sup>			
	50 °C	3.30 por 10 <sup>-8</sup>			

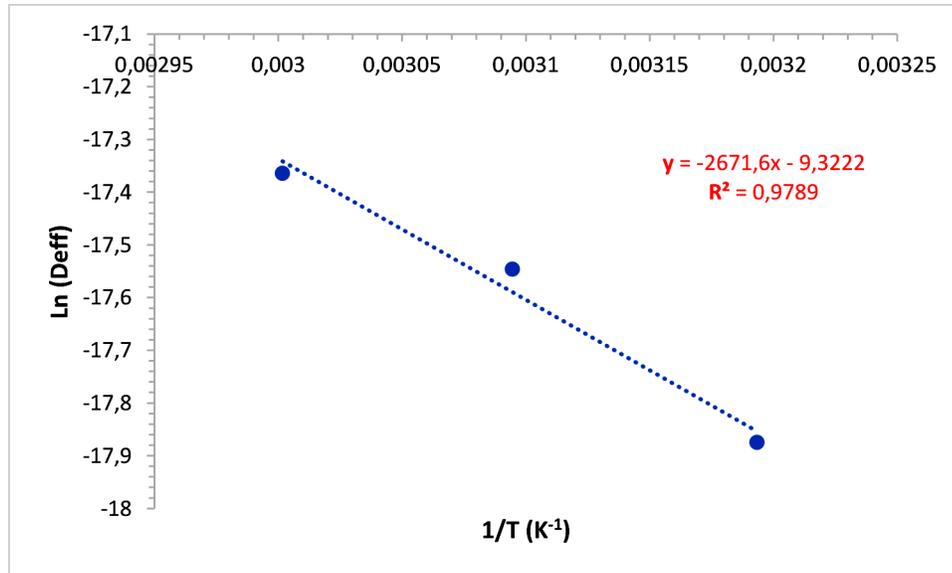
### **2.3.4 Relación entre la Difusividad Efectiva ( $D_{eff}$ ) y Energía de Activación, $E_a$**

El modelo teórico basado en la segunda Ley de Fick, análoga a la Ley de conducción de calor de Fourier, ha sido ampliamente usado para determinar durante el período de secado decreciente el valor de la velocidad en la que se produce la transferencia de masa a través de un área determinada, que para el cacao se ajusta al modelo de su geometría aproximada a una forma esférica, además del supuesto que la transferencia va a estar dominada por la difusión interna y se supone que se realiza en forma constante, característica definida como difusividad efectiva ( $D_{eff}$ ), a pesar de evidenciarse el encogimiento de su estructura interna (ver Figura (2-5)) (Villalba Vidales & Arzola De La Peña, 2015).

Los valores reportados en la Tabla 2-4, permiten inferir el resultado de una relación lineal directa ( $R^2=0.9941$ ) al aumentar la temperatura, como era de esperarse. Comparado con otros estudios, los resultados aquí logrados fueron superiores a los obtenidos para granos de cacao deshidratados por un método de capa delgada en estufa con sistema convectivo, a pesar de haberse realizado a temperaturas superiores (60 a 80 °C) o semillas y nueces procesadas por lecho fluidizado (C.L. Hii et al., 2009)(Perea-Flores et al., 2012).

La dependencia de la difusividad efectiva de la humedad a la variación de la temperatura durante el secado sigue una relación tipo Arrhenius (ver Figura (2-7)). De acuerdo a la estimación de la energía de activación ( $E_a$ ), a partir de la pendiente extraída de la ecuación de la recta  $E_a=m \cdot R$  (kJ/mol), el valor de energía requerida para iniciar la activación de la difusión de la humedad al interior de los granos de cacao fue de 27.9 kJ/mol y la constante de difusividad equivalente a la temperatura infinita  $D_{e0}$  7,95 por  $10^{-5}$  kJ/mol, requerimientos similares a matrices alimentarias complejas como granos de amaranto (23 a 37.5 kJ/mol) o semillas de oliva (25.4-29.2 kJ/mol) (Gögüs & Maskan, 2001; Guiné & Fernandes, 2006).

**Figura 2-7:** Relación de Arrhenius entre el logaritmo de la difusividad efectiva de la humedad ( $De_{eff}$ ) y el inverso de la temperatura absoluta para gramos de cacao



Además de la dependencia de la  $E_a$  con la temperatura, se han reportado otras fuentes que pueden influir en la variación de los valores de la  $E_a$  y  $De_0$ . Entre estos factores se encuentra el contenido de humedad inicial, ya que una materia prima con un mayor porcentaje de humedad presenta menor resistencia a la difusión, como el bagazo de caña, que presenta una humedad superior al 50 % e influye en los valores de  $E_a$  (19.47 kJ/mol) (Vijayaraj, Saravanan, & Renganarayanan, 2007). El segundo factor son los parámetros del tratamiento o técnica empleada. Un estudio realizado con cacao sometido a secado convectivo presentó un valor alto a pesar de tener temperaturas de estudio superior, pero a una velocidad inferior 0.01 m/s (C.L. Hii et al., 2009). Por último, está la complejidad de la matriz, porque entre más sencilla sea su composición proximal, aumentan las posibilidades de disminuir los requerimiento de  $E_a$ , como ocurre con la papa (12-32 a 14-34 kJ/mol) (Senadeera, Bhandari, Young, & Wijesinghe, 2003).

### 2.3.5 Modelos matemáticos de las curvas de secado

La descripción de los mecanismos del movimiento de la humedad al interior de grano de cacao es esencial para la selección de una tecnología de secado como la de lecho

fluidizado, la cual no ha sido ampliamente estudiada para su posible transferencia al sector productivo.

Para el entendimiento del mecanismo por el cual se da la reducción de humedad, se podría partir de la premisa de que en el período de secado constante predomina el mecanismo de flujo capilar, mientras que el de condensación- evaporación y flujo de vapor corresponden al período de decrecimiento, en el cual la velocidad de secado disminuye considerablemente, como se mencionó previamente. Esto se debe a que la humedad se retiene en los capilares más finos y puede migrar por ascensión capilar a lo largo de sus paredes o por evaporación y condensación sucesiva; así, la presión parcial del vapor de agua disminuye y el encogimiento continúa, pero a un ritmo mucho menor que al inicio de este periodo (J. H. Rodríguez & Quinto Diez, 2005).

La teoría más aceptada, especialmente para materias primas vegetales, es la de difusión líquida propuesta desde la segunda Ley de Fick, en la que se asume que la difusión es constante durante todo el tratamiento térmico, medios isotrópico y condiciones de frontera de primer orden, lo que conlleva a un distanciamiento de los datos experimentales al comparar los resultados con este modelo teórico (Perea-Flores et al., 2012). Por esta razón, se han desarrollado una serie de modelos semi-empíricos que han mejorado en cierta medida a partir de los ajustes a los resultados encontrados con diversas matrices y que fueron evaluados para los granos de cacao de este estudio.

En la Tabla 2-5 se listan los parámetros empíricos y estadísticos con los cuales se evaluaron 12 modelos, en los que se puede observar que 75 % de ellos presentaron un coeficiente de determinación por encima de 94 % y valores de RSME y  $X^2$  entre (0.0001 a 0.0198 y 0.0002 a 0.2327), razón por la cual no se requirió un modelo ajustado para este estudio.

En general, los modelos de tres términos exponenciales (Henderson modificado) o de dos términos como Aproximación de Difusión y Verma *et al.*, fueron los que mejor se ajustaron al tener un error cuadrático menor, acercándose con mayor exactitud al proyectar el comportamiento de los datos experimentales (altos valores de  $R^2$ ). Por otro lado, el modelo

de Newton fue el que menos se acercó como herramienta para una predicción del ajuste a la cinética de secado, como ocurrió con cacao deshidratado por horno convencional (C.L. Hii et al., 2009) (ver Figura (2-8)).

**Tabla 2-5:** Modelos simplificados de secado (semi-empírico y empíricos) a 40, 45 y 50 °C

Modelo	T (°C)	Parámetros empíricos							Parámetros estadísticos			
		k <sub>0</sub>	K	G	h	N	A	B	C	R <sup>2</sup>	X <sup>2</sup>	RSME
<b>Henderson modificado</b> $MR = a * e^{-k*t} + b * e^{-g*t} + c * e^{-h*t}$	50		0,00416	0,05474	0,8748		0,4230	0,4253	0,1517	0,99597	0,0004	0,0158
	45		0,00303	0,4727	0,9989		0,4937	0,0336	0,9067	0,99774	0,0002	0,0113
	40		0,0034	0,10470	0,7409		0,5268	0,4748	0	0,99376	0,0006	0,0203
<b>Promedio</b>										<b>0,9958</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0158</b>
<b>Aproximación de difusión</b> $MR = a * e^{-k*t} + (1-a) * e^{-k*b*t}$	50		0,0751				0,5592	0,0558		0,99544	0,0004	0,0168
	45		0,0585				0,5234	0,0520		0,99770	0,0002	0,0114
	40		0,1045				0,4732	0,0323		0,99360	0,0004	0,0182
<b>Promedio</b>										<b>0,9956</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0155</b>
<b>Verma et al</b> $MR = a * e^{-k*t} + (1-a) * e^{-g*t}$	50		0,0042	0,0751			0,4408			0,99544	0,0004	0,0168
	45		0,0031	0,0588			0,4766			0,99770	0,0002	0,0114
	40		0,0034	0,1045			0,5268			0,99360	0,0004	0,0182
<b>Promedio</b>										<b>0,9956</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0155</b>
<b>Page modificado</b> $MR = e^{-(kt)^n}$	50		0,0179			0,4428				0,99158	0,0006	0,0228
	45		0,011			0,4424				0,99182	0,0005	0,0215
	40		0,0113			0,4393				0,97490	0,0014	0,0361
<b>Promedio</b>										<b>0,9861</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,0268</b>
<b>Page</b> $MR = e^{-kt^n}$	50		0,1684			0,4428				0,991577	0,0006	0,0228
	45		0,1366			0,4424				0,983233	0,0005	0,0215
	40		0,1397			0,4393				0,974896	0,0014	0,0361
<b>Promedio</b>										<b>0,9832</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,0268</b>

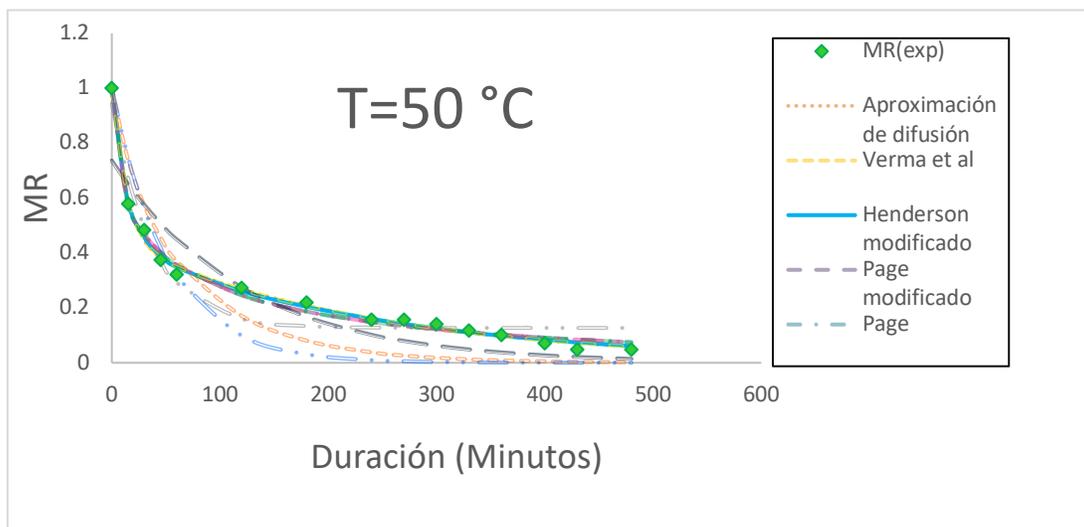
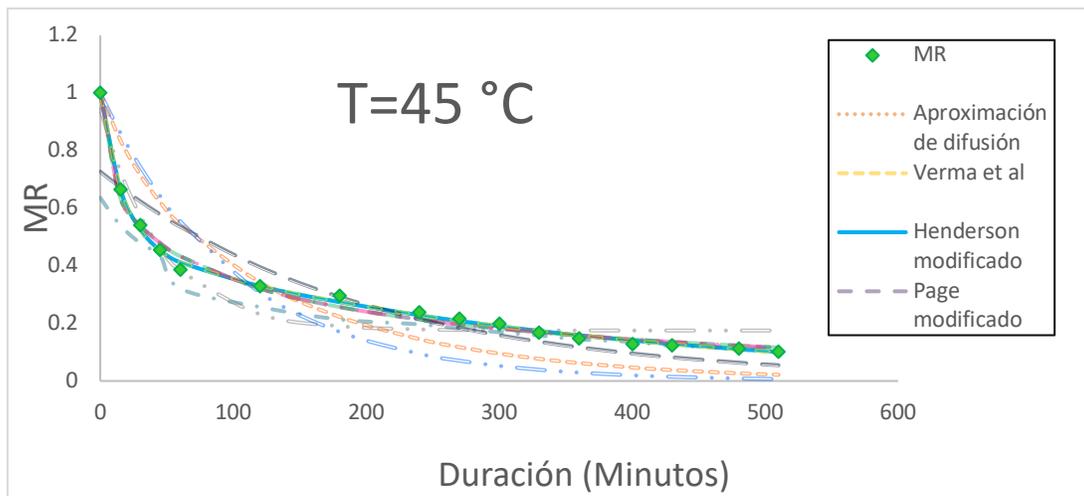
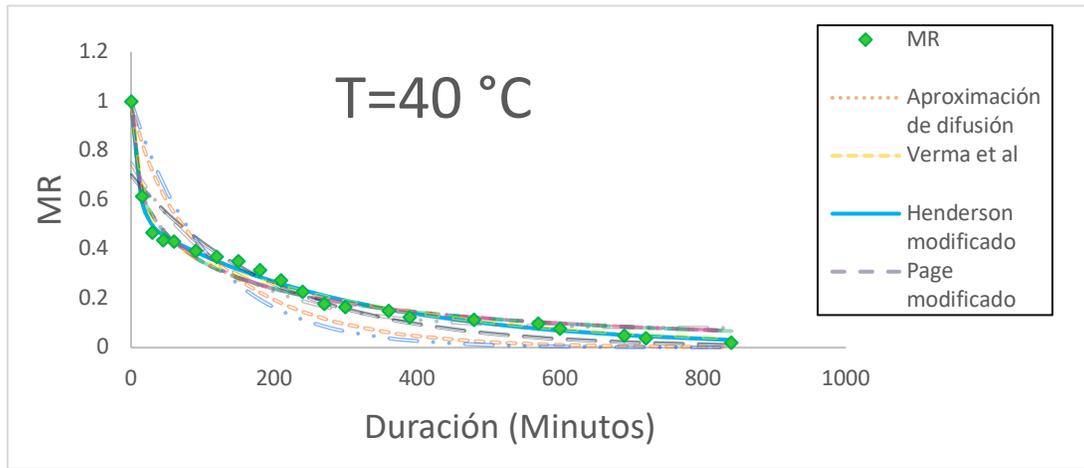
Tabla 2-5: (Continuación)

Modelo	T (°C)	Parámetros empíricos						Parámetros estadísticos				
		k <sub>0</sub>	k	g	h	n	A	B	C	R <sup>2</sup>	X <sup>2</sup>	RSME
$MR = a * e^{-k*tn} + bt$	45		0,1373				1,002			0,991821	0,0006	0,0215
	40		0,1326				0,9837			0,975132	0,0016	0,0359
<b>Promedio</b>										<b>0,9862</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,0267</b>
Hii et al	50		0,1682	0,1682		0,4430	0,6096		0,3899	0,991430	0,0008	0,0228
$MR = a * e^{-k*tn} + c * e^{-g*tn}$	45		0,1375	0,1368		0,4417	0,6342		0,3674	0,991721	0,0007	0,0215
	40		0,1153	0,1153		0,4819	0,6034		0,3919	0,973912	0,0013	0,0362
<b>Promedio</b>										<b>0,9857</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,0268</b>
Logarítmico	50		0,0267				0,8170		0,1270	0,9437	0,004	0,059
$MR = a * e^{-kt} + c$	45		0,0217				0,7674		0,1750	0,9458	0,004	0,056
	40		0,0075				0,6698		0,0788	0,8817	0,007	0,078
<b>Promedio</b>										<b>0,9234</b>	<b>0,005</b>	<b>0,064</b>
Henderson and Pabis	50		0,0082				0,7370			0,84048	0,011	0,099
$MR = a * e^{-kt}$	45		0,0051				0,7267			0,8501	0,010	0,092
	40		0,0050				0,7002			0,864548	0,0078	0,0839
<b>Promedio</b>										<b>0,8517</b>	<b>0,0096</b>	<b>0,0917</b>
Dos términos exponencial	50		0,0528				0,23657911			0,841123	0,0113	0,0989
$MR = a * e^{-k*t} + (1-a)*e^{-k*a*t}$	45		0,0344				0,2055017			0,789768	0,0136	0,1091
	40		0,0378				0,18944515			0,786549	0,0122	0,1053
<b>Promedio</b>										<b>0,8058</b>	<b>0,0124</b>	<b>0,1044</b>

**Tabla 2-5: (Continuación)**

Modelo	T (°C)	Parámetros empíricos							Parámetros estadísticos			
		$k_0$	K	g	h	n	a	B	C	R <sup>2</sup>	$\chi^2$	RSME
<b>Dos términos</b> $MR = a * e^{-k_0*t} + b * e^{-k_1*t}$	50	0,0042	0,0748				0,4406	0,5571		0,9954	0,0004	0,0167
	45	0,0031	0,0586				0,4765	0,5226		0,9977	0,0002	0,1091
	40	0,0035	0,0739				0,4561	0,5439		0,9842	0,0010	0,2327
<b>Promedio</b>										<b>0,9925</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,1195</b>
<b>Newton</b> $MR = e^{-kt}$	50		0,0193							0,7851	0,014	0,1150
	45		0,0098							0,6725	0,0198	0,1362
	40		0,0091							0,6793	0,018	0,1290
<b>Promedio</b>										<b>0,7123</b>	<b>0,0171</b>	<b>0,1267</b>

**Figura 2-8:** Comparación entre datos experimentales y predichos



Una de las aplicaciones de los modelos semi-empíricos de mejor ajuste es la determinación del tiempo de secado a partir de las condiciones de la relación de humedad inicial del producto y la requerida como humedad final.

Para la determinación proyectada de este tiempo de secado se procesó con el software MathLab, mediante la técnica numérica de Newton-Raphson, que permitió resolver un problema de búsqueda de raíces de los polinomios obtenidos por los dos mejores modelos (Henderson modificado y Aproximación de la Difusión). Nótese que los tiempos calculados para las tres temperaturas fueron: 50 °C: 438,9378 y 438,9406, 45 °C: 545,3080 y 545,3101 y, 40 °C: 557,5947 y 557,5969 min, respectivamente, con un error con respecto al valor esperado de entre 7.6 y 8.9 %, valores por debajo de 10 %, como es esperado. Cabe resaltar que los tiempos se aproximaron lo suficiente para tomar la decisión de usar cualquiera de los modelos para el seguimiento de la cinética de secado y realizar estudios previos para la toma de decisión de la temperatura de operación, como en este estudio, en el que los mejores resultados se dieron a 45 °C (Perea-Flores et al., 2012).

Finalmente, la cinética de secado también fue evaluada a través del modelo de referencia teórico, de Fick para el período decreciente, y se encontraron coeficientes de determinación suficientes para predecir (50 °C, R2: 0,973859, 45 °C: R2: 0.987660 y 40 °C, R2: 0.983104), pero con una diferencia entre el tiempo calculado con el esperado de 19 % para 40 °C, lo que se sigue soportando la idea de que los modelos semi-empíricos se acercan más a los valores predichos, un punto importante para su futuro uso.

### **2.3.6 Condiciones de operación de secado**

Las condiciones de operación de secado por Lecho Fluidizado fueron establecidas a partir de la optimización de la temperatura y la estandarización del porcentaje de fluidización, como se detalla a continuación:

- **Temperatura:** los parámetros seleccionados como variable respuesta para la optimización de la temperatura de secado por Lecho Fluidizado fueron el tiempo de secado

y la concentración al final del tratamiento térmico, tanto del ácido acético como el láctico. La decisión de escoger específicamente estos dos ácidos estuvo basada en algunos estudios que han concluido que, a pesar de existir otros ácidos endógenos como el ácido oxálico, succínico, málico o cítrico presentes en el grano de cacao, es la difusión del acético y láctico al interior del cotiledón la responsable de la acidez dominante (Schwan & Wheals, 2004).

Por lo anterior, la acidez dominante atribuida a la concentración del ácido acético y láctico es un parámetro delicado de caracterizar ya que depende de la etapa de poscosecha donde se evalúe. Por ejemplo, durante la fermentación, su pronunciada concentración al final puede ser un indicador de un paso a paso coherente durante este proceso (Rodríguez-Campos, Escalona-Buendía, Orozco-Avila, Lugo-Cervantes, & Jaramillo-Flores, 2011). De forma contraria, al final del secado, una acidez sobresaliente es considerada como un defecto y está asociada principalmente a tratamientos térmicos realizados de forma muy rápida, como es el caso de los secados artificiales.

En teoría, el ácido acético, por ser volátil, disminuye en una proporción considerable durante el secado, pero se ha detectado que en la mayoría de las propuestas tecnológicas alternativas al secado solar, al realizarse de forma tan rápida la evaporación del agua hasta alcanzar los porcentajes establecidos para el cacao en esta etapa que es por debajo de 7 %, se alcanza a percibir desafortunadamente que ni el ácido acético disminuye tanto como en el secado natural, fenómeno que es aún más marcado para el ácido láctico, que es considerado semi-volátil o no volátil, teniendo menor oportunidad de disminuir. Al respecto, vale la pena resaltar que existen estudios contradictorios donde se discute que el ácido láctico se pierde en mayor proporción durante el secado que el ácido acético, a pesar de ser un oxi-ácido con la presencia de un grupo hidroxilo adicional a la estructura molecular del ácido acético (Schwan & Wheals, 2004).

La anterior aseveración puede ser complementada por estudios posteriores realizados por Camu y colaboradores (2008) citados por Dina y otros (2010) en el que propusieron que al llevarse a cabo el secado por el método natural tradicional conocido como solar, el cual es lo suficientemente lento para permitir que el agua pueda transportar al ácido láctico

parcialmente del interior del cotiledón hacia la testa, se logra disminuir este defecto (Camu et al., 2008) (Dina, Ambarita, Napitupulu, & Kawai, 2015). Por esta razón se escogió como un parámetro de control también el ácido láctico, adicional al ácido acético que era más obvio, ya que se esperaba lograr que, con la selección de temperaturas para el secado artificial por Lecho Fluidizado, se obtuvieran resultados similares a los registrados en las zonas de estudio de Antioquia donde se practicó el secado solar, por medio de un tratamiento controlado y lento. De esta manera, se podría alcanzar un tiempo menor que por el secado solar, pero sin los contratiempos de los secados artificiales, como la acidez, ya sea proporcionada por un compuesto volátil o semi-volátil (Bonaparte, Alikhani, Madramootoo, & Raghavan, 1998).

Para tal fin se realizó un análisis de varianza de una vía, donde la variable independiente fue la temperatura (40, 45 y 50 °C). Estos valores fueron escogidos de acuerdo con los registros máximos alcanzados durante el secado solar en las subregiones de estudio. Los resultados se detallan en la Tabla 2-6.

**Tabla 2-6:** Tiempo de secado y concentración de ácido acético y láctico después del secado por Lecho Fluidizado a 40, 45 y 50 °C.

Temperatura (°C)	Tiempo de secado (horas)	Ácido Acético (% p/p)	Ácido Láctico (% p/p)
40 °C	13.9±0.55	0.0288±0.0013	0.0125±0.0006
45 °C	9.3±0.15	0.0117±0.00015	0.0097±0.0005
50 °C	8.9±0.10	0.0333±0.0019	0.0144±0.0008
Control	132	0.0288±0.0013	0.0072±0.002

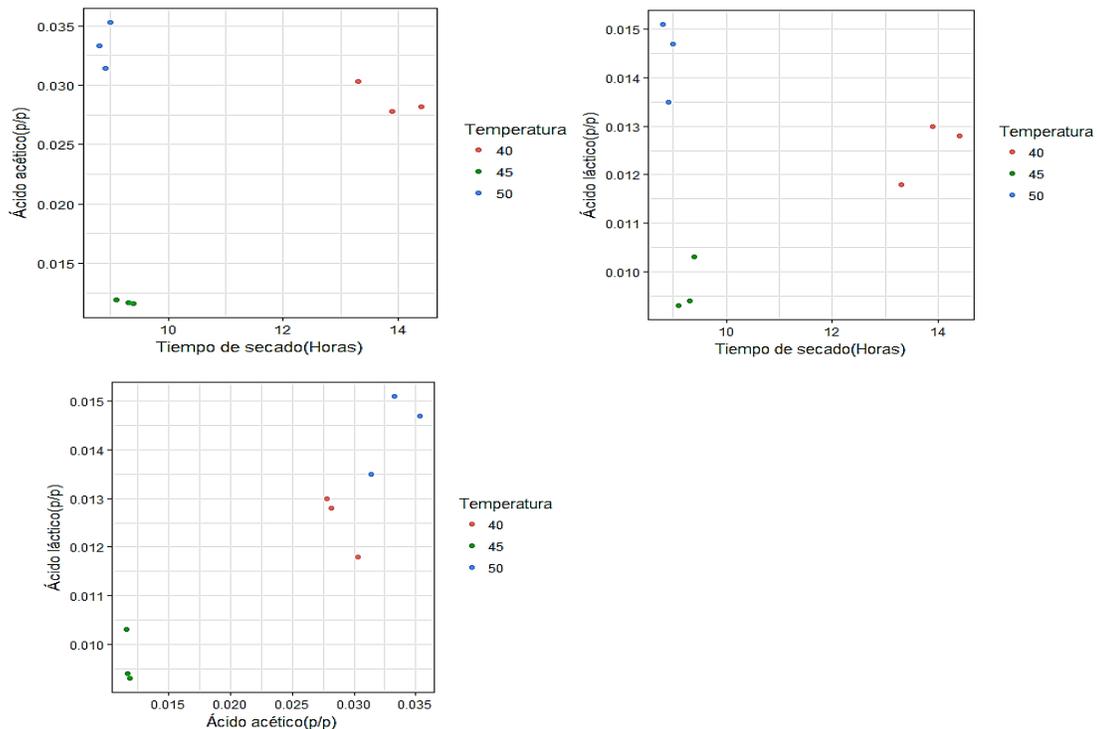
Se puede observar que la concentración de ácido acético a 50 °C fue superior a la obtenida para el cacao deshidratado por método natural y corresponde al menor tiempo de secado, lo cual tiene una tendencia reportada por previos estudios, en los que se ha identificado que un tratamiento rápido puede evitar la disminución de este ácido volátil y, al final, afectar la calidad del grano de cacao (Guehi, Irie, et al., 2010). Opuesto a estos resultados, el tratamiento a 40 y 45 °C presentó un valor igual o menor. Para el ácido láctico, cada tratamiento estuvo por encima de la referencia.

Este comportamiento puede estar asociado a que la mayor velocidad de secado se presenta durante el período constante a 50 °C, y es durante este tiempo donde se puede dar con mayor facilidad la disminución de la acidez. Este seguimiento fue realizado durante el secado al medir el pH del vapor recogido sobre un recipiente con un volumen de agua destilada constante.

El registro muestra como el pH para los tratamientos a 40 y 45 °C pasaron de 7.034 a 4.889 y de 6.446 a 4.786 en los primeros 60 min (período constante), respectivamente y sin cambios mayores en el período siguiente, opuesto al pH a 50 °C que pasó solo de 5.529 a 5.339 y el mayor cambio se presentó en el período de decrecimiento (4.7 al final del secado), lo cual puede soportar el comportamiento del ácido acético.

En la Figura 2-9 se puede apreciar la dispersión para el tiempo de secado en horas en función de la temperatura y las concentraciones de ácido acético y láctico, discriminada por temperatura.

**Figura 2-9:** Dispersión para el tiempo de secado en horas en función de la temperatura y las concentraciones de ácido acético y láctico, discriminada por temperatura



En estos gráficos de dispersión se puede apreciar que los valores más bajos en conjunto para las concentraciones de ácido acético y ácido láctico, respecto a la muestra, se presentan a una temperatura de **45°C**, mientras que los valores más altos para las concentraciones de los ácidos a una temperatura de **50°C**.

Para la verificación de las diferencias, la estructura de variación a partir del análisis de varianza, el cual se realizó de manera independiente por cada variable respuesta (ver Tabla (2-7)).

**Tabla 2-7:** Valores de estadísticos del análisis de varianza de una sola vía para tres niveles de temperatura

Variable respuesta	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio	Valor F	Pr(>F)
Tiempo de secado	2	45.96	22.981	204.8	3.01e-0.5 ***
Residuales	6	0.67	0.112		
Ácido Acético	2	0.0007775	0.0003888	207.2	2.91e-0.6 ***
Residuales	6	0.000113	0.000019		
Ácido Láctico	2	3.455e-0.5	1.727e-0.5	36.75	0.00043 ***
Residuales	6	2.820e-0.6	4.700e-0.7		

Con base a los resultados del análisis de varianza se pudo establecer, con un nivel de significancia del  $\alpha = 0,05$ , que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  en favor de  $H_1$ , de donde se infiere que existe evidencia muestral significativa para establecer que los tiempos de secado y las concentraciones de ácido acético y láctico en promedio difieren en al menos un par de temperaturas evaluadas.

La validación de los principales supuestos del modelo a una vía de clasificación mostró que los residuales no presentan comportamiento inadecuado, de tal manera que pueda afectar la inferencia. En la evaluación de la normalidad no se rechaza la hipótesis nula, lo que quiere decir que los residuales siguen una distribución normal, según la prueba de Shapiro Wilk. A partir del análisis de homocedasticidad por la prueba de Bartlett, se puede establecer que al menos uno de los residuales cumple con este supuesto. Finalmente, la independencia de los residuales fue probada con el test de Durbin – Watson.

La prueba de comparación múltiple utilizada fue la prueba honesta de Tukey, controlando la tasa de error por familia en un nivel especificado, ya que el método de Tukey ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual para que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor especificado; en este caso del 95% (ver Tabla (2-8)).

**Tabla 2-8:** Pares de comparaciones múltiples de acuerdo con la variación de la temperatura con un nivel de confianza del 95 %.

<b>Tiempo de secado</b>				
Comparaciones	Diferencias	Intervalo – Bajo	Intervalo – Alto	Valor P
45-40	-4,60	-5,44	-3,76	0,0000065
50-40	-4,97	-5,81	-4,13	0.0000041
50-45	-0,37	-1,21	0,47	0,425988
<b>Ácido Acético</b>				
45-40	-0,0170	-0,0205	-0,0136	0,00001
50-40	0,0046	0,0011	0,0080	0,01527
50-45	0,0216	0,0182	0,0250	0,00000
<b>Ácido Láctico</b>				
45-40	-0,0029	-0,0046	-0,0011	0,00522
50-40	0,0019	0,0002	0,0036	0,03367
50-45	0,0048	0,0030	0,0065	0,00035

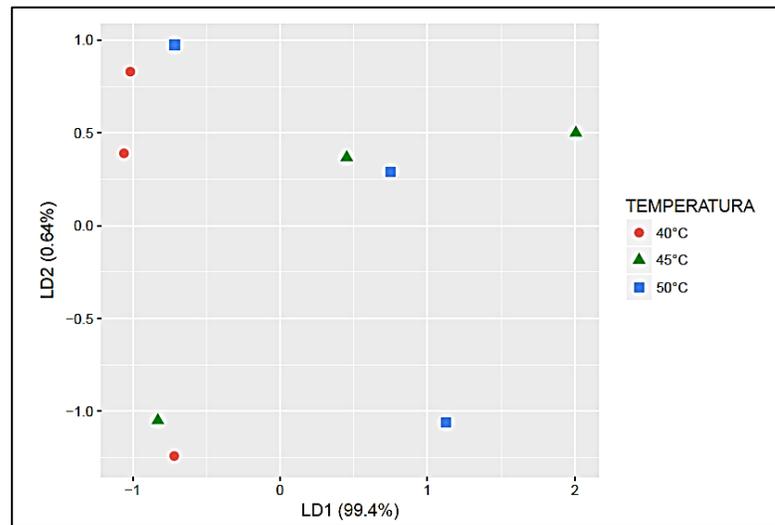
De los valores P, se puede inferir que para la variable “tiempo de secado” que los niveles de temperatura 45°C y 50°C no difieren significativamente, lo que quiere decir que es posible seleccionar cualquiera de las dos temperaturas con respecto a lo esperado en tiempo de secado. Las concentraciones de ácido acético y láctico presentan pares de comparaciones de temperatura que difieren estadísticamente.

Para la selección de la temperatura, partiendo de sus diferencias identificadas, y para definir una condición que refleje un balance entre todas las variables respuesta estudiadas, se realizó un Análisis Discriminante Lineal de Fisher (LDA).

El Análisis Discriminante Lineal permitió clasificar las muestras de cacao evaluadas en dos funciones discriminantes. La primera explica más del 99.4 % de la variación entre grupos en el conjunto de datos, la cual clasifica adecuadamente 3 elementos en la

temperatura 40°C, 1 para 45°C y 0 elemento en la temperatura 50°C. A partir de esta información, se determinó una combinación lineal de las variables predictoras que proporcionaron la máxima separación entre los centros de los datos y, al mismo tiempo, minimizaron la variación dentro de cada grupo de datos (ver Figura (2-10)).

**Figura 2-10:** Clasificación según el LDA.

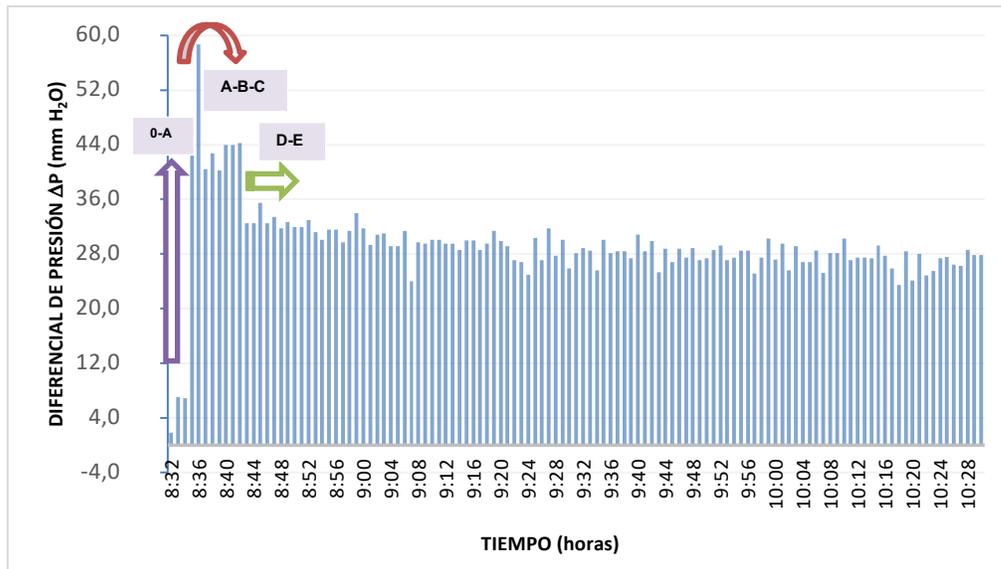


LD1, que representa la mayor contribución, está comprendida por el aporte del ácido láctico y acético, como se puede observar en la Figura 2-10. Las temperaturas de 40 y 45 °C se encuentran en el nivel más bajo, de lo que se puede inferir que es posible seleccionar cualquiera de las dos para obtener las concentraciones más bajas de los ácidos. Por otra parte, LD2 reúne con mayor peso al tiempo de secado y el contenido de ácido acético. En este se espera obtener los menores valores de ambos elementos y se aprecia que en el nivel central (45 y 50 °C) y más bajo se encuentra la temperatura de 45 °C, lo cual indica que para la temperatura es posible seleccionar tanto la de 50 °C como la de 45 °C, como se concluyó por el análisis de varianza.

Por lo anterior, se escogió la temperatura de 45 °C ya que responde de manera balanceada a los alcances de esta optimización que fueron: la más baja concentración de ácidos y un tiempo de secado, que no difiere de 50 °C y podría implicar un mayor gasto energético.

- **Fluidización:** así como durante la cinética de secado es posible identificar una serie de periodos, de igual forma un método basado en la fluidización comprende una serie de etapas, como se observa en la Figura 2-11, correspondiente al perfil registrado en línea durante las dos primeras horas de secado

**Figura 2-11:** Perfil del delta de presión durante los periodos de fluidización en el secado de granos de cacao a 45 °C durante los primeros 120 min de secado



En la Figura 2-10 se pueden distinguir tres periodos que son característicos de la fluidización (Roque, Ing, Stancich, & Stoppani, 2012) (Lim & Mujumdar, 2006). El primero 0A, conocido como *lecho fijo*, se caracterizó porque la velocidad del fluido fue baja y los granos de cacao permanecieron inmóviles. -Una vez la velocidad del aire aumentó, atravesando el lecho, la caída de presión también se incrementó, de acuerdo a lo característico de este principio, hasta que se igualó a la fuerza de gravedad sobre los granos de cacao por unidad de área de sección. De esta manera, el cacao comenzó a moverse en los primeros 2 min.

El período *intermedio*, comprendido por el espacio ABC, inició con la expansión lenta, donde los granos todavía estaban en contacto; la caída de presión aumentó más lento. Cuando se alcanzó el punto con el mayor  $\Delta P$  (58 Pa), el lecho se desagrega hasta que la velocidad aumenta alcanzando el máximo valor de rpm ( $2100 \pm 100$ ); de esta forma, los

granos se separaron para dar inicio a la fluidización, proceso en el que la caída de presión disminuyó (CD). Por último, se alcanzó el lecho fluidizado (C-D) (punto de fluidización incipiente), el movimiento de los granos se tornó intenso y al azar, lapso conocido como *lecho hirviente* a los sólidos fluidizados de este modo, seguido por la *fluidización continua*, en el cual se alcanza la velocidad del fluido necesaria para que los granos fueran arrastrados fuera del lecho y este deja de existir como tal.

Cuando el  $\Delta P$  del lecho disminuye (CD), la velocidad mínima *límite o terminal* de las partículas ( $v_t$ ), pudo ser calculada de manera aproximada (teniendo en cuenta la interacción por viscosidad y entre partículas) por la *Expresión de Ergun* (1952), correspondiente para este estudio a la velocidad mínima de fluidización  $V_{mf}$  1.55 m/s y la de operación  $V_f=4V_{mf}$ . Por esta razón, el equipo se operó durante 120 min a 6.2 m/s con  $\Delta P_{inicial}$  de  $33\pm 1$  a  $\Delta P_{final}$   $28\pm 2$ . Al disminuir la carga, se observó que la altura del lecho en reposo pasó de  $L_1=0.08$  m a  $L_2=0.065$  m y la masa se redujo aprox. 36 % (Barzegar, Zare, & Stroshine, 2015).

Se realizó el primer ajuste de la velocidad de fluidización para las nuevas condiciones se disminuyó a 5.4 m/s y se mantuvo de 120 a 380 min, con un  $\Delta P_{inicial}$  de  $27\pm 2$  hasta  $24\pm 2$  con una altura que cambió de  $L_2 = 0.065$  m a  $L_3 = 0.055$  m con un decrecimiento en la masa total de 47.5 %. Finalmente, se disminuyó la velocidad de fluidización hasta 4.1 m/s, período en el que se experimenta un cambio en el  $\Delta P$  que pasó de  $25 \pm 1$  mm H<sub>2</sub>O hasta  $22\pm 2$  mm H<sub>2</sub>O.

La disminución de la velocidad del arrastre neumático de los granos de cacao se dio como resultado de su pérdida de peso. La fuerza con la que puede ser fluidizada la masa de granos fermentados puede conllevar a obtener granos partidos. Para contrarrestar este efecto, se paso de 6.2 a 5.3 y a 4.1 m/s, lo que fue además una solución para su calidad final. Es así como: a) se realizó el secado solo a 6.2 m/s hasta alcanzar la humedad <7 %bh y se contaron los granos enteros al final, donde se determinó una pérdida de 21.7 %, b) El secado se programó 120 min a 6.2 m/s y hasta el final en 5.3 m/s, las pérdidas disminuyeron a 18.5 %. Por último, al aplicar la metodología propuesta para este estudio (= 120 min a 6.2 m/s, hasta 380 min a 5.3 m/s) y alcanzar la humedad requerida, las

pérdidas se redujeron hasta 11.5 %, razón por la cual la disminución de la velocidad de fluidización fue necesaria.

- **Apreciación energética:** a partir de la determinación de los parámetros relacionados con el balance de masas y energía, según las propiedades psicrométricas medidas durante el proceso, se pudo establecer la eficiencia térmica requerida para la evaporación del agua por Lecho Fluidizado del cacao fermentado, hasta alcanzar las condiciones requeridas del cacao después de finalizar la etapa de secado.

El consumo de energía fue de 1403.02 kJ/kg<sub>agua</sub>, valor inferior al rango esperado para este tipo de tecnología, y la energía de evaporación registrada fue de 2428.73 kJ/kg<sub>agua</sub>. De esta manera, la eficiencia térmica fue de 50.2%, un porcentaje que se acerca al máximo reportado para un tratamiento térmico basado en LF (38 a 58 %) (Nindo et al., 2003a; Abonyi et al., 1999). Dina y colaboradores (2015) realizaron el estudio sobre la disminución del tiempo y del consumo específico de energía SEC, por sus siglas en inglés *Specific Energy Consumption*, que representa la energía recibida por una masa de granos de cacao de Indonesia durante el tratamiento térmico solar mejorado con un sistema de desecantes, donde el nivel más bajo fue considerando las pérdidas de 13.29 MJ/kg para evaporar 595 g en 30 h, lo cual hace de esta propuesta de secado artificial una opción superior, ya que la cantidad de agua evaporada fue 2.7 kg y el calor neto 2761 kJ, que equivale a un SEC de 1.02 MJ/ kg<sub>agua</sub> sin considerar las pérdidas (Dina, Ambarita, Napitupulu, & Kawai, 2015b).

Los valores de cada parámetro psicrométrico y termodinámico, y el balance de materia y energía requeridos para la determinación de la eficiencia térmica, se detallan en el Anexo 2-3. En la Figura 2-12 se describe la representación termodinámica y psicrométrica de las dos etapas que comprende el paso del aire por el sistema de secado, que consiste en un calor sensible característico por conservar constante, durante el calentamiento, la humedad absoluta para retirar la humedad al pasar por el banco de resistencias, seguido por un calor isoentálpico, que remueve el agua del cacao ubicado en la cámara de lecho fluidizado a 45 °C, lo que implica asumir una temperatura de bulbo húmedo constante al

pasar del punto 2 y 3 en el proceso, como se ilustra en la Figura 2-12 (Lim & Mujumdar, 2006).



Una vez alcanzadas las condiciones óptimas de operación, se prosiguió con el análisis quimiométrico.

### **2.3.7 Perfil quimiométrico**

La calidad del cacao seco por la deshidratación por Lecho Fluidizado, comparado con el resultante del secado solar, se realizó teniendo en cuenta su perfil quimiométrico que permite abordar un concepto global de calidad con respecto al contenido de ácido acético y láctico como marcadores reconocidos para los tratamientos térmicos. Además, este control se conjugó con el balance de los compuestos volátiles relacionados con el perfil sensorial y la formación de uno de los principales contaminantes térmicos, como es la acrilamida.

En la Tabla 2-9 se describen los valores de la composición determinada para el cacao seco por los dos métodos de estudio: solar y Lecho Fluidizado.

**Tabla 2-9:** Descriptores quimiométricos del cacao sometido a un secado por Lecho Fluidizado y solar en tres subregiones de Antioquia

Abreviatura	Compuesto	Bajo Cauca Solar	Bajo Cauca LF	Urabá Solar	Urabá LF	Magdalena Medio Solar	Magdalena Medio LF
Time	Tiempo de secado (horas)	72.00 ± 0.00	7.17 ± 0.58	132.00 ± 0.00	7.50 ± 1.00	182.00 ± 0.00	8.33 ± 0.76
% H	Humedad % (kg agua/kg cacao húmedo)	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.02
TA_Ace	Acidez expresada en ácido acético, % p/p	0.29 ± 0.05	0.37 ± 0.13	0.51 ± 0.07	0.61 ± 0.02	0.93 ± 0.37	0.44 ± 0.10
TA_Lac	Acidez expresada en ácido láctico % p/p	0.44 ± 0.07	0.56 ± 0.20	0.76 ± 0.11	0.97 ± 0.10	1.39 ± 0.55	0.84 ± 0.47
Ph	pH	5.60 ± 0.10	5.07 ± 0.15	4.80 ± 0.00	4.71 ± 0.12	5.87 ± 0.93	5.76 ± 0.54
Acetic	Ácido acético - HS-SPME-GC %p/p	0.50 ± 0.39	0.46 ± 0.19	0.40 ± 0.14	0.35 ± 0.05	0.28 ± 0.15	0.22 ± 0.05
Lactic	Ácido Láctico % p/p	0.36 ± 0.22	0.08 ± 0.04	0.47 ± 0.25	0.14 ± 0.07	0.16 ± 0.00	0.15 ± 0.01
Acry	Acrilamida (%p/p: µg/µg por 100) x10-6	7.91 ± 3.36	8.00 ± 1.31				
V1	Ethanol, 2-ethoxy	TR (min)				20,39	
		Área				1,610,305.51 ± 2,789,130.97	
V2	1-Butanol, 3-methyl-	TR (min)	18.59 ± 0.02				
		Área	371,728.10 ± 146,170.76				
V3	2-Heptanol, acetate	TR (min)	20.73 ± 0.01			21.47 ± 0.13	
		Área	304,246.60 ± 156,364.12			1,918,201.80 ± 1,678,071.27	

Tabla 2-9: (Continuación)

Abreviatura	Compuesto		Bajo Cauca Solar	Bajo Cauca LF	Urabá Solar	Urabá LF	Magdalena Medio Solar	Magdalena Medio LF
V4	Acetoin o .2-Butanone, 3-hydroxy-	TR (min)	21.66 ± 0.01	21.09 ± 0.79	21.00 ± 0.02	20.85 ± 0.15		20,272
		Área	444,336.02 ± 205,018.57	596,238.43 ± 101,166.60	6,441,349.25 ± 301,489.80	5,790,759.73 ± 1,153,748.63		870833,588
V5	2-Heptanol	TR (min)	22.67 ± 0.01	22.17 ± 0.69	22.12 ± 0.01	22.05 ± 0.01		21.44 ± 0.23
		Área	654,865.87 ± 102,437.42	807,724.12 ± 730,000.42	1,297,662.51 ± 136,889.72	781,988.02 ± 347,522.71		2,155,180.51 ± 679,176.77
V6	2,3-butanediol	TR (min)					23,74	
		Área					803,444.96 ± 1,391,607.48	
V7	2-Acetoxy-3-butanone	TR (min)		24.60 ± 0.40	24.35 ± 0.01	23.94 ± 0.40		
		Área		225,457.44 ± 130,150.38	2,208,236.73 ± 219,082.76	1,282,360.55 ± 864,513.18		
V8	2-Nonanone	TR (min)	25.29 ± 0.01	24.79 ± 0.69			24.06 ± 0.11	24.22 ± 0.12
		Área	550,561.17 ± 84,998.89	421,547.59 ± 304,078.82			3,062,326.62 ± 610,676.02	1,184,769.84 ± 707,312.87
V9	cis-Linaloloxide	TR (min)					26,55	
		Área					258,374.77 ± 447,518.23	
V10	Pyrazine, trimethyl-	TR (min)		25.47 ± 0.62	25.37 ± 0.01	25.25 ± 0.11	24.84 ± 0.10	24,831
		Área		542,362.12 ± 378,216.60	2,754,059.32 ± 2,208,373.91	2,446,460.19 ± 996,079.82	898,244.02 ± 778,255.45	497174,217

Tabla 2-9: (Continuación)

Abreviatura	Compuesto		Bajo Cauca Solar	Bajo Cauca LF	Urabá Solar	Urabá LF	Magdalena Medio Solar	Magdalena Medio LF
V11	Octanoic acid, ethyl ester or Undecanoic acid	TR (min)	26.69 ± 0.01		26.11 ± 0.01		25.76 ± 0.53	
		Área	410,441.87 ± 95,532.61		1,023,879.38 ± 184,771.99		3,494,090.37 ± 1,233,551.87	
V12	Formic acid hydroxy, (+)-N-Acetylmuramic acid	TR (min)					26,32	
		Área					67,580.93 ± 117,053.61	
V13	2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro	TR (min)					26.65 ± 0.15	
		Área					549,130.63 ± 479,463.63	
V14	2,4-Dimethylhexanedioic acid	TR (min)		27.16 ± 0.02				
		Área		12,112,994.42 ± 2,122,420.74				
V15	Pyrazine, tetramethyl-	TR (min)	28.20 ± 0.01	27.70 ± 0.69	27.61 ± 0.01	27.47 ± 0.12	27.06 ± 0.08	26,986
		Área	1,213,245.78 ± 862,270.40	5,236,612.31 ± 4,487,870.53	17,467,864.47 ± 7,025,634.12	34,868,147.66 ± 8,348,582.17	2,167,117.20 ± 3,329,380.78	5566950,409
V16	2-nonanol	TR (min)	29.41 ± 0.15	28,083			28.05 ± 0.11	28.21 ± 0.14
		Área	311,162.85 ± 171,719.81	1080797,749			1,596,346.53 ± 465,493.72	964,735.26 ± 460,930.33

Tabla 2-9 (Continuación)

Abreviatura	Compuesto		Bajo Cauca Solar	Bajo Cauca LF	Urabá Solar	Urabá LF	Magdalena Medio Solar	Magdalena Medio LF
V17	Pyrazine, 3,5-diethyl-2-methyl-	TR (min)			28.94 ± 0.32			
		Área			2,105,276.87 ± 908,236.14			
V18	Butanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl éster o 1-Methoxy-2-propyl acetate	TR (min)		29,223	30.09 ± 0.01		29.30 ± 0.13	29,293
		Área		17491990,88	4,399,495.93 ± 585,588.64		2,497,713.98 ± 1,750,524.79	3589220,682
V19	Benzaldehyde	TR (min)	29.95 ± 0.01	29.82 ± 0.00	29.32 ± 0.00	29.16 ± 0.13		28.87 ± 0.00
		Área	1,494,782.14 ± 218,517.96	2,586,741.03 ± 836,267.38	2,083,166.16 ± 606,452.49	2,839,471.05 ± 506,006.38		1,427,841.77 ± 1,145,394.80
V20	Linalool	TR (min)	30.21 ± 0.01		29.51 ± 0.17	29.46 ± 0.13	28.87 ± 0.12	
		Área	237,668.50 ± 80,885.94		836,280.68 ± 722,131.78	253,587.41 ± 45,259.38	1,348,666.25 ± 549,638.89	
V21	1-Octanol	TR (min)		30.62 ± 0.00				
		Área		4,373,498.03 ± 2,107,487.19				
V22	1-Methoxy-2-propyl acetate	TR (min)	30.73 ± 0.01			29.92 ± 0.14		
		Área	2,235,680.60 ± 853,806.82			5,091,349.00 ± 871,484.15		

Tabla 2-9: (Continuación)

Abreviatura	Compuesto		Bajo Cauca Solar	Bajo Cauca LF	Urabá Solar	Urabá LF	Magdalena Medio Solar	Magdalena Medio LF
V23	Propanoic acid, 2-methyl- o isobutiric acid	TR (min)	31.10 ± 0.01				29.63 ± 0.09	29.72 ± 0.19
		Área	452,420.07 ± 329,833.66				2,535,466.61 ± 378,561.95	5,259,300.44 ± 3,004,410.04
V24	4-Hydroxy-2-butanone	TR (min)						29.85 ± 0.16
		Área						935,172.51 ± 900,559.91
V25	Decanoic acid, ethyl éster	TR (min)					31.79 ± 0.12	32.02 ± 0.00
		Área					1,488,146.97 ± 376,454.35	1,430,255.75 ± 45,140.26
V26	Propanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	TR (min)	32.09 ± 0.00	30.42 ± 0.80				
		Área	227,137.92 ± 118,013.11	1,184,291.96 ± 753,078.30				
V27	Acetic acid, Diethyl-	TR (min)		30.99 ± 0.00			29,82	
		Área		1,554,994.56 ± 664,030.47			1,123,041.73 ± 1,945,165.34	
V28	Butanoic acid, 3-methyl-	TR (min)			33.42 ± 0.08	33.21 ± 0.14	32.54 ± 0.16	32.71 ± 0.17
		Área			9,601,598.59 ± 3,454,480.24	9,949,015.04 ± 342,687.94	18,873,808.43 ± 5,985,954.62	24,586,756.14 ± 5,671,726.27

Tabla 2-9: (Continuación)

Abreviatura	Compuesto		Bajo Cauca Solar	Bajo Cauca LF	Urabá Solar	Urabá LF	Magdalena Medio Solar	Magdalena Medio LF
V29	Decanoic acid, ethyl éster	TR (min)		32.81 ± 0.26				
		Área		3,587,409.66 ± 5,975,534.18				
V30	3H)-Furanone, dihydro-	TR (min)		33.16 ± 0.01				
		Área		138,993.21 ± 30,321.30				
V31	Benzeneacetaldehyde	TR (min)		33.61 ± 0.00	33.05 ± 0.27	32,564		
		Área		520,610.31 ± 97,035.24	5,506,161.23 ± 4,524,168.46	2684081,047		
V32	Butanoic acid, 3-methyl-	TR (min)		33.44 ± 0.81				
		Área		7,523,663.20 ± 3,126,668.29				
V33	Hexanoic acid, 2-methyl-	TR (min)	34.01 ± 0.02					
		Área	8,532,299.55 ± 2,414,025.72					
V34	Pentanoic acid, 2-methyl-, methyl ester	TR (min)			34.48 ± 0.01			
		Área			1,463,942.94 ± 431,291.37			
V35	Benzeneacetic acid, ethyl éster	TR (min)	37.43 ± 0.01	36.82 ± 0.85	36.74 ± 0.01		36.59 ± 0.44	36.12 ± 0.16
		Área	343,574.05 ± 167,936.02	279,822.07 ± 220,653.99	1,254,337.19 ± 207,460.07		886,268.73 ± 23,755.19	406,811.14 ± 139,029.38
V36	Acetic acid, 2-phenylethyl éster	TR (min)	38.29 ± 0.01	37.67 ± 0.86		37.43 ± 0.14	36.79 ± 0.19	36.96 ± 0.16
		Área	6,485,032.77 ± 2,686,275.73	10,621,953.00 ± 8,256,245.51		3,796,490.44 ± 3,506,525.68	10,625,417.81 ± 4,635,609.18	7,583,139.95 ± 3,254,501.17

Tabla 2-9: (Continuación)

Abreviatura	Compuesto		Bajo Cauca Solar	Bajo Cauca LF	Urabá Solar	Urabá LF	Magdalena Medio Solar	Magdalena Medio LF
V37	Benzoic acid, pent-2-yl ester	TR (min)	38.88 ± 0.05	38.34 ± 0.84	38.25 ± 0.01	38.17 ± 0.01	37.49 ± 0.16	
		Área	375,475.68 ± 419,465.82	523,604.86 ± 203,302.83	2,787,157.84 ± 1,013,366.36	1,050,283.09 ± 351,839.77	1,191,477.96 ± 1,304,506.87	
V38	Phenol, 2-methoxy-	TR (min)		39.72 ± 0.01				
		Área		339,454.78 ± 45,160.12				
V39	Benzyl alcohol	TR (min)	39.85 ± 0.02		39.13 ± 0.01	38.97 ± 0.15		38.49 ± 0.17
		Área	406,686.63 ± 88,079.24		426,141.56 ± 85,426.05	394,533.23 ± 110,074.83		550,202.38 ± 210,329.68
V40	Phenylethyl Alcohol	TR (min)	40.77 ± 0.02	40.14 ± 0.88	40.08 ± 0.01	39.89 ± 0.16	39.20 ± 0.14	39.40 ± 0.18
		Área	21,412,435.72 ± 2,216,325.05	26,900,554.71 ± 17,234,639.32	11,037,174.69 ± 1,252,900.18	13,213,980.25 ± 3,782,988.44	25,927,150.10 ± 5,906,842.04	25,273,415.09 ± 2,051,541.09
V41	Hexanoic acid, 2-ethyl-	TR (min)		41.58 ± 0.23		40.90 ± 0.08		
		Área		238,600.58 ± 228,169.20		707,327.53 ± 474,918.38		
V42	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	TR (min)				41.39 ± 0.13		
		Área				452,787.68 ± 102,246.39		
V43	Octanoic acid, ethyl ester or Undecanoic acid	TR (min)					42.63 ± 0.10	
		Área					1,088,006.78 ± 373,979.29	

**Tabla 2-9: (Continuación)**

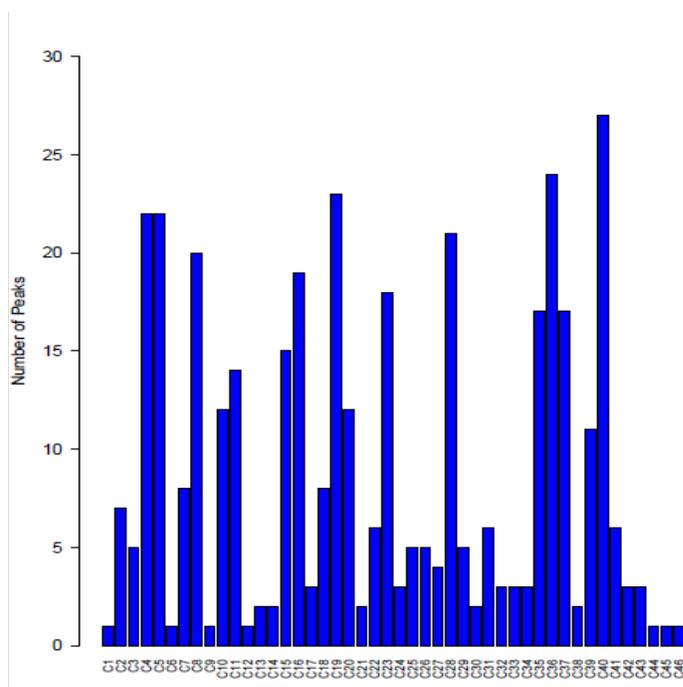
Abreviatura	Compuesto		Bajo Cauca Solar	Bajo Cauca LF	Urabá Solar	Urabá LF	Magdalena Medio Solar	Magdalena Medio LF
V44	n-Decanoic acid	TR (min)						
		Área					147,794.56 ± 255,987.69	
V45	5-Methyl-2-phenyl, Nonanoic acid	TR (min)					42,98	
		Área					339,330.29 ± 587,737.31	
V46	4H-Pyran-4-one,2,4-dihydroxy-2,6-dimethyl	TR (min)					45,78	
		Área					371,712.17 ± 525,680.39	

% p/p: porcentaje peso a peso expresado en mg/mg por 100, TR: Tiempo de retención

- **Alineamiento de los picos:** el análisis de los compuestos volátiles, junto con otros parámetros medidos, requirieron de una organización de la información extraída del software Cobra, obtenida por el equipo de GC-MS/MS, antes del análisis multivariado.

Los picos cromatográficos asociados a los 46 compuestos volátiles previamente identificados, según su espectro de masas correspondientes a las muestras de secado solar y LF, se organizaron en una lista definida en términos de los tiempos de retención y área volátiles, como se muestra en la Figura 2-13.

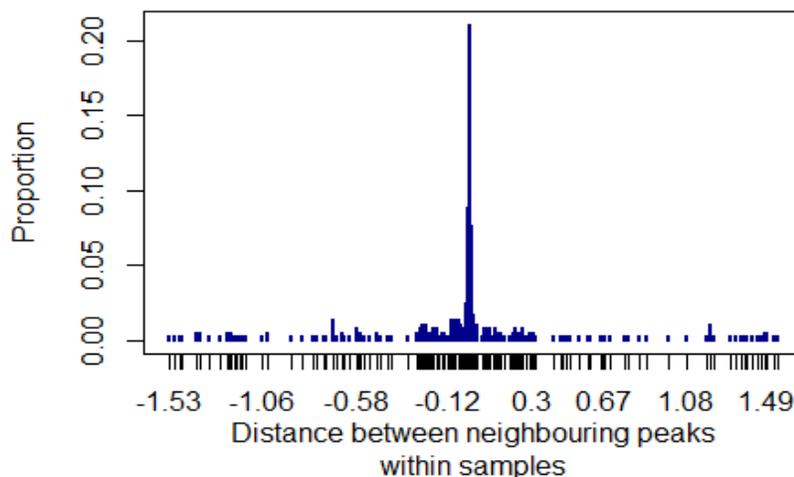
**Figura 2-13:** Distribución del número de picos correspondientes a cada compuesto volátil presente en las muestras de secado y organizados con GCalignR



Los compuestos volátiles que presentaron el mayor número de picos fueron: acetoína o .2-butanona, 3-hidroxi-2-Heptanol, benzaldehído, ácido butanoico, 3-metil, ácido acético, 2-feniletíl éster y fenil-etil alcohol.

Posteriormente, se calculó en qué proporción están distanciados cada uno de los picos cromatográficos de los compuestos volátiles en estudio, como se ilustra en la Figura 2-14.

**Figura 2-14:** Distribución de los picos cromatográficos de los compuestos volátiles presente en las muestras de secado

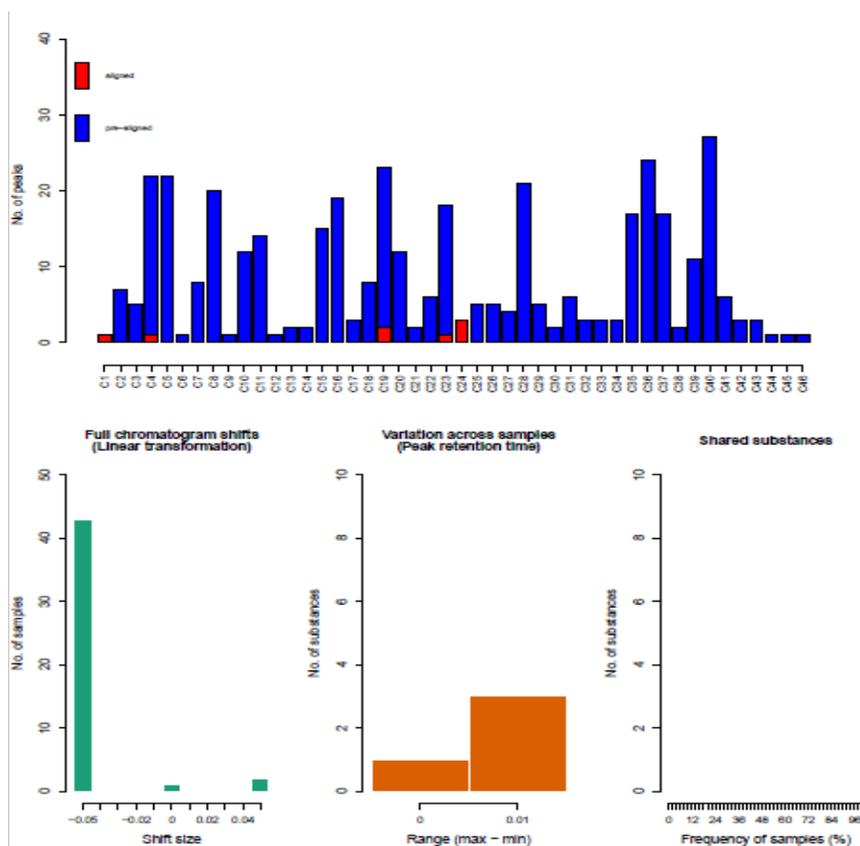


De esta agrupación por distancia se puede observar que el rango está comprendido entre (-1.53 y 1.54) y su valor promedio fue -0.03462. Después de la compilación de estos datos, se realizó la alineación de los picos de cada uno de los cromatogramas, sin especificar un compuesto volátil de referencia, de tal manera que el software lo estableciera de manera automática en función del mayor valor promedio de similitud con toda la muestra (*highest average similarity to all samples* (score = 9.32)) con la función *align\_chromatograms*.

El procedimiento retuvo cuatro compuestos volátiles: acetoina o 2-butanona, 2-heptanol, 2-metil ácido propanoico o ácido isobutírico y 4-hidroxi-2-butanona. La baja retención y el comportamiento de la alineación indican que no era necesario realizar ninguna transformación de los compuestos o someterlos a un procedimiento de *Warping*, para la alineación de los picos; se prosiguió con el análisis multivariado. Las salidas del alineamiento se pueden apreciar en la Figura (2-15). En la figura superior se observa que las barras en rojo corresponden a los compuestos antes mencionados, pero al verificarse en un gráfico de cambios totales del cromatógrama (barras verdes) solo se detectan dos con una baja intensidad, y al analizarlas de forma individual formarían dos grupos con un compuesto y el otro con cuatro. Finalmente, se verifica que lo extrae a un grupo de sustancias para compartir con un pico seleccionado que debía fraccionar el cromatógrama;

pero no hubo respuesta y por esta razón se concluye que es posible procesar los datos sin una alineación especial.

**Figura 2-15:** Alineamiento de los picos cromatográficos en función de la mayor similitud

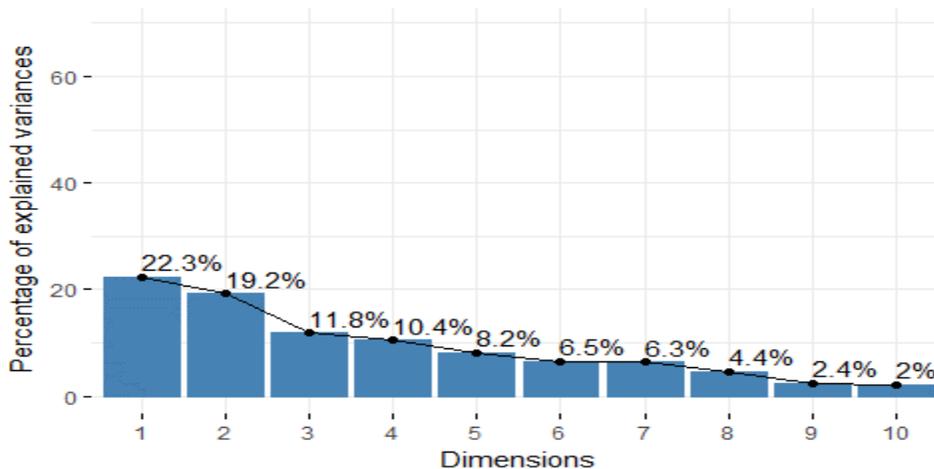


- **Comparación entre tratamientos térmicos en función de su composición química:** el reconocimiento de las similitudes entre los perfiles quimiométricos del cacao obtenido por dos tratamientos térmicos (natural y por lecho fluidizado) se llevó a cabo mediante un ACP donde intervienen las variables de interés descritas en la Tabla 2-7: tiempo de secado, acidez expresada en ácido acético y láctico, cuantificación cromatográfica de estos dos ácidos, acético por GC/HS-SPME y láctico por HPLC-DAD, pH, perfil bromatológico y los compuestos volátiles identificados por GC-MS/MS).

Con base en los resultados obtenidos, se puede establecer que las primeras dos componentes en el plano factorial permitieron explicar el 41,45 % de la variación total, y

con las primeras 5 componentes principales el 71,8% de la variación total (ver Figura (2-16)).

**Figura 2-16:** Porcentaje de la variación explicada para cada componente

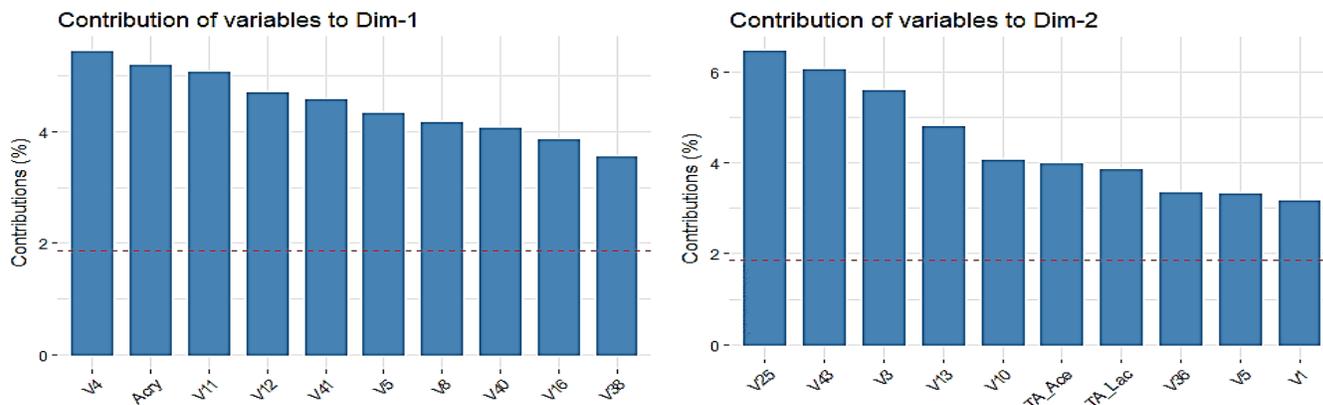


La mayoría de las variables aportan contribuciones superiores al 50% en las primeras cinco componentes principales, excepto las variables: ácido acético, 3-metil-1-butanol, ácido n-decanoico y 4-hidroxi-2-butanona. Los compuestos con mayor contribución en las cinco primeras componentes principales corresponden a: a) ácido N-acetil-murámico, b) ácido 2-etil-hexanoico, c) 2-heptanol, d) Ácido pentanoico, 2-metil, éster metílico y e) 2-nonanol. Con respecto al primer plano factorial, los compuestos que más contribuyen a la primera componente principal fueron: (V4) acetoína o .2-butanona, 3-hidroxi-, (Acry) acrilamida, (V11) ácido octanoico, etil éster o ácido undecanoico, (V12) ácido fórmico, hidroxil, ácido (+)-N-acetilmurámico, (V41) 2-etil-ácido hexanoico, (V5) 2-heptanol, (V8) 2-nonanona, (V40) Fenil etil alcohol, (V16) 2-nonanol y (V38) 2-metoxi fenol.

En la segunda componente, el aporte estuvo representado por: V(25) ácido decanoico, etil éster, (43) ácido octanoico, etil éster, (3) 2-heptanol acetato, (V13) 2-furanmetanol, 5 eteniltetrahidro, (10) trimetil pirazina, (TA\_Ace) acidez total expresada en % p/p de ácido acético, (TA\_Lac) acidez total expresada en % p/p de ácido láctico, (V36) ácido acético, 2-feniletil éster, (V5) 2-heptanol, (V1) etanol, 2-etoxi. En los siguientes gráficos se presentan

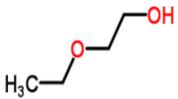
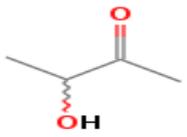
las contribuciones a cada una de las dos primeras componentes principales en el primer plano factorial (ver Figura (2-17)).

**Figura 2-17:** Contribución a las dos primeras componentes de cada compuesto o parámetro en el cacao seco por método solar o LF

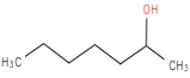
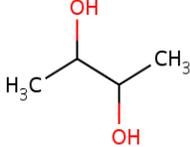
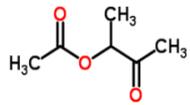
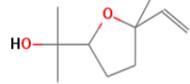
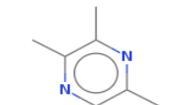
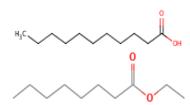


Como puede observarse, el objetivo del ACP de reducir el número de variables para explicar el comportamiento de los individuos, en este caso las tres subregiones productoras de Antioquia, fue logrado al pasar de 46 compuestos volátiles descritos según su estructura y descriptor de aroma o sabor en la Tabla 2-10; un compuestos neoformado y dos ácidos marcadores de fermentación y secado (acético y láctico) a CP1 y 2 compuesta por 10 variables cada una. Esto permitió identificar a profundidad el comportamiento de estas variables con respecto a un aporte a su perfil en intensidad alta o baja; de esta manera se obtuvo el gráfico con las contribuciones de las variables (ver Figura (2-16)) al primer plano factorial y se completó la información con la relación de las contribuciones por subregiones (ver Figura (2-18)).

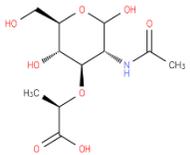
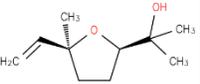
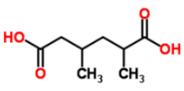
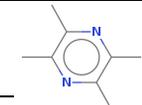
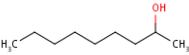
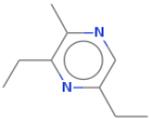
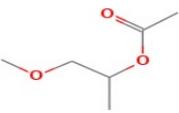
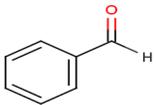
**Tabla 2-10:** Estructura y descriptor de los compuestos volátiles identificados en las muestras de cacao fermentado en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio y sometidas a secado solar y por Lecho Fluidizado.

Abrev.	Nombre	Estructura	Olor/Sabor	Otros nombres	Ref.
V1	Ethanol, 2-ethoxy		Dulce	2-ethoxyethanol	<a href="https://www.cdc.gov/niosh/">https://www.cdc.gov/niosh/</a>
V2	1-Butanol, 3-methyl-		Cebada, chocolate	3-Methyl-1-butanol; Isoamyl alcohol; Isopentyl alcohol; 3-Methylbutan-1-ol; Isopentanol	Rodríguez, 2011
			Frutal		Otero, 2017
V3	2-Heptanol, acetate		Herbal limón, fresco, floral	2-heptyl acetate; Acetic acid, hept-2-yl ester; 1-Methylhexyl acetate	<a href="http://www.thegoodscentscompany.com/datas/rw1025621.html">www.thegoodscentscompany.com/datas/rw1025621.html</a>
			Frutal, verde		<a href="http://www.msdssearch.dow.com/PublishLiteratureDOWCOM/dh_096d/">www.msdssearch.dow.com/PublishLiteratureDOWCOM/dh_096d/</a>
V4	Acetoin o .2-Butanone, 3-hydroxy-		Cremoso, dulce, graso	3-Hydroxy-2-butanone; 2-Butanone, 3-hydroxy-; 3-hydroxybutan-2-one; acetoin; 3-hydroxy-2-butanone (acetoin); 2-Hydroxy-3-butanone; 3-hydroxybutan-2-one (acetoin); 3-hydroxy-2-butanone (acetoin); Methanol, acetylmethyl-; 1-Hydroxyethyl methyl ketone; 2,3-Butanolone; 2-Butanol-3-one; UN 2621; NSC 7609	Afoakwa, 2009
			Frutal		Aculey, 2010

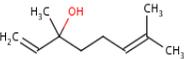
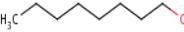
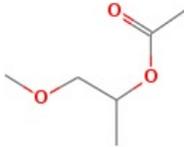
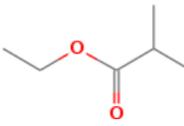
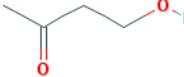
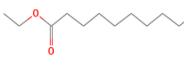
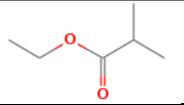
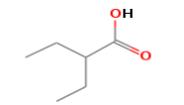
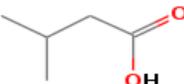
**Tabla 2-10:** (Continuación)

Abrev.	Nombre	Estructura	Olor/Sabor	Otros nombres	Ref.
V5	2-Heptanol		Dulce, cítrico	2-Hydroxyheptane, 1-Methylhexanol	Rodríguez, 2012
V6	2,3-butanediol		Dulce, cremoso	2,3-Butylene glycol, 2,3-Dihydroxybutane, Dimethylene glycol, Pseudobutylene glycol, Sym-dimethylethylene glicol	Misnawi, 2012
V7	2-Acetoxy-3-butanone		Cremoso, manteca	1-Methyl-2-oxopropyl acetate, 3-Oxo-2-butanil acetate	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/">https://www.sigmaaldrich.com/</a>
V8	2-Nonanone		Coco-herbal, dulce, frutal, queso	$\beta$ -nonanone, heptyl methyl ketone	Otero, 2017
V9	cis-Linaloloxide		Dulce, floral, cremoso	furanoid, cis-5-Trimethyl-2-furanmethanol, (Z)-Linalool furanoxide, 5-ethenyltetrahydro- $\alpha,\alpha$ -5-trimethyl-	<a href="http://www.leffingwell.com/chirality/cis-linalooloxide(furanoid).htm">http://www.leffingwell.com/chirality/cis-linalooloxide(furanoid).htm</a>
V10	Pyrazine, trimethyl-		Cocoa, tostado, cocinado	2,3,5-Trimethylpyrazine; Pyrazine, trimethyl-; 2,3,6-Trimethylpyrazine; pyrazine, 2,3,5-trimethyl	Afoakwa, et al., 2009
V11	Octanoic acid, ethyl ester or Undecanoic acid		Dulce, grasoso	Ethyl caprylate; octanoic acid ethyl ester (ethyl octanoate); Ethyl ester octanoic acid; ethyl n-octanoate; Ethyl octoate; Caprylic acid ethyl ester; n-Caprylic acid ethyl ester; Ethyl octylate; Ethyl ester of an octanoic acid	Rodríguez, 2012

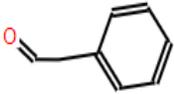
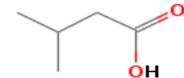
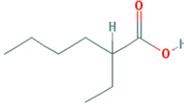
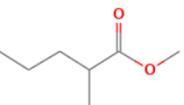
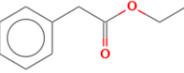
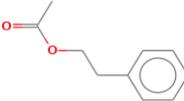
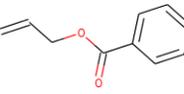
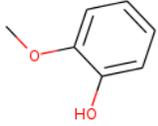
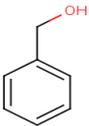
**Tabla 2-10:** (Continuación)

Abrev.	Nombre	Estructura	Olor/Sabor	Otros nombres	Ref.
V12	Formic acid hydroxy, (+)-N-Acetylmuramic acid			N-Acetyl-D-muramoate, N-Acetylmuramic acid	
V13	2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro		Suave alcohol	linalyl oxide, (Z)-Furanoid linalool oxide, 5-Ethenyltetrahydro-a,a,5-trimethyl-(2R,5S)-rel-2-Furanmethanol, 5-Ethenyltetrahydro-a,a,5-trimethyl-cis-2-Furanmethanol, cis-Furanoid linalool oxide, cis-Linalool 3,6-oxide, Linalool oxide B, Linalool oxide I.	<a href="http://www.nj.gov/health/eoh/rtkv/document/fs/0954.pdf">www.nj.gov/health/eoh/rtkv/document/fs/0954.pdf</a>
V14	2,4-Dimethylhexanedioic acid				
V15	Pyrazine, tetramethyl-		Café-Leche, tostado	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine, Tetramethylpyrazine	Misnawi, 2012
V16	2-nonanol			1-methyl-1-octanol, 2-hydroxynonane, 2-nonyl alcohol	
V17	Pyrazine, 3,5-diethyl-2-methyl-			3,5 Diethyl 2 methylpyrazine, 2,6-Diethyl-3-methylpyrazine	
V18	Butanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl ester o 1-Methoxy-2-propyl acetate		Rancio, queso, sudor	Propylene glycol 1-methyl ether 2-acetate, Acetic acid, 2-methoxy-1-methylethyl ester, 2-Acetoxy-1-methoxypropane	Rodríguez, 2011
V19	Benzaldehyde		De nuez	Benzene carbaldehyde, Benzenecarbonal, Benzoic aldehyde	Afoakwa, et al., 2009

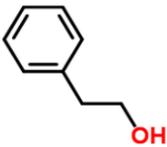
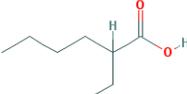
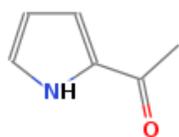
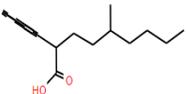
**Tabla 2-10:** (Continuación)

Abrev.	Nombre	Estructura	Olor/Sabor	Otros nombres	Ref.
V20	Linalool		Floral, frutal (suave)	2,6-dimethylocta-2,7-dien-6-ol, $\beta$ -linalool, linalyl alcohol	Food chemistry
V21	1-Octanol		Aromatico	1-hydroxyoctane, capryl alcohol, n-heptyl carbinol, primary octyl alcohol	Cameo, 1999
V22	1-Methoxy-2-propyl acetate		Similar al éter	Acetic acid, 2-methoxy-1-methylethyl ester, 2-Acetoxy-1-methoxypropane, 2-(1-Methoxy)propyl acetate, 2-Methoxy-1-methylethyl acetate, propylene glycol 1-methyl ether 2-acetate	
V23	Propanoic acid, 2-methyl- o isobutiric acid		Rancio, Soya, queso, manteca	Ethyl isobutyrate	Rodríguez, 2011
V24	4-Hydroxy-2-butanone			4-Hydroxybutan-2-one, Methylolacetone; 3-Oxo-1-butanol	
V25	Decanoic acid, ethyl ester		Rancio, grasoso	Ethyl decanoate, Ethyl caprate, Capric acid, n-Capric acid ethyl ester	Rodríguez, 2012
V26	Propanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester		Rancio	Ethyl isobutyrate	Rodríguez, 2012
V27	Acetic acid, Diethyl-		Vinagre	Butanoic acid, 2-ethyl-, 2-Ethylbutyric acid, 3-Pentanecarboxylic acid	Rodríguez, 2012
V28	Butanoic acid, 3-methyl-		Rancio	Isovaleric acid, 3-methylbutanoic acid, Delphinic acid	Rodríguez, 2012
V29	Decanoic acid, ethyl ester		Rancio, grasoso	Ethyl decanoate, Ethyl caprate, Capric acid, n-Capric acid ethyl ester	Rodríguez, 2012
V30	2(3H)-Furanone, dihydro-				

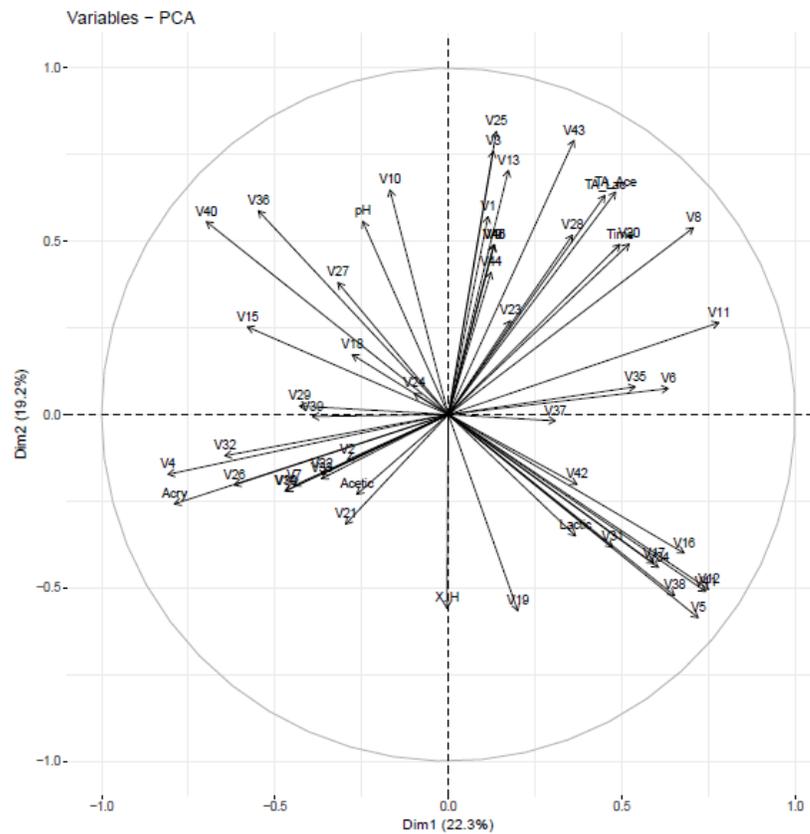
**Tabla 2-10:** (Continuación)

Abrev.	Nombre	Estructura	Olor/Sabor	Otros nombres	Ref.
V31	Benzeneacetaldehyde		Verde, dulce, floral, clavo, miel, cacao		Otero, 2017
V32	Butanoic acid, 3-methyl-		Rancio	Isovaleric acid, 3-methylbutanoic acid, Delphinic acid	Rodríguez, 2011
V33	Hexanoic acid, 2-methyl-		Dulce, pungente	2-methylhexanoic acid, 2-Hexanecarboxylic acid; 2-Methylcaproic acid	Rodríguez, 2011
V34	Pentanoic acid, 2-methyl-, methyl ester			Methyl 2-methylpentanoate, 2-Methylvaleric acid, methyl ester, Ácido valérico, 2 metil éster metílico; Éster metílico del ácido 2-metilpentanoico; 2-metilvalerato de metilo	
V35	Benzeneacetic acid, ethyl ester			Ethyl phenylacetate, Acetic acid, phenyl-, ethyl ester; α-Toluic acid, ethyl ester	
V36	Acetic acid, 2-phenylethyl ester		Floral, frutal, dulce	2-phenylethyl acetate, Benzylcarbiny acetate	<a href="http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21105987.html">http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21105987.html</a>
V37	Benzoic acid, pent-2-yl ester			2-Propenyl benzoate, Allyl benzoate; benzoic acid, 2-propenyl ester	
V38	Phenol, 2-methoxy-		Ahumado	1-Hydroxy-2-methoxybenzene, 2-Hydroxyanisole, 2-Methoxyphenol (guiacol)	Rodríguez, 2012
V39	Benzyl alcohol		Dulce, floral	(hydroxymethyl)benzene, benzenecarbinol	Rodríguez, 2012

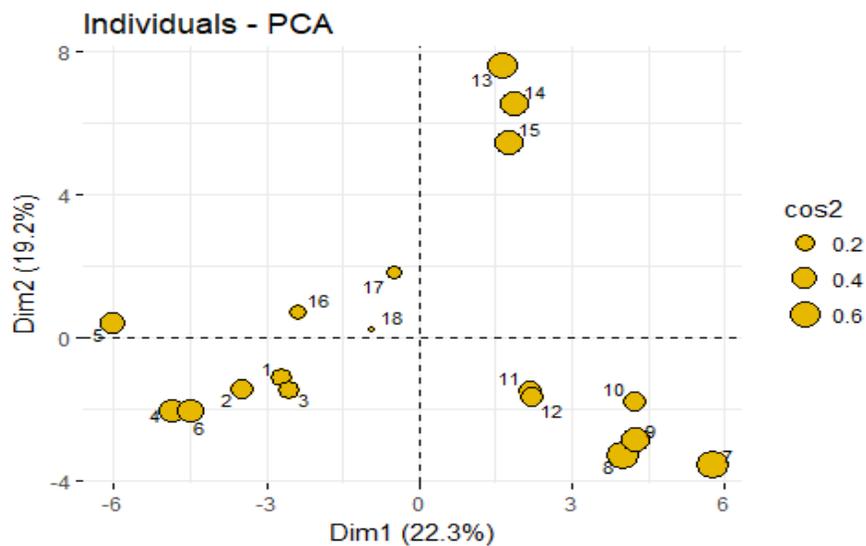
**Tabla 2-10:** (Continuación)

Abrev.	Nombre	Estructura	Olor/Sabor	Otros nombres	Ref.
V40	Phenylethyl Alcohol		Miel, rosas	Phenylethanol, $\beta$ -phenylethyl alcohol, benzenethanol, $\beta$ -Fenylethanol, 2-Hydroxyethylbenzene, b-Hydroxyethylbenzene, 2-Phenylethanol	J.Sancho
V41	Hexanoic acid, 2-ethyl-			2-ethylhexanoic acid, 2-Ethylcaproic acid	
V42	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-			2-Acetylpyrrole 1H-Pyrrole, 2-acetyl, Pyrrole- $\alpha$ -methyl ketone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)ethan-1-one, Ketone, methyl pyrrol-2-yl	
V43	Octanoic acid, ethyl ester or Undecanoic acid		Dulce, grasoso	Hendecanoic acid, Octanoic acid, ethyl ester	Rodríguez
V44	n-Decanoic acid		Rancio, grasoso	1-nonanecarboxylic acid, capric acid, decanoic acid	Rodríguez
V45	5-Methyl-2-phenyl, Nonanoic acid				Rodríguez
V46	4H-Pyran-4-one, 2,4-dihydroxy-2,6-dimethyl				

**Figura 2-18** Contribución de las variables (compuestos)



**Figura 2-19:** Contribuciones por las subregiones de BC – solar (1,2 y 3), BC – LF (4, 5 y 6), U-solar (7, 8 y 9), U-LF (10, 11 y 12), M- solar (13, 14 y 15) y M-LF (16, 17 y 18)



Con base al biplot y el gráfico de contribuciones individuales se puede establecer que, tanto por el método de secado natural, como el de secado artificial, los cotiledones de cacao en cada una de las zonas geográficas se caracterizan por la presencia de altos valores de compuestos diferentes. Adicionalmente, las observaciones registradas en las zonas de Urabá y Bajo Cauca conforman conglomerados (o están agrupadas) en su respectivos cuadrantes en el plano factorial; en cambio las observaciones de Magdalena Medio están agrupadas en cuadrantes opuestos.

En la Tabla 2-11 se agrupan cada una de las variables que definen a cada subregión de acuerdo con el tipo de secado:

**Tabla 2-11:** Distribución de variables entre individuos (subregiones)

Magdalena Medio - Lecho Fluidizado		Magdalena Medio – Solar	
pH	pH	TA_Ace	Acidez total expresada en ácido acético
V15	Tetrametil Pirazina (café-leche, tostado)	TA_Lac	Acidez total expresada en ácido láctico
V18	Ácido 3-hidroxi-betanoico, etil éster (rancio, queso)	V1	2-etoxi-Etanol (dulce)
V24	4-Hidroxi-2-butanona	V3	2-Heptanol, acetato (herbal limón, fresco, floral, verde)
V27	Ácido Acético, Dietil (vinagre)	V6	2,3-butanediol (dulce, cremoso)
V29	Ácido Decanoico, etil éster (rancio, grasoso)	V8	2-Nonanona (coco-herbal, dulce, frutal, queso)
V30	Dihidro-(3H)-Furanona	V11	Ácido Octanoico, etil éster (dulce, grasoso)
V36	Ácido Acético, 2-feniletíl éster (floral, frutal, dulce)	V13	2-Furanmetanol, 5-eteniltetrahidro (suave, alcohol)
V40	Alcohol feniletíl (miel, rosas)	V20	Linalool (floral, frutal, suave)
		V2	Ácido Propanoico, 2-metil - o ácido isobutírico (rancio, soya, queso, manteca)
		V3	Ácido Decanoico, etil éster (rancio, grasoso)
		V25	3-metil-Ácido Butanoico (rancio)
		V28	Ácido Bencenoacetico, etil éster
		V35	Ácido Octanoico, etil éster (dulce, grasoso)
		V43	Ácido n-Decanoico (rancio, grasoso)
		V44	4H-Piran-4-one,2,4-dihidroxi-2,6-dimetil
		V46	

**Tabla 2-11:** (Continuación)

<b>Bajo Cauca - Solar</b>		<b>Urabá - Solar</b>	
<b>Bajo Cauca - Lecho Fluidizado</b>		<b>Urabá - Lecho Fluidizado</b>	
Acetic	Ácido acético	V5	Ácido Bencenoacético, etil éster
Acry	Acrilamida	V16	2-nonanol
V2	3-metil-1-Butanol (cebada, chocolate, frutal)	V17	3,5-dietil-2-metil-Pirazina
V4	Acetoina o 3-hidroxi-2-Butanona (cremoso, dulce, graso, frutal)	V19	Benzaldehido (nuez)
V7	2-Acetoxi-3-butanona (cremoso, manteca)	V31	Bencenoacetaldehido (verde, dulce, floral, clavo, miel, cacao)
V21	1-Octanol (aromático)	V34	Ácido 2-metil-pentanoico, metil éster
V27	Ácido Acético, Dietil (vinagre)	V37	Ácido Benzoico, pent-2-il éster
V26	Ácido 2-metil-propanoico, , etil éster (rancio)	V42	Etanona, 1-(1H-pirrol-2-il)-
V32	Ácido 3-metil-Butanoico (rancio)	Lac	Ácido láctico

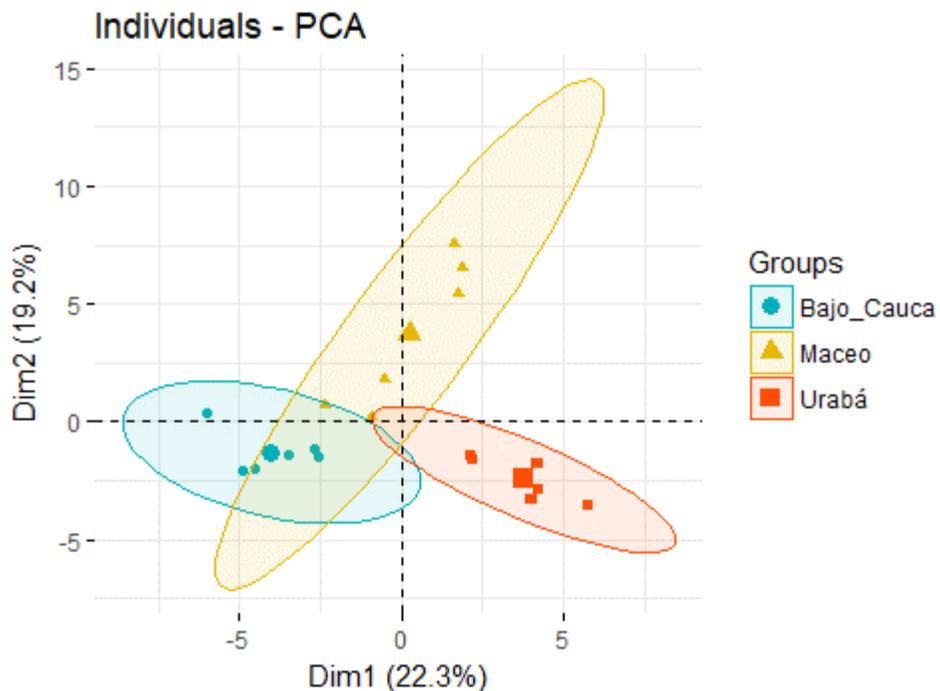
Con respecto a la distribución de las observaciones, en el primer plano factorial se puede establecer que en la región de Magdalena Medio, los registros de cotiledones secados por método natural se caracterizan por tener altos valores que coinciden con los siguientes descriptores: dulce, limón, herbal, fresco, floral, cremoso, coco, graso, suave, alcohol, frutal, rancio, soya, queso, manteca, rancio-Valérico. Opuesto a este perfil, el tratamiento térmico por LF produjo, en el producto final, la presencia en bajas concentraciones de café-leche, tostado, rancio, queso, cremoso, dulce, frutal, graso, vinagre y miel rosas. Diferencias que pueden ser debido a la duración del secado natural, el cual fue el más extenso de todas las zonas y tratamientos (182 h), pero se destaca que fue bajo el único tratamiento que se formó una furanona, a las que se les atribuye un importante impacto sensorial, no solo por sus descriptores, en este caso floral, frutal y dulce, sino porque puede percibirse en chocolates de alta calidad (Owusu, 2010). De igual forma, se conservó uno de los descriptores asociados a cacaos especiales que es miel-rosas, el cual no se conservó por el tratamiento solar en Magdalena Medio pero si fue detectado en la mezcla al final de la fermentación y antes desde los clones ICS-1 y FEC-2 (Anexo 2-4) y que fue reportado en uno de los criollos modernos objeto de estudio de Fedecacao y con el cual se participó en el primer Congreso Internacional de Aromas realizado en Cartagena en 2017 (Anexo 2-5).

En el Bajo Cauca se presentan los métodos de secado, tanto artificial como natural cotiledones, con presencia de los siguientes compuestos volátiles: cebada, chocolate, frutal, cremoso, dulce, graso, vinagre, frutal suave, rancio, soya, manteca y reporte de compuestos neoformados como la acrilamida en bajas concentraciones, resultado probablemente del secado en tan corto tiempo en esta subregión.

Urabá fue la zona que menos descriptores presentó (chocolate, nuez y láctico) de acuerdo con los compuestos que caracterizan tanto el tratamiento natural como el artificial.

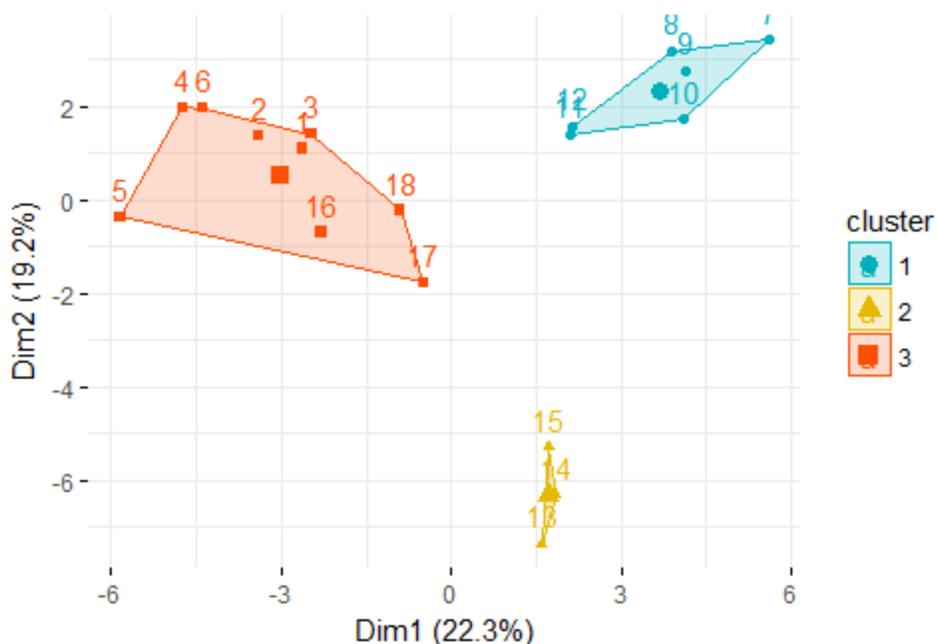
La distribución por zonas en el primer plano factorial se ilustra a continuación, donde se puede apreciar que la zona con mayor variabilidad fue Magdalena Medio. Esto se debe a la diferencia entre los tratamientos de secado. Por otro lado, la menor variabilidad en términos de las dos primeras componentes fue Urabá (ver Figura (2-20)).

**Figura 2-20:** Distribución de la variabilidad de las dos primeras componentes para cada subregión



Finalmente, con el análisis de clúster (ADC) se pudo establecer una partición en la cual se evidencia cómo el cacao seco de Magdalena Medio comparte características similares en términos del secado por método artificial con la subregión del Bajo Cauca. Las demás asociaciones permitieron identificar cómo el perfil del cacao obtenido por los dos tratamientos están asociados fuertemente en términos de la zona estudiada para Urabá y Bajo Cauca (ver Figura (2-21)).

**Figura 2-21:** Partición de Clúster por subregiones: BC-solar (1, 2, 3), BC-LF (4, 5, 6), U-solar (7, 8, 9), U-LF (10, 11, 12), M-solar (13, 14, 15), M-LF (16, 17, 18)



Las diferencias por subregiones pueden estar influenciadas por la presencia de algunos compuestos característicos de ciertos grupos funcionales precursores o característicos de esta etapa de poscosecha, los cuales se distinguen por el siguiente orden según su abundancia: pirroles>terpenos>compuestos azufrados>furanos>fenoles. Entre las reacciones esperadas a partir de algunos compuestos presentes se encuentran: i) oxidación de alcoholes primarios a aldehído, ii) alcoholes secundarios a cetonas y, iii) oxidación de alcoholes en presencia de oxígeno (Rodríguez-Campos et al., 2011; Schwan, 2015).

Para corroborar este comportamiento, se verificaron las concentraciones (Tabla 2-7) de algunos compuestos que fueron importantes para la diferenciación entre subregiones y se tuvo en cuenta el tratamiento térmico de los principales precursores (alcoholes) y compuestos derivados (aldehídos, cetonas o ésteres, así como pirazinas) que pueden aportar al aroma y sabor, apoyando el entendimiento de las clasificaciones de los grupos antes mencionados. Los compuestos más representativo fueron: Bajo Cauca (pirazinas por LF), Urabá (alcoholes y aldehídos aromáticos en muestras tratados por las técnicas de secado) y Magdalena Medio (cetonas y alcohol primario por secado natural).

Por último, el contenido de acrilamida presente en el cacao seco en Bajo Cauca permitió verificar que la formación de este contaminante térmico puede darse desde el secado y no solo en las etapas de procesamiento durante la industrialización, como es esperado. Un estudio computacional realizado previamente (Anexo 2-2) demuestra cómo a temperaturas de 50, 60 y 70 °C es posible que se dé esta reacción desde el punto de vista termoquímico. Con este resultado se puede afirmar que tanto la temperatura (secado artificial a una temperatura constante de 45 °C), como los cortos tiempos de secado con grandes cambios de temperatura (secado solar con temperaturas máximas de 50 °C en la superficie de la marquesina y solo 72 h de tratamiento), pueden estar relacionados con algunas de las variables explicativas de este resultados.

Ahora bien, que probablemente no se hubiera formado acrilamida durante el tratamiento térmico a partir del cacao fermentado en Urabá y Magdalena Medio, aunque hubieran sido sometidos al mismo tratamiento térmico artificial, puede explicarse, por un lado, por el contenido de acidez, parámetro que ha sido clasificado como un factor de mitigación en el control o reducción de la formación de la acrilamida. Cabe resaltar que la región que mayor acidez presentó desde el inicio del secado hasta el final de éste fue Urabá (acético: 1.58 % p/p y láctico: 1.27 % p/p).

Por otra parte, la concentración de los precursores disponibles puede influir también en su formación. Entre los principales precursores se encuentran la glucosa o fructosa, siendo más reactiva la glucosa, al interactuar con la asparagina, principal aminoácido precursor. En la subregión que menor concentración de azúcares reductores se desarrollaron fue en

Magdalena Medio, (Fructosa: 0.24 % p/p, glucosa 0.25 % p/p) (Claeys, De Vleeschouwer, & Hendrickx, 2005). De igual forma, la ausencia de la asparagina fue total en esta zona, razón por la cual se considera que su formación está relacionada con la presencia de los precursores desarrollados en medio del tratamiento térmico bajo las condiciones realizadas (45 °C en Lecho Fluidizado y a bajas temperaturas por 184 h por método solar).

Otro aspecto para resaltar es la posibilidad de que la concentración más alta de cisteína, presente especialmente en Urabá, y luego en Magdalena Medio, haya disminuido las posibilidades de formación de acrilamida durante el secado. Según Zeng & Davies (2005) y Koutsidis y colaboradores (2009), la cisteína puede actuar como un interferente de uno de los principales aductos de la asparagina, el cual consiste en la unión de este aminoácido con los dicarbonilos provenientes de glucosa generados en la etapa de iniciación durante la reacción de *Maillard*; es decir, que al unirse en complejo en presencia de la cisteína pueden ser atacados los R-dicarbonilos por los grupos tiol de la cisteína, formando el aductos de tiol-aldehído. Mediante este mismo mecanismo de acción, la reacción inhibitoria puede darse durante la formación de pirazinas a partir de otros aminoácidos, siendo la cisteína una de las posibles causas de disminución de la concentración de acrilamida o pirazinas (Koutsidis et al., 2009).

Lo destacable de este resultado es que, a pesar de la formación de este compuesto neoformado en cacaos fermentados en Bajo Cauca, y habiendo sido secados por dos técnicas, su contenido está por debajo de la dosis dentro de la cual es probable que la acrilamida produzca alguna incidencia de tumores (llamados efectos "neoplásicos") u otros efectos adversos potenciales (desarrollo neurológico, pre y posnatal y reproducción masculina). El límite inferior de este rango se denomina Límite de Confianza Inferior de la Dosis de Referencia (BMDL<sub>10</sub>) de 0.17 mg / kg pc / día (1 mg / kg pc / día = miligramos por kilogramo de peso corporal por día). Para otros efectos, los cambios neurológicos se consideraron por medio de entidades como European Food Safety Authority – EFSA una BMDL<sub>10</sub> de 0,43 mg / kg pc / día. Cómo puede notarse, el contenido en el cacao está en una concentración de partes por billón, concentración inferior, controlable para las etapas posteriores a las que pueden ser sometidos los granos de cacao (EFSA, 2015).

Por otro lado, los valores de acrilamida encontrados podrían servir en un futuro como valores de referencia dentro del alcance de la propuesta regulatoria de la EFSA, reglamento (UE) 2017/2158 de la comisión del 20 de noviembre de 2017, por el cual se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en alimentos. Esta legislación entró en vigor el 11 de abril de 2018 (Diario Oficial de la Unión Europea, 2001).

De acuerdo a los resultados, es posible hacer una invitación a los integrantes del sector productivo, para que consideren como opción el secado artificial basado en la tecnología de Lecho Fluidizado a 45 °C, con el fin de contrarrestar algunos de los aspectos que tanto afectan la estandarización y economía de todos los actores de la cadena. A través de este estudio se pudo demostrar que esta alternativa es un aporte al *pull* de ofertas que hay para realizar el secado, y que por medio del control planificado y basado en un diseño estadístico orientado a resolver, no solo la disminución del tiempo sino también la reducción de la acidez total, en especial asociada al ácido acético y láctico producto de secados artificiales, se pueden establecer condiciones comparables con cacaos que pueden tardarse entre 6 y 7 días secando.

Mediante los modelos probados se puede proyectar el tiempo estimado de secado para nuevos tratamientos térmicos con la misma mezcla estudiada. También se podrá complementar con otras mezclas o clones, pero teniendo como referencia el punto de partida que se estableció bajo este proyecto.

Se pudieron identificar compuestos volátiles significativos que permiten establecer diferencias entre los tratamientos térmicos en Magdalena Medio, un hecho probablemente asociado a la duración del secado natural. Estos compuestos fueron puestos a prueba para poder compararlos con otras variables relevantes en la evaluación global, ventaja que no puede aprovechar con los software de uso directos en cromatografía para análisis metabólicos. Por eso se resalta que el tratamiento estadístico preliminar realizado a los compuestos volátiles permitió llevarlos a un análisis en conjunto con la acidez total, volátil y semi-volátil, así como otros compuestos denominados contaminantes térmicos, entre ellos la reconocida acrilamida, la cual se pudo demostrar computacional y experimentalmente que es un compuestos que puede desarrollarse desde el secado, ya sea solar o artificial.

Los compuestos volátiles fueron muy variados y podrán ser una línea de inicio para que los productores de cada zona resalten los atributos identificados, que para Bajo Cauca y Urabá coinciden, aún bajo los dos tratamientos térmicos.

# **3. Capítulo 3. Marcadores químicos como indicadores de la calidad característica de cacaos especiales**

## **3.1 Introducción**

En la actualidad, el método más empleado para evaluar la calidad de los granos de cacao fermentados y secos es la “prueba de corte”, la cual carece de rigurosidad científica y no permite la toma de decisiones o trazabilidad en las etapas posteriores a la fermentación y secado de la materia prima, que dependen del desarrollo de compuestos que se generan en estos dos momentos de la poscosecha. Es por esto que se hace tan importante realizar un seguimiento a la concentración de compuestos característicos de cacaos especiales por poseer notas de aroma frutal, floral o la presencia de ciertos aminoácidos que reaccionarán posteriormente para generar compuestos posiblemente tóxicos, como la acrilamida.

De igual forma, la identificación de otros compuestos que permitirían reorientar el desarrollo de nuevos productos derivados del cacao, en la mayoría de los casos no pueden ser completamente reconocidos y controlados por los encargados de la industrialización, sino por los productores de la materia prima que, en la mayoría de casos, se encuentran lejos de los centros avanzados de procesamiento que se encargan de la transformación del cacao. Esto limita la clasificación de la materia prima e impide su estandarización, ocasionando reprocesos a medida que se generan relaciones de dependencia frente al monopolio de ciertos países productores que cuentan con procesos más estandarizados que otros (Misnawi & Ariza, 2011b)(USDA, 2008).

Por consiguiente, la implementación de técnicas soportadas por tecnología robusta y métodos avanzados es una de las opciones, especialmente de los países productores del

cultivo de cacao, para mejorar el control y la trazabilidad de la calidad de la materia prima, con el fin de posicionarse en mercados globales.

En la industria del cacao, por la naturaleza y concentración de algunos de los compuestos del grano, se requiere del uso de equipos como los cromatógrafos Líquidos (LC) acoplados a espectrómetros de masas que integran tecnología, ya sea de tiempo de vuelo *Time-of-Flight* (TOF), o adaptan unidades de espectrometría de masas con triple cuadrúpolo (TQD). Ambas tecnologías permiten una alta definición para el análisis de compuestos en mezclas complejas y contaminadas, detección de analitos a bajas concentraciones (femtogramo= $10^{-15}$  g), tiempos de análisis más rápidos y mayor versatilidad en las pruebas de muestras de mayor peso molecular a altas temperaturas sin afectar el detector de masas, entre otras ventajas que benefician el control de calidad del cacao por los bajos pesos moleculares y la abundancia de compuestos de propiedades químicas similares.

Además del apoyo de la prueba de corte, otro de los métodos de análisis que limitan la definición de un perfil de aromas es la evaluación sensorial, ya que depende de catadores expertos. Por esta razón, tener acceso a la caracterización de los compuestos volátiles responsables de aroma o a la determinación de compuestos tipo fenólicos que afectan el sabor, aún en concentraciones muy bajas, se convierte en una herramienta cuantitativa que responde a los criterios de calidad requeridos por la industria, sin dejar de lado la imprescindible participación de catadores expertos (Emmanuel Ohene Afoakwa et al., 2009b; Misnawi & Ariza, 2011b).

Cabe destacar que en la normativa de los principales países que se encargan del procesamiento industrializado del cacao, se han venido definiendo estándares de calidad que exigen de manera explícita el tipo de equipos para cada técnica a emplear, con el fin de demostrar el cumplimiento de los requerimientos para materias primas o producto terminado. Esta es una de las razones más relevantes en el momento de invertir en las tecnologías mencionadas para ser competitivos y posicionar en los mercados productos como el cacao.

Estas exigencias no solo van dirigidas a la calidad sensorial, sino también a la calidad nutricional y el aseguramiento de la ausencia o cumplimiento de los límites máximos permitidos de compuestos posiblemente tóxicos, como metales, pesticidas y aquellos compuesto intermediarios o finales de la glucosilación avanzada de neoformados, como la acrilamida, que en el caso del cacao, su detección es posible con tecnologías cromatográficas (Loaëc, Jacolot, et al., 2014b).

Los métodos realizados con los equipos mencionados proporcionan una información completa que comprende un número considerable de salidas o cromatogramas, información que requiere de un tratamiento especial para su análisis, que a su vez debe apoyar la toma de decisiones y la elaboración de las predicciones requeridas por los productores. Las herramientas y modelos que permiten este tratamiento de datos se describen a continuación.

La falta de acceso de los productores a un gran número de métodos o, por lo contrario, los volúmenes de información amplios pueden llevar a resultados que propician decisiones de producción contradictorias, por lo que se requiere de apoyos en métodos estadísticos y matemáticos, de gran utilidad para soportar la información obtenida a través de análisis químicos, lo que se denomina Quimiometría, disciplina presentada por Kowaski (1997). Los resultados pueden ayudar a la toma de decisiones sobre la selección de pruebas determinantes para la optimización de procesos o para mejorar la calidad del producto partiendo de su conocimiento, ya sea al inicio para su caracterización (cacao crudo de diferentes variedades, orígenes, productores, etc.), durante el proceso (fermentación o secado) o al final (cacao bien fermentado y seco de características de Cacao Común o Fino o de Aroma) (International Chemometrics Society, 2002)(Wold, 1995).

En la actualidad, la quimiometría se ha convertido en una ayuda de gran interés para el mundo científico, al permitir el reconocimiento de pautas o modelos (*Pattern recognition*) utilizando sistemas de reducción de la información multidimensional, de tal manera que la agrupa y crea perfiles más accesibles para su interpretación, razón por la cual ha contribuido adicionalmente a disciplinas o áreas como la ingeniería de procesos, ciencias

ambientales, sistemas biológicos, entre otras, que se apoyan en la química analítica y las técnicas instrumentales para su estudio (Bader et al., 2009).

La cadena productiva de cacao no es ajena al uso de esta disciplina, razón por la cual se encuentran estudios relacionados con el análisis y predicción, por ejemplo, de los perfiles de los compuestos volátiles durante el proceso de tostión o el estudio de la población microbiana responsable de la fermentación dependiendo de las regiones estudiadas o del método empleado o la calidad bioquímica del cacao evaluada por espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), por mencionar algunos (Aculey et al., 2010b; Hue et al., 2014).

Una de las técnicas que mayor información provee es la cromatografía, que cada vez avanza en el desarrollo de equipos y software más robustos, lo que permite identificar y cuantificar elementos o compuestos que conforman una muestra de interés, como es el caso de los precursores o responsables del aroma del cacao desde su cosecha hasta la obtención de los subproductos, así como la identificación de compuestos nocivos desarrollados durante su industrialización (Loaëc, Jacolot, et al., 2014b)(Cambrai et al., 2010; Humston et al., 2010; Vázquez-Ovando, Molina-Freaner, Nuñez-Farfán, Betancur-Ancona, & Salvador-Figueroa, 2015b). Ahora bien, los resultados obtenidos de la caracterización en las diferentes etapas productivas pueden ser tratados y analizados por medio de técnicas quimiométricas de reconocimiento de patrones: Análisis de Clúster (Conglomerados) y Análisis de Componentes Principales (PCA), en el cual se hará énfasis (Foo-tim Chau, 2004; Zbytniewski, 2005).

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una herramienta matemática que permite encontrar la existencia de tendencias, patrones y relaciones en datos químicos de naturaleza multivariada; es decir, se consideran simultáneamente muchas variables.

Cada factor principal, o base de representación en el nuevo espacio dimensional, estará definido teniendo en cuenta el grado de explicación de la variabilidad total. Así, el primer factor involucrará la mayor cantidad posible de variabilidad, el segundo de ellos explicará la mayor parte de la variabilidad residual y los otros factores contribuirán de manera sucesiva hasta abarcar toda la variabilidad de los sistemas estudiados.

La mayoría de los estudios realizados en cacao que aplican la quimiometría han hecho uso de PCA (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2009; Crafacck et al., 2014; Gu et al., 2013; Hue et al., 2014; Humston et al., 2010; Ioannone et al., 2015; Johnson, Heymann, & Ebeler, 2015; Lacerda Ramos, Ribeiro Dias, Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel, & Freitas Schwan, 2014; Lima et al., 2012; Margaret Owusu, 2010; Mota, Barros, & Castilho, 2010; Margaret Owusu, Petersen, & Heimdal, 2013; Rodríguez, 2011; Rodriguez-Campos et al., 2012, 2011; Vázquez-Ovando et al., 2015; Wollgast, 2004) de la mano de estudios Análisis Factorial Discriminante (Cambrian, et al, 2010).

Por lo anterior, el uso de una aproximación quimiométrica basada en un análisis de factores se empleó para la caracterización del cacao crudo, fermentado y seco bajo dos métodos, de forma que sea útil como indicador de calidad para los actores de la cadena productiva.

## 3.2 Métodos

**Análisis de Factores Principales (AFP) con ACP:** esta técnica, que parte de la descomposición espectral, fue empleada para medir la covarianza (correlaciones) entre las variables en términos de algunas pocas subyacentes inobservables de cantidades aleatorias llamadas factores, lo que permitió identificar cómo se agrupó cada variable.

A partir del método de Componentes Principales determinado en los capítulos 1 y 2, y por el Criterio de Transformación de Kaiser - Método Varimax, se realizó el análisis de factores comunes para el cacao crudo, fermentado y seco por los dos métodos de estudio (natural y artificial por Lecho Fluidizado). Los factores permitieron proponer ejes con pocas cargas grandes y tan cercanas a cero cómo fue posible para las demás, lo cual se logra por una maximización iterativa de la función cuadrática de las cargas.

## 3.3 Resultados y Discusión

### 3.3.1 Cacao crudo y fermentado

La Figura 1-2 describe los tres conglomerados de variables que caracterizan a toda la muestra analizada a partir del Análisis de Componentes Principales obtenido para el análisis de cacao fresco y fermentado para las tres subregiones de estudio. A partir de las componentes se definió el Análisis de Factores Principales (AFP) lo que condujo a tres factores tales que en conjunto explicaron el 100% de la variación de toda la muestra analizada.

En la Tabla 3-1 se describen las variables que conforman los tres factores, con la respectiva ponderación y denominación inobservable a la cual se llegó.

**Tabla 3-1:** Análisis de Factores Principales para cacaos antes y después de la fermentación en tres subregiones de Antioquia

Factor	Denominación/Ponderación	Variables
Primer Factor	Indicadores de calidad de cacao con propiedades funcionales <b>39</b>	Acidez total expresada en: ácido láctico, cítrico, málico, oxálico y succínico Contenido de Proteína (%) Contenido de Fructosa (% p/p) Contenido de Glucosa (% p/p) Contenido de Teobromina (% p/p) Contenido de Cafeína (% p/p) Contenido de Epicatequina (% p/p) Contenido de Catequina (%p/p)
Segundo Factor	Indicadores de calidad de inicio de fermentación <b>35</b>	pH Humedad (% bh) Cenizas (%) Relación de antocianinas Concentración de ácido láctico (% p/p) Contenido de ácido cítrico (% p/p) Contenido de ácido oxálico (% p/p) Contenido de ácido succínico (% p/p) Contenido de sacarosa (% p/p)
Tercer Factor	Indicadores de calidad de cacao bien fermentado <b>26</b>	Fibra (%) Contenido de manitol (%) Contenido de Leucina (%) Contenido de Metionina (% p/p) Contenido de Valina (% p/p) Contenido de Cisteína (% p/p) Contenido de Asparagina (% p/p) Contenido de Lisina (% p/p)

Cada uno de los factores es una herramienta que apoya la toma de decisiones sobre la clasificación y distinción del cacao, ya sea por su origen o estado

El Factor 1 denominado “Indicadores de calidad de cacao con propiedades funcionales”: fue definido de esta manera por representar la existencia de los compuestos responsables de la actividad antioxidantes (catequina y epicatequina) y el contenido de alcaloides (cafeína y teobromina). Ambos grupos están relacionados con sus propiedades funcionales deseables, pero un efecto sobre el sabor (astringente y amargo) producido por estos compuestos hace que la industria defina cuál va a ser el balance en el contenido. Por otra parte, el contenido de ácidos podrá alterar el pH del medio, parámetro que puede influir directamente en la inactivación de la enzima polifenol oxidasa, responsable de la transformación de los monómeros de procianidina mencionados. Finalmente, la presencia

de azúcares reductores en este factor puede ayudar a entender qué tanto están disponibles para iniciar la reacción de Maillard una vez finalice la fermentación y se comience el secado.

El Factor 2 fue definido como “Indicadores de calidad de inicio de fermentación” ya que este momento del proceso (cacao crudo) se caracteriza por su alta humedad y contenido de sacarosa que luego será hidrolizada durante la fermentación. Por otro lado, el pH estará determinado por el ácido cítrico, característico del cacao crudo y los demás ácidos que presentarán variación según el origen, como lo demostró el ACP1.

El último Factor “Indicadores de calidad de cacao bien fermentado”, toma en consideración los aminoácidos libres, precursores de aroma característicos de la fase final de la fermentación, que se producen por la hidrólisis debido a la acción de las enzimas endoproteasa aspártica y carboxipeptidasa serina (Biehl et al 1993. Bytof et al.1995. Voigt et al. 1996. Hansen et al. 2000).

### **3.3.2 Cacao seco por método natural y artificial**

La comparación de la calidad del cacao al final de la poscosecha, obtenido por el secado solar, podrá definirse a partir del perfil quimiométrico compilado por cada Factor.

El método permitió distinguir cuatro factores que aportan más de 50 % de la variación explicada, donde el Factor 2 representa el mayor valor de cargas factoriales, que explica una proporción acumulada por el Factor 2 (29 %), Factor 1 (53 %), Factor 3 (77 %) y Factor 4 (100 %).

En la Tabla 3-2 se muestra la distribución de las variables que mejor explican los factores comunes del ADF obtenido del ACP.

**Tabla 3-2:** Descripción de las variables que conforman los factores comunes del ADF a partir del ACP.

Factor	Denominación/Ponderación	Variables – descriptor
Primer Factor	Calidad de secado <b>25</b>	Ácido 2-metil-hexanoico (dulce, pungente) 1-metoxi-2-propil acetato (similar al éter) pH
Segundo Factor	Atributos de calidad en aroma <b>29</b>	2-Etoxi-etanol (dulce) 2-Heptanol, acetato (Herbal, fresco, floral, frutal, verde) 2,3-butanediol (dulce, cremoso) 2-nonanone (coco herbal, dulce, frutal, queso) Trimetil pirazina (cocoa, tostado, cocinado) Ácido octanoico, etil éster o ácido undecanoico (dulce, grasoso) 2-Furanmetanol, 5-eteniltetrahidro (suave alcohol) Linalool (floral, frutal (suave)) Ácido decanoico, etil éster (rancio, grasoso) Ácido acético, dietil (vinagre)
Tercer Factor	Balance sabor y salud <b>24</b>	2-acetoxi-3-butanona (cremoso, manteca) Acetoína (cremoso, dulce, frutal) Acrilamida (contaminante térmico)
Cuarto Factor	<b>23</b>	3,5 dietil-2-metil pirazina Ácido 2-metil Pentanoico, metil éster Ácido benceno-acético, etil éster Ácido benzoico, pent-2-il éster Bencil alcohol (dulce, floral)

El principal Factor es el segundo, que según la proporción de información que es capaz de resumir de acuerdo con su variabilidad, explica algunas de las características impartidas por un amplio grupo de compuestos responsables de aroma con una connotación que puede relacionarse con notas presentes en cacao especiales.

En cuanto al primer Factor, al contener la variable pH, puede ser relacionado con la calidad del secado por el grado de acidez, al mismo tiempo que vincula otros compuestos que pueden aportar al perfil de sabor. El tercer Factor responde de manera directa al alcance de este apartado, el cual relaciona aroma, sabor y uno de los principales contaminantes térmicos que ya fue identificado como compuesto a controlar desde esta etapa de poscosecha. Por último, el Factor 4 está conformado por una serie de ésteres y una pirazina, que se pueden asociar al aroma del producto final.

Cabe resaltar que no existe evidencia de un atributo asignado específicamente, lo cual puede ser un reto para identificarlo a futuro y lograr una asociación con la calidad sensorial del cacao.

## **4. Conclusiones y recomendaciones**

### **4.1 Conclusiones**

#### **4.1.1 Capítulo 1: Perfil químico de los compuestos precursores del aroma y sabor generados durante la fermentación**

Los métodos requeridos para el análisis de cacao en diferentes matrices (mucílago, cotiledón con alto contenido de humedad o seco) requieren de una debida estandarización y validación para el aseguramiento de la calidad de los resultados obtenidos. Por esta razón, para dar respuesta al objetivo específico “Determinar el perfil químico de los compuestos precursores del aroma y sabor generados durante la fermentación de cuatro clones de cacao cultivados en diferentes regiones de Antioquia para su trazabilidad” se requirió de una combinación de pruebas de análisis dirigidas a develar el perfil bromatológico, físico y químico del cacao durante la fermentación que permitiera establecer dichas diferencias en la procedencia de clones y la caracterización de los granos al finalizar una de las principales etapas de la poscosecha, la fermentación.

El análisis de estadística multivariada permitió la selección de pruebas de análisis para la identificación de tres factores relacionados con la calidad del cacao, que se posicionan como herramientas de gran utilidad para caracterizar los materiales vegetales con propiedades funcionales y verificar la finalización del proceso: a) Indicadores de calidad de cacao con propiedades funcionales, b) Indicadores de calidad de inicio de fermentación, e c) Indicadores de calidad de cacao bien fermentado.

Las mezclas de clones cultivados en Antioquia y conformada por dos clones Universales CCN-51 y ICS-1 y dos Regionales FLE-2 y FEC-2 fueron fermentadas bajo las mismas

condiciones en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio y se pudieron establecer diferencias entre las subregiones (BC diferente de U y M), pero al finalizar la fermentación, de acuerdo al Análisis de Clúster, se pudo encontrar un perfil común, definido por una serie de variables explicativas, resultado de la combinación lineal que arrojó el análisis previo de Componentes Principales.

Los precursores de aroma más influyentes esperados al finalizar la fermentación, por caracterizar la finalización de este proceso, estuvieron representados principalmente por aminoácidos libres, algunos de ellos involucrados en la formación de aldehídos responsables de aroma y característicos de cacaos especiales.

#### **4.1.2 Capítulo 2. Sistema de secado**

En respuesta al segundo objetivo específico “Establecer un sistema de secado de cacaos fermentados, basado en una tecnología que permita la disminución de la humedad del grano, sin afectar el equilibrio entre los compuestos responsables del aroma y de aquellos neoformados”, la propuesta de secado por Lecho Fluidizado del cacao fermentado permitió la obtención de un producto comparable, en cuanto a su perfil quimiométrico, con el obtenido por secado solar en las tres subregiones de Antioquia estudiadas (Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio) que presentan condiciones agroclimáticas variadas..

Las condiciones de secado óptimas están basadas en la temperatura de secado a 45 °C y una velocidad de secado a 6.2 m/s (120 min), 5.3 m/s (hasta los 380 min de secado) y 4.1 m/s hasta alcanzar la humedad del cacao seco (< 7 %), para un tratamiento total de 500±40 min aproximadamente, pero que dependerá de la humedad inicial. Para definir el tiempo aproximado de secado es posible emplear el modelo semi-empírico Henderson modificado o Difusividad aproximada. La eficiencia térmica del secado bajo la metodología propuesta fue 50.2 %, valor cercano al máximo esperado por este tipo de tratamiento.

Se corroboró mediante un estudio computacional previo, seguido de la determinación mediante un método implementado bajo una técnica robusta (UHPLC-MS/MS), que este contaminante térmico puede ser formado desde la segunda etapa de poscosecha, que,

para las zonas estudiadas, solo fue detectado en concentraciones inferiores a partes por billón en Bajo Cauca por los dos tratamientos térmicos evaluados. Cabe aclarar que estos niveles están por debajo de lo sugerido por entidades gubernamentales.

### **4.1.3 Capítulo 3. Marcadores químicos indicadores de calidad**

“Definir los marcadores químicos como indicadores de la calidad sensorial característica de cacao especiales, mediante un análisis quimiométrico” fue el tercer objetivo específico que se basó en la definición del perfil de los compuestos volátiles, los cuales corresponden a una de las variables evaluadas más relevantes para el cometido de este estudio.

Consistió en encontrar marcadores que permitieran hacer una distinción de algunos descriptores de atributos y defectos. Estos pueden ser establecidos por medio del seguimiento de factores que reúnen los compuestos que proporcionan información sobre los perfiles de interés específico para la cadena productiva de cacao, como la calidad de secado, los atributos de calidad de aroma o el balance de sabor y salud. De esta forma, se puede realizar la evaluación de la calidad del cacao seco obtenido ya sea por un método natural o artificial, con mayor efectividad.

Los compuestos que influyen en el sabor como ácidos, alcaloides y monómeros de procianidinas pueden ser considerados como indicadores del inicio de fermentación (altos contenidos de teobromina y cafeína) que hacen parte del perfil funcional que puede ser aprovechado a futuro, siendo el material vegetal del Bajo Cauca el de mayor contenido de estos compuestos. Por su parte, el ácido acético se resaltó al final del proceso y el cítrico, oxálico y succínico al inicio.

## **4.2 Recomendaciones**

Con el fin de consolidar la transferencia de tecnología al sector productivo, se recomienda continuar con los siguientes estudios acerca del tratamiento térmico propuesto:

- Realizar un estudio en campo donde se puedan replicar las condiciones de operación en las tres subregiones.
- Evaluar el secado con recirculación de aire, con el fin de mejorar la eficiencia térmica.
- Diseñar el escalado del equipo y proceso de forma que se adapte a condiciones productivas de cada centro.

Con respecto al perfil quimiométrico, se sugiere validar los métodos que se lograron estandarizar y de esta forma consolidarlos como centro de referencia para la trazabilidad de la calidad del cacao a nivel nacional.

## Bibliografía

- Abbasipour, H., Mahmoudvand, M., Rastegar, F., & Hosseing, M. (2011). Fumigant toxicity and oviposition deterrence of the essential oil from cardamom, *Elettaria cardamomum*, against three stored-product insects. *Journal of Insect Science*, *11*, 1–10.
- Aculey, P. C., Snitkjaer, P., Owusu, M., Bassompierre, M., Takrama, J., Nørgaard, L., Nielsen, D. S. (2010a). Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *Journal of Food Science*, *75*(6), S300–S307. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01710.x>
- Adeyeye, E. I., Akinyeye, R. O., Ogunlade, I., Olaofe, O., & Boluwade, J. O. (2010). Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. *Food Chemistry*, *118*, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.127>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2009a). Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food Chemistry*, *113*, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.088>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2009b). Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.088>
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, F. S., Budu, a. S., & Saalia, F. K. (2012). Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, *19*(3), 1071–1077.
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2013). Chemical

- composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50(December), 1097–1105. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0446-5>
- Alma, M., Fajardo, R., Córdova Téllez, L., López Andrade, A. P., Alvarado, A. D., Zavaleta Mancera, H. A., ... Monter, V. (2011). Tolerancia a la desecación en semillas de tres orígenes genéticos de cacao (*Theobroma cacao* L.) desiccation tolerance in seeds from three genetic origins of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Fitotecnia Mexicana*, 34(3), 175–182.
- Álvarez, C., Pérez, E., Boulanger, R., Lares, M., Ssmat, A. S., Davrieux, F., & Cros, E. (2012). Identificación de los compuestos aromáticos en el cacao Criollo de Venezuela usando microextracción en fase sólidos y cromatografía de gases. *Vitae*, 19(1), S370–S372. Retrieved from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=169823914116>
- Andreoli, R. V., de Oliveira, S. S., Kayano, M. T., Viegas, J., de Souza, R. A. F., & Candido, L. A. (2017). The influence of different El Niño types on the South American rainfall. *International Journal of Climatology*, 37(3), 1374–1390. <https://doi.org/10.1002/joc.4783>
- Araujo, Q. R., Fernandes, C. A. F., Ribeiro, D. O., Efraim, P., Steinmacher, D., Lieberei, R., ... Araujo, T. G. (2014). Cocoa Quality Index – A proposal. *Food Control*, 46, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.003>
- Ardhana, M., & Fleet, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 87–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Argüello-Navarro, A. Z., & Moreno-Rozo, L. Y. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 63(3), 238–245. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n3.41033>
- Arturo, J., Sulvarán, R., Katil, A., Rieche, S., Del, R. A., & Vargas, V. (2014). Characterization of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Farming Systems in the Norte de

- Santander Department and Assessment of Their Sustainability. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 67(1), 7177–7187.
- Bader, B. W., Bernardo, J. M., Brereton, R. G., Cadarso-Suárez, C., Campisi, B., Carlson, J. E., ... R., C. (2009). *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*. (S. Brown, R. Tauler, & B. Walczar, Eds.) (Primera). Amsterdam: Elsevier.
- Badrie, N., Bekele, F., Sikora, E., & Sikora, M. (2015). Cocoa Agronomy, Quality, Nutritional, and Health Aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(5), 620–659. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.669428>
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos*. (S. A. de C. V. Pearson Educación de México, Ed.) (Cuarta). Naucalpan de Juárez, México: Pearson Educación de México, S.A. de C.V.
- Bart-Plange, A., & Baryeh, E. A. (2003). The physical properties of Category B cocoa beans. *Journal of Food Engineering*, 60(3), 219–227. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00452-1)
- Barzegar, M., Zare, D., & Stroshine, R. L. (2015). An integrated energy and quality approach to optimization of green peas drying in a hot air infrared-assisted vibratory bed dryer. *Journal of Food Engineering*, 166, 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.026>
- Batista, N. N., Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.051>
- Bedoya, C. (2016). *Metodologías para el análisis bromatológico, físico y químico del cacao fermentado y seco, dentro del marco normativo internacional*. Corporación Universitaria Lasallista.
- Beer, J. (1987). Advantages, disadvantages and desirable characteristics of shade trees

- for coffee, cacao and tea. *Agroforestry Systems*, 5(1), 3–13. <https://doi.org/10.1007/BF00046410>
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). 5 Aroma Compounds. In Springer (Ed.), *Food Chemistry* (4th ed., pp. 340–401). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Bermudo, E., Moyano, E., Puignou, L., & Galceran, M. (2008). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products☆. *Talanta*, 76(2), 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.03.011>
- Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., & Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of Theobroma cacao beans and cocoa products. *Food Control*, 65, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013>
- Bharath, S., & Connor, C. B. (2008). *Assessing drying rates of cacao beans using small samples. Annual Report 2007. Cocoa Research Unit, U. W. I.* St. Augustine, Trinidad.
- Bonaparte, A., Alikhani, Z., Madramootoo, C. A., & Raghavan, V. (1998). Some quality characteristics of solar-dried cocoa beans in St Lucia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 553–558. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199804\)76:4<553::AID-JSFA986>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199804)76:4<553::AID-JSFA986>3.0.CO;2-V)
- Bravo, A., & McGraw, D. R. (1974). Fundamental artificial drying characteristics of cocoa beans. *Journal of Tropical Agriculture (Trin.)*, 51(3), 395–406.
- Brunetto, M. D. R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., & Al, E. (2007). Determination the Theobromine, Thephilline and caffeine in cocoa samples by high performance liquid chromatographic method with online sample cleanup in a swithching-column system. *Food Chemistry*, 100, 459–467.
- Bullock, A. T., Burnett, G. M., & Kerr, C. M. L. (1971). Electron spin resonance spectra of radicals derived from acrylamide and methacrylamide. *European Polymer Journal*, 7(7), 791–796. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(71\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0014-3057(71)90045-0)
- Bustamante, S. Z., Tamayo Tenorio, A., & Rojano, B. A. (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.
- Cádiz-Gurrea, M. L., Lozano-Sanchez, J., Contreras-Gámez, M., Legeai-Mallet, L., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2014). Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of Theobroma cacao extract. *Journal of Functional Foods*, 10, 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.016>
- Cambrai, A., Marcic, C., Morville, S., Houer, P. S., Bindler, F., & Marchioni, E. (2010). Differentiation of chocolates according to the cocoa's geographical origin using chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1478–1483. <https://doi.org/10.1021/jf903471e>
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- Chapiro, A., & Percec, L. (1971). Polymerisation radiochimique de l'acrylamide dans des milieux de nature differente. *European Polymer Journal*, 7(10), 1335–1355. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(71\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0014-3057(71)90031-0)
- Chávez, A., & Mansilla, J. (2004). *Manual del cultivo de cacao. Programa para el Desarrollo de la Amazonia*.
- Chinenye, N. M. (2009). Effect of Drying Temperature and Drying Air Velocity on the Drying Rate and Drying Constant of Cocoa Bean. *Agricultural Engineering*.
- Claeys, W. L., De Vleeschouwer, K., & Hendrickx, M. E. (2005). Kinetics of acrylamide formation and elimination during heating of an asparagine-sugar model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9999–10005. <https://doi.org/10.1021/jf051197n>
- Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, and L. J. (2004). Polyphenols - Food Sources and Bioavailability.pdf. *Am J Clin Nutr*, 79(5), 727–47. <https://doi.org/10.1038/nature05488>

- Colina, M. L. (2014). Deshidratación por lecho fluidizado. In E. Trillas (Ed.), *Deshidratación de Alimentos* (Primera, pp. 141–150). Iztapalapa.
- Columna YMC ODS.S5 para Alcaloides con HPLC\_ DAD.
- Comisión del Codex Alimentarius. (2009). *Code of Practice for the Reduction of Acrylamide in Foods* (No. CAC/RCP 67-2009). France. Retrieved from <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/es/>
- Comisión venezolana de Normas Industriales - COVENIN. (1995). Norma venezolana. Granos de Cacao. Covenin 50:1995.
- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., & Collin, S. (2004). Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 6243–6249. <https://doi.org/10.1021/jf040105b>
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., ... Nielsen, D. S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, *63*, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.032>
- Dano, S. D., Manda, P., Dembélé, A., Abla, A. M. J. K., Bibaud, J. H., Gouet, J. Z., & Sika, C. B. Z. M. (2013). Influence of fermentation and drying materials on the contamination of cocoa beans by Ochratoxin A. *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins5122310>
- De Brito, E. S., García, N. H. P., & Amancio, A. C. (2004). Use of a proteolytic enzyme in cocoa (*Theobroma cacao* L.) processing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *47*(4), 553–558. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000400008>
- de Oliveira, A. M., Rosa Pereira, N., Marsaioli, A., & Augusto, F. (2004). Studies on the aroma of cupuassu liquor by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1025*(1), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.061>
- de Oliveira, G. H. H., Corrêa, P. C., de Souza Santos, E., Treto, P. C., & Diniz, M. D. M. S. (2011). Evaluation of thermodynamic properties using GAB model to describe the

- desorption process of cocoa beans. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(10), 2077–2084. Retrieved from 10.1111/j.1365-2621.2011.02719.x
- de Oliveira, T. B., Rogero, M. M., & Genovese, M. I. (2015). Polyphenolic-rich extracts from cocoa (*Theobroma cacao* L.) and cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. K. Shum) liquors: A comparison of metabolic effects in high-fat fed rats. *PharmaNutrition*, 3(2), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2015.01.002>
- Di Mattia, C., Martuscelli, M., Sacchetti, G., Scheirlinck, I., Beheydt, B., Mastrocola, D., & Pittia, P. (2013). Effect of Fermentation and Drying on Procyanidins, Antiradical Activity and Reducing Properties of Cocoa Beans. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1028-x>
- Diab, J., Hertz-Schünemann, R., Streibel, T., & Zimmermann, R. (2014). Online measurement of volatile organic compounds released during roasting of cocoa beans. *Food Research International*, 63, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.047>
- Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) 2017/2158 de la Comisión de 20 de noviembre de 2017. Por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos, 2015 § (2001). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3381>
- Dina, S. F., Ambarita, H., Napitupulu, F. H., & Kawai, H. (2015a). Study on effectiveness of continuous solar dryer integrated with desiccant thermal storage for drying cocoa beans. *Case Studies in Thermal Engineering*, 5, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.csite.2014.11.003>
- Dirección General de Normas. (1980). Norma Mexicana NMX-F-352-S. Cacao en grano fermentado.
- Doores, S. (1993). *Organic Acids. YMC Separation Technology* (Vol. 18).
- Ducki, S., Miralles-Garcia, J., Zumbé, A., Tornero, A., & Storey, D. M. (2008). Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 74, 1166–

1174. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.034>
- Dybing, E. et al. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem. Toxicol.*, 43, 365–410.
- EFSA/DATEX/002 (revision 1). (n.d.). *European Food Safety Authority, Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food.*
- EFSA. (2015). *Acrylamide in food What is acrylamide? Why is it present in food? An overview of EFSA's risk assessment: What are the risks for consumers of acrylamide in food? What happens to acrylamide in the body? What is the margin of exposure?* <https://doi.org/10.2805/90424>
- Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C., & Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*, 229(6), 937–948. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1132-y>
- Esatbeyoglu, T., Wray, V., & Winterhalter, P. (2015). Isolation of dimeric, trimeric, tetrameric and pentameric procyanidins from unroasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) using countercurrent chromatography. *Food Chemistry*, 179, 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.130>
- European Commission Directorate-General for Health and Food Safety. SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, Legal Deposit § (2015). Retrieved from [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_11945.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf)
- Faborode, M. O., Favier, J., & Ajayi, O. A. (1995). On the effects of forced-air drying on cocoa quality. *Journal of Food Engineering*, 25(3), 455–472.
- Fagunwa, a O., Koya, O. a, & Faborode, M. O. (2009). Development of an Intermittent Solar Dryer for Cocoa Beans. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, XI(July), 1–14.

- FAO/WHO. (2004). *Health Implications of Acrylamide in Food*. *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 90). Geneva. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.001>
- Farah, D. M. H., Zaibunnisa, A. H., & Misnawi. (2012). Optimization of cocoa beans roasting process using response surface methodology based on concentration of pyrazine and acrylamide. *International Food Research Journal*, 19(4), 1355–1359.
- Fedecacao. (2005). *Caracterización físicoquímica y beneficio del grano de cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia*.
- Fedecacao, F. N. D. C. (2015). *Características de clones autorizados en Colombia*.
- Foo-tim Chau, et al. (2004). *Chemometrics: From Basics to Wavelet Transform*. (First). New Jersey: Wiley – Interscience. Wiley & Sons, Inc. Hoboken,.
- Fraundorfer, 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>
- García-Alamilla, P., Salgado-Cervantes, M. A., Barel, M., Berthomieu, G., Rodríguez-Jimenes, G. C., & García-Alvarado, M. A. (2007). Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. *Journal of Food Engineering*, 79, 1159–1165. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.04.005>
- Gil, M. (2018). *Aproximación quimiométrica del balance entre los compuestos neoformados y los responsables de la calidad desarrollados durante las etapas de poscosecha de cacaos especiales (Theobroma cacao L.) cultivados en Antioquia*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Gil, M., Orrego, F., Cadena, E., Alegria, R., & Londono-londono, J. (2016). Effect of Pectin Lyase Enzyme on Fermentation and Drying of Cocoa ( *Theobroma cacao L.* ): An Alternative to Improve Raw Material in the Industry of Chocolate. *Food and Nutrition Sciences*, 3(April), 215–226. <https://doi.org/DOI: 10.4236/fns.2016.74023>
- Gögüs, F., & Maskan, M. (2001). Drying of olive pomace by a combined microwave-fan assisted convection oven. *Nahrung - Food*, 45(2), 129–132.

- [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20010401\)45:2<129::AID-FOOD129>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010401)45:2<129::AID-FOOD129>3.0.CO;2-T)
- Granvogl, M., & Schieberle, P. (2007). Quantification of 3-aminopropionamide in cocoa, coffee and cereal products : CC Correlation with acrylamide concentrations determined by an improved clean-up method for complex matrices. *European Food Research and Technology*, 225, 857–863. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0492-9>
- Grupo de Análisis Sectorial. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2013). *Informe de Gestión 2013 Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*.
- Gu, F., Tan, L., Wu, H., Fang, Y., Xu, F., Chu, Z., & Wang, Q. (2013). Comparison of Cocoa Beans from China, Indonesia and Papua New Guinea. *Foods*, 2, 183–197. <https://doi.org/10.3390/foods2020183>
- Gu, Y., Hurst, W. J., Stuart, D. A., & Lambert, J. D. (2011). Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf200180n>
- Guehi, S. T., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, D. K., & Zahouli, G. I. B. (2010). Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(3), 163–171.
- Guehi, S. T., Irie, G., Zahouli, B., Fae, A. M., Ban-Koffi, L., & Nemlin, J. G. (2010). Effect of Drying Methods on the Chemical Quality Traits of Cocoa Raw Material. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(4), 184–190. Retrieved from [http://www.researchgate.net/publication/45492320\\_Effect\\_of\\_Drying\\_Methods\\_on\\_the\\_Chemical\\_Quality\\_Traits\\_of\\_Cocoa\\_Raw\\_Material](http://www.researchgate.net/publication/45492320_Effect_of_Drying_Methods_on_the_Chemical_Quality_Traits_of_Cocoa_Raw_Material)
- Guiné, R. P. F., & Fernandes, R. M. C. (2006). Analysis of the drying kinetics of chestnuts. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.04.063>
- Harrington, W. L. (2011). *The Effects of Roasting Time and Temperature on the Antioxidant Capacity of Cocoa Beans from Dominican Republic , Ecuador , Haiti , Indonesia , and Ivory Coast*. Retrieved from [http://trace.tennessee.edu/utk\\_gradthes/976](http://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/976)

- Hashim, P., Selamat, J., Kharidah, S., & Ali, A. (1998). Changes in Free Amino Acid , Peptide-N , Sugar and P y razine Concentration during Cocoa Fermentation. *Journal of Science, Food and Agriculture*, 78, 535–542.
- Hii, C. L., Law, C. L., & Cloke, M. (2009). Modeling using a new thin layer drying model and product quality of cocoa. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.022>
- Hii, C. L., Menon, A. S., Chiang, C. L., & Sharif, S. (2017). Kinetics of hot air roasting of cocoa nibs and product quality. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), 1–6. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12467>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- Hue, C., Gunata, Z., Bergounhou, A., Assemat, S., Boulanger, R., Sauvage, F. X., & Davrieux, F. (2014). Near infrared spectroscopy as a new tool to determine cocoa fermentation levels through ammonia nitrogen quantification. *Food Chemistry*, 148, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.005>
- Hue, C., Gunata, Z., Breyse, A., Davrieux, F., Boulanger, R., & Sauvage, F. X. (2016). Impact of fermentation on nitrogenous compounds of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from various origins. *Food Chemistry*, 192, 958–964. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.115>
- Humston, E. M., Knowles, J. D., McShea, A., & Synovec, R. E. (2010). Quantitative assessment of moisture damage for cacao bean quality using two-dimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry and chemometrics. *Journal of Chromatography A*, 1217, 1963–1970. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.069>
- Icco. (2005). Production and net exports of cocoa beans in 2005 / 06, 2005.
- ICONTEC Internacional. Norma Técnica Colombiana NTC 1252. Cacao en grano (2003).

- Illegghems, K., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2015). Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. *Food Microbiology*, *50*, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.005>
- Incropera, F. P., DeWitt, D. P., Bergman, T. L., & Lavine, A. S. (2007). *Fundamentals of Heat and Mass Transfer*. (F. P. Incropera & F. P. F. O. H. A. M. T. Incropera, Eds.), *Water* (Vol. 6th). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2011.03.022>
- Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. (2014a). *Resolución ICA 4180 de Dic 2 de 2014. Registro comercial FEC-2 (Fedecacao El Carmen, Santander)*. Colombia.
- Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. (2014b). *Resolución ICA 4181 de Dic 2 de 2014. Registro comercial FLE-2 (Fedecacao Lebrija, Santander)*.
- International Chemometrics Society. (2002). *The North American Chapter of International Chemometrics Society*.
- International Cocoa Organization (ICCO). Guidelines on Best Known Practices in the Cocoa Value Chain, Nineteenth meeting § (2009).
- Ioannone, F., Di Mattia, C. D., De Gregorio, M., Sergi, M., Serafini, M., & Sacchetti, G. (2015a). Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. *Food Chemistry*, *174*, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.019>
- Ioannone, F., Di Mattia, C. D., De Gregorio, M., Sergi, M., Serafini, M., & Sacchetti, G. (2015b). Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. *Food Chemistry*, *174*, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.019>
- Jacquot, C., Petit, J., Michaux, F., Chávez Montes, E., Dupas, J., Girard, V., ... Gaiani, C. (2016). Cocoa powder surface composition during aging: A focus on fat. *Powder Technology*, *292*, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.01.032>

- Jinap, M. S., Nazamid, S., & Jamilah, B. (2002). Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chemistry*, 78(4), 407–417. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00120-6)
- Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2004). Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. *Food Quality and Preference*, 15(5), 403–409. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00097-1)
- Johnson, A. J., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2015). Volatile and sensory profiling of cocktail bitters. *Food Chemistry*, 179, 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.114>
- Jonfia-Essien, W. A., West, G., Alderson, P. G., & Tucker, G. (2008). Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry*, 108, 1155–1159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.001>
- Jumnongpon, R., Chaiseri, S., Hongsprabhas, P., Healy, J. P., Meade, S. J., & Gerrard, J. A. (2012). Cocoa protein crosslinking using Maillard chemistry. *Food Chemistry*, 134, 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.189>
- Kadow, D., Niemenak, N., Rohn, S., & Lieberei, R. (2015). Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) – Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.015>
- Kaiser, H. F. (1961). A Note on Guttman's Lower Bound for the Number of Common Factors. *British Journal of Statistical Psychology*, 14, 1–2. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8317.1961.tb00061.x>
- Kaleta, A., Górnicki, K., Winiczenko, R., & Chojnacka, A. (2013). Evaluation of drying models of apple (var. Ligol) dried in a fluidized bed dryer. *Energy Conversion and Management*, 67, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.11.011>
- Kocadağlı, T., Göncüoğlu, N., Hamzalıoğlu, A., & Gökmen, V. (2012). In depth study of acrylamide formation in coffee during roasting: role of sucrose decomposition and lipid oxidation. *Food & Function*, 3(9), 970–975. <https://doi.org/10.1039/c2fo30038a>

- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - a review. *Food Research International*, 82, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Koutsidis, G., Simons, S. P. J., Thong, Y. H., Haldoupis, Y., Mojica-Lazaro, J., Wedzicha, B. L., & Mottram, D. S. (2009). Investigations on the effect of amino acids on acrylamide, pyrazines, and Michael addition products in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9011–9015. <https://doi.org/10.1021/jf9014763>
- Krähmer, A., Engel, A., Kadow, D., Ali, N., Umaharan, P., Kroh, L. W., & Schulz, H. (2015). Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 181, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.084>
- 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>
- Lacerda Ramos, C., Ribeiro Dias, D., Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel, M., & Freitas Schwan, R. (2014). UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64, 908–918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>
- Leal, G. A., Gomes, L. H., Efraim, P., de Almeida Tavares, F. C., & Figueira, A. (2008). Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*, 8(5), 788–798. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00405.x>
- Leal, G. A., Gomes, L. H., Efraim, P., De Almeida Tavares, F. C., & Figueira, A. (2008). Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*, 8(1), 788–798. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00405.x>

- Lide, D. R. (2005). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. (D. R. Lide, Ed.), eBook (85th ed.). Boca ratón, FL: CRC Press. <https://doi.org/978-1466571143>
- Lim, C., & Mujumdar, A. (2006). Fluidized Bed Dryers. In T. & F. Group (Ed.), *Handbook of drying* (Vol. 55, pp. 18–24). <https://doi.org/10.1021/ie50643a003>
- Lima, L. J. R., van der Velpen, V., Wolkers-Rooijackers, J., Kamphuis, H. J., Zwietering, M. H., & Rob Nout, M. J. (2012). Microbiota dynamics and diversity at different stages of industrial processing of cocoa beans into cocoa powder. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.07691-11>
- Loaëc, G., Jacolot, P., Helou, C., Niquet-Léridon, C., & Tessier, F. J. (2014a). Acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural and N(ε)-carboxymethyl-lysine in coffee substitutes and instant coffees. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 31(4), 593–604. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.885661>
- Loaëc, G., Niquet-Léridon, C., Henry, N., Jacolot, P., Volpoet, G., Goudemand, E., ... Tessier, F. J. (2014). Effects of variety, agronomic factors, and drying on the amount of free asparagine and crude protein in chicory. Correlation with the acrylamide formation during roasting. *Food Research International*, 63, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.010>
- Mari, A., Montoro, P., D'Urso, G., Macchia, M., Pizza, C., & Piacente, S. (2015). Metabolic profiling of *Vitex agnus castus* leaves, fruits and sprouts: Analysis by LC/ESI/(QqQ)MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSn. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.018>
- Márquez-Sillero, I., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. (2013). Comparison of two evaporative universal detectors for the determination of sugars in food samples by liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 110, 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.07.008>
- Marseglia, A., Palla, G., & Caligiani, A. (2014). Presence and variation of γ-aminobutyric acid and other free amino acids in cocoa beans from different geographical origins.

- Food Research International*, 63, 360–366.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.026>
- Marseglia, A., Sforza, S., Faccini, A., Bencivenni, M., Palla, G., & Caligiani, A. (2014). Extraction, identification and semi-quantification of oligopeptides in cocoa beans. *Food Research International*, 63, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.046>
- Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & Van Boekel, M. A. J. S. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 364–373. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00022-X)
- Menezes, A. G. T., Batista, N. N., Ramos, C. L., Silva, A. R. de A. e, Efraim, P., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2016). Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 81, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.036>
- Meziane, S. (2011). Drying kinetics of olive pomace in a fluidized bed dryer. *Energy Conversion and Management*, 52(3), 1644–1649. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.10.027>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018). Agronet. Retrieved May 5, 2018, from <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Centro de Investigaciones Agropecuarias. (2012). Consolidado de Demandas de las Agendas de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación. Retrieved May 12, 2015, from [www.siembra.org.co](http://www.siembra.org.co)
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2009). *Resolución Minagricultura 0329 de 17 de noviembre de 2009. Materiales de cacao introducidos en Colombia*.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2012). *Plan de Desarrollo Cacaotero 2012-2021*. Bogotá, D.C.
- Misnawi. (2012). Effect of cocoa bean drying methods on polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in cocoa butter. *International Food Research Journal*, 19(4), 1589–

1594.

Misnawi, & Ariza, B. T. S. (2011a). Use of gas Chromatography-Olfactometry in combination with solid phase micro extraction for cocoa liquor aroma analysis. *International Food Research Journal*, 18(2), 829–835.

Misnawi, & Ariza, B. T. S. (2011b). Use of gas Chromatography-Olfactometry in combination with solid phase micro extraction for cocoa liquor aroma analysis. *International Food Research Journal*, 18, 829–835.

Montgomery, D. (2001). Response surface methods and other approaches to process optimization. In *Design and analysis of experiments* (5th ed.). New York: Wiley.

Montgomery, D. (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. (L. Wiley, Ed.) (2nd ed.). Distrito Federal.

Moreira, I. M. da V., Miguel, M. G. da C. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 54(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>

Mota, S. G. R., Barros, T. F., & Castilho, M. S. (2010). In vitro screening and chemometrics analysis on a series ofazole derivatives with fungicide activity against *Moniliophthora perniciosa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(2), 510–519. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000300017>

Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.03.013>

Neuhaus, N. (2014). *Tecnología de lecho fluidizado*.

Nguyen, H. T., van der Fels-Klerx, H. J., & van Boekel, M. a J. S. (2016). Kinetics of N( $\epsilon$ )-(carboxymethyl)lysine formation in aqueous model systems of sugars and casein. *Food Chemistry*, 192, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.110>

- Noor-Soffalina, S. S., Jinap, S., Nazamid, S., & Nazimah, S. A. H. (2009). Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavour precursors in a lipidic model system. *International Journal of Food Science and Technology*, *44*, 168–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01711.x>
- Official Methods of Analysis. (2012). *Chapter 31. Cacao bean its products*. AOAC International.
- Official Methods of Analysis. (2016). *AOAC 942.15 Acidity (Titratable) of Fruit Products*.
- Ohene, E., Quao, J., Takrama, J., Simpson, A. and Kwesi, F. (2011). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *J Food Sci Technol*, *50*, 1097–1105. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0446-5>
- Oliveira, L. F., Braga, S. C. G. N., Augusto, F., Hashimoto, J. C., Efraim, P., & Poppi, R. J. (2016a). Differentiation of cocoa nibs from distinct origins using comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate analysis. *Food Research International*, *90*, 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.047>
- Oracz, J., & Nebesny, E. (2014). Influence of roasting conditions on the biogenic amine content in cocoa beans of different Theobroma cacao cultivars. *Food Research International*, *55*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.032>
- Oracz, J., Nebesny, E., & Żyżelewicz, D. (2011). New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, *86*, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.066>
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., & Nebesny, E. (2015). The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(9), 1176–1192. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.686934>
- Ortega, N., Romero, M. P., Maci??, A., Reguant, J., Angles, N., Morelló, J. R., & Motilva, M. J. (2010). Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, *23*(3), 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.005>

- Ou, B., Hampsch-Woodill, M. and Prior, R. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619–4626. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1021/jf010586o681>
- Owusu, M. (2010). *Influence of raw material and processing on aroma in chocolate*. Copenhagen.
- Owusu, M., Petersen, M. A., & Heimdal, H. (2013). Relationship of sensory and instrumental aroma measurements of dark chocolate as influenced by fermentation method, roasting and conching conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 50(5), 909–917. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0420-2>
- Páramo, D., García-Alamilla, P., Salgado-Cervantes, M. A., Robles-Olvera, V. J., Rodríguez-Jimenes, G. C., & García-Alvarado, M. A. (2010). Mass transfer of water and volatile fatty acids in cocoa beans during drying. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.02.028>
- Patras, M. A., Milev, B. P., Vrancken, G., & Kuhnert, N. (2014). Identification of novel cocoa flavonoids from raw fermented cocoa beans by HPLC–MSn. *Food Research International*, 63, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.031>
- Perea-Flores, M. J., Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J. J., Calderón-Domínguez, G., Méndez-Méndez, J. V., Palacios-González, E., & Gutiérrez-López, G. F. (2012). Mathematical modelling of castor oil seeds (*Ricinus communis*) drying kinetics in fluidized bed at high temperatures. *Industrial Crops and Products*, 38, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.008>
- Perego, P., Fabiano, B., Cavicchioli, M., & Del Borghi, M. (2004). Cocoa Quality and Processing. *Food and Bioproducts Processing*, 82(4), 291–297. <https://doi.org/10.1205/fbio.82.4.291.56402>
- Pereira, G. V. de M., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current Opinion in Food Science*, 7, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001>

- Perú, M., & Costa, D. (2009). *Guía de Gestión de Calidad en Centro de Acopio , Secado y Fermentación de Cacao*.
- Phillips-Mora, W., Arciniegas-Leal, A., Mata-Quirós, A., & Motamayor-Arias, J. (2012). Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. In *Serie técnica - Manual técnica 105* (p. 70). Turrialba, Costa Rica: Programa Agroambiental Mesoamericano.
- Pierucci, S., Klemeš, J. J., Piazza, L., Bakalis, S., Puello-Mendez, J., Meza-Castellar, P., ... Villamizar, L. (2017). Comparative Study of Solar Drying of Cocoa Beans: Two Methods Used in Colombian Rural Areas. *Chemical Engineering Transactions*, 57(2012), 8–13. <https://doi.org/10.3303/CET1757286>
- Pini, G. F., De Brito, E. S., García, N. H. P., Valente, A. L. P., & Augusto, F. (2004). A Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) method for the chromatographic determination of alkylpyrazines in cocoa samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(2), 267–271. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000200017>
- Pino, J. a, Ceballos, L., & Quijano, C. E. (2010). Headspace volatiles of Theobroma cacao L. pulp from Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(2), 113–115. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700276>
- Portillo, E., Labarca, M., Grazziani, L., Cros, E., Assemat, S., Davrieux, F., & Boulager, R. (2011). Influencia de la condiciones del tratamiento poscosecha sobre la temperatura y acidez en granos de cacao Criollo (Theobroma cacao L .). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 28(Supl. 1), 646–660.
- Proexport Colombia. (2012). *Cacao colombiano fino y de aroma*. Bogotá, D. C.
- Ramírez, J., Sigarroa, A., & Del Valle, R. (2014). Characterization of Cocoa ( Theobroma cacao L .) Farming Systems in the Norte de Santander Department and Assessment of Their Sustainability. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 67(1), 7177–7187.
- Regueiro, J., Vallverdú-Queralt, A., Simal-Gándara, J., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. (2013). Development of a LC – ESI-MS/MS Approach for the Rapid Quantification

- of Main Wine Organic Acids in Human Urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (61), 6763–6768. <https://doi.org/10.1021/jf401839g>
- Ríos, G., Granados, M. F., Martínez, G., Félix, M. G., Zacatecas, U. A. De, Académica, U., ... Gdl, C. (2011). Modelado Matemático en el Secado de Betabel ( Beta vulgaris ) en un Secador de Lecho Fluidizado y Caracterización Fisicoquímica del Producto Seco, 1(1).
- Robert Gentleman, Kurt Hornik, and G. P. (2011). *Use R!* (Springer, Ed.), *Media* (First). New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-78171-6>
- Rodríguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., & Lugo-Cervantes, E. (2012a). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.078>
- Rodríguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44(1), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>
- Rodríguez, J. (2011). *Estudio de los compuestos volátiles de Theobroma cacao L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado.*
- Rodríguez, J. H., & Quinto Diez, P. (2005). Secado de medios porosos : una revisión a las teorías actualmente en uso. *Científica*, 9(2), 63–71.
- Rohsius, C., Matissek, R., & Lieberei, R. (2006). Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. *European Food Research and Technology*, 222, 432–438. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0130-y>
- Roque, I., Ing, M., Stancich, S., & Stoppani, I. (2012). *Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Rosario Cátedra de Ing . De las Reacciones Fluidización.*
- Saltini, R., Akkerman, R., & Frosch, S. (2013). Optimizing chocolate production through

- traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, 29, 167–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.054>
- Sandhya, M. V. S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaik, J., Rao, L. J., Janardhan, P., & Murthy, P. S. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.002>
- Schwan, R. F. (2015). *Cocoa and Coffee Fermentations*. (R. Schaw & G. Fleet, Eds.). Boca Ratón, FL: CRC Press.
- Secretaría de Estado de Salud Pública de Argentina. (2013). Capítulo XV. Productos Estimulantes o Fruitivos: cacao y chocolate. *Código Alimentario Argentino*.
- Senadeera, W., Bhandari, B. R., Young, G., & Wijesinghe, B. (2003). Influence of shapes of selected vegetable materials on drying kinetics during fluidized bed drying. *Journal of Food Engineering*, 58(3), 277–283. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00386-2](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00386-2)
- Tinoco, H. A., & Ospina, D. Y. (2010). Análisis del proceso de deshidratación de cacao para la disminución del tiempo de secado. *EIA Magazine*, 7(13), 53–63. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=70086159&lang=es&site=ehost-live>
- Tomas-Barberán, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marín, A., Muguerza, B., Gil-Izquierdo, A., Cerdá, B., ... Espín, J. C. (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (pp. 3926–3935). <https://doi.org/10.1021/jf070121j>
- Torrez Irigoyen, R. M. (2013). fluidización para la producción de soja crocante Ricardo Martín Torrez Irigoyen.
- Turchiuli, C., Eloualia, Z., El Mansouri, N., & Dumoulin, E. (2005). Fluidised bed agglomeration: Agglomerates shape and end-use properties. *Powder Technology*, 157(1–3), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2005.05.024>

- USDA, U. S. D. of A.-. Formation of PAH's in food prepared in the home and from catering outlets to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting (2008). United Kingdom.
- van Deventer, H., & Heijmans, R. (2001). DRYING WITH SUPERHEATED STEAM. *Drying Technology*, 19(8), 2033. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=8535588&lang=es&site=ehost-live>
- Vázquez-Ovando, A., Molina-Freaner, F., Nuñez-Farfán, J., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2015a). Classification of cacao beans (*Theobroma cacao* L.) of southern Mexico based on chemometric analysis with multivariate approach. *European Food Research and Technology*, 240(6), 1117–1128. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2415-0>
- Vázquez-Ovando, A., Molina-Freaner, F., Nuñez-Farfán, J., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2015b). Classification of cacao beans (*Theobroma cacao* L.) of southern Mexico based on chemometric analysis with multivariate approach. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2415-0>
- Vignoni, L. A., Césari, R. M., Forte, M., & Mirábile, M. L. (2006). Determinación de Índice de Color en Ajo Picado. *Información Tecnológica*, 17(6), 63–67. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642006000600011>
- Vijayaraj, B., Saravanan, R., & Renganarayanan, S. (2007). Studies on thin layer drying of bagasse. *Archives of Thermodynamics*, 31, 422–437. <https://doi.org/10.1002/er>
- Villalba Vidales, J. A., & Arzola De La Peña, N. (2015). Modelos matemáticos y experimentales sobre el secado de biomasa. *Ingeniería y Desarrollo. Universidad Del Norte*, 33(2), 301–330. <https://doi.org/10.14482/inde.33.2.5674>
- Voigt, J., Heinrichs, H., Voigt, G., & Biehl, B. (1994). Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds. *Food Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90117-1)

- Voigt, J., Janek, K., Textoris-Taube, K., Niewianda, A., & Wöstemeyer, J. (2016). Partial purification and characterisation of the peptide precursors of the cocoa-specific aroma components. *Food Chemistry*, 192, 706–713. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.068>
- Wandan, E. N., Elleingand, E. F., & Ndouba, A. M. (2011). A screening for benzo[a]pyrène in cocoa beans subjected to different drying methods during on farm processing. *International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)*, 3(5), 3621–3630.
- Wang, L., Chen, C., Su, A., Zhang, Y., Yuan, J., & Ju, X. (2016). Structural characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction from defatted adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) seed meal. *Food Chemistry*, 196, 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.083>
- Wehrens, R. (2011). *Chemometrics with R* (First). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17841-2>
- Wold, S. (1995). *Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it? Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Vol. 30). [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)00042-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00042-9)
- Wollgast, J. (2004). *The contents and effects of polyphenols in chocolate Qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health*. University of Gießen, Gießen.
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423–447. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5)
- Yogendrasidhar, D., & Pydi Setty, Y. (2018). Drying kinetics, exergy and energy analyses of Kodo millet grains and Fenugreek seeds using wall heated fluidized bed dryer. *Energy*, 151, 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.03.089>

- 
- Zapata Bustamante, S., Tamayo Tenorio, A., & Alberto Rojano, B. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao Colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 391–404.
- Zbytniewski, R. B. B. (2005). Characterization of natural organic matter(NOM) derived from sewage sludge compost. Part 1. *Chemical and Spectroscopic Properties. Bioresource Technology.*, 96(4), 471–478.
- Zuidema, P. A., Leffelaar, P. A., Gerritsma, W., Mommer, L., & Anten, N. P. R. (2005). A physiological production model for cocoa (*Theobroma cacao*): model presentation, validation and application. *Agricultural Systems*, 84(2), 195–225. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2004.06.015>

# Lista de anexos

## Capítulo 1

**Anexo 1-1:** Effect on Pectin Lyase Enzyme on fermentation and drying of cocoa (*Theobroma cacao* L.): An alternative to improve raw Material in the Industry of Chocolate. (Publicado: J. Food and Nutrition Science, 2016, 7, p. 215 . 226.

**Anexo 1-2:** Manuscrito Profile of cacao cultivated in Colombia: a study based on standardized methods, indicators of quality and variety

**Anexo 1-3:** Artículo sometido: Matrix effects on sugars and mannitol quantification developed during postharvest of cocoa: an alternative for traceability of aroma precursors by liquid chromatography with an evaporative detector

**Anexo 1-4:** Detector Aspectos agronómicos y climáticos de las finca productora de cada subregión

**Anexo 1-5:** Ponencia: IV versión del Congreso Internacional De Investigación E Innovación En Ingeniería, Ciencia Y Tecnología De Alimentos - IICTA 2018,

## Capítulo 2

**Anexo 2-1:** Propiedades de la partícula y parámetro fluidodinámicos

**Anexo 2-2:** Artículo sometido: a Computational and experimental study of acrylamide formation in cocoa beans during drying process: effect of the precursor sugar

**Anexo 2-3:** Eficiencia térmica\_Balance de masay energía

**Anexo 2-5:** Perfil químico de los clones CCN-51, ICS-1, FLE-2 y FEC-2 provenientes de Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio

**Anexo 2-4:** Póster: The First International Flavor and Fragrance Conference 2017

Anexo 1 1: Effect on Pectin Lyase Enzyme on fermentation and drying of cocoa (*Theobroma cacao* L.): An alternative to improve raw Material in the Industry of Chocolate. (Publicado: J. Food and Nutrition Science, 2016, 7, p. 215. 226.

Food and Nutrition Sciences, 2016, 7, 215-226  
Published Online April 2016 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/fns>  
<http://dx.doi.org/10.4236/fns.2016.74023>



## Effect of Pectin Lyase Enzyme on Fermentation and Drying of Cocoa (*Theobroma cacao* L.): An Alternative to Improve Raw Material in the Industry of Chocolate\*

Maritza Gil<sup>1,2</sup>, Francy Orrego<sup>1</sup>, Edith Cadena<sup>1</sup>, Rosa Alegria<sup>1</sup>, Julian Londono-Londono<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup>Corporación Universitaria Lasallista, Grupo de investigación de Ingeniería de Alimentos, GRIAL, Caldas, Colombia  
Email: magil@unal.edu.co, ingandreaagil@gmail.com, fsorregov@unal.edu.co, emcadenac@unal.edu.co, roaalegriama@unal.edu.co, jalondo@gmail.com

Received 7 March 2016; accepted 17 April 2016; published 20 April 2016

Copyright © 2016 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

### Abstract

Cocoa (*Theobroma cacao*), in all its presentations, is consumed all over the world and is one of the main drivers of the economic in several countries. The world's Cocoa tendency is focused on developing special beans. This category is subject to postharvest processes of utmost importance such as the fermentation and dry, which are currently carried out with traditional and poorly effective devices, which need to be improved to obtain a high quality product. The aim of this study was to evaluate the influence of the pectin lyase enzyme (E.C.4.2.2.10) on the postharvest cocoa process. We evaluated the enzyme dosage (1.0% and 0.5%) in fermentation and its effect on the variables temperature, acidity and drying time by convection at 60°C. The Pectin lyase activity during fermentation does not cause a significant effect on the variables of temperature and acidity; however, the drying process time required to achieve 7.0% moisture was reduced. The enzyme dosage of 1.0% was the best result, the amount of exudate obtained (115 ml) during fermentation and the best degree of fermentation (77% ± 3.8) were increased and further shows a change in porosity facilitating the scale surface and internal moisture diffusion. The drying rate (Nw) expressed in kg<sub>water</sub>/m<sup>2</sup> \* min was determined based on the empirical model of Newton, where the higher speed was obtained during the falling period. In conclusion, enzyme dosage 1% was the best concentration evaluated because weaken grain husk, which allowed an adequate fermentation,

\*Project: "Evaluation of enzymes with activity pectin lyase during fermentation of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from Antioquia-Colombia. An alternative for improving postharvest". Financed by Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín Corporación Universitaria Lasallista, Compañía Nacional de Chocolates and Ingredientes y Productos Funcionales, IPF S.A.S.

How to cite this paper: Gil, M., Orrego, F., Cadena, E., Alegria, R. and Londono-Londono, J. (2016) Effect of Pectin Lyase Enzyme on Fermentation and Drying of Cocoa (*Theobroma cacao* L.): An Alternative to Improve Raw Material in the Industry of Chocolate. *Food and Nutrition Sciences*, 7, 215-226. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2016.74023>

**Anexo 1-2: Manuscrito Profile of cacao cultivated in Colombia: a study based on standardized methods, indicators of quality and variety****Profile of cacao cultivated in Colombia: a study based on standardized methods, indicators of quality and variety**  
**Perfil de cacao cultivado en Colombia: estudio basado en métodos estandarizados, indicadores de calidad y variedad**

Maritza Gil<sup>1\*</sup>, Carolina Vergara<sup>2</sup>, Luz Alzate<sup>3</sup>, Julian Londono-Londono<sup>4</sup>

**Abstract**

Several modifications have been reported for methods used to recognize varieties and the quality of cocoa during post-harvest. This situation has limited the obtention of comparable and competitive profiles. For this reason, the aim of this study was to standardize the methodologies to evaluate the bromatological, and physicochemical profile of raw, fermented and dried cocoa of four clones from Colombia, in order to identify its quality during post-harvest and between varieties. *Fat content*: Six solvents were evaluated by using Soxhlet and an alternative method assisted by Ultrasound. *Total acidity*: It was optimized with respect to time by using centrifugation. *Antioxidant capacity*: Two solvent systems were evaluated to obtain the higher recovery of cocoa extract in the determination of polyphenols and antioxidant capacity. *Fermentation index*: The difference among the varieties as well as raw and well-fermented cocoa was calculated by using the anthocyanins absorbance ratio. Finally, the experiments were conducted in a completely randomised design. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed using the statistical software R Studio and, significant differences between the methods and varieties were determined by Tukey's test at  $P < 0,05$ . Hexane was the most efficient solvent for the extraction of fat content. The use of centrifugation instead of filtration during the determination of total acidity reduced the time of analysis in 25 min. Acetone:water:acetic acid (70:29.5:0.5) mixture was the best system for the extraction in the determination of the antioxidant activity. Ratio of anthocyanins  $< 1$  was an indicator of well-fermented beans and raw cocoa varieties. Proteins, fiber, anthocyanins and phenols showed significant differences between varieties, which may be

---

<sup>1</sup> Food Engineer. PhD student in Agricultural Science. Universidad Nacional de Colombia. Faculty of Agricultural Sciences. Medellín-Antioquia Colombia. Research group in Food Engineering, GRIAL. Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia. [magil@unal.edu.co](mailto:magil@unal.edu.co)

<sup>2</sup> Food Engineer. Master Student in Post-harvest horticultural. Corporación Universitaria Lasallista. Researcher Grupo de investigación de Ingeniería de Alimentos, GRIAL. Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia. [carolinavergara06@gmail.com](mailto:carolinavergara06@gmail.com)

<sup>3</sup> Food Engineer, Ph.D in Pharmaceutical and Food Sciences. Director of the Research group in Food Engineering, GRIAL. Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia. [lualzate@gmail.com](mailto:lualzate@gmail.com)

<sup>4</sup> Pharmaceutical Chemist. Ph,D in Chemical. Regional Director of the Colombian Corporation for Agricultural Research CORPOICA, Rionegro, Antioquia. [jalondo@gmail.com](mailto:jalondo@gmail.com)

\*Corresponding author:

Maritza Gil – ORCID: 0000-0001-9231-248X

e-mail: [magil@unal.edu.co](mailto:magil@unal.edu.co)

Anexo 1 3: Artículo sometido: Matrix effects on sugars and mannitol quantification developed during postharvest of cocoa: an alternative for traceability of aroma precursors by liquid chromatography with an evaporative detector

### Journal of Food Science and Technology

#### Matrix effect on quantification of sugars and mannitol developed during postharvest of cocoa: an alternative for traceability of aroma precursors by liquid chromatography with an evaporative detector --Manuscript Draft--

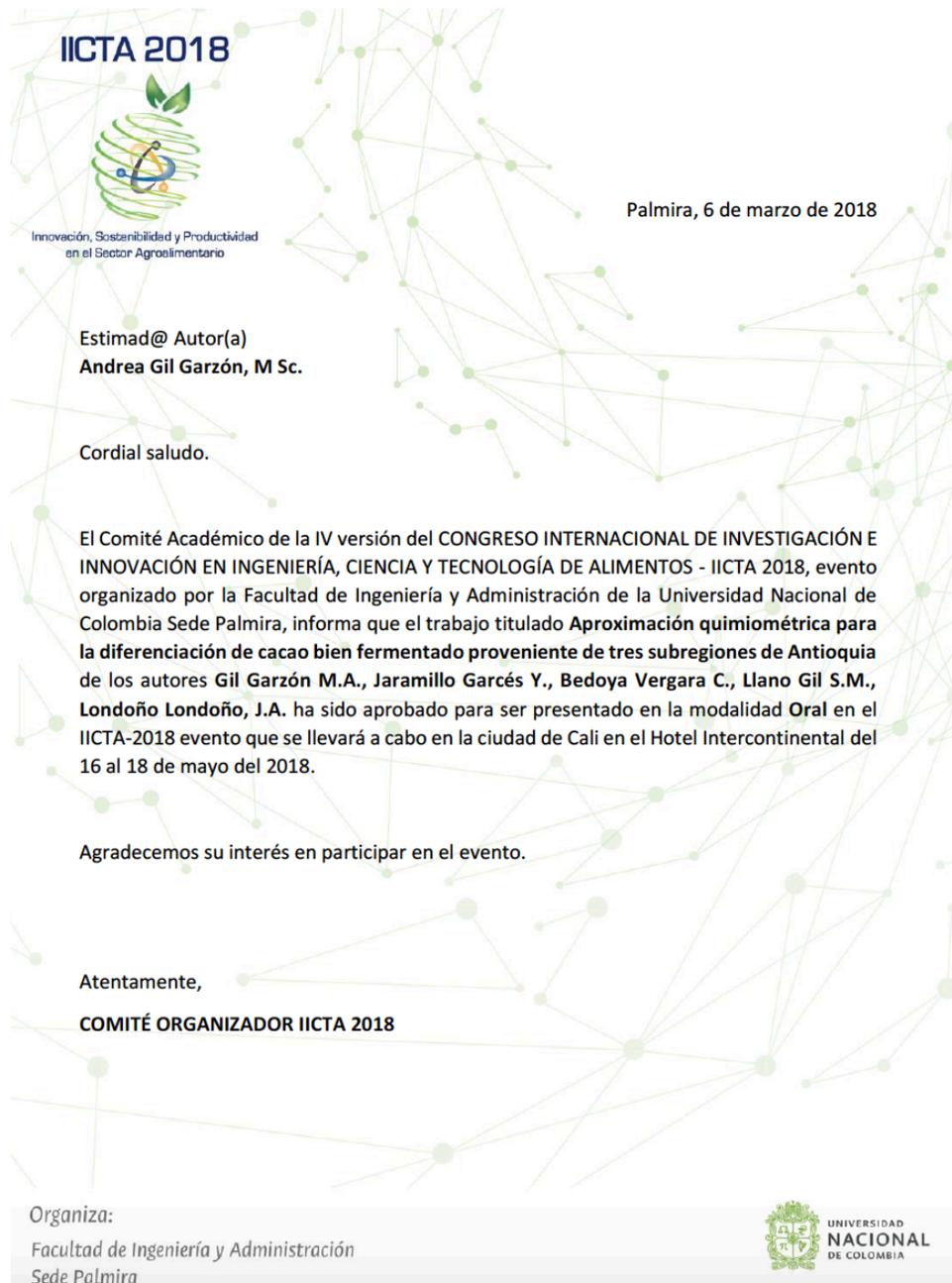
Manuscript Number:	JFST-D-18-00607	
Full Title:	Matrix effect on quantification of sugars and mannitol developed during postharvest of cocoa: an alternative for traceability of aroma precursors by liquid chromatography with an evaporative detector	
Article Type:	Original Article	
Corresponding Author:	Maritza Andrea Gil, Pg.D. Student National University of Colombia Medellin, Antioquia COLOMBIA	
Order of Authors:	Maritza Andrea Gil, Ph.D. Student Sandra Llano, Chemist. Master Food and Nutrition Innovation Yamile Jaramillo, Food Engineer. Master student in Food and Nutritio Jairo Quijano, Ph.D. Chemical Science Julian Londono-Londono, Pharmaceutical Chemist. Ph.D. Chemical Science	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	National University of Colombia	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Maritza Andrea Gil, Ph.D. Student	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Government of Antioquia—Secretary of Agriculture and Rural Development (4600003895) Colciencias (647-2015)	Not applicable MSc. Maritza Andrea Gil
Abstract:	<p>The profile of reducer sugars developed during each stage of the postharvest of cocoa beans is an important quality index to be one of the main precursors of flavor or neoformed compounds, but its quantification after extraction from the different parts of the bean is a challenge due to the complexity of the matrix. The prime aim of this study was to validate a rapid chromatographic method with a corona-charged aerosol detector (C-CAD) to improve the sensitivity during the tracking of the formation of reducing sugars and mannitol in samples obtained from fermentation and drying of cocoa beans with the corresponded corrected matrix effect. From a different amount of grinded cocoa beans without defatting (20 mg raw fermented and 10 mg dried) was extracted the analytes by a solid phase. The experimental variables affecting the effective detection were evaluated at different temperatures and filters. Method validation studies showed an average of recovery between 77.8 - 120 % for fermented cocoa and 79.6 - 117.7 % dried cocoa. A linear response was achieved for fructose, glucose, sucrose, and mannitol to concentrations of 0.1-40 mg L<sup>-1</sup> and maltose 0.1-70 mg L<sup>-1</sup> and regression coefficients (R) were 0.9991, 0.9993, 0.9992, 0.9995 and 0.9994, respectively. This method was successfully applied to a clones mix of cocoa from Antioquia, Colombia to corroborate the hydrolysis reaction of sucrose into glucose and fructose during of fermentation and drying. A quality indicator of an efficient postharvest process thus: glucose 0.66 %w/w and fructose 1.46 %w/w, higher values than others reported.</p>	

Anexo 1 4: Detector Aspectos agronómicos y climáticos de las finca productora de cada subregión

BAJO CAUCA					
Variable		Edilson Andrés Rodríguez	Los Placeres	Dios con Nosotros	La Primavera
Zona agroecológica		BHT	BHT	BHT	BHT
Altitud (msnm)		340	90	90	340
Temperatura promedio (°C)		30	34	35	34
Humedad promedio (%)		60	80		60
Precipitación (mm/año)		2400	2400		2400
Suelo	Topografía	Pendiente	Plano	Plano	Pendiente
	Textura	Arcilla:Limoso	Arenoso - Aluvial (Arcilla: Arenoso++++)	Arenoso - Aluvial (Arcilla: Arenoso++++)	Arcilla:Limoso
	CIC (US/CM)				
	pH	5	7	7	4.5
Edad promedio de cultivo (años)		7 años	9	4	7 años
Sistema de fertilización		Producción (Remital), Mezclas nórdicas, Agrimix + cloruro de potasio	Remital	Triple 15 (dos veces al año) 600 g/ árbol	Producción (Remital), Mezclas nórdicas, Agrimix + cloruro de potasio
Sombrio	Porcentaje	10%	15%	40%	10%
	Tipo	Maderable (Nogal y Cedro)	Abarco, Caucho, Ceiba y Tolúa	Transitorio (Plátano 40%) Permanente (Roble < 1%)	Maderable (Nogal y Cedro)
Riego		N/A	N/A	N/A	N/A
Drenaje		Sin drenaje	Sin drenaje	Si 3 Zanjas en una hectárea	Sin drenaje
Maleza		Nativa: controlada (2 veces al año: abril y octubre)	2 controles (abril o mayo - octubre y noviembre)	Cuatro veces/año	Controlada (2 veces al año: abril y octubre)
Poda		Controlada (2 veces al año: abril y octubre)	3 podas (abril, agosto y noviembre)	Dos veces/año Abril y octubre	Controlada (2 veces al año: abril y octubre)
Rendimiento (kg/hectárea)		1500	1600	800	1500
Índice de mazorca (semillas/mazorca)		CCN-51 (14) FEC-2 (xx)	ICS-1 (22)	20 (CCN-51) 16 (FEC-2 y FLE-2)	CCN-51 (14)

MAGDALENA MEDIO							
Variable	Vista Hermosa	La Queiebra	La Parcelita	Cannes	Chaparral	Buenos Aires	
Zona agroecológica							
Altitud (msnm)	920	900	900	1014.5	1230	1000	
Temperatura promedio (°C)	24	24	24	23	24	25	
Humedad promedio (%)	80	80	80	80	85	85	
Precipitación (mm/año)	2600	2600	2600	2500	2600	3000	
Suelo	Topografía	pendiente	Pendiente	Pendiente	Plano - Pendiente	Pendiente	Pendiente
	Textura	Arcillo-Arenoso	Arcilloso	Arcilloso-Arenoso	Arcilloso-Arenoso	Franco Arenoso-Arcilloso	Arcillo-Arenoso
	CIC (US/CM)						
	pH	5	4.8	5	5.2	5.8	4.5
Edad promedio de cultivo (a)	5	9	4	11	7	6	
Sistema de fertilización	17-6-18-2 y PCMS, 2 veces al año, abril y septiembre - octubre (lluvias)	17-6-18-2 y Agrimins. 2 veces al año, abril y septiembre - octubre (lluvias)	17-6-18-2 y Agrimins, 1 veces al año, abril (lluvias)	2 veces al año, abril y octubre (lluvias)	15-15-15 Agrimins. Enmienda tripre 30 Rio Claro (P, Ca, Mg, S) y Nutrifoliar. N-P-K. 2 veces al año, abril y octubre (lluvias). 680 g dividido en 3	2 veces al año, abril y octubre (lluvias). 680 g dividido en 3	
Sombrio	Porcentaje	0%	30%, 1 hectárea	1 hectárea	30% 4.7 hectárea	10% 3 hectárea	3 hectárea
	Tipo		cedro rojo		Cedro rojo	Acacia	
Riego	0						
Drenaje	0	Si en el plano	Si en el plano				
Maleza	4 veces al año	3 veces al año	3 veces al año	4 veces al año	3 veces al año	3 veces al año	
Poda	1 vez al año	2 vez al año	1 vez al año. Poda (después de fertilización)	1 vez al año, Poda (después de fertilización)	1 vez al año. Abril - Poda (después de fertilización)	1 vez al año, Abril - Poda (después de fertilización)	
Regimen pluviométrico							
Rendimiento (kg/hectárea)	1 tonelada/mensual, 2 hectáreas	CCN-51 (15/kg) FEC-2 (16/kg)	CCN-51 (16/kg) FEC-2 (17/kg)	CCN-51 (16/kg) FEC-2 (17/kg)	CCN-51 (16/kg) CCN-51: 210 ICS-1:310 ICS-1 (18/kg)	CCN-51 (15/kg)	
Índice de mazorca (semillas/mazorca)	CCN-51 (16/kg) FEC-2 (15/kg) FLE-2 (14/kg)						
		Bajo Cauca La Isla	Bajo Cauca La Candelaria	Magdalena Medio	Urabá		
Radiación promedio	185.5	211.9	145.0	183.9			
Radiación máxima	1188.4	1032.7	1118.8	1181.0			

Anexo 1-5: Ponencia: IV versión del Congreso Internacional De Investigación E Innovación En Ingeniería, Ciencia Y Tecnología De Alimentos - IICTA 2018



**IICTA 2018**



Innovación, Sostenibilidad y Productividad  
en el Sector Agroalimentario

Palmira, 6 de marzo de 2018

Estimad@ Autor(a)  
**Andrea Gil Garzón, M Sc.**

Cordial saludo.

El Comité Académico de la IV versión del CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN INGENIERÍA, CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS - IICTA 2018, evento organizado por la Facultad de Ingeniería y Administración de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, informa que el trabajo titulado **Aproximación quimiométrica para la diferenciación de cacao bien fermentado proveniente de tres subregiones de Antioquia** de los autores **Gil Garzón M.A., Jaramillo Garcés Y., Bedoya Vergara C., Llano Gil S.M., Londoño Londoño, J.A.** ha sido aprobado para ser presentado en la modalidad **Oral** en el IICTA-2018 evento que se llevará a cabo en la ciudad de Cali en el Hotel Intercontinental del 16 al 18 de mayo del 2018.

Agradecemos su interés en participar en el evento.

Atentamente,  
**COMITÉ ORGANIZADOR IICTA 2018**

Organiza:  
Facultad de Ingeniería y Administración  
Sede Palmira



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

Capítulo 2

Anexo 2-1: Propiedades de la partícula y parámetro fluidodinámicos

	Parámetro	Simbología	Dimensiones	Expresión/Dependencia	Valores calculado con datos técnicos	Valores calculado con datos reales	Valores registrados en el equipo y apoyado en cálculos reales	Referencia	
Propiedades termofísicas del grano de cacao	Densidad arreada				730.67	730.67	730.67	Torres (2013)	
	Densidad compacta			$\rho_{aireada}$	$\frac{Kg}{m^3}$	1118.37	1118.37	$\frac{1118.37}{\sqrt{2}}$	Bart-Flange & Baryeh(2003)
	Densidad partícula				890.00	866.86	$\frac{866.86}{\sqrt{2}}$	Bart-Flange & Baryeh(2003) Colina, M. Deshidratación de Alimentos. Ed. Casa abierta al tiempo. Urupetrol, p. 202	
Propiedades termodinámicas del aire	Viscosidad			$\rho_{compacta}$	$\frac{Kg}{m^3}$	0.00001939	0.00001939	$\frac{0.00001939}{1.4}$	EES Software
	Densidad				1.105	1.105	$\frac{1.105}{1.4}$	EES Software	
Factores físicos del grano de cacao	Largo			Medido directamente	$\frac{Kg}{m^3}$	0.25	0.25	0.25	Torres (2013)
	Ancho			Medido directamente	$\frac{Kg}{m^3}$	0.18	0.18	$\frac{0.18}{\sqrt{2}}$	Torres (2013)
	Alto			Medido directamente	$\frac{Kg}{m^3}$	0.13	0.13	$\frac{0.13}{\sqrt{2}}$	Torres (2013)
	Factor de forma				$\frac{kg}{m^3}$	0.72	0.72	$\frac{0.72}{\sqrt{2}}$	Torres (2013)
	Porosidad a mínima de lecho	( $\epsilon_0$ )		$\mu$	$\frac{kg}{m^3}$	0.21	0.35	0.35	Torres (2013)
	Porosidad mínima de fluidización	( $\epsilon_{mf}$ )		$\epsilon_{mf} = 1 - \frac{\rho_p}{\rho_a}$	$\frac{kg}{m^3}$	0.51	0.46	$\frac{0.46}{\sqrt{2}}$	Torres (2013)
	Área Superficie				$\frac{m}{m}$	0.000986016	0.000986016	$\frac{0.000986016}{\sqrt{2}}$	Torres (2013)
	$\epsilon$			$l_m$	$\frac{m}{m}$	0.87	0.87	0.87	Torres (2013)
	Masa grano			Medido directamente	$\frac{m}{m}$	0.00274	0.00274	0.00274	Torres (2013)
	Volumen inicial			Medido directamente	$\frac{m}{m}$	0.00000375	0.00000375	0.00000375	Torres (2013)
	Volumen compacto			Medido directamente	$\frac{m}{m}$	0.00000245	0.00000245	$\frac{0.00000245}{\sqrt{2}}$	Torres (2013)
	Diámetro equivalente			$\phi$	Adimensional	0.0193	0.0193	$\frac{(l_m \cdot l_a \cdot l_e)^{1/3}}{\sqrt{2}}$	Torres (2013)
	Diámetro efectivo				$\frac{m}{m}$	0.0138	0.0138	$\frac{0.0138}{\sqrt{2}}$	Torres (2013)
Area Total				$\frac{m}{m}$	0.000001386	0.000001386	$\frac{0.000001386}{\sqrt{2}}$	Torres (2013)	
Fluidodinámica del lecho fluidizado	Velocidad mínima de fluidización			$1.75 \cdot D_p^{0.4} \cdot \rho_a^{0.6} \cdot \nu^{0.4} / (\epsilon_{mf}^{1.5} \cdot \rho_p^{0.5}) + 150 \cdot (1 - \epsilon_{mf}) \cdot D_p \cdot \rho_a \cdot \nu / (\rho_p \cdot \rho_a \cdot \mu) = 0$	Adimensional	2.63	2.04	$1 - \frac{\rho_{aireada}}{\rho_{compacta}}$	Torres (2013)
	Velocidad de operación				Adimensional	7.9	6.12	6.12	Torres (2013)
	Diámetro de entrada de aire a la cámara de secado			Medido directamente	Adimensional	0.39	0.39	0.39	Serway & Jewett (2005)
	Diámetro de entrada de aire a la torre vertical			Medido directamente	Adimensional	0.334	0.334	0.334	Serway & Jewett (2005)
	Diámetro de entrada de aire atmosférico al equipo			Medido directamente	Adimensional	0.250	0.250	0.250	Serway & Jewett (2005)
	Velocidad del aire a la entrada del equipo				Adimensional	19.2	14.9	14.9	Serway & Jewett (2005)
	Altura mínima de lecho	H		Medido directamente	Adimensional	0.08	0.08	0.075 a 0.005	Torres (2013)
	Altura mínima de fluidización	$l_{mf}$		$Lmf = (1 - \epsilon) / (1 - \epsilon_{mf})$	Adimensional	0.13	0.10	0.09	Torres (2013)
Caida de presión	$\frac{\Delta p}{\rho}$	$\frac{m}{m}$ $\frac{H}{m}$ $\frac{O}{m}$		$Lmf(\rho_s - \rho_a) \cdot (1 - \epsilon_{mf}) \cdot g$	Adimensional	56.14	45.22	38 ± 3.6	Torres (2013)

Anexo 2 2: Artículo sometido: A Computational and experimental study of acrylamide formation in cocoa beans during drying process: effect of the precursor sugar

**ANEXO 2-2**

**Computational and experimental study of acrylamide formation in cocoa beans during drying process:  
effect of the precursor sugar**

**Maritza Gil<sup>1</sup>, Pablo Ruiz<sup>2</sup>, Jairo Quijano<sup>2</sup>, Julian Londono-Londono<sup>1</sup>**

**Summary**

This paper presents a theoretical study at the HF/6-31 g (d) level for acrylamide formation from the reaction between glucose or fructose with asparagine carried out in 333.1 5 343.15 K, simulating the drying conditions cocoa beans during drying. The concentration of sugars studied were evaluated during fermentation, drying and roasting for comparing their behavior.

The mechanism proposed consisted of four steps: addition (I), water elimination (II), decarboxylation (III) and re-arrangement (IV), each step required of a cyclic transition state of four members and the rate-determining step was the III. The glucose followed an elimination type E1-like and for the fructose was E1cb-like. The TS of the III step showed an “early” character for both reactants and the whole reaction for this step was slightly asynchronous.

The results shown that the reaction of acrylamide formation was favored for fructose rather than glucose (lower energy barrier) and the comparison of these results with the concentration of the studied monosaccharides during the stages of fermentation and drying of the cocoa nibs coincided with that the fructose decreased greater than glucose.

The rate of reaction was favored with increasing temperature. Thermochemical properties not previously reported for this reaction under the conditions studied, were reported.

**Keywords:** acrylamide, cocoa bean, drying, sugars, asparagine, elimination reaction.

<sup>1</sup> Grupo de investigación de Ingeniería de Alimentos GRIAL. Corporación Universitaria Lasallista. Caldas, Antioquia - Colombia

<sup>2</sup> Laboratorio de Fisicoquímica Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín AP 3840. Medellín, Colombia

Correspondence to: Maritza Gil – [mgandreaGil@gmail.com](mailto:mgandreaGil@gmail.com); [magil@unal.edu.co](mailto:magil@unal.edu.co)

Anexo 2-3: Eficiencia térmica\_Balance de masa y energía

	Parámetro	Simbología	Dimensiones	Entrada al banco de resistencias	Condiciones de salida de las resistencias	Condiciones de salida del secador
Propiedades termofísicas y termodinámicas del gas	Presión atmosférica	Patm	kPa	101.4	101.4	101.4
	Presión de aire seco (tablas)	Pas	kPa	9.8	9.8	
	Humedad relativa	rh	%	0.7	0.1353	0.2396
	Humedad absoluta	ω		0.008062	0.008062	0.0121
	Temperatura bulbo seco	Tdb	°C	16.3	45	39.78
	Temperatura bulbo húmedo	Twb	°C	13.1	22.67	22.67
	Temperatura de rocío	Tdp	°C	10.8	10.82	15.38
	Densidad	ρ		1.2	1.105	1.013
	Viscosidad	μ		0.00001806	0.00001939	0.00001914
	Volumen específico	v		0.83	0.9123	0.9992
	Difusividad térmica	α		0.00002027	0.00002416	0.00002592
	Calor específico	cp		1.019	1.021	1.028
	Entalpía	h		36.77	66.04	71.1
	Entropía	s		5.741	5.838	5.887

	Parámetro	Simbología	Dimensiones	Valor
Condiciones de operación	Velocidad del aire (1)	V		6.2
	Velocidad del aire (2)	V		5.1
	Velocidad del aire (3)	V		4.3
Propiedades y parámetros del producto	Humedad inicial base seca			1.2759821
	Humedad final base seca			0.1603046
	Humedad crítica base seca			0.586290555
	Cantidad			5.1
	EMC (XE) experimental			0.102
	T inicial			289.5
Para la eficiencia térmica	T final			318.15
	Radio del ducto	r	m	0.125
	Tiempo 1	t	h	2
	Tiempo 2	t	h	4.3
	Tiempo 3	t	h	2
	Valor			455.87

Parámetro	Simbología	Dimensión	Expresión/Dependencia	Etapa 1: calor sensible			Etapa 2: calor isométrico		
				6.2 m/s	5.1 m/s	4.3 m/s	6.2 m/s	5.1 m/s	4.3 m/s
Área del ducto	$A_T$	$m^2$	$A_T = \frac{\pi r^2}{4}$	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012
Presión de aire seco	$P_{as}$	kPa	$P_{as} = P_T - P_{H_2O}(P_{sat}:45^\circ C)$	91.64	91.64	91.64	91.64	91.64	91.64
Volumen específico de aire seco	$V_{as}$	$\frac{m^3}{kg_{as}}$	$V_{as} = \frac{V_{H_2O} \times P_T}{P_{as}}$	0.92	0.92	0.92	1.11	1.11	1.11
Densidad del aire seco corregido	$\rho_{as}$	$\frac{kg_{as}}{m^3}$	$\rho_{as} = \frac{1}{V_{as}}$	1.09	1.09	1.09	0.90	0.90	0.90
Densidad del aire total	$\rho_{aT}$	$\frac{kg_{aT}}{m^3}$	$\rho_{aT} = \rho_{as} \cdot (1 + \omega)$	1.10	1.10	1.10	0.91	0.91	0.91

Anexo 2-4: Póster: The First International Flavor and Fragrance Conference 2017

PONENCIA: "The First International Flavor and Fragrance Conference 2017"

**PHYSICAL-CHEMICAL METHODS THAT SUPPORT THE SENSORIAL QUALITY OF A NOVEL VEGETAL MATERIAL OF COCOA (THEOBROMA CACAO L.) GROWN IN ANTIOQUIA - COLOMBIA**

**CIENDE BARRIO, Diego\***, **Molina Alvarez De Castro, José María\***, **Salda Amador González, Luz Dora Pérez Barrientos\*\***, **Olga Lucía Martínez Alvarez\*\*** \*Facultad de Ingeniería, Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia, Colombia, [ciendebarrio@lasallista.edu.co](mailto:ciendebarrio@lasallista.edu.co); [molina@lasallista.edu.co](mailto:molina@lasallista.edu.co); [alvarez@lasallista.edu.co](mailto:alvarez@lasallista.edu.co); [olga@lasallista.edu.co](mailto:olga@lasallista.edu.co) \*\*Departamento de Alimentos, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia, [luis.porras@udea.edu.co](mailto:luis.porras@udea.edu.co); [ingaudreagil@udea.edu.co](mailto:ingaudreagil@udea.edu.co)

**INTRODUCTION**  
Cocoa (Theobroma cacao L.) is one of the most important fruits in Colombia. This species is affected by multiple risks in Colombia: type of soil and climate (1). In the world the demand for cocoa has increased due to the use of cocoa in the food industry. The aim of this research was to study the chemical and sensory profiles of Colombian cocoa. Characterizing the cocoa grown in a wide range of climatic zones, for which some maturing characteristics are sought. The present research had the objective of determining the physical-chemical methods in the influence of the fermentation process on the sensory profile of a novel 'cacao' cocoa material grown in the municipality of Medellín/Antioquia, Colombia. For this, physical-chemical tests were performed, as well as a sensory analysis. The paper presents the results by multidimensional approach according to PCA, HSCCD and IHS.

**RESULTS**  
Profile by multidimensional approach of a modern Cacao cacao grown in the North of Antioquia

**RESULTS- PHYSICO-CHEMICAL TESTS**

Moisture	25.33 mg / g (dehydrated cocoa)
Tannin	27.94 mg / g (dehydrated cocoa)
Thermogravimetric analysis	0.4%
Thermogravimetric analysis	12.39 / g (dehydrated cocoa)
Equilibrium	0.02 mg / g (dehydrated cocoa)
Content of phenol compounds	27.4 GAE mg / g
Antioxidant capacity	2027.04 μmol TE / g (100g)
Fermentation index (pH/percentage content)	0.44
pH	5.2
Acidity	0.13 meq/kg <sup>100</sup> / 10.5 / g
Free extract	100% SDC
Color (color index KI)	35 (pale yellow and intense orange)

**CONCLUSIONS**  
Methodologies such as physicochemical procedures and descriptive sensory analysis have become an important tool to differentiate fine cocoa and aroma from common cocoa, which is a very valuable proposal for Colombian territory, since being able to continue with the characterization of cocoa profiles from different regions of Antioquia and the country, will allow to generate greater knowledge of the processes of transformation for its improvement, developing better sensory characteristics of the cocoa produced in the country and in this way increase the competitiveness of the sector.



**PHYSICAL-CHEMICAL METHODS THAT SUPPORT THE SENSORIAL QUALITY OF A NOVEL VEGETAL MATERIAL OF COCOA (THEOBROMA CACAO L.) GROWN IN ANTIOQUIA - COLOMBIA**

**Carolina Bedoya Vergara\***, **Maritza Andrea Gil Garzón\***, **Ana María Muñoz\***, **Julián Alberto Londoño\***, **Luis Danilo Porras Barrientos\*\***, **Olga Lucía Martínez Alvarez\*\*** \*Facultad de Ingenierías, Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia, Colombia, [carolinavergara06@gmail.com](mailto:carolinavergara06@gmail.com); [ingaudreagil@gmail.com](mailto:ingaudreagil@gmail.com); [ana0626@gmail.com](mailto:ana0626@gmail.com); [jalondo@gmail.com](mailto:jalondo@gmail.com) \*\*Departamento de Alimentos, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia, [luis.porras@udea.edu.co](mailto:luis.porras@udea.edu.co); [olga.martinez@udea.edu.co](mailto:olga.martinez@udea.edu.co)

Anexo 2-5: Perfil químico de los clones CCN-51, ICS-1, FLE-2 y FEC-2 provenientes de Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio

En las Tablas 1 y 2 se describen los resultados obtenidos de los análisis de acidez, pH, extracto etéreo y compuestos volátiles realizados a los clones CCN-51, ICS-1, FLE-2 y FEC-2 cosechados y sometidos a fermentación en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio. Entre los principales hallazgos se destaca que la acidez varió entre subregiones, pero al final la concentración de los iones de hidrógeno aportado por los ácidos presentes en cada clon calculados por el pH estuvieron en un rango cercano, así para Bajo Cauca fue entre 5.8 y 6.2, Urabá de 5.8 a 6, por último para Magdalena Medio se reportó un pH entre 5.7 a 6.5, siendo en las tres localidades el CCN-51 el más ácido y el de menor acidez el FEC-2. Con respecto al Extracto Etéreo el porcentaje más elevado lo presentó el FLE-2 (> 50 %), los demás estuvieron por debajo.

Los compuestos volátiles se redujeron a siete compuestos lo que concuerda con lo esperado para un cacao crudo sin que haya pasado por un proceso de fermentación y secado para formar compuestos volátiles responsables de las reacciones no enzimáticas o como resultados de rutas metabólicas de ciertos microorganismos. Los grupos funcionales que se reportan corresponden a cetonas, alcoholes, aldehídos y el linalool que es un terpeno con un alcohol con descriptores frutales, florales, fresco, verde, miel, cítrico, entre otros enunciados en la siguiente Tabla.

El clon que presentó mayor número de compuestos volátiles fue FEC-2 en Magdalena Medio (6), seguido por Urabá (5) y finalmente por Bajo Cauca (4) presentes principalmente a los clones regionales FEC-2 y FLE-2. Puesto al CCN-51 que en Magdalena Medio solo fue descrito por un volátil asociado a un descriptor dulce y cítrico que también está presente en las otras dos subregiones, pero en Urabá presentó un descriptor diferenciado a miel y rosas, que podría tener un impacto alto ya que es el clon en mayor proporción en la mezcla FLE-2 tiene cuatro volátiles en las tres subregiones y lo que diferencia a Magdalena Medio es el descriptor a miel, en cambio en U se asoció a atributos dulce, frutal, miel y rosas. Finalmente, ICS-1 en Bajo Cauca se distingue por lo dulce y cítrico y a al ICS-1 proveniente de Magdalena Medio y Urabá tienen descriptores a: dulce, frutal miel, rosas y floral.

**Tabla 1:** Descripción bromatológica y química de los clones obtenidos en Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio.

Parámetro	CCN-51-BC	ICS-1-BC	FLE-2-BC	FEC-2BC	CCN-51 U	ICS-1 U	FLE-2-U	FEC-2-U	CCN-51-M	ICS-1-M	FLE-2-M	FEC-2M
Acidez expresada en ácido acético % p/p	0,74	0,57	0,49	0,28	0,40	0,65	0,79	0,64	0,51	0,26	0,29	0,21
Acidez expresada en ácido láctico % p/p	1,10	0,86	0,74	0,43	0,60	0,98	1,18	0,96	0,77	0,39	0,43	0,31
Acidez expresada en ácido cítrico % p/p	0,78	0,61	0,52	0,30	0,43	0,70	0,84	0,68	0,55	0,28	0,30	0,22
Acidez expresada en ácido málico % p/p	0,82	0,64	0,55	0,32	0,45	0,73	0,88	0,71	0,57	0,29	0,32	0,23
Acidez expresada en ácido oxálico % p/p	0,55	0,43	0,37	0,21	0,30	0,49	0,59	0,48	0,39	0,20	0,21	0,16
Acidez expresada en ácido succínico % p/p	1,45	1,13	0,97	0,56	0,79	1,28	1,54	1,26	1,01	0,51	0,56	0,41
pH	5,83	6,06	6,13	6,20	5,80	5,79	5,82	6,00	5,74	6,30	6,40	6,50
Humedad (kg agua/kg cacao húmedo)	0,33	0,40	0,35	0,35	0,38	0,41	0,34	0,41	0,34	0,34	0,32	0,34
Extracto etéreo, %	47,37	45,32	52,29	47,37	44,78	44,71	51,12	43,75	41,44	42,66	53,18	41,52

**Tabla 2:** Contenido de volátiles en clones crudos provenientes de Bajo Cauca, Urabá y Magdalena Medio

Parámetro		CCN-51-BC	ICS-1-BC	FLE-2-BC	FEC-2BC	CCN-51-U	ICS-1-U	FLE-2-U	FEC-2-U	CCN-51-M	ICS-1-M	FLE-2-M	FEC-2M
V2	1-Butanol, 3-methyl-frutal					16,14	16,16	16,18	16,20		16,20		16,19
	TR (min)					7008830	10161622	8526003	3072457		3966045		2308797
	Área					,85	,36	,57	,65		,29		,66
V5	2-Heptanol Dulce, cítrico	20,39	20,45	20,38	20,37	20,37		20,40	20,36	20,42	20,41	20,35	20,34
	TR (min)	2241000	427614,	2548229	5470903	732342,		1837797	5014713	649291,	1052435	6203042	8042211
	Área	,79	44	,21	,90	,29		,90	,62	,46	,09	,06	,32
V8	2-Nonanone Cacao-herbal, dulce, frutal, queso			23,07	23,14				23,08			23,05	23,09
	TR (min)			8218865	1453045				5787236			9113323	4458339
	Área			,28	,45				,47			,70	,59
V16	2-nonanol	26,97		26,93	26,94			26,96	26,94			26,91	26,92
	TR (min)	440162,		2807846	1095840			621858,	2199225			3368318	2713262
	Área	89		,66	,13			06	,62			,32	,35
V20	Linalool Floral, frutal (suave)				27,67				27,67				27,65
	TR (min)				947124,				995663,				1107479
	Área				07				20				,67
V31	Benzeneacetaldehyde Verde, dulce, floral, clavo, miel, cacao			30,78			30,75					30,78	
	TR (min)			1787625			3572559,					1504157	
	Área			,73			31					,59	
V40	Phenylethyl Alcohol Miel, rosas					37,68	37,70				37,76		37,71
	TR (min)					3018213	3385205,				596918,		1760017
	Área					,73	10			39		,13	
		CCN-51	ICS-1	FLE-2	FEC-2	CCN-51	ICS-1	FLE-2	FEC-2	CCN-51	ICS-1	FLE-2	FEC-2