

Análisis basado en metabolómica no dirigida como estrategia para identificar patrones químicos
característicos en muestras de cacaos especiales

Paula Victoria Bacca Villota

Trabajo de investigación para optar por el título de Magíster en Química

Director

William Hidalgo Bucheli.

PhD, Ciencias Naturales

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

A mi abuela Rí y a mi papí Pablo.

“La gratitud es la memoria de corazón” Lao Tse

Agradecimientos

A Dios, por hacer esto posible.

A mi abuelita Rita Villota Q.E.P.D. y a mi papi Pablo Villota Q.E.P.D

A mis padres, por su apoyo incondicional, paciencia y amor durante éste y todos mis proyectos.

De forma muy especial al Doctor William Hidalgo, su apoyo incondicional, sus enseñanzas y su motivación permanente que hicieron posible la culminación de este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander y a la escuela de Química por brindarme la oportunidad de pertenecer al programa de maestría en química.

A la Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB) por brindar los recursos necesarios para la ejecución del proyecto.

A mis amigos y compañeros Luis Eduardo Acuña, Leidy Sierra, Lorena Toro y Silvia Escobar, por el apoyo constante y los momentos compartidos, una valiosa amistad que se afianzó en este camino.

A mis amigos Ximena Mora, Edward Benavides y Sebastián Martínez por su amistad incondicional, por su motivación y apoyo constantes.

A los evaluadores por el tiempo dedicado para la evaluación de este proyecto.

Tabla de contenido

Introducción	17
1.Objetivos	21
1.1.Objetivo general.....	21
1.2.Objetivos específicos	21
2.Marco teórico y estado del arte.....	22
2.1.Marco teórico	22
2.1.1 Generalidades y aspectos taxonómicos del cacao.....	22
2.1.2 Impacto económico del fruto del cacao para Colombia.....	23
2.1.3 Metabolitos presentes en el cacao.....	37
2.1.4 Metabolómica.....	42
2.1.5 Análisis estadístico.....	46
2.2.Estadodelarte.....	50
3.Metodología	60
3.1.Recolección y caracterización de las muestras de cacao.....	60
3.1.1 Análisis físicos.....	62
3.1.2 Determinación del contenido de cadmio.....	63
3.1.3 Prueba sensorial.....	64
3.2.Estandarización de la técnica de extracción de metabolitos -no volátiles- en las muestras de cacao.	68
3.2.1 Proceso de desengrasado.....	68
3.2.2 Extracción de metabolitos de cacao.....	69
3.3. Contenido de fenoles totales en cacao.....	72

3.4. Análisis cromatográfico por UHPLC/MS.....	72
3.4.1 Determinación de la relación teobromina/cafeína en cacao.....	73
3.5. Análisis de datos	74
4. Resultados y discusión.....	77
4.1 Análisis físico, químico y sensorial de las muestras de cacao.....	77
4.1.1 Análisis físico.....	77
4.1.2 Análisis del contenido de cadmio.....	80
4.1.3 Análisis sensorial.....	84
4.2. Optimización del método de extracción de metabolitos de cacao.....	89
4.2.1 Proceso de desengrasado.....	90
4.2.2 Evaluación del solvente de extracción.....	91
3.3 Evaluación de variables de extracción tiempo y temperatura.....	93
4.2.3 Extracción de metabolitos en muestras de cacao en grano.....	97
4.3. Análisis cromatográfico de los extractos.....	100
4.3.1. Tratamiento preliminar de los datos y obtención de las tablas de intensidad de iones.....	100
4.3.2 Relación de análisis fisicoquímicos, sensoriales y metabólico.....	114
5. Conclusiones.....	122
6. Recomendaciones	124
Referencias Bibliográficas	125

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cacao.....	22
Tabla 2. Producción nacional de cacao por departamentos, año 2022.cacao	26
Tabla 3. Funciones biológicas de algunos polifenoles reportados con actividad	38
Tabla 4. Etiquetas de las muestras de granos de cacao recolectadas de diferentes fincas colombianas para el análisis metabolómico.....	61
Tabla 5. Descriptores sensoriales para evaluar las muestras escritores	66
Tabla 6. Solventes evaluados para la extracción de metabolitos en muestra de grano de cacao seco.	70
Tabla 7. Variables evaluadas para la extracción de metabolitos de muestra en grano de cacao seco.	71
Tabla 8. Diseño experimental evaluado para la extracción de metabolitos de muestra de grano seco de cacao Diseño	71
Tabla 9. Resultados de la caracterización física de las muestras de cacao	78
Tabla 10. Resultados de concentración de cadmio, contenido de fenoles totales y relación teobromina/cafeínas	81
Tabla 11. Resultados de los descriptores en sabores básicos, sensación trigeminal, sabores atípicos y puntaje sensorial general de las muestras de cacao	87
Tabla 12. Resultados proceso de desengrasado con <i>n</i> -hexano en muestras de cacao en grano....	90
Tabla 13. Evaluación de solvente de extracción para metabolitos no volátiles en muestras de cacao en grano.....	92

Tabla 14. Contenido de fenoles totales [expresado en mg de ácido gálico (A.G) /g de muestra seca] de acuerdo a la evaluación de condiciones de tiempo y temperatura de extracción.....	94
Tabla 15. Cuantificación de fenoles totales [expresado en mg de ácido gálico (A.G) / g de muestra seca] en la extracción de metabolitos en muestras de cacao en grano.....	98

Lista de Figuras

Figura 1. Porcentaje de producción mundial de cacao en grano (a) por continentes (b) por países durante el año cacaotero 2022/2023	24
Figura 2. Mayores productores mundiales de cacao durante los periodos 2019/20, 2020/21 y 2021/22. Mayores	25
Figura 3. Producción nacional de cacao (ton.) periodo 2008-2022	27
Figura 4. Precio promedio nacional de cacao en grano por kilogramo (\$COP) 2009-2022.....	29
Figura 5. Hectáreas de cacao sembradas en Colombia 2010-2019.....	30
Figura 6. Importaciones y exportaciones de cacao en grano 2008- 2021	33
Figura 7. Precio de las importaciones y exportaciones de cacao en grano 2008- 2021	36
Figura 8. Estructuras químicas de los principales metabolitos secundarios presentes en el cacao	41
Figura 9. Número de publicaciones reportadas en la base de datos de SCOPUS usando como ecuación de búsqueda las palabras claves: a) " <i>Cocoa beans</i> " AND " <i>Metabolomics</i> " AND " <i>Quality</i> " b) " <i>Cocoa</i> " AND " <i>Metabolomics</i> " OR " <i>OMICS</i> "	51
Figura 10. Resultados proceso de desengrasado en la muestra MACP011a	91
Figura 11. Contenido de fenoles totales de acuerdo a la evaluación de solventes de extracción	93
Figura 12. Contenido de fenoles totales de acuerdo a condiciones de extracción evaluadas: tiempo y temperatura	95
Figura 13. Contenido de fenoles totales en muestras de cacao en grano	100
Figura 14. Perfil cromatográfico de corriente iónica total obtenido para la muestra N° 5 (REG) mediante análisis UHPLC/MS	102

Figura 15. Cromatogramas antes (izquierda) y después (derecha) de la corrección de los tiempos de retención y alineación de los datos mediante el uso de XCMS online	103
Figura 16. Box plot y kernel density plots antes y después de la normalización para las muestras y controles de calidad haciendo uso del método seleccionado: Normalization by sum, y el escalado de datos por Autoscaling.....	105
Figura 17. Varianza explicada por los componentes principales. La línea verde representa la varianza acumulada y la línea azul muestra la varianza explicada por cada uno de los componentes principales	106
Figura 18. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los perfiles químicos de muestras de granos de cacao	107
Figura 19. Gráficas de análisis de componentes principales (izquierda) y gráficas de volcán (derecha) de grupos analizados en pares: (a) amarillo vs azul, (b) amarillo vs verde, (c) amarillo vs rojo, (d) azul vs verde, (e) verde vs rojo, (f) azul vs rojo.....	109
Figura 20. Gráficos radiales del análisis sensorial de las muestras de cacao agrupadas según los resultados del PCA: (a) grupos amarillo, (b) azul, (c) verde y (d) rojo.	116
Figura 21. Mapa de calor de los metabolitos identificados (identificación presuntiva) para cada grupo de muestras	118

Lista de Apéndices

Apéndice 1. Etiquetas de las muestras de granos de cacao recolectadas de diferentes fincas colombianas para el análisis metabolómico

Apéndice 2. Resultados de descriptores de aroma prueba sensorial evaluados para muestras de cacao grano

Apéndice 3. Resultados proceso de desengrasado con n-hexano en muestras de cacao en grano

Apéndice 4. Medias del resultado del proceso de desengrasado con n-hexano en muestras de cacao en grano

Apéndice 5. Análisis de varianza para proceso de desengrasado con n-hexano de las muestras de cacao en grano

Apéndice 6. Curva de calibración para fenoles totales método de Folin-Ciocalteu (patrón de Acido Gálico)

Apéndice 7. Evaluación de solventes de extracción para metabolitos no volátiles en muestras de cacao en grano

Apéndice 8. Análisis de varianza para evaluación de solventes de extracción de metabolitos en muestras de cacao en grano.

Apéndice 9. Prueba de múltiples rangos aplicado al contenido de fenoles totales como resultado de la evaluación de solventes de extracción

Apéndice 10. Medias del contenido de fenoles totales resultado de los tratamientos evaluados como solventes de extracción de metabolitos en muestras de cacao en grano.

Apéndice 11. Resultado de la evaluación de las condiciones de tiempo y temperatura de extracción para metabolitos no volátiles en muestras de cacao

Apéndice 12. Análisis de varianza para evaluación de las condiciones de tiempo y temperatura de extracción de metabolitos en muestras de cacao en grano

Apéndice 13. Medias del contenido de fenoles totales resultado de la evaluación de tiempo y temperatura de extracción de metabolitos en muestras de cacao en grano

Apéndice 14. Cuantificación de fenoles totales [expresado en mg de ácido gálico (A.G) / g de muestra seca] en la extracción de metabolitos en muestras de cacao en grano usadas en el presente estudio

Apéndice 15. Análisis de varianza para el contenido de polifenoles para las treinta y seis muestras de cacao usadas en el presente estudio

Apéndice 16. Medias del contenido de fenoles totales para las treinta y seis muestras de cacao en grano usadas en el presente estudio

Apéndice 17. Identificación presuntiva de los metabolitos diferenciales en muestras de cacao en grano usados en el análisis metabolómico

Apéndice 18. Metabolitos diferenciales identificados aumentados o disminuidos en muestras de cacao en grano usados en el análisis metabolómico

Apéndice 19. Espectro de masas experimental de Teobromina obtenido por UHPLC/MS (20eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 20. Espectro de masas experimental de Cafeína obtenido por UHPLC/MS (30eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 21. Espectro de masas experimental de Ácido cumárico por UHPLC/MS (10eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 22. Espectro de masas experimental de 2-Heptanotriol por UHPLC/MS (10eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 23. Espectro de masas experimental de Citrbrasina por UHPLC/MS (20eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 24. Espectro de masas experimental de Anhidrido succínico por UHPLC/MS (20eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 25. Espectro de masas experimental de 2- piperidona por UHPLC/MS (10eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 26. Espectro de masas experimental de Treonina por UHPLC/MS (10eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 27. Espectro de masas experimental de Biotripirrina-a por UHPLC/MS (10eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 28. Espectro de masas experimental de cinamato de heptilo por UHPLC/MS (10eV) (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 29. Patrón isotópico de Teobromina experimental (superior) y reportado (inferior)

Apéndice 30. Patrón isotópico de Cafeína experimental (superior) y reportado (inferior)

* *Nota:* "Los archivos se encuentran adjuntos y se pueden consultar en el Repositorio Institucional."

Abreviaturas

ac	Acuoso
CAESCA	Cacaos especiales de Antioquia y Cesar
CC	Control de calidad
CIB	Corporación para Investigaciones Biológicas
CORPOICA	Corporación de Investigación Agropecuaria
D.E	Desviación estándar
FEDECACAO	Federación de Cacaoteros
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas de Alta Resolución)
ICCO	Organización Internacional del Cacao
ICS	Quimiometría ICS95 10
MS	Mass spectrometry (Espectrometría de masas)
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
NTC	Norma Técnica Colombiana
NIST	National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología)
PCA	Análisis de componentes principales
SPE	Extracción en fase sólida

TON	Tonelada
t_R	Tiempo de retención
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia)
UHPLC/HRMS	Ultra High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia) / High Resolution Mass Spectrometry (Espectrometría De Masas De Alta Resolución)

Resumen

Título: Análisis basado en metabolómica no dirigida como estrategia para identificar patrones químicos característicos en muestras de cacaos especiales. *

Autor: Paula Victoria Bacca Villota **

Palabras Clave: Metabolómica, Metabolómica No Dirigida, Cacaos especiales, UHPLC/HRMS, Análisis de componentes principales, sabor y aroma.

Descripción: Colombia es un destacado productor de cacao fino, según lo indica la Organización Internacional del Cacao. No obstante, la mayor parte de sus exportaciones corresponde al cacao de categoría ordinaria. Varios organismos nacionales se encuentran en proceso de desarrollar plataformas tecnológicas destinadas a permitir que los pequeños productores certifiquen la calidad de sus granos. El propósito fundamental de este estudio fue identificar marcadores químicos distintivos presentes en 36 muestras de granos de cacao originarias de cinco departamentos colombianos, y establecer su relación con las propiedades de calidad del cacao. Con este fin, se llevó a cabo un enfoque de metabolómica no dirigida utilizando UHPLC/HRMS, en combinación con análisis sensoriales y fisicoquímicos. A pesar de que las 36 muestras no presentaron diferencias significativas en cuanto a calidad sensorial, contenido de polifenoles y la relación entre teobromina/cafeína, el análisis estadístico multivariado permitió la diferenciación de las muestras en cuatro grupos distintos. Adicionalmente, se observó una agrupación similar de las muestras en los análisis físicos. Los metabolitos responsables de esta agrupación fueron investigados mediante análisis estadístico univariante y tentativamente identificados mediante la comparación de espectros de masas experimentales con los datos reportados en las bases de datos. En este sentido, se identificaron alcaloides, flavonoides, terpenoides, péptidos, quinolinas y compuestos de azufre como las principales clases de compuestos que permitieron diferenciar entre los grupos de muestras. Esto resalta la relevancia de los perfiles químicos como una huella característica significativa para futuras investigaciones en el control de calidad y la caracterización más precisa del cacao fino.

* Trabajo de investigación

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: William Hidalgo Bucheli. Ciencias Naturales, Ph.D.

Abstract

Title: Untargeted metabolomics-based analysis as a strategy to identify characteristic chemical patterns in specialty cocoa samples. *

Author(s): Paula Victoria Bacca Villota**

Key Words: Metabolomics, Untargeted Metabolomics, Specialty Cocoa, UHPLC/HRMS, Principal Component Analysis, Flavor and Aroma.

Description: Colombia is a leading producer of fine cocoa, according to the International Cocoa Organization. However, most of its exports are of ordinary cocoa. Several national agencies are in the process of developing technological platforms to enable small producers to certify the quality of their beans. The main purpose of this study was to identify distinctive chemical markers present in 36 cocoa bean samples from five Colombian departments, and to establish their relationship with cocoa quality properties. To this end, an untargeted metabolomics approach was carried out using UHPLC/HRMS, in combination with sensory and physicochemical analyses. Although the 36 samples showed no significant differences in sensory quality, polyphenol content and theobromine/caffeine ratio, multivariate statistical analysis allowed the differentiation of the samples into four distinct groups. In addition, a similar clustering of the samples was observed in the physical analyses. The metabolites responsible for this clustering were investigated by univariate statistical analysis and tentatively identified by comparison of experimental mass spectra with data reported in databases. In this sense, alkaloids, flavonoids, terpenoids, peptides, quinolines and sulfur compounds were identified as the main classes of compounds that allowed differentiation between groups of samples. This highlights the relevance of chemical profiles as a significant fingerprint for future research in quality control and more accurate characterization of fine cocoa.

* Research work

** Faculty of Science. School of Chemistry Director: William Hidalgo Bucheli. Natural Sciences, Ph.D.

Introducción

El cacao es un producto muy apetecido en la industria de alimentos alrededor del mundo por sus características organolépticas, demandado principalmente por compañías chocolateras, americanas y europeas, para la elaboración de diversos productos como refrescos, dulces, caramelos, reposterías, bebidas alcohólicas, perfumes, productos cosméticos y medicinales, entre otros (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombia, 2021).

En Colombia, el cultivo de cacao ha venido en crecimiento, pues ha sido priorizado como uno de los productos agrícolas con mayor potencial, gracias al reconocimiento mundial de la calidad de los genotipos que se cultivan en el país y por ende, al tipo de grano de cacao que puede producirse, el cual presenta excelentes propiedades organolépticas (Contreras, 2017). Por esta razón, en 2021, se cosecharon más de 65.000 toneladas de granos de cacao, generando un valor de exportación que superó los 29 millones de US, de acuerdo a las cifras suministradas por el Ministerio de Agricultura (Fedecacao, 2021).

De acuerdo con la Organización Internacional del Cacao (ICCO), Colombia es productor de cacao fino o especial, con granos de alta calidad, textura suave y un aroma excepcional. A pesar de estas cualidades, la mayor parte de la producción se destina al mercado local, mientras que una fracción reducida se comercializa a nivel internacional bajo la categoría de cacao regular (Barrientos *et al.*, 2019). Para mejorar la participación de Colombia en el mercado global de cacao de calidad, es crucial implementar tecnologías y herramientas avanzadas que permitan a los pequeños productores certificar la calidad de sus productos. La calidad del cacao desempeña un papel fundamental en la cadena de valor, ya que influye en la demanda y agrega valor al producto final. De este modo se abren nuevas oportunidades para los productores e investigadores en este

campo; a los primeros, les permitirá ofrecer un producto de calidad más definido y uniforme, capaz de satisfacer las necesidades del cliente y, a los segundos, les brinda un tema que, aunque no es nuevo, requiere estudios detallados que definan criterios de calidad reproducibles en el cacao.

Actualmente, la calidad de los granos de cacao se evalúa mediante una serie de características físicas, químicas y organolépticas, como son: el índice de grano, la prueba de corte, el grado de fermentación, contenido de cadmio, contenido de polifenoles, relación teobromina/cafeína y la evaluación sensorial del licor de cacao para definir las notas de sabor (Aguilar, 2016).

Investigaciones previas acerca de la composición química de los granos de cacao han identificado la presencia de compuestos, tanto volátiles como no volátiles, que están estrechamente relacionados con las características sensoriales de estos granos. Los metabolitos secundarios, como los polifenoles y las metilxantinas, junto con los carbohidratos y las proteínas, desempeñan un papel fundamental en la determinación del sabor y el aroma de los granos de cacao (Figueira & Scotton, 2020).

En particular, los polifenoles son un grupo de compuestos que se encuentran en alta concentración en los granos de cacao y han suscitado un creciente interés en la comunidad científica debido a sus propiedades antioxidantes. Además, estos compuestos aportan sensaciones astringentes y amargas, contribuyendo de manera significativa a los sabores frescos y frutales presentes en los licores de cacao (Aprotosoiaie *et al.*, 2016).

Por otro lado, las metilxantinas, una clase de compuestos no volátiles, también tienen un papel importante. Entre las principales xantinas presentes en el cacao se encuentran la teofilina, la

teobromina y la cafeína (López, 2014). Algunos estudios sugieren que la relación entre la teobromina y la cafeína en los granos de cacao podría servir como un indicador de su calidad, y además se ha determinado que algunas propiedades, como el grado de fermentación de los granos y descriptores de sabor como el amargor, guardan relación con este coeficiente (Calvo *et al.*, 2021; Ordoñez *et al.*, 2020).

En los últimos años, la metabolómica ha emergido como una herramienta valiosa para analizar la composición química de productos naturales y su vinculación con parámetros deseables o exploratorios. En el caso del cacao, se han empleado enfoques metabolómicos específicos para identificar y cuantificar compuestos de interés, como los polifenoles, metilxantinas, catequinas y flavonoides (López, 2014). Otros estudios también han buscado establecer relaciones entre estos compuestos y diversos aspectos, como la procedencia geográfica de las muestras de cacao (Marseglia *et al.*, 2016), la evaluación del estado de fermentación de los granos (Mayorga *et al.*, 2016), así como la investigación de la dinámica de los componentes volátiles y no volátiles (Rodríguez *et al.*, 2011).

No obstante, hasta la fecha, pocos estudios se han enfocado en la identificación de posibles marcadores químicos que estén presentes en las muestras de cacao y que puedan correlacionarse con las propiedades sensoriales deseables y la calidad del grano (Escobar *et al.*, 2021; Fayeulle *et al.*, 2020). En este contexto, la metabolómica no dirigida se presenta como una herramienta particularmente útil, ya que simplifica el proceso analítico para identificar múltiples metabolitos en matrices químicamente diversas, como los granos de cacao, de manera más eficiente y rápida.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo de investigación fue identificar marcadores químicos diferenciales en muestras de cacaos especiales (en grano) que estén relacionados con propiedades organolépticas asociadas a la calidad del cacao.

Los granos de cacao fermentado y seco provenientes de diferentes fincas ubicadas en Maceo (Antioquia), Manaure (Cesar), Santa Marta (Magdalena), San Vicente de Chucurí (Santander) y Norte de Santander, fue la población muestral del presente estudio que hizo parte del macro-proyecto inter-institucional titulado “Mejoramiento de la calidad de los cacaos especiales en Antioquia y Cesar a través de la generación de capacidades y servicios tecnológicos localmente adaptados para incrementar la competitividad en el mercado internacional – proyecto del programa Colombia más competitiva PC+C042-017” cuyo objetivo fue aunar esfuerzos para mejorar la competitividad en la producción y comercialización del cacao en las regiones objeto de estudio, permitiendo el crecimiento económico a través del fortalecimiento del sector productivo del cacao, así como también a través de mejores estrategias de mercado y comercialización a nivel internacional de nuestro producto.

En consecuencia, se espera que estos marcadores químicos contribuyan al desarrollo de una plataforma tecnológica más robusta para certificar la calidad de los granos de cacao producidos por pequeños agricultores en Colombia.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Identificar marcadores químicos diferenciales en muestras de cacaos especiales (en grano) que estén relacionados con propiedades organolépticas asociadas a la calidad del cacao

1.2. Objetivos específicos

Optimizar el método de extracción de metabolitos -no volátiles- de muestras de cacao seco utilizando extracción en fase sólida (SPE)

Determinar el perfil metabolómico diferencial de los extractos metanólicos mediante análisis estadístico uni- y multivariado

Asociar los marcadores químicos característicos de las muestras de cacao con propiedades organolépticas

2. Marco teórico y estado del arte

2.1. Marco teórico

2.1.1 Generalidades y aspectos taxonómicos del cacao

El nombre “Theobroma” fue asignado por David Linneo en 1737 como término científico para nombrar el árbol del cacao y significa “Alimento de los dioses”. Bethan y Hoocker en 1862 fueron quienes clasificaron a la planta como Sterculiaceae. En 1964, Cuatrecasas clasificó las especies del género Theobroma en seis formas por su polimorfismo y tipos intermedios resultado del entrecruzamiento (Batista, 2009). La clasificación taxonómica del cacao se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica del cacao

Sub-reino:	Embriophyta
División:	Espermatofita
Clase:	Angiosperma
Sub-clase:	Dicotiledónea
Orden:	Marvales
Suborden:	Malvinas
Familia:	Esterculiácea
Tribu:	Bitneria
Género:	<i>Theobroma</i>
Especie:	<i>Theobroma cacao</i>

Existen tres tipos de cacao: Criollo, forastero y trinitario. El criollo, es el más raro y escaso (1% de producción mundial) y tiene su origen en América Central y México. Se cultiva en México, Nicaragua, Guatemala, Colombia, Venezuela, Madagascar, Comoras, Sri Lanka, Indonesia (Java)

e Islas Samoa. Estos árboles se caracterizan por ser frágiles, sensibles y de bajo rendimiento, lo cual explica su nivel de producción tan escasa. Su fruto es grande y de color verde o rojo. Los granos son grandes y de color claro. Es un cacao excepcional, aromático y poco amargo (Rojas & Sacristán, 2013).

El forastero, es el más cultivado (80% de producción mundial) y básicamente se cultiva en Perú, Ecuador, Colombia, Brasil y África en general. El árbol que lo produce es muy resistente a las enfermedades, el fruto es de color verde y amarillo cuando madura y los granos son aplanados de un color violeta. Este cacao se obtiene de la mezcla con otros cacaos superiores. Tiene un sabor fuerte y su aroma es amargo y ácido (Rojas & Sacristán, 2013).

El trinitario, este tipo de cacao es un híbrido del cacao forastero y el criollo. En cuanto a la producción a nivel mundial representa entre un 10 - 15%. Normalmente se cultiva en las zonas donde se había plantado anteriormente el cacao Criollo. Se empezó a cultivar en la Isla de Trinidad (Caribe) cuando un ciclón arrasó las plantaciones de este cultivo. Su rendimiento es cercano al del cacao Forastero. Además, es un excelente cacao que en ocasiones reemplaza las plantaciones del tipo Criollo (Rojas & Sacristán, 2013).

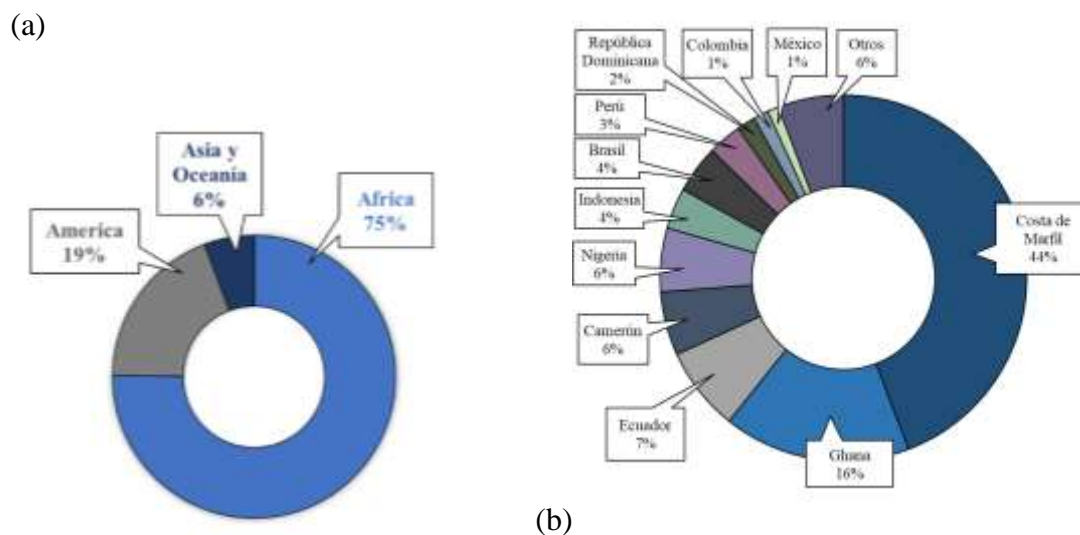
2.1.2 Impacto económico del fruto del cacao para Colombia

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta que se encuentra de manera natural en los bosques de América del Sur, en las regiones del Amazonas y Orinoco. Algunas tribus indígenas de Centro y Suramérica ya la conocían antes de la llegada de los españoles, los cuales le daban gran variedad de usos, incluso, como moneda de gran valor dado por algunas tribus como los Chichimecas, Toltecas y Aztecas (Seguine & Meinhardt, 2014). En la época de la colonización, los españoles llevaron el fruto a África y lo plantaron en zonas de bosque húmedo tropical, por

esta razón el cacao se cultiva principalmente en África del Oeste, siendo Costa de Marfil (44%), el mayor productor a nivel mundial, según las estadísticas registradas hasta el año 2018 (Figura 1 y Figura 2).

Figura 1.

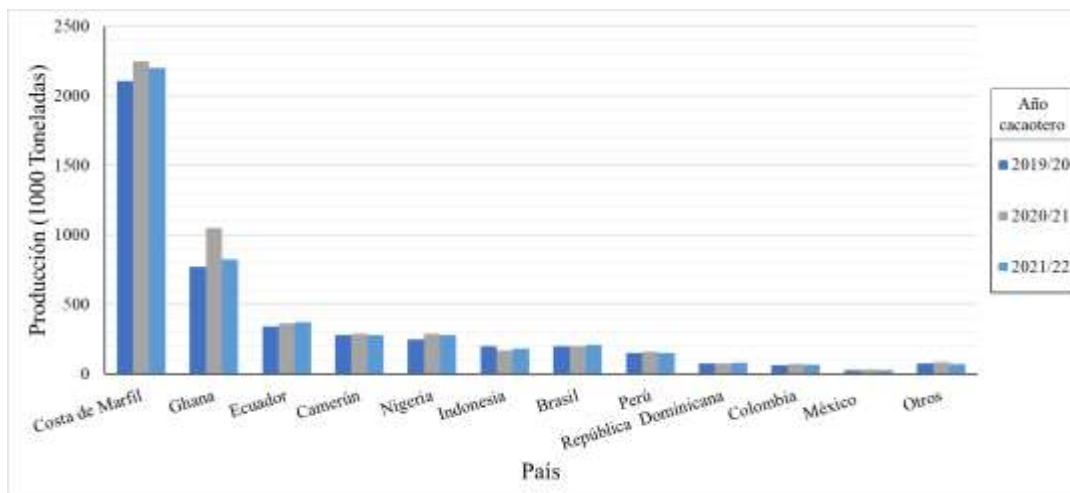
Porcentaje de producción mundial de cacao en grano (a) por continentes (b) por países durante el año cacaotero 2022/2023



Nota. Adaptado de (ICCO, 2022)

Figura 2.

Mayores productores mundiales de cacao durante los periodos 2019/20, 2020/21 y 2021/22



Nota. Adaptado de (Hütz-Adams *et al.*, 2022)

Colombia ocupa el décimo lugar como productor de cacao en el mundo. El cacao se cultiva en casi todo el territorio nacional, pero se concentra básicamente en cuatro zonas agroecológicas: I) Montaña Santandereana, que comprende los departamentos de Santander y Norte de Santander; II) Valles interandinos secos, que comprende los departamentos de Huila, sur del Tolima y norte del Magdalena; III) Bosque húmedo tropical, que comprende las zonas de Urabá, Tumaco, Catatumbo, Arauca, Meta y Magdalena y, IV) Zona Cafetera Marginal Baja: Gran Caldas, suroeste de Antioquia, y norte del Tolima (SIC, 2011). En la Tabla 2, se evidencia que, en el departamento de Santander, se concentra el mayor porcentaje de la producción nacional de cacao, seguido por los departamentos de Huila, Arauca, Antioquia y Tolima. En estos seis departamentos se concentra cerca del 80% de la producción nacional (Fedecacao, 2022b).

Tabla 2.*Producción nacional de cacao por departamentos, año 2022*

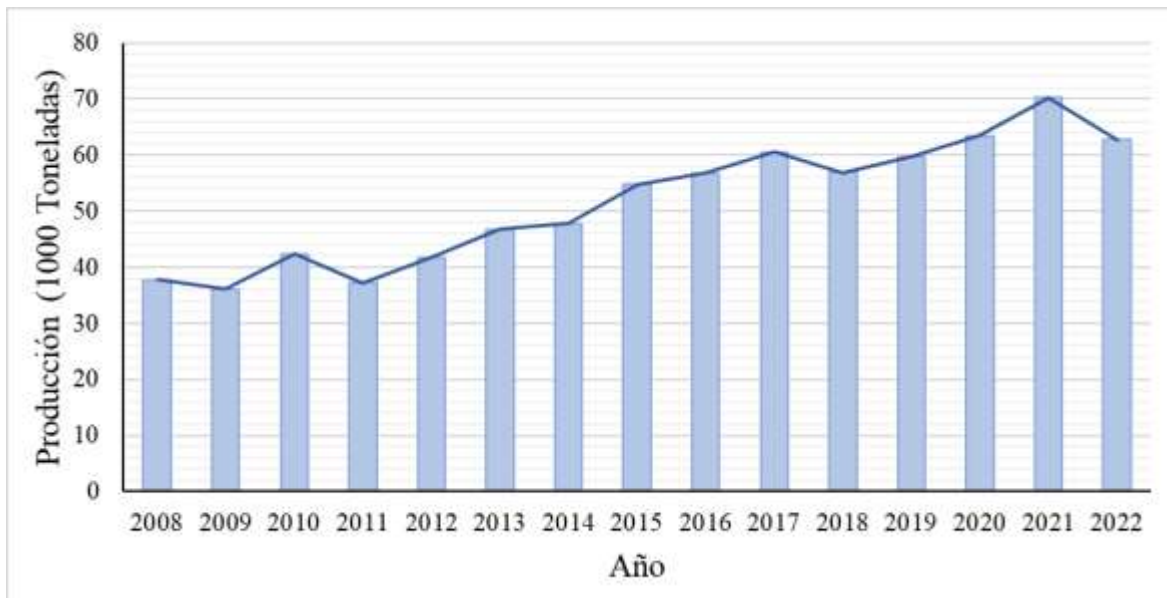
Departamento	Producción (Ton)	Participación nacional (%)
Santander	22899	36,8
Arauca	10520	16,9
Antioquia	5188	8,3
Tolima	3593	5,8
Huila	3518	5,7
Nariño	3372	5,4
Otros departamentos	13068	21,1
Total	62158	100,0

Nota. Fuente: (Fedecacao, 2022b)

De acuerdo con la Federación Nacional de Cacaoteros (Fedecacao, 2022b) , durante los últimos diez años (2012 a 2022) la producción de cacao en el país aumentó en 16.000 toneladas, correspondiente a un crecimiento del 34%. Reportando el año cacaotero 2020/21 una cifra récord de producción (70.205 toneladas de grano seco); sin embargo, el extenso periodo de lluvias en el año subsecuente 2021/22 disminuyó dicha producción en un 11%, debido a que estas condiciones climáticas influyen sobre la producción, aumentando el desarrollo y propagación de enfermedades en el cacao y dificultando la floración del árbol. Por otro lado, esto también dificultó la explotación y transporte del producto a los puntos de compra, situación que se reportó igualmente en 2018, conllevando igualmente a una disminución en la producción nacional de grano (Fedecacao, 2022a) (Figura 3).

Figura 3.

Producción nacional de cacao (ton.) periodo 2008-2022



Nota. Adaptado de (Fedecacao, 2022a)

Si bien la producción de cacao ha venido en aumento, lo que no ha ayudado mucho es su precio. Después de haber alcanzado un valor superior a los \$9.000 el kilogramo en diciembre de 2015, a 2021 solo ha vuelto a alcanzar valores comparables a finales de 2020 y 2021; en efecto, como se presenta en la Figura 4, después de 2016 el precio descendió, pese a que en aquel entonces había rumores sobre la posible escasez en Costa de Marfil, el mayor productor del mundo, luego de un tiempo se evidenció que este país africano, al igual que otros de esa misma región, estaban incrementando sus volúmenes de producción, lo que llevó a que los precios bajaran. Bajo este panorama, la estrategia de los cacaocultores se ha centrado en incrementar la productividad por hectárea (Agro Negocios, 2018). En el 2019, el presidente ejecutivo de Fedecacao, Eduardo Baquero, destacó que en el país hay 176.050 hectáreas sembradas de cacao (Figura 5) y además

señaló que uno de los principales retos del sector es la renovación de 70.000 hectáreas de planta envejecida (Agro Negocios, 2019). En 2021, El ministerio de agricultura (Minagricultura) anunció un plan de renovación de diez mil hectáreas de cacao para mejorar la productividad como primer paso de la meta incluida en el Plan Nacional de Renovación, cuya meta es poner a producir 70.000 hectáreas envejecidas de cacao en el mediano plazo (Fedecacao, 2021b). Dado que Colombia es un tomador de precio regido por la Bolsa de Valores de Nueva York y Londres y, que los precios dependen por lo tanto de la oferta y demanda del producto a nivel mundial, como consecuencia de la pandemia se generó especulación en el mercado, lo cual ha incrementado la volatilidad o variación constante del precio de cacao (Fedecacao, 2021a). Sin embargo, el último año el precio del cacao casi que se ha triplicado. Esto obedece a que África, principalmente Costa de Marfil y Ghana, suministran cerca del 70% de la producción mundial, pero en este momento atraviesa por dificultades. Está siendo azotada por intensas lluvias, las cuales traen consigo una ola de enfermedades a los cultivos. Actualmente en el mundo se habla de una crisis internacional en el mercado del cacao a raíz de la baja producción en África. No obstante, los productores colombianos no muestran inquietud al respecto. Esto se debe a que el mercado nacional apenas representa el 1,5% de la producción mundial. De hecho, Eduard Baquero López, presidente ejecutivo de Fedecacao, sostiene con cierta tranquilidad que la industria y los consumidores en Colombia pueden estar tranquilos, pues la producción para abastecer al país está garantizada. Hay que aprovechar estos momentos para fortalecer las plantaciones y la productividad. Esto no va a durar siempre y en algún momento van a bajar”, advirtió el presidente de Fedecacao.

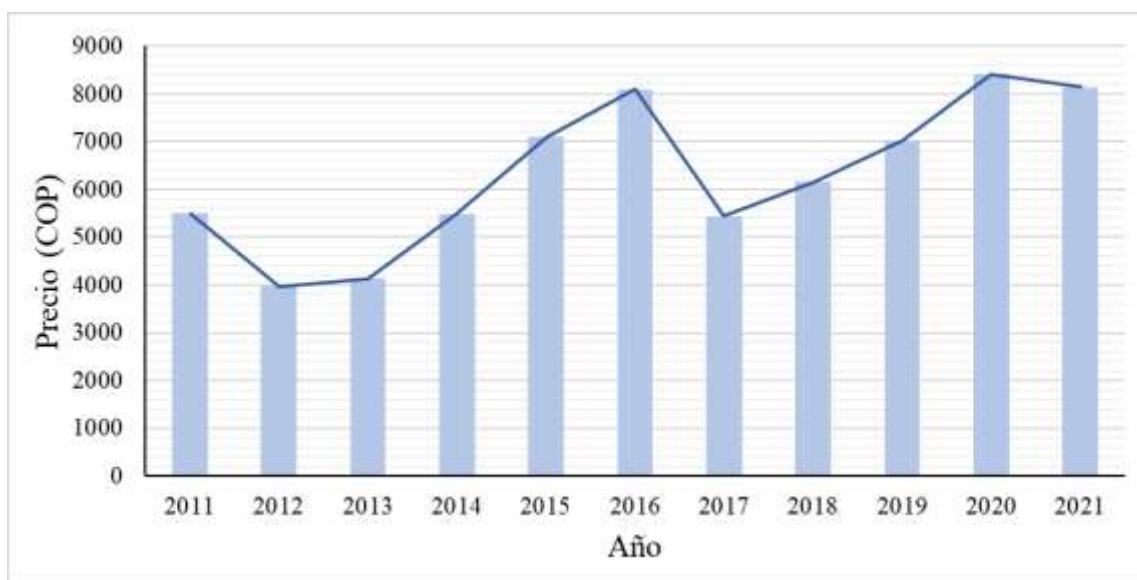
El año pasado, el país produjo unas 60.000 toneladas, se exportaron cerca de 4.000 y se importaron tan solo unas 200.000. En otras palabras, eso quiere decir que Colombia es

autosuficiente en el cultivo de este grano. La demanda anual es de cerca de 45.000 toneladas. (Villamizar, 2024)

La otra cara de la moneda es la de los industriales que necesitan de la materia prima para producir golosinas, confitería y chocolates, lo que ha encarecido estos precios para el consumidor final. Esa misma discusión se ha tenido en el Consejo Nacional Cacaotero que lidera el Ministerio de Agricultura y del que participa la Andi y Fedecacao. La preocupación de los industriales es que estos productos también están sujetos a una presión adicional: los impuestos saludables que entraron en vigencia en noviembre de 2023 y que cobran un impuesto al consumidor de 15% y aumentará al 20% a finales de año. Este incremento, sumado al alza en el costo de la materia prima, podría intensificar el impacto sobre los precios al consumidor, afectando potencialmente el consumo y la demanda de productos derivados del cacao (El colombiano, 2024).

Figura 4.

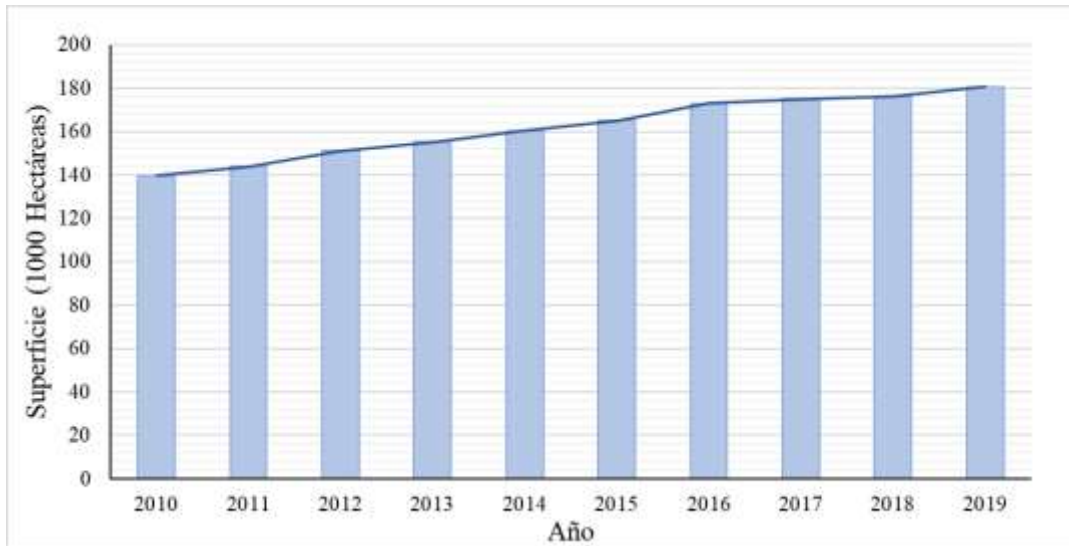
Precio promedio nacional de cacao en grano por kilogramo (\$COP) 2009-2022



Nota. Adaptado de (Fedecacao, 2022a)

Figura 5.

Hectáreas de cacao sembradas en Colombia 2010-2019



Nota. Adaptado de (Fedecacao, 2022a)

De enero a septiembre del 2022, las exportaciones colombianas de productos de cacao o sus derivados fueron equivalentes a US 98,03 millones, lo cual indica que presentaron un crecimiento del 6,8% con respecto al mismo periodo de tiempo en el 2021 (Figura 6). Además, según datos del DANE, entre enero y abril del 2023 fueron exportadas 8.884 toneladas métricas y se han alcanzado ventas por US\$ FOB 39,2 millones.

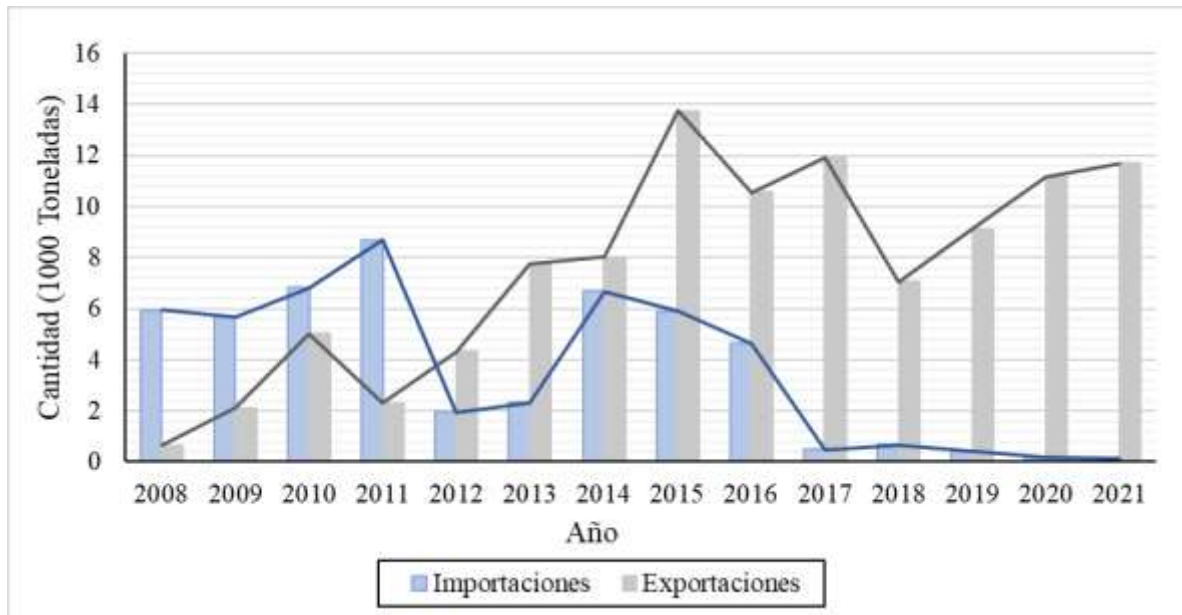
Con este bien, el país ha llegado a destinos como Estados Unidos, México y Canadá, entre muchos otros, y se han preparado los chocolates más exquisitos y de mayor calidad del mundo. Por esto, se identificó que hay un panorama prometedor para la exportación de cacao en Colombia dentro del mercado internacional.

Michel Arrion, director ejecutivo de ICCO afirmó: Colombia ingresa como uno de los 10 productores más importantes de cacao en el mundo. Pero no todo es cuestión de volúmenes, de

cantidades, también es una cuestión de calidad, porque Colombia está produciendo uno de los mejores cacaos del mundo, y principalmente la gran mayoría de la producción del país es fina de sabor y aroma.

Entre los destinos más prometedores para exportar cacao colombiano se encuentran Países Bajos y Alemania. Estos fueron reconocidos, en el 2021, como unos de los principales países consumidores de cacao en el mundo y hacen parte del grupo de los países importadores dentro de la ICCO. Otro destino que se destaca es Estados Unidos, ya que también hace parte de los países con mayor demanda del cacao y tiene fuertes lazos comerciales con Colombia. Finalmente, Suiza, al ser uno de los lugares del mundo que más ha sido reconocido por la calidad de sus chocolates y siendo miembro importador de la ICCO, es un destino atractivo al que exportadores colombianos que deseen alcanzar los mercados más sofisticados en el mundo pueden aspirar a llegar. (ProColombia, 2023). Por el contrario, las importaciones de cacao llegaron a un mínimo histórico (

Figura 6), evidenciando que el país cuenta con la materia prima necesaria para abastecer la demanda interna y se tienen excedentes para la exportación, pasando de importar 6'700.000 toneladas en 2014, a 1.300 en 2021, es decir, una reducción del 98% (Fedecacao, 2022a) .

Figura 6.*Importaciones y exportaciones de cacao en grano 2008- 2021*

Nota. Adaptado de (Fedecacao, 2022a)

Otro aspecto importante del cacao es en el ámbito social, ya que es uno de los productos líderes en la sustitución de cultivos ilícitos en el proceso de posconflicto para el país. Los productores de cacao tienen la firme certeza de que es una vía alternativa lícita para crear desarrollo y sostenibilidad en las zonas rurales del país, dándole la oportunidad a las comunidades afectadas de tener una estabilidad económica por un medio legal con un producto de alta competitividad mundial, debido a que Colombia cuenta con un excelente fruto de aroma y calidad. La cooperación internacional está interesada en realizar proyectos que ayuden en el proceso de posconflicto y que tengan relación con el cacao, uno de los más importantes es CACAO POR LA PAZ implementado por USAID (Agency for International Development), la agencia de Cooperación Internacional de Estados Unidos. La inversión a este producto va a generar grandes beneficios en el proceso de

desarme, desmovilización y reinserción por parte de las FARC; evidenciando así una inclusión social con la que se busca mejor calidad de vida que genere sostenibilidad, por el momento los resultados que se plantean son la creación de viveros de cacao *heirloom*, capacitando a 110 personas en productividad agrícola o seguridad alimentaria, establecer una fundación de investigación de cacao e investigar, desarrollar o transferir diez tecnologías o prácticas de manejo en beneficio de la producción de cacao, todo esto deberá llevarse a cabo entre los años 2022 a 2026 (USAID, 2021) . Esto representa una alternativa de gran importancia ya que no solo va a contribuir de gran manera al proceso de posconflicto, sino que a su vez va a generar desarrollo productivo y económico al país.

En relación con los programas de sustitución de cultivos, la ministra de Agricultura y Desarrollo Rural enfatizó el papel destacado del cacao. Explicó que existe una coincidencia entre las áreas con potencial para el cultivo de cacao y las áreas donde hay presencia de cultivos de coca. Esto proporciona una oportunidad para que las comunidades que dependen de la coca puedan optar voluntariamente por la sustitución de cultivos, convirtiendo al cacao en una alternativa viable. Además, añadió que el cacao se considera una solución dentro de la nueva política antidrogas.

En el nuevo enfoque de las políticas antidrogas, dentro del gobierno de Gustavo Petro, se está llevando a cabo una transformación significativa. Este enfoque ya no adopta una postura represiva hacia los cultivadores, sino que busca integrarlos en las soluciones frente a los cultivos de uso ilícito. Por eso, en la actualidad, se está trabajando para que la producción de cacao prácticamente se duplique. Actualmente, se produce un promedio de 62,000 toneladas, pero se aspira a alcanzar las 126,000 toneladas anuales. (Zapata, 2023)

La ministra resaltó los logros alcanzados mediante la administración de los recursos del Fondo Nacional del Cacao por parte de FEDECACAO. Destacó que el cacao presenta una versatilidad que permite su combinación con la agricultura de subsistencia. Además, enfatizó su enorme potencial de crecimiento y su capacidad para impulsar la economía agrícola. Estos aspectos coinciden con los enfoques prioritarios de su programa de gobierno: primero, es cultivado por familias campesinas bajo esquemas de economía familiar y comunitaria; segundo, se intercala con productos que contribuyen a la seguridad alimentaria; y tercero, es un cultivo agroforestal. Por todas estas razones, el cacao se convierte en un aliado fundamental para el desarrollo agrícola y económico del país.

La ministra anunció que los proyectos de sustitución tendrán un enfoque prioritario en regiones con altos índices de cultivos ilícitos como Catatumbo, el Pacífico nariñense, el Pacífico caucano, Putumayo, Arauca, Meta y Guaviare. También incluirán a los cultivadores de coca que solicitan participar en programas de sustitución. Estos programas tendrán como primera opción el cultivo de cacao y como segunda opción el cultivo de café. (Fedecacao, 2023)

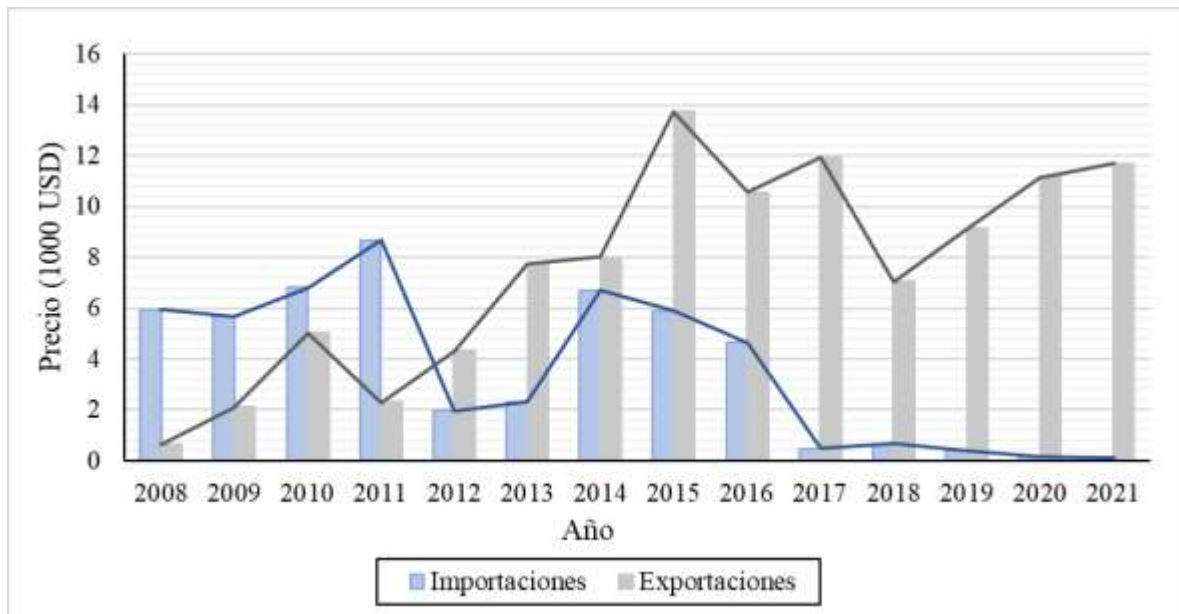
El más reciente Plan Nacional de Desarrollo del Cacao 2022, propone la renovación de 80.000 hectáreas, de las cuales ya han sido renovadas 33.000, y para el año 2023 se proyectó renovar 5.000 más; al respecto, para el año 2022, se renovaron más de 11.000 hectáreas en 23 departamentos, con el apoyo del Ministerio, el Fondo Nacional del Cacao, la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), la Gobernación de Santander y la alcaldía de San Vicente de Chucurí.

Según datos del Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE) de Colombia, en el año 2021, las exportaciones de cacao y productos derivados alcanzaron los más

de 200 millones de US de los cuales 30 millones correspondieron a la exportación únicamente del grano (Figura 7) (OEC, 2022). Estos ingresos representaron una contribución significativa a la economía colombiana, de una parte, por los ingresos generados por las exportaciones y, de otra, debido a que 850 empresas colombianas se dedican a la elaboración de derivados del cacao, chocolate y confitería, de las cuales el 99% son micro y pequeñas empresas, con presencia en 26 departamentos del país. Además, el DANE indicó que la industria de chocolatería y confitería aportó \$1,16 billones de pesos a la producción nacional, lo que representó el 2,95% del Producto Interno Bruto (PIB) de la industria de alimentos durante 2022 (ANDI, 2023; Infobae, 2023)

Figura 7.

Precio de las importaciones y exportaciones de cacao en grano 2008 - 2021



Nota. Adaptado de (Perez & Cajiao, 2019)

En el año 2023, el cacao fue identificado, según AGRONEGOCIOS, como uno de los cinco productos más agroexportables, presente en más de 500 municipios de 30 departamentos y generó alrededor de 174.000 empleos directos e indirectos (Agro Negocios, 2023).

Finalmente, en marzo de 2024, el Grupo Nutresa, a través de la Compañía Nacional de Chocolates, lanzó un nuevo programa de alto impacto para continuar el fortalecimiento de la cadena de cacao en Colombia con seis compromisos a este sector en el país que ascienden a \$1,5 billones en los próximos 10 años para asociaciones de campesinos y cooperativas, lo que, según Carlos Ignacio Gallego, presidente de Nutresa, es un importante aporte al desarrollo territorial y la productividad en el campo colombiano. Existe un potencial de 2,8 millones de hectáreas aptas para el cultivo de cacao. Este cultivo tiene 100% de mercado y queremos que el cacao sea una potencia de ingresos y de buen trabajo (Gonzales, 2024).

2.1.3 *Metabolitos presentes en el cacao*

Los metabolitos secundarios son todos aquellos compuestos producidos por un organismo como plantas, bacterias, hongos, entre otros, que no están involucrados en el crecimiento y demás funciones esenciales (Thirumurugan *et al.*, 2018). En el caso del cacao, los metabolitos secundarios más importantes son los polifenoles y metilxantinas (Figura 8), estos compuestos se encuentran en el grupo de compuestos no volátiles junto a los carbohidratos y las proteínas, que son responsables del sabor y aroma del cacao al igual que los terpenos que son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que dan características organolépticas (aroma y sabor), no solo se utilizan por la aromaterapia, sino que también están aprobados como saborizantes en la industria alimentaria al ser compuestos no tóxicos. (Gardea *et al.*, 2017) .

Los polifenoles se consideran el grupo más grande de compuestos de origen vegetal con más de 8.000 moléculas conocidas presentes en frutas, vegetales, cortezas, flores y semillas. Estos compuestos orgánicos han despertado cierto interés en la comunidad científica debido a su vasta gama de funciones biológicas beneficiosas para los seres humanos, las cuales se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3.

Funciones biológicas de algunos polifenoles reportados con actividad

Propiedad	Mecanismo biológico
Actividad antioxidante	Actúan como eliminadores de radicales libres, protegiendo las células y tejidos del daño oxidativo causado por los radicales libres, al restaurar el equilibrio redox. El estrés oxidativo se ha relacionado con diversas enfermedades crónicas, como enfermedades cardíacas, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Cory <i>et al.</i> , 2018; Li <i>et al.</i> , 2021).
Antiinflamatorio	Pueden inhibir la producción de mediadores inflamatorios en el cuerpo, lo que ayuda a reducir la inflamación crónica, la cual se asocia a su vez con una variedad de patologías como cardiopatías, diabetes tipo 2, artritis y enfermedades del tracto digestivo (Cory <i>et al.</i> , 2018; Li <i>et al.</i> , 2021).
Protección cardiovascular	Tienen efectos protectores para la salud cardiovascular. Pueden mejorar la función de los vasos sanguíneos, reducir la presión arterial, disminuir los niveles de colesterol LDL (colesterol "malo") y reducir el riesgo de formación de coágulos sanguíneos, pudiendo ayudar a prevenir enfermedades cardíacas y accidentes cerebrovasculares (Cory <i>et al.</i> , 2018; Li <i>et al.</i> , 2021).
Regulación de la glucosa en sangre	Algunos polifenoles, como los presentes en el té verde y el cacao, han demostrado tener efectos beneficiosos en la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Pueden mejorar la sensibilidad a la insulina, ayudar a controlar el azúcar en la

	sangre y prevenir el desarrollo de la diabetes tipo 2. (Cory <i>et al.</i> , 2018; Li <i>et al.</i> , 2021)
Acción anticancerígena	Se ha descubierto que algunos polifenoles tienen propiedades anticancerígenas. Pueden inhibir el crecimiento y la proliferación de células cancerosas, así como inducir la muerte celular programada (apoptosis) en células cancerosas. Además, los polifenoles pueden ayudar a prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos en tumores (angiogénesis) y bloquear la invasión y metástasis de células cancerosas. (Cory <i>et al.</i> , 2018; SIC, 2011)
Protección neuronal	Pueden ejercer efectos protectores sobre las células nerviosas en el cerebro. Se ha demostrado que tienen propiedades neuroprotectoras y pueden ayudar a prevenir o retrasar enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson. Además, los polifenoles pueden mejorar la función cognitiva y proteger contra el deterioro cognitivo relacionado con la edad (Cory <i>et al.</i> , 2018; Danezis <i>et al.</i> , 2016)
Actividad antimicrobiana	Actúan de diversas formas para inhibir el crecimiento bacteriano. Algunos polifenoles pueden dañar la membrana celular de las bacterias, lo que conduce a la lisis celular y la muerte bacteriana. Otros polifenoles pueden interferir con las enzimas y procesos metabólicos esenciales para la supervivencia de las bacterias. También se ha observado que los polifenoles pueden inhibir la formación de biopelículas (comunidades bacterianas organizadas que pueden adherirse a superficies y ser resistentes a los antibióticos convencionales). (Daglia, 2012; El Moussaoui <i>et al.</i> , 2019; Hamidpour <i>et al.</i> , 2015)
Actividad antifúngica	Pueden dañar la membrana celular de los hongos y alterar su metabolismo, lo que resulta en su muerte. Algunos estudios también han demostrado que los polifenoles pueden inhibir la formación de estructuras fúngicas como las hifas, que son importantes para la invasión y propagación de los hongos. (Daglia, 2012; El Moussaoui <i>et al.</i> , 2019; Hamidpour <i>et al.</i> , 2015)

Las almendras de cacao son una rica fuente de polifenoles; estos compuestos confieren sensaciones astringentes, amargas y contribuyen significativamente a los sabores verdes y afrutados de los licores de cacao. Algunos de los polifenoles más importantes presentes en el cacao corresponden a epicatequina, catequina y las proantocianidinas B1 y B2 (Castellanos *et al.*, 2007).

Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isopreno que están constituidos por cinco átomos de carbono. Es la polimerización lo que da lugar a la clasificación, las categorías son: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos. Los terpenoides tienen importancia por su uso como aromas y fragancias; algunos otros tienen importancia medicinal. Entre los metabolitos secundarios del cacao se han reportado dos compuestos pertenecientes a la familia de los terpenos, el *cis*-óxido-linanol y linalol (Perea *et al.*, 2013).

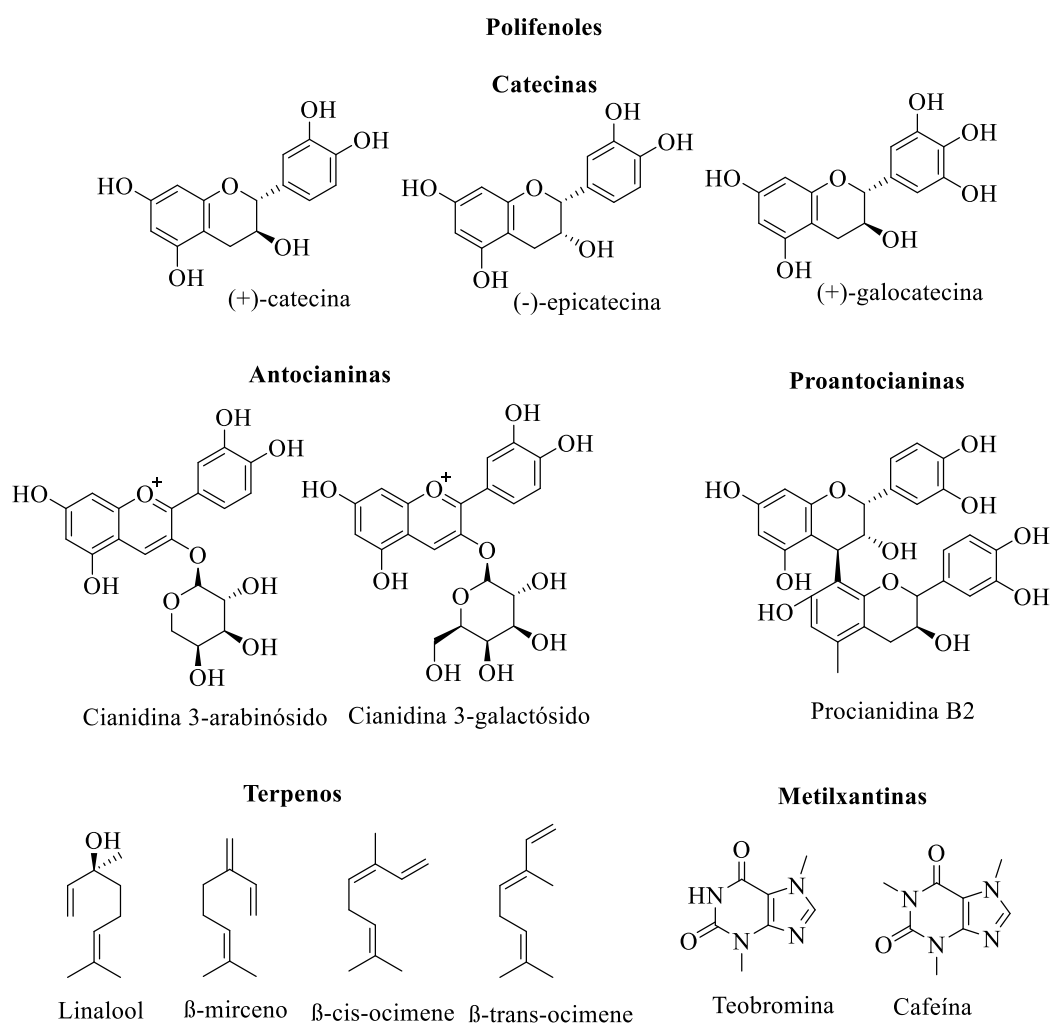
Los alcaloides, específicamente las metilxantinas, son derivados N-metilados de las xantinas. Las tres principales metilxantinas en cacao corresponden a cafeína, teobromina y teofilina. La teobromina (3,7-dimetilxantina) es la purina alcaloide más importante; tiene un efecto estimulante, suave y duradero. Las semillas de cacao contienen entre 1-4% de teobromina y entre 0,2 - 0,5% de cafeína. La relación teobromina/cafeína en almendras de cacao puede resultar en un indicio de “fineza” (Carrillo *et al.*, 2014; Espín *et al.*, 2007; Sotelo & Alvarez, 1991).

Por otra parte, se han identificado alrededor de 600 compuestos volátiles que también son contribuyentes al sabor del cacao. Incluyen varias clases químicas tales como aldehídos, cetonas, ésteres, alcoholes, pirazinas, quinoxalinas, furanos, pirógenos, lactonas, pirroles y dicetopiperazinas (Ramli *et al.*, 2006). Por ejemplo, el 2-heptanol y 2-feniletanol son alcoholes principales en semillas tostadas. Además, el 2-feniletanol es el compuesto más odor-activo en los

cacaos secos y fermentados. El 2-metilbutanal y el 3-metilbutanal que surgen durante la fermentación producen notas de malta y chocolate en el cacao sin tostar y tostado. La acetofenona determina las notas dulces (Al-Owaisi *et al.*, 2014).

Figura 8.

Estructuras químicas de los principales metabolitos secundarios presentes en el cacao



2.1.4 Metabolómica

La metabolómica se enfoca en la detección, cuantificación y elucidación de la estructura química de los metabolitos, los cuales presentan una notoria diversidad en sus características físico-químicas y estructuras moleculares. Dentro de esta amplia variedad de compuestos, se distinguen dos categorías: los metabolitos endógenos, que incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, azúcares, vitaminas, cofactores, pigmentos, antibióticos, entre otros, y son generados de forma natural por un organismo; y los metabolitos exógenos, como fármacos, contaminantes ambientales, aditivos alimentarios, toxinas y otros xenobióticos, que provienen de la interacción con el entorno (Instituto Roche, 2019).

Esta amplia gama de moléculas se caracteriza por diversas propiedades, como polaridad, peso molecular, grupos funcionales, estabilidad y reactividad química, entre otras. Como resultado, se requiere el empleo de múltiples plataformas y configuraciones analíticas para lograr la máxima cobertura en el análisis del metaboloma. Esta necesidad de diversidad analítica contrasta con los experimentos de genómica y proteómica, que no enfrentan un desafío similar en términos de variedad de moléculas (Yanes, 2015).

Las dos principales plataformas tecnológicas empleadas para la identificación y cuantificación de metabolitos son la resonancia magnética nuclear (NMR, Nuclear magnetic resonance) y la espectrometría de masas (MS, Mass spectrometry). La técnica de MS suele estar acoplada a técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida (LC-MS, Liquid chromatography–Mass spectrometry), la cromatografía de gases (GC-MS, Gas chromatography–Mass spectrometry) o, en menor medida, la electroforesis capilar (CE-MS, Capillary electrophoresis–Mass spectrometry). Debido a la diversidad de estas plataformas analíticas y a la

complejidad química de los metabolitos, la identificación de las estructuras de estos compuestos se ha convertido en un desafío principal en la conversión de los datos crudos de NMR y MS en conocimiento bioquímico. (Yanes, 2015).

A pesar de que la identificación de metabolitos y proteínas se basa en la técnica de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), la diferencia clave es que los espectros de fragmentación de los metabolitos suelen ser impredecibles, a diferencia de los datos de MS/MS para péptidos y proteínas (Gerlich & Neumann, 2013). La identificación de metabolitos se logra al comparar la similitud de los valores espectrales experimentales con los de un estándar puro o comparación con los espectros reportados en bases de datos y literatura científica. Estos estándares suelen estar disponibles en bases de datos o ser adquiridos por el propio laboratorio. Por lo tanto, las bases de datos y bibliotecas espectrales, se convierten en herramientas esenciales para convertir los datos brutos en identificaciones de metabolitos y, en última instancia, en conocimiento bioquímico (Allen *et al.*, 2014).

La cantidad exacta de metabolitos reportados en bases de datos puede variar y cambiar con el tiempo, ya que la investigación en metabolómica es un campo activo y en constante evolución. Por ejemplo, la Biblioteca Espectral de Metabolitos de alta Resolución de SCIEX 2.0 (AMMSL, por sus siglas en inglés Accurate Mass Metabolite Spectral Library) está conformada por 650 compuestos. Sin embargo, hay muchas otras bases de datos y bibliotecas de metabolitos, cada una con su propio conjunto de compuestos. NIST 17: 13808 compuestos que proporcionan la cobertura más amplia de compuestos exógenos y endógenos con 29507 Espectros de MS/MS. METLIN:24678 metabolitos, incluyendo aproximadamente 8000 lípidos. Además, incluye alrededor de 670 tiempos de retención. METLIN permite realizar búsquedas en lotes o individuales

basadas en la masa exacta. MoNA: un reservorio colaborativo centralizado de metadatos y auto-revisado de 13038 metabolitos (Proos, 2020).

Como se mencionó previamente, la metabolómica se encuentra en una situación de gran complejidad química, analítica y computacional. Esto la convierte posiblemente en la disciplina más multidisciplinaria dentro de las ciencias ómicas. En la actualidad, se requiere la integración del conocimiento de diversas ramas científicas, incluyendo la ingeniería electrónica para el procesamiento de señales espectrales, la química analítica y orgánica para la detección y caracterización de metabolitos, la bioestadística y la física estadística para el análisis de datos, y, por supuesto, la bioquímica para la interpretación biológica de estos datos (Yanes, 2015).

El primer paso para realizar un experimento metabolómico es decidir qué metabolitos se quieren medir. En algunos casos, es posible que solo se quiera medir un pequeño número de metabolitos específicos, en cuyo caso se utiliza un “enfoque dirigido”. En otros casos, es posible que se quiera medir una amplia gama de metabolitos, en cuyo caso se utiliza un “enfoque abierto o no dirigido”. El número y las propiedades químicas de los metabolitos estudiados son factores importantes que determinan el éxito de un experimento en metabolómica (Yanes, 2015). A continuación, se describirá en más detalle los dos enfoques utilizados en metabolómica.

2.1.4.1. *Metabolómica dirigida*

La metabolómica dirigida es un enfoque que se centra en la medición de un pequeño número de metabolitos específicos, seleccionados en función de su relevancia para una vía metabólica o proceso biológico concreto. Este enfoque es útil para investigar hipótesis específicas sobre el metabolismo, como el efecto de un fármaco o una modificación genética en una enzima (Northen *et al.*, 2007; Yanes, 2015).

Los avances en espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (NMR) aportan beneficios a la metabolómica dirigida. Sin embargo, existe una variedad de herramientas analíticas adicionales que podrían ser consideradas. Aunque el término "metabolómica dirigida" es relativamente nuevo, existen numerosos protocolos optimizados para preparar y analizar metabolitos específicos en diversas muestras biológicas. Las principales ventajas de los estudios de metabolómica dirigida incluyen su alta especificidad, reproducibilidad cuantitativa, gran sensibilidad con límites de detección y cuantificación muy bajos, y un alto rendimiento analítico (Yanes, 2015).

2.1.4.2. *Metabolómica no dirigida*

La metabolómica no dirigida es un enfoque que se centra en la medición de un gran número de metabolitos a la vez, sin la necesidad de una hipótesis específica. Sin embargo, esto no significa que se trate de un experimento improvisado. Cuanta más información tengamos sobre los metadatos, los resultados previos disponibles y el contexto bioquímico del problema que queremos abordar, más fácil será diseñar un experimento de metabolómica efectivo utilizando la plataforma analítica más adecuada. Esto es especialmente crucial en el caso de la espectrometría de masas (MS), dada la diversidad de técnicas de ionización y analizadores de masas disponibles (Calavia *et al.*, 2012).

Los datos generados en metabolómica no dirigida son de una gran complejidad, especialmente en equipos de espectrometría de masas de alta resolución, donde cada muestra produce archivos gigantescos que contienen miles de señales espectrales. Para lidiar con esta complejidad, resulta fundamental contar con herramientas computacionales y enfoques quimiométricos que desempeñen un papel esencial en el análisis de estos datos (Yanes, 2015).

2.1.5 *Análisis estadístico*

El proceso de identificación de especies químicas en metodologías no dirigidas comienza con el tratamiento preliminar de los datos crudos. En el caso de las metodologías basadas en HPLC-MS, los archivos “raw o crudos” corresponden a listas de triadas de datos de tiempo de retención (tR), relación masa/carga (m/z); y número de iones (Ebbels & De Iorio, 2011). En la mayoría de los análisis metabolómicos, los datos no se examinan en su formato original debido a su complejidad, la posible presencia de factores confusos y la existencia de formatos de archivo específicos de cada fabricante. Por lo tanto, se requiere el uso de herramientas informáticas que transformen estos datos crudos (provenientes de cada sistema analítico) en archivos con un formato universal que pueda ser procesado, interpretado y analizado estadísticamente mediante herramientas bioinformáticas (Theodoridis *et al.*, 2013). De esta manera, los archivos crudos pueden ser procesados por plataformas especializadas, donde se lleva a cabo la detección de picos, la deconvolución, la corrección de los tiempos de retención, la sustracción del ruido de fondo y la integración de las señales. Estas plataformas digitales tienen en cuenta los parámetros utilizados en las fases de separación cromatográfica y detección mediante espectrometría de masas. Los datos resultantes de este preprocesamiento se organizan finalmente en arreglos matriciales, donde cada vector representa la replicación de una muestra y sus componentes representan la intensidad medida de los iones que componen su espectro de masas completo (Ebbels & De Iorio, 2011).

La forma en que se llevan a cabo los análisis estadísticos en metodologías de metabolómica no dirigida depende en gran medida de los objetivos del estudio. En términos generales, los principales objetivos de cualquier análisis estadístico en metabolómica son la clasificación y diferenciación de los individuos estudiados en diversos grupos, fundamentada en sus perfiles

químicos; la determinación de diferencias significativas entre los grupos de muestras en relación con un fenotipo, tratamiento o estado biológico de interés; y, finalmente, la identificación de los metabolitos diferenciales que explican las disparidades observadas en los perfiles químicos (Ebbels & De Iorio, 2011)

Los enfoques estadísticos multivariados más comúnmente empleados incluyen el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés, Principal Component Analysis) y el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés) (Smilde *et al.*, 2013). Los dos enfoques buscan realizar transformaciones lineales de variables significativas para generar un par de nuevas variables, mutuamente ortogonales, denominadas "componentes". Estas componentes permiten explicar la varianza observada en los perfiles químicos de las muestras, al tiempo que logran reducir la dimensionalidad de las matrices de datos que las representan. (Chen *et al.*, 2022).

El análisis de Componentes Principales (PCA) se fundamenta en una exploración no supervisada de la pareja de componentes principales que pueda explicar la máxima variabilidad observada. Esta explicación se representa gráficamente mediante proyecciones de cada uno de los vectores de la matriz (cada muestra) sobre los dos componentes. El resultado de estas operaciones se materializa en una gráfica de *scores*, donde los ejes coordenados corresponden a los dos componentes principales y cada punto representa una información completa del espectro de masas de una réplica (Miller & Miller, 2018). En consonancia con esto, los puntos que exhiben una agrupación reflejan perfiles químicos similares, mientras que los puntos más distantes en el gráfico de *scores* indican perfiles químicos diferentes. Esto posibilita la categorización no supervisada de las muestras estudiadas según su similitud química.

Al igual que el PCA, el PLS-DA busca identificar similitudes y diferencias en los perfiles metabólicos de las muestras a través de gráficos de scores. Sin embargo, a diferencia del PCA, este método multivariado tiene en cuenta la existencia previa de grupos de muestras definidos. Por lo tanto, se esfuerza por explicar de manera más eficiente la varianza existente entre los dos grupos predefinidos mediante un modelo de regresión. Además, el PLS-DA facilita la realización del proceso de validación cruzada a través del estadístico Q^2 , el cual representa una medida del error del modelo matemático para categorizar y predecir la pertenencia de las muestras a un grupo, teniendo en cuenta su similitud química (Szymańska *et al.*, 2012). En investigaciones de metabolómica, este proceso de validación garantiza que los metabolitos elegidos como potenciales biomarcadores de algún efecto de interés estén directamente implicados en la explicación de las disparidades observadas en la separación de los gráficos de Score del PLS-DA (Pang *et al.*, 2022).

Ambos enfoques de análisis multivariado son ampliamente empleados en investigaciones metabolómicas, y se recomienda interpretar sus resultados de manera conjunta para evitar problemas de sobreajuste de los datos metabolómicos derivados de los modelos de regresión inherentes al PLS-DA (Chen *et al.*, 2022).

Después de establecer la clasificación de las muestras mediante estos métodos, suele seguirse una estrategia que permita evaluar la significancia estadística de las relaciones (m/z) responsables de las agrupaciones formadas. Para este propósito, se utilizan métodos estadísticos univariados como gráficos de volcán, análisis de veces de cambio (fold-change) y la prueba t de Student (Chen *et al.*, 2022). Estos métodos facilitan la identificación de características de relación masa carga (o características, que representan un compuesto químico) que superan un umbral de significancia

estadística determinado, lo que las convierte en posibles metabolitos modulados de manera diferente por la acción del tratamiento u otro objetivo de estudio, según sea el caso.

Los análisis mencionados hasta ahora suelen ser la etapa que requiere más tiempo y esfuerzo por parte de los investigadores en los estudios metabolómicos (Theodoridis *et al.*, 2013). Por lo tanto, estas actividades deben llevarse a cabo antes de avanzar con la identificación de los metabolitos afectados por el tratamiento. Las relaciones (m/z) de relevancia estadística se someten luego al proceso de anotación, que implica la generación de listas de posibles candidatos mediante su búsqueda en diversas bases de datos. Una vez que se determinan los posibles metabolitos modulados diferencialmente, se procede a llevar a cabo su identificación presuntiva o confirmatoria, según sea el caso (Hopfgartner *et al.*, 2013).

Al igual que la mayor parte del proceso en los estudios metabolómicos, la identificación de metabolitos también está condicionada por el tipo de estudio y los objetivos establecidos. En términos generales, la sociedad internacional de metabolómica recomienda que, en estudios no dirigidos, se alcance un nivel de identificación presuntiva donde se establezca la fórmula molecular y la estructura probable del metabolito (Gil-de-la-Fuente *et al.*, 2019). Por otro lado, para investigaciones basadas en metodologías dirigidas, es necesario alcanzar una identificación inequívoca y confirmatoria de los analitos.

La determinación de la identidad química de los metabolitos en estudios no dirigidos implica la comparación de las masas exactas y las abundancias de los picos diagnósticos identificados en el modo de operación *full-scan* con la información almacenada en bibliotecas de espectros de masas como Metlin, ChemSpider, Human Metabolome Database (HMDB), MassBank, entre otras (Chatzimitakos & Stalikas, 2016).

2.2. Estado del arte

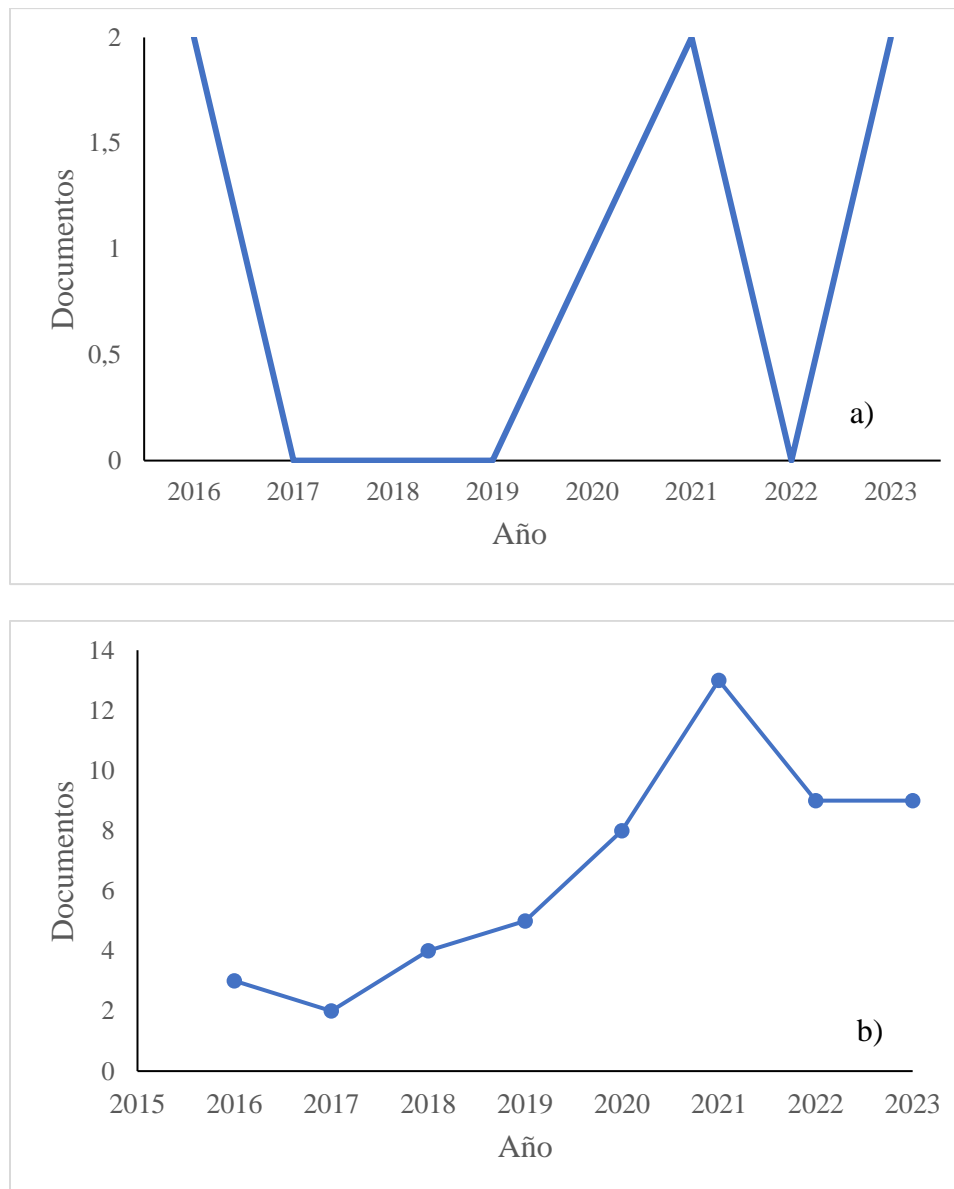
Al realizar una búsqueda bibliográfica sobre el tema de la presente investigación, se consultó la base de datos SCOPUS. Al emplear la ecuación de búsqueda con las palabras clave "*Cocoa beans*" AND "*Metabolomics*" AND "*Quality*", se observó que el número de publicaciones científicas desde el año 2016 hasta 2023 es reducido, con tan solo 7 documentos encontrados. Cabe destacar que Colombia figura como uno de los países que más contribuyó con publicaciones científicas, al igual que Francia. Sin embargo, es importante señalar que la cantidad total de documentos es limitada.

Al ampliar la búsqueda utilizando las palabras clave "*Cocoa*" AND "*Metabolomics*" OR "*OMICS*", se observó un notable aumento en el número de publicaciones, alcanzando un total de 70. En este caso, España se destacó como el principal contribuyente a la producción científica en el tema. Este hallazgo sugiere un interés significativo y una activa participación de la comunidad científica en la investigación relacionada con el cacao y la metabolómica.

Estos resultados preliminares indican que el tema de estudio posee un respaldo científico, aunque la disponibilidad de información puede variar según las palabras clave utilizadas en la búsqueda. Es crucial considerar estos hallazgos al desarrollar la revisión bibliográfica y contextualizar la investigación dentro del marco global de la metabolómica aplicada a granos de cacao y su calidad.

Figura 9.

Número de publicaciones reportadas en la base de datos de SCOPUS usando como ecuación de búsqueda las palabras claves: a) "Cocoa beans" AND "Metabolomics" AND "Quality" b) "Cocoa" AND "Metabolomics" OR "OMICS"



En el mundo se realizan actualmente esfuerzos para mejorar el sector cacaotero debido a las falencias en temas de calidad que tiene este sistema productivo; muchos trabajos de investigación tienen como finalidad principalmente enriquecer el conocimiento general, mejorar las técnicas de cultivo, cosecha y poscosecha, identificar las principales características que afectan la calidad del grano (sabor y aroma) y a la vez, impulsar el desarrollo de nuevos productos a base de cacao. Colombia no es ajena a estos esfuerzos, muestra de ello son algunos trabajos de investigación relacionados con el análisis químico donde se evidencia una clara tendencia por el estudio de los polifenoles y las metilxantinas, que son generalmente los metabolitos secundarios que se encuentran en mayor concentración en este fruto (López, 2014).

Evidencia de esto es el artículo publicado en el 2012 realizado en Medellín: “Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacao colombiano durante los procesos de pre e industrialización”, en el cual se usó la cromatografía líquida de alta eficiencia como técnica de separación; el estudio concluye que el contenido de polifenoles varía entre 75,5 y 43,5 mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra. Consideran también que estos resultados pueden ser aplicados como parámetros de control para evaluar calidad de cacaos procedentes de la región santandereana. Además, determinaron que el uso de horno infrarrojo como secador tiene la capacidad de disminuir la pérdida de polifenoles aproximadamente en un 30% (Gil, 2012).

En el 2014, en Bucaramanga (Santander), se desarrolló la investigación titulada: “Validación de un método para la determinación de flavonoides y metilxantinas por cromatografía líquida de alta eficiencia- aplicación en el análisis de grano de cacao”; el objetivo fue determinar el contenido de catequinas, epicatequinas, procianidina B1 y B2, metilxantinas, teobromina y

cafeína en grano de cacao. Concluyendo que, durante la fermentación, el grano pierde propiedades antioxidantes y disminuye la concentración de flavonoides con respecto al grano verde (Jiménez, 2014).

En el mismo año se realiza un trabajo titulado: “Caracterización de materiales regionales promisorios de cacao colombiano: física, química; funcional y organoléptica”, realizaron la caracterización de 7 materiales regionales promisorios y uno introducido, con el fin de encontrar parámetros diferenciadores. La caracterización físico-química correspondió a la evaluación de: masa de grano, porcentaje de cascarilla, fibra, grasa, proteína y cenizas, además se cuantificaron polifenoles y actividad antioxidante. Se hizo la caracterización y cuantificación de compuestos volátiles y se determinó el perfil del sabor. Los materiales evaluados presentaron diferencias significativas dando lugar a grupos estadísticamente distintos. El material FSV 155 presentó valores altos en cuanto al contenido de catequina, epicatequina y actividad antioxidante, además mostró la menor relación teobromina /cafeína relacionándose con materiales criollos y un perfil sensorial típico de un material criollo (Noguera, 2014).

En el 2017 se publicó el libro titulado “Características de calidad del cacao de Colombia, catálogo de 26 cultivares” donde se resume los resultados más relevantes del proyecto “Caracterización fisicoquímica, organoléptica y funcional de material de cacao introducidos y regionales promisorios más comercializados en el país”. En el proyecto se caracterizaron morfológica, agronómica, física, química y sensorialmente diferentes muestras de grano. Según los resultados de las caracterizaciones, existe una amplia variabilidad dada por el origen genético y la interacción con el ambiente; las variables que más confirman esto son los índices de granos y el contenido de granos que se reportan en valores mayores con relación a otros países. Afirman

que todas sus muestras tienen alto contenido de grasas y al analizar el perfil de ácidos grasos se demuestra que esta grasa puede ser catalogada como manteca dura. Además, los perfiles sensoriales evaluados permitieron determinar la calidad del cacao principalmente a través de la identificación de aromas específicos como notas frutales, caramelo y nuez. Por último, se afirma que una alternativa para incursionar en el mercado de chocolates funcionales y saludables es comercializar cacao sin fermentar y seco; lo anterior basados en el contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante y el contenido de metilxantinas (Perea *et al.*, 2013).

A nivel internacional, específicamente se encuentran varios artículos relacionados con análisis metabolómico de cacao y su relación con calidad; por ejemplo: En el 2007 se publicó el artículo titulado: “Detección por GC-MS de marcadores quirales en granos de cacao de diferente calidad y origen geográfico”. Granos de cacao fermentados de diferentes países de origen y (Ecuador, Ghana, Trinidad) y granos de cacao tostados, se analizaron sus contenidos de ciertos hidroxiácidos quirales, catequinas, y aminoácidos. El objetivo de este trabajo fue verificar si el contenido y naturaleza de los compuestos quirales presentes tanto en granos fermentados como en los granos de cacao tostados podrían estar relacionados con los parámetros tradicionales utilizados para clasificar la variedad de semillas y el grado de fermentación. Una correlación se encontró entre el contenido de polifenoles y el grado de fermentación, mientras que la epimerización de (-)-epicatequina a (+)-catequina se observó durante el tostado. Los resultados mostraron que varios compuestos quirales podrían considerarse marcadores de buena calidad para semillas de cacao y productos relacionados con el cacao y origen geográfico (Caligiani *et al.*, 2007).

En el 2011 se publicó el artículo “Dinámica de compuestos volátiles y no volátiles en cacao (*Theobroma cacao* L.) durante los procesos de fermentación y secado utilizando análisis de

componentes principales”. Los diferentes compuestos volátiles y no volátiles producidos durante el proceso de fermentación y secado se consideran indicadores de la calidad del grano de cacao. Se encontraron treinta y nueve compuestos diferentes identificados por HS-SPME/GC-MS relacionados con las notas deseables y el mal sabor. Los compuestos volátiles y no volátiles se asociaron con la acidez y los cambios de pH, como el ácido acético y el ácido láctico. Mediante análisis de componentes principales (PCA), las relaciones entre los compuestos, días de fermentación y secado se asociaron con la dinámica de estos compuestos. La identificación del compuesto principal producido durante los procesos de fermentación y secado pueden ser útiles para buscar un indicador de mal sabor y como índice de fermentación, como los ácidos isobutírico, isovalérico y propiónico. La oxidación del 3-metil-1-butanol a acetato de 3-metil-1-butanol puede ser útil para evaluar el grado de fermentación. En el secado, los compuestos con los niveles más altos fueron ácido acético e isobutírico, acetato de etilo y acetato de 3-metil-1-butanol, pentanal, 2,3-pentanodiona, 1,3-butanodiol y 2,3-butanodiol. Por lo tanto, el ácido acético y el ácido isobutírico, debido a sus altos niveles y su bajo valor umbral, podrían desempeñar un papel importante en la calidad aromática del cacao seco (Rodríguez *et al.*, 2011).

En el año 2015 se publicó el artículo titulado “Evaluación de la calidad del aroma de cacao mediante múltiples enfoques analíticos”. En este estudio, la calidad de 26 granos de cacao fermentados de 4 países diferentes (Vietnam, Indonesia, Perú y Ghana) se evaluaron mediante un análisis de composición (aminoácidos, azúcares reductores, polifenoles y ácido láctico) y el perfil de composición de volátiles relacionados con el aroma (HS-SPME-GC-MS). Se investigaron diferentes grupos de cacao que tienen características organolépticas únicas que fueron afectadas por fermentación, condiciones de tostado y origen geográfico. Se obtuvo clara distinción de cacao

de sabor fino (variedad Criollo) y cacao de baja calidad. Adicional, varios marcadores para la relación entre origen del grano/calidad fueron identificados (Tran *et al.*, 2015).

En el año 2016, el artículo titulado “Una evaluación metabolómica no dirigida de los granos de cacao durante la fermentación” permite avanzar en el conocimiento químico del proceso de fermentación como un paso crítico en el procesamiento de cacao de alta calidad; sin embargo, la bioquímica que hay detrás de este proceso aún no está bien entendida a nivel molecular. En esta investigación, utilizando un enfoque no dirigido, se exploraron los cambios químicos que ocurren durante todo el proceso de fermentación. Variedades de cacao genéticamente indefinidas de Trinidad y Tobago, Costa Rica y un clon IMC-67 fueron sometidos a fermentación utilizando condiciones controladas en la planta piloto y en la granja. Se recogieron muestras diariamente, se obtuvieron extractos en una mezcla de acetona/ácido acético/agua (70/29,5/0,5%) y se analizaron usando un sistema UPLC-ESI + -Q-TOF-MS. El análisis de datos pre-procesados, aplicando un modelo PLS-DA, destacó diferencias significativas entre los tres períodos de fermentación, observados a los 0–2, 3–4 y 5–6 días, respectivamente. Entre los metabolitos más relevantes se determinaron la sacarosa, flavanoles como (epi) catequina, dímeros y trímeros de procianidina, antocianinas y, se identificaron tentativamente, oligopéptidos que varían en tamaño de 3 a 12 aminoácidos. En general, flavanoles y azúcares tendieron a disminuir durante la fermentación, mientras que la mayoría de los oligopéptidos aumentaron a niveles máximos después de 3 a 4 días de fermentación y disminuyó posteriormente. Estos resultados arrojan una nueva visión sobre la optimización de la fermentación del cacao, así como también, posibles estrategias que permitan contribuir al desarrollo de nuevas alternativas para el procesamiento del cacao basadas en valores bioquímicos y funcionales (Mayorga-Gross *et al.*, 2016).

En adición, también fue publicado el artículo “Metabolómica basada en cromatografía líquida-espectrometría de masas de tiempo de vuelo enfocada para la discriminación de los granos de cacao de diferentes regiones en crecimiento”. Mediante un enfoque metabolómico para la discriminación de los granos de cacao mediante cromatografía líquida espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC-TOF MS) y análisis multivariable, se estudiaron seis muestras de cacao en granos de seis cultivos regionales. Los marcadores críticos, como los polifenoles, se identificaron a través de la correspondiente relación masa/carga y la identificación tentativa de los biomarcadores se completaron con la masa precisa mediante la técnica TOF MS. Los resultados revelaron que la técnica LC-TOF MS junto con un modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales puede ser exitoso para la discriminación de los granos de cacao basados en sus orígenes geográficos para el aseguramiento efectivo de la calidad (Hori *et al.*, 2016).

El documento titulado “Química del sabor del cacao y productos de cacao”, presenta una visión general sobre el sabor del cacao a partir de la composición y una perspectiva sensorial. Los cacaos a granel (tipo Forastero) exhiben fuertes notas básicas de cacao, mientras que las variedades finas (Criollo, Nacional) exhiben notas aromáticas, características de sabor florales o más suaves. Cerca de 600 compuestos diferentes (alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, ésteres y pirazinas) se han identificado como componentes activos de olor. El aroma específico del cacao surge de complejas reacciones bioquímicas y químicas durante el procesamiento poscosecha de granos crudos y de muchas características propias del cacao: genotipo, composición química de semillas crudas, condiciones ambientales, prácticas agrícolas, procesamiento y etapas de fabricación. Ha habido mucha investigación sobre los componentes químicos no volátiles y volátiles del sabor del cacao. Sin embargo, las relaciones entre todos los componentes químicos

que probablemente desempeñen un papel en el sabor del cacao, sus propiedades sensoriales, las fuentes y mecanismos de formación de sabor no se entiende completamente (Aprotosoia *et al.*, 2016).

En otro trabajo titulado “Resonancia magnética nuclear con giro al ángulo mágico (HR-MAS ^1H NMR) y la quimiometría como herramienta útil para evaluar el origen geográfico de los granos de cacao”. En este trabajo se estudió la aplicabilidad de la resonancia magnética nuclear protónica de sólidos “HR-MAS ^1H NMR” combinada con quimiometría para evaluar los orígenes geográficos de 60 granos de cacao fermentados y secos de 23 países productores diferentes de cacao de las tres principales áreas de cultivo (África, América Central / del Sur, Asia / Oceanía). El perfil químico se determinó por HR-MAS ^1H NMR directamente en polvo de cacao después de la optimización del método, permitió la detección simultánea de aminoácidos, polialcoholes, ácidos orgánicos, azúcares, metilxantinas, catequinas y lípidos. El conjunto de datos obtenido fue, por lo tanto, representativo de todas las clases de compuestos de cacao. Un enfoque cuantitativo dirigido de metabolitos seleccionados fue posible solo con los datos de HR ^1H NMR, los enfoques adoptados mostraron una discriminación de los orígenes del cacao. Por tanto, la técnica HR-MAS NMR presentó las ventajas de obtener una imagen muy rápida de las muestras, que comprende componentes lipofílicos e hidrofílicos, evitando cualquier manipulación de la muestra (Marseglia *et al.*, 2016).

Recientemente, se publicó el artículo titulado: “Composición no volátil y volátil de licor de cacao y chocolate de sabor fino a granel de África occidental y ecuatoriano”. En esta investigación, el licor de cacao y el chocolate producido a partir de granos de cacao de África occidental (Forastero, cacao "a granel") y Ecuador (variedad Nacional, cacao de "sabor fino")

fueron investigados. Aquí, se determinaron los niveles de varias clases de metabolitos primarios y se identificó y cuantificó mediante las técnicas HS-SPME GC-MS y UPLC-HRMS, una amplia gama de metabolitos secundarios, incluidos ácidos orgánicos volátiles, aldehídos, ésteres, pirazinas, polifenoles, metilxantinas y aminas biogénicas. Los valores de actividad de olor (OAV) se calcularon para evaluar la contribución de los volátiles individuales en el aroma final. Varios compuestos aromáticos volátiles fueron más abundantes en el licor de cacao y el chocolate de África Occidental, mientras que las muestras ecuatorianas fueron más ricas en la mayoría de los metabolitos no volátiles cuantificados. El análisis de componentes principales (PCA) confirmó que las cuatro muestras se pueden distinguir claramente. Se encontró que los alcoholes, las pirazinas, los aminoácidos y las aminas biogénicas son altamente influyentes para causar esta diferenciación. El enfoque propuesto puede ser útil en futuros estudios sobre colecciones de muestras de cacao más extensas, a fin de resaltar las similitudes y señalar las diferencias típicas en la composición química entre estas muestras (Tuentner *et al.*, 2020).

Finalmente, el artículo: “Determinación de teobromina y cafeína en granos de cacao amazónico fermentados y no fermentados (*Theobroma cacao* L.) utilizando voltamperometría de onda cuadrada después de la separación cromatográfica” permitió proponer un método analítico basado en la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) (Squarewave voltammetry) con un electrodo de diamante dopado con boro (BDD) para determinar las concentraciones de teobromina (TB) y cafeína (CF) junto con otras sustancias características como los compuestos fenólicos, que contribuyen a la percepción del sabor amargo característico de las muestras de cacao amazónico fermentado y no fermentado y sus derivados comestibles, como los chocolates. Según los resultados, se puede determinar el contenido de TB y CF con una precisión y exactitud aceptables

en muestras de cacao amazónico fermentadas y no fermentadas con una cantidad reducida de residuos, lo que representa buenas herramientas analíticas para el control de calidad de cacao y chocolate fermentados (Júnior *et al.*, 2020).

3. Metodología

3.1. Recolección y caracterización de las muestras de cacao

En total, 36 muestras de cacao en granos de fincas provenientes de las regiones de Antioquia, Cesar, Magdalena, Norte de Santander y Santander en Colombia (Tabla 4) fueron utilizadas para el análisis metabolómico, recolectadas y suministradas por el equipo de trabajo CAESCA enmarcado en el macro proyecto: “Mejoramiento de cacaos especiales en Antioquia y Cesar a través de la generación de capacidades y servicios tecnológicos localmente adaptados para incremento de la competitividad en el mercado internacional – proyecto del programa Colombia más competitiva PC+C042-017” el cual es un programa de la embajada Suiza en Colombia – Cooperación Económica y Desarrollo (SECO) ejecutado por Swisscontact e INNPulsa. El muestreo lo realizó un técnico de campo del equipo CAESCA, previo al envío le practicaron análisis físico-químico y análisis sensorial a la población muestral. Los granos recibidos correspondieron a granos fermentados (de acuerdo a la metodología reportada por Contreras (2017), la fermentación dependió de la variedad de cacao, por ejemplo, para CCN 51 que son la mayoría de muestras, fueron 6 días de fermentación, cuyo proceso de fermentación fue en cajones de madera de 60 x 60 x 60 cm, tapado con hojas de plátano, monitoreando temperatura y pH. A las 24 horas se realiza el primer volteo y así sucesivamente todos los días hasta cumplir en promedio 6 días de fermentación y secado (el proceso de secado se realizó al sol en una capa de 3 a 5 cm de alto de granos de cacao y se hacían remociones y volteos por hora en el día, por

aproximadamente 6 días, hasta que el porcentaje de humedad de los granos estuvo entre 6,5 y 7,5%, según la metodología reportada por López (2014)). Una cantidad aproximadamente de 30 g por muestra, provenientes de diferentes fincas ubicadas en Antioquia, Cesar, Magdalena, Norte de Santander y Santander, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a una encuesta en la que se evaluó diferentes criterios como: identificación de la muestra o lote, central de beneficio, cantidad de árboles de cacao, el nivel educativo del productor y finalmente prueba de cadmio la cual la realizó en el laboratorio de consultas Industriales UIS.

Tabla 4.

Etiquetas de las muestras de granos de cacao recolectadas de diferentes fincas colombianas para el análisis metabolómico

# I.D.	Identificación	Productor	Departamento
1	MAN 1	Manaure	Cesar
2	MAN 2	Manaure	Cesar
3	MAN 3	Manaure	Cesar
4	POR 1	Porce	Antioquia
5	REG	Porce	Antioquia
6	SAR	No especificado	Norte de Santander
7	MAK	Urabá	Antioquia
8	URA 1	Urabá	Antioquia
9	URA 2	Urabá	Antioquia
10	POR 2	Porce	Antioquia
11	SDR	San Vicente de Chucurí	Santander
12	URA 3	Urabá	Antioquia
13	CCN 1	Maceo	Antioquia
14	L8T7	Maceo	Antioquia

15	CCN 2	Maceo	Antioquia
16	CCN 3	Maceo	Antioquia
17	CCN 4	Maceo	Antioquia
18	CCN 5	Maceo	Antioquia
19	CCN 6	Maceo	Antioquia
20	CCN 7	Maceo	Antioquia
21	CCN 8	Maceo	Antioquia
22	CCN 9	Maceo	Antioquia
23	CCN 10	Maceo	Antioquia
24	CCN 11	Maceo	Antioquia
25	CCN 12	Maceo	Antioquia
26	CCN NO	Maceo	Antioquia
27	MAN 4	Manaure	Cesar
28	MAN 5	Manaure	Cesar
29	SV 1	Maceo	Antioquia
30	SV 2	Maceo	Antioquia
31	CCN 13	Maceo	Antioquia
32	MEZ 1	Maceo	Antioquia
33	MAN 6	Manaure	Cesar
34	MON	San Vicente de Chucurí	Santander
35	ICS	Maceo	Antioquia
36	SNM	Santa Marta	Magdalena

3.1.1 *Análisis físicos*

Para analizar y caracterizar la muestra de cacao, fue necesario realizar diferentes análisis físicos, los cuales se realizaron en el Laboratorio de Fitosanidad y control biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB Medellín) con base en la norma ISO 2451:2017. El primer análisis consistió en la medición de la humedad en los granos de cacao. A continuación, los granos se caracterizaron de acuerdo a los siguientes procesos: tamizado, categorización de los residuos y materia extraña, recuento de los granos (granos partidos, aplanados y pegados), total de granos

atípicos y material extraño. Índice de grano, prueba de corte, total de granos defectuosos y normales (granos mohosos, dañados por insectos, germinados y pizarrosos), grado de fermentación (granos sin fermentar, parcialmente fermentados, fermentados y sobre fermentados) y grado de fisuración.

3.1.2 Determinación del contenido de cadmio

La determinación del contenido de cadmio se realizó en el laboratorio de consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander utilizando la metodología según el protocolo estándar AOAC 999.10 de 2005 con ligeras modificaciones (AOAC, 2023). Esta interpretación fue acreditada bajo el alcance 21-LAB-031 de la Agencia Nacional de Acreditación de Colombia.

3.1.2.1. Preparación de la muestra

Inicialmente se llevó la muestra de cacao al horno a una temperatura de 70 °C por 4 horas, luego se separó la cáscara del grano de cacao. La almendra o el grano completo (según sea el caso) se deben triturar, pulverizar y tamizar para buscar su homogeneidad.

3.1.2.2. Pesada

Se peso alrededor de 0,25 g de cacao (almendra) en su respectivo tubo de digestión, teniendo en cuenta que cada 5 muestras pesadas se aplicó una réplica con la finalidad de tener un control de aseguramiento de resultados. Adicionalmente en cada lote de muestras se realizó la pesada del Material de Referencia Certificado, así como adicionados de muestra.

3.1.2.3. Digestión ácida de la muestra

Se realizó digestión asistida por microondas en una solución de peróxido de hidrógeno al 30% (v/v), ácido nítrico y ácido clorhídrico (manteniendo volumen final de 8 mL). Se insertaron los tubos de digestión en el carril del digestor (ETHOS UP marca MILESTONE), luego se

encendió y programó el Digestor con el método establecido para muestras de cacao donde está determinado el tiempo, la temperatura y presión para todo el proceso de digestión.

3.1.2.4. *Análisis por espectroscopia de absorción atómica por llama u horno de grafito*

El extracto obtenido en la etapa de digestión, se filtró y se determinó el contenido total de cadmio mediante espectroscopía de absorción atómica de llama (El equipo de Absorción Atómica es un AGILENT FS 240 y GTA 120) o de horno de grafito.

3.1.2.5. *Preparaciones curvas de calibración*

Por FLAA (espectroscopía de absorción atómica de llama) el rango de trabajo se preparó entre 0,008 mg Cd/L hasta 1,5 mg Cd/L, teniendo como adicionales los patrones de verificación de condiciones del equipo y carta de control. Así mismo, para el Horno de Grafito el rango de trabajo se programó entre 0.3 µg Cd/L hasta 1,5 µg Cd/L, con las mismas condiciones de patrones de verificación y carta control, siguiendo preferiblemente las condiciones de rangos de trabajo establecidas en el manual del equipo. En ambas mediciones se tiene el blanco de la curva y el blanco del método que es indispensable para la realización de los cálculos.

3.1.3 *Prueba sensorial*

Las pruebas sensoriales fueron realizadas por un conjunto de cinco catadores del panel CAESCA, quienes siguieron la metodología estándar ISO 13299:2016, la cual sirve como guía para establecer el perfil sensorial de una muestra que puedan ser evaluados por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto u oído. Este consiste en describir y cuantificar los atributos sensoriales asignándoles un valor de intensidad. La calidad de los resultados depende del número de evaluadores y de su habilidad para describir sus percepciones. En las muestras de granos de cacao,

se evaluaron los diferentes criterios de aroma, sabores básicos, sensación trigeminal y sabores atípicos (ISO, 2016).

3.1.3.1. Preparación de licor

La preparación del licor de cacao, la realizó la empresa antioqueña Cletto chocolate (Cra 43A #35 SUR - 65, Envigado, Antioquia). Para ello, se envió aproximadamente 1 kg de granos de cacao, preliminarmente, Cletto, realizó el proceso de tostado de los granos en un horno a 125 °C por 25 minutos, posteriormente se realizó el proceso de descascarillado y finalmente se obtuvo 750 g de nibs de cacao. Para obtener 300 g de licor de cacao, se colocó 350 g de nibs en un melanger (un molinillo de piedra que se utiliza para producir y refinar licor en la fabricación de chocolate), previamente engrasado con manteca de cacao, los nibs de cacao se molieron hasta obtener un tamaño de partículas de 20 micras, el cual, se midió con la ayuda de un micrómetro, el proceso duro aproximadamente 2 horas, sin embargo, algunos licores se dejaron por más tiempo hasta que se alcanzó el tamaño de partícula deseado. El licor obtenido se colocó en bandejas con papel parafinado y se llevó al congelador a -20°C, una vez solidificado el licor, se partió en tabletas, se colocó en bolsas y se dejó almacenado en el congelador.

3.1.3.2. Preparación de muestras

Antes de la evaluación sensorial, se colocó aproximadamente 15 g de licor de cacao en un vaso y se precalentó en un microondas entre 45 – 50 °C para fundir la muestra en el orden de la evaluación. Para la evaluación sensorial las muestras deben estar a una temperatura de 40 °C, de acuerdo a la metodología reportada por Chatelain (2017).

3.1.3.3. *Proceso y criterios de evaluación sensorial (descriptores)*

Se tomó alrededor de 1 mL de licor de cacao en una pequeña espátula, se trasladó directamente a la lengua, y se dejó allí durante 20 segundos. Durante este tiempo, se evaluó los diferentes criterios (Tabla 5). El catador debió considerar que algunos criterios aparecen o desaparecen de forma muy rápida, mientras que otros persisten durante más tiempo. Se puntuó la intensidad de los atributos para cada descriptor, mediante una escala de categorías de 0 “imperceptible” a 10 “intenso” (documento “formulario de cata”). Para limpiar el paladar, se enjuaga la boca con agua potable a temperatura de 40 °C, libre de olores y sabores (Chatelain *et al.*, 2019).

Tabla 5.

Descriptores sensoriales para evaluar las muestras

Categoría	Atributo	Definición	Descripción de la escala
Gustos básicos	Acidez	Gusto básico, provocado por una solución acuosa diluida con ácido cítrico, percibida en la punta de la lengua. Aquí se refiere a los ácidos frutales y no al ácido láctico o ácido butírico.	Imperceptible - muy intensa
	Amargor	Gusto básico, provocado por una solución acuosa diluida con cafeína, percibida en la parte posterior de la lengua.	Imperceptible – muy intenso
Sensación trigeminal	Astringencia	Sensación trigeminal, contracción de la mucosa bucal provocado por estímulos químicos como por ejemplo polifenoles	Imperceptible – muy intensa
Textura	Granulosidad	Atributo de textura geométrico relacionado con la percepción del	Liso - granulado

		tamaño, forma y cantidad de partículas en el licor	
Aroma	Floral	Notas que se refieren a flores (flor de azahar, flor de tilo)	Imperceptible – muy intenso
	Afrutado-fresco	Notas que se refieren a frutas cítricas, bayas (frambuesa, mora..) y frutas tropicales (piña, maracuyá)	Imperceptible – muy intenso
	Afrutado-seco	Notas que se refieren a frutas secas como damasco seco, pasa de uva seca)	Imperceptible – muy intenso
	Cacao	Nota que se refiere a los granos de cacao bien fermentado, tostado y libre de defectos o polvo de cacao, barras de chocolate oscuro	Imperceptible – muy intenso
	Dulce / caramelo	Notas que se refieren a miel, panela, dulce de leche, jugo de caña	Imperceptible – muy intenso
	Nuez	Nota que se refiere a nueces como almendras, avellana, maní	Imperceptible – muy intenso
	Madera	Nota que se refiere a madera seca como roble, teca, fresno o haya	Imperceptible – muy intenso
	Especiado	Nota que se refiere a especias como canela, clavos, vainilla, pimienta o tabaco.	Imperceptible – muy intenso
	Especiado	Nota que se refiere a la intensidad de la tostadura del cacao	Imperceptible – muy intenso
Sabores atípicos	Sobre-fermentado	Nota que se refiere a una fermentación demasiado larga o no uniforme (descomposición de fruta)	Imperceptible – muy intenso
	Putrefacción	Nota que se refiere a materia vegetal húmeda en descomposición	Imperceptible – muy intenso
	Mohoso	Nota que se refiere a moho	Imperceptible – muy intenso
	Humoso animal	Nota que se refiere a humo de materia vegetal quemado	Imperceptible – muy intenso
		Nota que se refiere a notas animales sucias como sudor y orina	Imperceptible – muy intenso
Valoración	Calidad global	Refleja la impresión global de la muestra en términos de limpieza,	Baja - alta

intensidad y complejidad del aroma y
de balance entre los sabores en una
muestra

Nota. Tomado de Ensayo interlaboratorio para los laboratorios de cacao en Colombia (2019).

3.2. Estandarización de la técnica de extracción de metabolitos -no volátiles- en las muestras de cacao.

3.2.1 *Proceso de desengrasado*

El proceso de desengrasado se hizo según lo descrito por Mayorga Gross y colaboradores con algunas modificaciones (Mayorga-Gross *et al.*, 2016). Aproximadamente 1,5 g de muestra de cacao (seco, molido, sin cascarilla con ayuda de un molino eléctrico Hamilton Beach) fue sometido a extracción con *n*-hexano (12 mL cada vez; 8 mL de *n*-hexano por 1 g de muestra). Para ello se utilizó la muestra MACP01, se colocó en una plancha de agitación por 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 g por 10 min. Se conservó el sólido como muestra de cacao desengrasada, las muestras fueron secadas a 40 °C en un horno durante 48 horas. Luego se transfirieron al desecador durante 24 h. Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado con el fin de medir el efecto de los tratamientos sobre la variable de respuesta. Los tratamientos consistieron en el número de volúmenes de *n*-hexano con que fue tratada la muestra y la variable de respuesta fue la cantidad de masa de cacao desengrasada. Se aplicó tres tratamientos:

T1: extracción grasa con 12 mL de *n*-hexano

T2: extracción grasa con 12 mL de *n*-hexano x 2 volúmenes

T3: extracción grasa con 12 mL de *n*-hexano x 3 volúmenes

3.2.2 *Extracción de metabolitos de cacao*

El proceso de extracción de metabolitos se realizó siguiendo el proceso descrito por (Menguy *et al.*, 2009) con algunas modificaciones. La optimización de la extracción de metabolitos del grano seco de cacao se realizó utilizando extracción en fase sólida C18 (SPE-C18).

3.2.2.1. *Evaluación del solvente de extracción*

Aproximadamente 100 mg de muestra de cacao MACP01 seca y desengrasada fue utilizada para evaluar el solvente de extracción; los solventes evaluados fueron metanol y acetonitrilo. Debido a que estos solventes presentan algunas características importantes en la extracción de compuestos fenólicos como la polaridad; en este caso, los dos son solventes polares lo que permite disolver y extraer eficazmente una amplia gama de polifenoles, incluidos flavonoides, taninos y ácidos fenólicos (Sarria *et al.*,2021). Estabilidad, tanto el metanol como el acetonitrilo son solventes relativamente estables y puros, lo que significa que pueden garantizar la integridad de los polifenoles extraídos y la precisión de los resultados analíticos (Bass, 2015). Facilidad de evaporación, al igual que el metanol, el acetonitrilo se puede eliminar fácilmente después de la extracción, lo que deja los polifenoles concentrados y listos para su análisis posterior (Sarria *et al.*,2021).

A cada muestra se le adicionó 1,5 mL del solvente de extracción (Tabla 6), se sometió a ultrasonido por 20 minutos a una temperatura de 30 °C. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 g por 10 minutos. Posterior a ello, 1 mL del extracto orgánico (sobrenadante) se sometió a evaporación a 40 °C durante 6 h en un concentrador de vacío Savant Speed Vac SPD120 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC 28804, EE.UU) (se determinó la cantidad de extracto obtenido). El extracto seco fue resuspendido en 1 mL de agua (tipo I), se sonicó durante 1 minuto y luego se

pasó a través de un cartucho de SPE-C18 (Columna LiChrolut® RP-18 (40 - 63 μm), 500 mg, 3 ml, tubos de PP estándar. Merck). Este procedimiento se repitió 2 veces con 1 mL de agua cada vez. Luego, el extracto fue resuspendido en 1 mL de metanol y se sometió a extracción en SPE-C18. Este último procedimiento se realizó utilizando 11 mL de MeOH para obtener el extracto metanólico. Tanto la fracción acuosa como la orgánica fueron evaluadas para cuantificación de fenoles totales (sección 3.3), la cual fue la variable de respuesta para determinar el efecto del solvente en la extracción de compuestos fenólicos en cacao.

Tabla 6.

Solventes evaluados para la extracción de metabolitos en muestra de grano de cacao seco

Tratamiento	Solvente de extracción (% v/v)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	50% ACN (ac)		
2	75% ACN (ac)		
3	50% MeOH (ac)		
4	75% MeOH (ac)		
5	50% ACN (ac) - H ₃ PO ₄ (0,03%)	30	20
6	75% ACN (ac) - H ₃ PO ₄ (0,03%)		
7	50% MeOH (ac) - H ₃ PO ₄ (0,03%)		
8	75% MeOH (ac) - H ₃ PO ₄ (0,03%)		

Nota. Muestra de cacao MACP01

3.2.2.2. Evaluación de temperatura y tiempo de extracción

Una vez determinado el solvente de extracción más favorable, se procedió a optimizar los parámetros de temperatura y tiempo de extracción. Para ello se realizó un diseño experimental 2^2 , dos factores, dos niveles y 4 réplicas en el punto central, la variable de respuesta fue el contenido de fenoles totales.

Tabla 7.

Variables evaluadas para la extracción de metabolitos de muestra en grano de cacao seco

Variables	Niveles		
	Inferior [-1]	Central [0]	Superior [1]
[A] Tiempo (min)	20	30	40
[B] Temperatura (°C)	25	35	45

Nota. Muestra de cacao MACP01

Tabla 8.

Diseño experimental evaluado para la extracción de metabolitos de muestra de grano seco de cacao

No.	[A]	[B]
1	-1,4	0
2	-1	-1
3	1	-1
4	0	-1,4
5	0	1,4
6	-1	1
7	1	1
8	1,4	0
9	0	0
10	0	0

Nota. Muestra de cacao MACP01

3.3. Contenido de fenoles totales en cacao

Para cuantificar los fenoles totales en las muestras se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Al-Owaisi *et al.*, 2014). Brevemente, se mezclaron 860 μL de solución de carbonato de sodio al 7,5% (m/v) con 150 μL de muestra (preparación descrita con anterioridad en la sección 3.2.2.1 y 430 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2.0 M diluido 1:10 con agua desionizada agitando luego de cada adición. Luego se incubó la mezcla por 1 hora a temperatura ambiente y protegida de la luz. Se registró la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Tokio, Japón). El método de estándar externo se empleó para el análisis cuantitativo, usando Ácido Gálico (AG) como analito estándar (pureza >98%, Merck). La curva de calibración se preparó a partir de una solución stock de ácido gálico de 1.000 ppm y se preparó disoluciones de: 30, 45, 60, 85, 100 y 120 ppm. Los resultados fueron expresados en términos de mg de ácido gálico por gramo de muestra de grano de cacao seco (mg GA/g de muestra).

3.4. Análisis cromatográfico por UHPLC/MS

El perfil químico se realizó siguiendo la metodología descrita por Ortega *et al.* (2008). Se utilizó un UHPLC DionexTM UltimateTM 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA), equipado con una interfaz ESI operada a 3500 V en el modo de adquisición de iones positivos y un desgasificador (SRD-3400), una bomba de gradiente binario (HPG3400RS), un automuestreador (WPS 300TRS) y una unidad termostatazada para la columna (TCC 3000). La separación cromatográfica se realizó en una columna Acclaim RSLC 120 C18 (2,1 mm \times 150 mm \times 2,2 μm). La fase móvil consistió en A: ácido acético en agua al 2% y B acetonitrilo. El gradiente

de elución se estableció de la siguiente manera: 0-2 min, 0% B; 2-18 min, 0-100 % B; y 18-20 min, 100 % B. Se analizó una alícuota de 500 μL del extracto metabólico en el instrumento. El volumen de muestra inyectado fue de 2,5 μL y el caudal fue de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas de alta resolución con un sistema de detección de corriente de iones tipo Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.) a través de una interfaz de electrospray (HESI-II), operado en modo de iones positivos a 350° C, una tensión capilar de +4000 V y una temperatura de 320 °C. El analizador de masas orbitrap se hizo funcionar en modo de barrido completo (*Full MS Scan*) con una resolución de 30.000 m/m en el modo de adquisición de iones positivo. Los iones moleculares se enviaron para su fragmentación a la HCD (cámara de disociación por colisión de mayor energía) a energías de 10, 20, 30 y 40 eV. El rango dinámico de masas fue de 80 a 1.000 m/z . Para el análisis instrumental basado en UHPL-HRMS, cada una de las 36 muestras estudiadas contó con un triplicado técnico. Del tratamiento preliminar de estos datos y del análisis estadístico descrito en el siguiente apartado, se obtuvieron los perfiles químicos de las muestras.

3.4.1 Determinación de la relación teobromina/cafeína en cacao

La determinación de la cantidad de cafeína y teobromina y la relación T/C de los granos de cacao se hizo una aproximación semicuantitativa, donde se encontró a partir de la cuantificación por % de abundancia relativa de los perfiles cromatográficos de las muestras. Para ello, se identificaron las señales de las dos metilxantinas en el cromatograma de iones totales (EIC), se extrajo la intensidad de sus señales de cada una de las tres réplicas de la muestra y se calculó el promedio, para calcular la relación.

3.5. Análisis de datos

3.5.1. Análisis de varianza de la optimización del proceso de extracción

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI. Para el análisis de la optimización del proceso de extracción de los metabolitos no volátiles se realizó análisis de varianza para observar diferencias estadísticamente significativas en las variaciones de condiciones de extracción de compuestos fenólicos como el proceso de desengrasado, solvente de extracción, tiempo y temperatura. Se realizó un análisis de varianza de un factor, cuyo objetivo principal es comparar las medias de los diferentes niveles. Por medio de los estadísticos F y p calculados en el análisis de varianza (ANOVA), se determinó la incidencia estadística que tuvo cada factor en el proceso. Para cada factor significativo se realizó una prueba de rangos múltiples con el fin de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos con un nivel del 95,0% de confianza. También se realizó análisis de varianza para comparar el contenido de compuestos fenólicos en las 36 muestras de cacao estudiadas.

3.5.2. Análisis de los perfiles químicos

Para llevar a cabo la metodología de análisis basada en un enfoque de metabolómica no dirigida, se llevó a cabo un tratamiento preliminar de los cromatogramas de iones completos para obtener los perfiles químicos de las muestras. En este proceso, los archivos crudos de los espectros de masas fueron convertidos del formato .raw, específico de Thermo, al formato universal .MzXML utilizando la herramienta MSConvert del software de acceso libre ProteoWizard (Chen *et al.*, 2022). Esta transformación permitió la obtención de archivos correspondientes a los espectros de masas obtenidos en los modos de adquisición de iones positivos, facilitando así el uso

de plataformas de procesamiento de datos de acceso abierto que operan de manera independiente al formato de archivos de cada fabricante y sistema analítico.

Una vez transformados los datos, estos fueron analizados en la plataforma de procesamiento de datos en línea de acceso libre XCMS (versión 3.7.1) (<https://xcmsonline.scripps.edu/>). Mediante esta herramienta, se realizaron los procesos de corrección de tiempo de retención, alineamiento de los cromatogramas, filtrado, sustracción del ruido de fondo y detección de características para los cromatogramas de iones completos obtenidos mediante ambos modos de adquisición. Para realizar estas operaciones, se realizaron trabajos en modo multi-grupo con las muestras de control (**CTRL**), control de calidad (**QC**), y tratamiento (**TTO**). Estos trabajos fueron llevados a cabo teniendo en cuenta la configuración de parámetros descrita por Smith y colaboradores (Smith *et al.*, 2006) con las modificaciones listadas a continuación: La configuración base escogida fue UPLC/ORBITRAP (171), para la detección de características se seleccionó el modo CentWave con error de masas de 5 ppm, ancho de pico mínimo de 5 segundos y ancho de pico máximo de 20 segundos; para la corrección del tiempo de retención se seleccionó el método obiwarp (profStep=1); y para la alineación de los cromatogramas se definió: mzwid= 0.025 y bw=5.

De acuerdo al pre-tratamiento de datos mencionado anteriormente, se obtuvo una tabla de intensidad de iones que se utilizó como matriz de datos. En este formato, las duplas de relación m/z e intensidad relativa a lo largo del cromatograma de iones, derivadas del análisis de cada muestra, se organizaron en un archivo de Excel. Los encabezados de las columnas se etiquetaron con un código que representaba el tipo de muestra y el número de réplica para cada condición. A partir de este punto, los conjuntos de datos generados mediante los procesos descritos

anteriormente se denominaron como los perfiles metabolómicos de las muestras. Posteriormente, estos archivos se analizaron en la plataforma de análisis bioinformático de acceso libre en línea, MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml>), para llevar a cabo los correspondientes análisis estadísticos (Pang *et al.*, 2022).

Inicialmente se aplicó el análisis de componentes principales (PCA) a todos los datos para reducir la dimensionalidad de los datos en un primer análisis exploratorio. La normalización se realizó mediante la suma total de las intensidades de los espectros de masas, la transformación logarítmica y el escalado automático de los datos se realizaron con el software MetaboAnalyst (Versión 5.0.) (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml>).

Las diferencias en los perfiles metabólicos de los grupos de muestra establecidos por el análisis multivariado fueron exploradas también mediante análisis univariado. Para este propósito, todas las muestras dentro de un solo grupo se trataron como si fueran réplicas de una sola muestra. Se aplicó el análisis de veces de cambio (FC, fold-change) y la prueba t en pares de grupos de muestra para determinar las características discriminantes m/z . Una característica de relación m/z (o variable metabólica) se consideró estadísticamente significativo si su valor p era igual o inferior a 0,05 y su FC superior a 2 o inferior a 0,5. La identificación presuntiva de las características estadísticamente significativas se realizó mediante una búsqueda de posibles coincidencias utilizando la plataforma CEU Mass-Mediator (versión 3.0) (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>). Luego, se realizó la comparación de los iones característicos de los espectros de masas reportados en diferentes bases de datos con aquellos encontrados en los cromatogramas de iones completos. Para realizar dicha comparación, los iones moleculares de los metabolitos, los datos de intensidad relativa y masa exacta se empleó el software *Thermo Xcalibur 3.0* (Thermo Fisher Scientific, San

Jose, CA, USA). Así, los metabolitos fueron buscados a lo largo de la corriente iónica total de las muestras utilizando como referencia el dato de t_R suministrado por el software XCMS. Una vez encontrados los iones moleculares en la corriente iónica total, se dispuso de los iones obtenidos a partir de la celda de disociación de colisiones activadas (HCD) según el espectro de masas reportado. Posteriormente se obtuvieron las parejas de datos de masa exacta e intensidad relativa y se compararon los iones diagnósticos de cada metabolito, con aquellos reportados en repositorios como Kegg, HMDB, LipidMaps, Metlin, NP Atlas, KNApSAcK, Mass Bank y MINE. Este proceso permitió establecer de manera presuntiva, la identidad de los metabolitos de acuerdo con el segundo nivel de certeza definido por la sociedad de metabolómica para estudios no dirigidos (Gil-De-La-Fuente *et al.*, 2019; Sumner *et al.*, 2007). Además, se utilizaron patrones químicos de: cafeína, teobromina, procianidina B1 y B2 (Merck), para efectos de identificación.

4. Resultados y discusión

4.1 Análisis físico, químico y sensorial de las muestras de cacao

4.1.1 Análisis físico

La caracterización física de las muestras de cacao se resume en la Tabla 9. El índice de grano, el total de granos defectuosos (granos mohosos, dañados por insectos, germinados y pizarrosos), el grado de fermentación (granos sin fermentar, parcialmente fermentados, fermentados y sobre fermentados), el grado de agrietamiento y la calificación física global (0.0 es el valor más bajo y 10,0 es el valor más alto) y los resultados mostraron que todas las muestras tenían una calificación física global superior a 7,9.

Tabla 9.*Resultados de la caracterización física de las muestras de cacao*

# I.D	Identificador muestra	Índice de grano (g/grano)	Total, granos defectuosos	Grado Fermentación	Grado agrietamiento	Calificación Global
1	MAN 1	1,04	7,50%	97,00%	69,50%	8,1
2	MAN 2	0,88	11,10%	99,00%	80,50%	7,9
3	MAN 3	0,9	11,00%	94,00%	76,00%	8,1
4	POR 1	1,28	4,00%	96,50%	86,50%	8,9
5	REG	1,5	6,00%	96,00%	86,50%	9,2
6	SAR	1,38	12,00%	99,00%	89,00%	9,1
7	MAK	1,13	13,00%	97,00%	86,50%	8,7
8	URA 1	1,44	10,00%	96,00%	87,00%	9,1
9	URA 2	1,5	16,00%	96,50%	91,50%	9,1
10	POR 2	1,53	10,00%	97,50%	93,00%	9,3
11	SDR	1,17	36,50%	84,50%	89,50%	8
12	URA 3	1,21	24,50%	99,50%	87,50%	8,6
13	CCN 1	1,43	3,00%	65,50%	96,00%	8,7
14	L8T7	1,38	4,50%	61,00%	92,50%	8,5
15	CCN 2	1,68	2,50%	70,00%	98,00%	8,9
16	CCN 3	1,5	14,00%	78,50%	92,00%	8,7
17	CCN 4	1,5	13,00%	66,50%	93,50%	8,6
18	CCN 5	1,5	12,00%	80,50%	94,00%	8,9
19	CCN 6	1,2	9,00%	94,00%	80,00%	8,6
20	CCN 7	1,26	8,00%	94,60%	87,50%	8,7
21	CCN 8	1,25	7,50%	90,50%	93,50%	8,8
22	CCN 9	1,53	10,00%	90,00%	90,50%	9
23	CCN 10	1,62	4,00%	86,50%	88,00%	9,2
24	CCN 11	1,42	11,50%	77,50%	93,00%	8,6
25	CCN 12	1,24	11,00%	94,50%	79,00%	8,6
26	CCN NO	1,43	0,00%	83,50%	89,00%	9
27	MAN 4	1,09	13,00%	93,50%	89,50%	8,6
28	MAN 5	1,14	11,00%	88,50%	87,00%	8,5
29	SV 1	1,42	4,50%	57,50%	88,50%	8,3
30	SV 2	1,64	5,00%	94,00%	95,50%	9,3

31	CCN 13	1,48	17,50%	75,00%	94,50%	8,6
32	MEZ 1	1,85	10,00%	67,00%	79,00%	8,7
33	MAN 6	1,38	5,00%	92,50%	81,00%	8,7
34	MON	1,02	10,00%	98,00%	89,00%	8,7
35	ICS	1,22	6,50%	76,50%	85,50%	8,4
36	SNM	1,68	9,50%	95,00%	87,00%	9,3

El índice de grano es el peso medio del grano en gramos (g) tomado de una muestra de 100 granos de cacao secos (g/grano). Se espera que este peso sea superior a 100 g para asegurar un índice de mazorca adecuado (número medio de mazorcas necesarias para obtener 1 kg de cacao seco). De acuerdo con la Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), un índice de grano mayor a 1,7 g/grano es alto, entre 1,7 y 1,4 g/grano es medio y menor a 1,4 g/grano es bajo (García *et al.*, 2022). En este estudio, el 50% de las muestras mostraron un índice de grano medio, y el porcentaje restante tuvo un índice de grano bajo. El grado de craqueo es causado por la proteólisis durante la fermentación y está relacionado con la estructura interna de un grano. Generalmente, la relación entre el grado de craqueo y el de fermentación es directamente proporcional ya que se adhieren a la cáscara de la almendra insuficientes granos fermentados o tostados, lo que dificulta su separación (End, 2015). Según la Norma Técnica Colombiana NTC-1252, el cacao fino o de aroma debe tener un porcentaje de granos bien fermentados mayor (o igual) al 70% y el cacao común mayor (o igual al) 65% (ICONTEC, 2021). En este estudio, todas las muestras tuvieron un grado de craqueo mayor al 70%, 2 muestras (L8T7 y SV 1) tuvieron un grado de fermentación menor al 65%, 3 muestras (CCN 1, CCN 4 y MEZ 1) estuvieron entre 65% y 69%, y 31 muestras tuvieron un grado de fermentación mayor (o igual) a 70% (Tabla 9). De acuerdo al grado de craqueo y de fermentación, la mayoría de las muestras de esta investigación se pueden catalogar como cacao fino o de aroma.

Los granos defectuosos se definen como granos con moho interno, granos dañados por insectos, granos germinados (el germen de la semilla ha perforado la cáscara) o granos pizarrosos (al menos la mitad de la superficie de los cotiledones expuestos por la prueba de corte son de color pizarroso). El Estándar de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) estipula un máximo de 4% de granos mohosos y un máximo de 4% de granos dañados o infectados por insectos, pero el total de estos dos no debe exceder el 6%. Por otro lado, el porcentaje de granos germinados y pizarrosos debe ser inferior al 10% (End, 2015). El número total de granos defectuosos informados en la Tabla 9 es la suma de todos los defectos (mohosos, infectados por insectos, dañados, brotados y pizarrosos). Según los resultados, la muestra SDR superó el rango permitido para granos mohosos (12 %) y brotados (10,5 %), y URA 3 también superó el rango permitido para granos dañados por insectos (21 %) y pizarrosos (11 %). Las 34 muestras restantes caen dentro del rango permitido para granos pizarrosos, mohosos e infectados. Sin embargo, de estas 34 muestras, 15 excedieron el rango permitido para granos germinados. Si se tiene en cuenta el porcentaje de granos pizarrosos y granos germinados solo 19 de las 36 muestras de cacao cumplen el estándar de calidad.

4.1.2 Análisis del contenido de cadmio

La concentración de cadmio, el contenido de fenoles totales y la relación teobromina/cafeína constituyen otros parámetros de relevancia para determinar la calidad del grano de cacao. En este sentido, la Tabla 10 muestra los resultados de los análisis químicos para las muestras de cacao evaluadas.

Tabla 10.

Resultados de concentración de cadmio, contenido de fenoles totales y relación teobromina/cafeína

# I.D	Identificador muestra	Contenido de fenoles totales (mg AG/g muestra)	Contenido de cadmio (mg/Kg en almendras)	Abundancia relativa (%) de cafeína (C)	Abundancia relativa (%) de teobromina (T)	T / C
1	MAN 1	126,8	0,421	10,4	20,5	1,97
2	MAN 2	103,4	0,241	9,1	19,4	2,1
3	MAN 3	151,5	0,540	11,2	19,8	1,8
4	POR 1	90,1	0,576	10,9	13,9	1,3
5	REG	96,8	0,438	8,0	15,2	1,9
6	SAR	112,8	8,576	4,4	12,0	2,8
7	MAK	100,0	0,413	9,9	11,1	2,8
8	URA 1	88,9	1,694	7,6	11,8	1,6
9	URA 2	115,4	1,491	7,4	13,2	1,8
10	POR 2	100,7	0,360	11,8	13,6	1,2
11	SDR	119,8	7,069	7,6	11,5	1,5
12	URA 3	122,8	1,379	5,7	10,4	1,8
13	CCN 1	128,0	0,361	7,3	18,8	2,6

14	L8T7	153,1	0,648	6,2	16,7	2,7
15	CCN 2	131,0	0,537	10,2	16,8	1,6
16	CCN 3	141,4	0,535	8,7	18,0	2,1
17	CCN 4	136,5	0,359	6,9	16,8	2,4
18	CCN 5	118,2	0,293	6,6	15,3	2,3
19	CCN 6	140,6	0,418	5,4	13,3	2,5
20	CCN 7	141,3	0,181	4,7	14,6	3,1
21	CCN 8	124,1	0,293	6,4	15,4	2,4
22	CCN 9	138,5	0,464	6,5	15,6	2,4
23	CCN 10	168,2	0,540	6,8	17,7	2,6
24	CCN 11	146,9	0,688	7,4	18,1	2,4
25	CCN 12	147,1	0,482	4,8	14,6	3,1
26	CCN NO	121,4	0,290	11,0	17,2	1,6
27	MAN 4	120,8	2,934	10,0	17,6	1,8
28	MAN 5	134,5	1,582	9,0	14,8	1,6
29	SV 1	118,9	0,962	8,9	15,4	1,7
30	SV 2	88,1	0,716	9,9	14,8	1,5
31	CCN 13	143,4	0,482	8,5	12,9	1,5
32	MEZ 1	117,3	0,633	8,5	16,4	1,9
33	MAN 6	122,5	0,119	10,3	18,7	1,8
34	MON	91,7	10,130	3,3	12,0	3,6

35	ICS	143,4	0,357	7,2	17,4	2,4
36	SNM	124,7	0,354	6,6	16,1	2,5

Según los resultados, el contenido de fenoles totales varió entre 88,1 y 168,2 mg AG/g de muestra; 30 muestras presentaron un valor superior a 100 mg AG/g de muestra, lo que se considera alto contenido para granos no tostados (Aprotosoai *et al.*, 2016). Un resultado como el anterior es deseable, ya que los polifenoles contribuyen al sabor astringente del cacao, son antioxidantes adecuados (inhiben la peroxidación de lípidos al reducir los radicales libres y quelan metales) y son responsables de los beneficios para la salud asociados con el consumo de cacao (Aprotosoai *et al.*, 2016). El valor de la relación teobromina/cafeína (T/C) para la mayoría de las muestras fue inferior a 4, y solo la muestra 6 tuvo un valor de 4,8 (Tabla 10). La relación T/C en los granos de cacao es otro indicio importante de la "finura" del cacao (Sotelo & Alvarez, 1991). Varios autores han reportado que este coeficiente puede estar relacionado con varias propiedades de los granos de cacao, por ejemplo, Urbanska *et al.* (2019) y Carrillo *et al.* (2014) encontraron que la relación teobromina/cafeína se correlacionaba con el lugar de origen de los granos de cacao; Brunetto *et al.* (2019) establecieron este coeficiente en relación con el genotipo y la variedad de cacao. Brunetto *et al.* (2007), y Calvo *et al.* (2021) encontraron que esta relación es útil como biomarcador del estado de fermentación del grano. Por otro lado, Ordoñez *et al.* (2020) establecieron que la relación T/C está relacionada con el amargor, que es uno de los descriptores de finura en granos de cacao especiales. Sotelo *et al.* (1991) reportaron una relación del valor T/C para cacao Forastero o "a granel" superior a 4, incluso superior a 10, mientras que cacao Criollo fue inferior a 4. Dado que todas las muestras utilizadas en nuestro estudio correspondieron a la variedad de clones forastero

(Tabla S1), los resultados obtenidos para las muestras son menores a 4, por lo tanto, tendrían unos descriptores de finura tipo criollo. Sin embargo, no hubo una relación notable entre la relación teobromina/cafeína y el origen geográfico de las muestras; esto podría explicarse por la coexistencia de diferentes microclimas en zonas geográficamente cercanas y la variabilidad climática característica de diferentes regiones de Colombia.

América Latina representa actualmente alrededor del 15% de la producción mundial de cacao, y en Colombia, a pesar de ser un importante productor de cacao fino de aroma (término que se aplica a una producción de calidad especial), el cultivo regional de cacao enfrenta muchos desafíos, incluida la presencia de cadmio (Cd) en el suelo, un metal pesado que se acumula en los granos de cacao y se ha asociado con efectos nocivos para la salud humana (Jiménez, 2015). El Reglamento de la Comisión Europea No. 488/2014, que entró en vigor en enero de 2019, fijó límites tolerables entre 0,1 y 0,8 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ para productos derivados del cacao (EC–European Commission, 2014).

Todas las muestras del estudio entraron dentro de los límites permitidos de Cd, excepto las muestras de cacao SAR, SDR, URA 1, URA 2 y URA 3, cuyos valores excedieron los límites tolerables aceptados; esto se puede atribuir a varios factores, incluidas las características químicas, físicas y biológicas del suelo, la contaminación por el uso de agroquímicos o el agua de riego. Otro factor importante es la capacidad de asimilación de los árboles de cacao, característica que está influenciada por condiciones asociadas al genotipo de la planta.

4.1.3 *Análisis sensorial*

Las pruebas sensoriales fueron realizadas por cinco catadores del panel de Cacaos Especiales de Antioquia y Cesar (CAESCA), quienes previamente fueron entrenados según el método reportado por Chetschik *et al* (2019). Los catadores evaluaron diferentes criterios de aroma,

sabores básicos, sensación trigeminal y sabores atípicos (Tabla 11). En esta evaluación, el catador debe considerar que algunos criterios aparecen o desaparecen muy rápidamente, mientras que otros pueden persistir por más tiempo. Luego, se puntúa la intensidad de los atributos para cada descriptor, utilizando una escala de categorías de 0 “imperceptible” a 10 “intenso” (Chetschik *et al.*, 2019; STANDARD & ISO, 2003). Este sistema de denario se puede dividir en rangos más cortos de puntajes que tendrán los siguientes significados: 0 = Ninguno presente, 1 = Solo un rastro y es posible que no se encuentre si se vuelve a probar, 2 = Presente en la muestra, 3 a 5 = Claramente característico la muestra, 6 a 8 = Caracterización dominante de la muestra, y 9 a 10 = Máxima (supera algunas otras notas de sabor en la muestra) (Sukha, 2017).

Los descriptores de aroma se utilizan como indicador de los sabores dominantes que pueden estar presentes en el licor o productos de cacao. La nota de cacao se relaciona con granos de cacao bien fermentados, tostados y sin defectos. En el estudio, 13 muestras tenían una nota de cacao entre 2,3 y 2,9 (presente en la muestra), y 23 muestras tenían una nota de cacao entre 3,0 y 5,0 (caracterización clara de la muestra). El descriptor de fruta fresca está relacionado con notas de frutas cítricas (limón, naranja), frutas tropicales (piña, maracuyá) y bayas (frambuesa, mora) (Chatelain *et al.*, 2019). Aquí, el número de muestras con notas de frutas cítricas fue 8 entre 0,0 y 0,9 (ninguna presente), 18 entre 1,0 y 1,9 (solo un rastro), 5 entre 2,0 y 2,5 (presente en la muestra) y 5 entre 3,0 y 4,4 (caracterizando claramente la muestra). El atributo de frutos secos se asocia con notas de albaricoques y pasas, entre otros (Seyfried & Granvogl, 2017); dentro del grupo de muestras, 8 estuvieron entre 0 y 0,9 (ninguna presente), 27 entre 1,0 y 1,9 (solo un rastro), y solo 1 muestra (SNM) se caracterizó por presentar este tipo de notas (2,3). El aroma floral, relacionado con notas de azahar, tilo y rosa fresca, solo estuvo presente en trazas en las muestras CCN 3, URA

3 y POR 1 (valores entre 1,0 y 1,3). El aroma a madera, relacionado con notas de roble, teca, fresno o haya, solo estuvo presente en trazas en 5 muestras CCN 1, CCN 4, CCN 8, CCN 13 y MAN 5 (valores entre 1,0 y 1,5). La especia se refiere a las notas especiadas como la canela, el clavo, la vainilla, el pimiento morrón o el tabaco. Estas especias se encontraron en trazas en 14 muestras (1,0–1,8) y estaban presentes en las muestras CCN 4 y MAN 3 (2,0–2,4). El descriptor nuez está relacionado con notas de nuez como almendra, avellana y maní, entre otras. Los resultados mostraron que el número de muestras con notas a nuez fue 1 (CCN 12) con un valor de 0,8 (ninguno presente), 14 entre 1,3 y 1,9 (solo un rastro), 16 entre 2,0 y 2,9 (presente en la muestra), y 5 entre 3,0 y 3,3 (que caracteriza claramente a la muestra). El dulzor o caramelo se refiere a notas de miel, panela, dulce de leche o jugo de caña (Schnermann & Schieberle, 1997); 3 muestras (L8T7, CCN 10 y CCN 12) se caracterizaron por una ausencia de dulzura (0,7–0,8), 29 muestras tenían trazas de dulzura (1,0–1,9) y 4 muestras (URA 1, CCN 4, CCN 13, y SV1) tenían dulzura (2,0–2,8). Finalmente, el aroma relacionado con la intensidad del tostado del cacao estuvo presente en 16 muestras (2,2–2,9), con 19 muestras (3,0–5,8) y solo 1 muestra (CCN 8) con un valor de 6,8.

El sabor es un criterio clave para determinar la calidad de los productos de cacao. Este criterio incluye la intensidad del sabor a cacao o chocolate, junto con otras notas aromáticas secundarias, y la ausencia de sabores indeseables. Los descriptores de sabores básicos (acidez y amargor), sensación trigeminal (astringencia) y sabores atípicos se utilizaron para calificar el sabor de las muestras de cacao en este estudio (Tabla 11). El sabor ácido está relacionado con los ácidos acético y láctico formados durante la fermentación. Un alto nivel de acidez generalmente se asocia con un pH de 5,0 (o menos) en los granos secos, lo que da como resultado un sabor indeseable y

un producto de cacao deficiente. Normalmente, cuando se lleva a cabo un secado adecuado, la acidez provocada por el ácido acético se reduce a un valor bajo aceptable (End, 2015).

Tabla 11.

Resultados de los descriptores en sabores básicos, sensación trigeminal, sabores atípicos y puntaje sensorial general de las muestras de cacao

# I.D	Identificación de la muestra	Acidez	Amargura	Astringencia	Sabores atípicos	Calificación global
1	MAN 1	3,3	3,0	3,0	0,0	8,2
2	MAN 2	2,1	3,7	1,4	0,0	7,0
3	MAN 3	4,2	4,2	1,3	0,0	7,3
4	POR 1	3,3	2,5	2,0	0,0	7,4
5	REG	2,0	3,4	1,6	1,0	6,3
6	SAR	6,0	2,3	1,6	0,0	8,4
7	MAK	2,1	2,4	1,3	0,0	7,3
8	URA 1	2,9	1,8	1,9	0,0	8,8
9	URA 2	2,2	3,0	1,8	0,0	7,7
10	POR 2	2,6	2,3	1,4	0,0	8,0
11	SDR	4,3	3,0	1,4	0,0	8,3
12	URA 3	2,1	2,4	1,4	0,0	7,9
13	CCN 1	2,4	4,7	2,3	0,0	6,5
14	L8T7	1,5	5,3	1,5	1,9	4,9
15	CCN 2	3,4	4,0	2,4	0,0	7,1
16	CCN 3	1,9	3,8	1,9	0,0	7,0
17	CCN 4	5,0	4,9	3,0	0,0	7,2
18	CCN 5	2,5	3,1	2,3	0,5	7,4
19	CCN 6	3,8	3,0	1,6	0,0	7,8
20	CCN 7	2,6	3,3	2,4	0,0	7,1
21	CCN 8	2,4	3,4	2,2	0,0	6,0
22	CCN 9	2,3	4,0	2,1	0,0	7,1
23	CCN 10	1,5	3,7	3,3	0,0	7,0
24	CCN 11	1,8	3,3	2,5	0,0	7,0
25	CCN 12	5,0	3,2	1,7	1,3	5,3

26	CCN NO	2,1	3,4	1,4	0,0	8,3
27	MAN 4	3,8	3,0	2,0	0,0	7,7
28	MAN 5	3,7	3,3	1,7	0,0	6,3
29	SV 1	2,7	3,8	2,1	0,0	6,8
30	SV 2	3,6	3,0	2,0	0,0	7,7
31	CCN 13	2,3	4,1	1,8	0,0	7,8
32	MEZ 1	4,9	3,0	1,6	0,0	7,9
33	MAN 6	4,3	3,7	1,7	0,0	7,5
34	MON	6,2	3,0	1,7	1,0	6,7
35	ICS	2,3	3,8	2,1	1,0	6,5
36	SNM	2,2	2,5	1,7	0,0	8,3

La acidez de las muestras L8T7, CCN 3, CCN 10 y CCN 11 tuvo el valor más bajo (1.5–1.9), mientras que 14 muestras estuvieron entre 2,0 y 2,9 (nivel 2, presente), se encontraron características claras para 13 muestras (3,3 –5,0) y característica dominante para SAR y MON (6,0–6,2). En relación al grado de amargor y astringencia (contracción de la mucosa bucal provocada por estímulos químicos como los polifenoles), se considera que cierto valor forma parte del complejo gustativo del chocolate, pero su presencia excesiva resulta desagradable y generalmente se asocia con Fermentación insuficiente, granos pizarrosos y morados. Esto se puede corregir teniendo un mayor porcentaje de granos de color parcialmente marrón en lugar de morados, con procesos adecuados de cosecha, fermentación y secado (Amoa-Awua, 2015) . En este estudio, 1 muestra (URA 1) tenía un amargor de 1,8 (solo una traza), 6 muestras (POR 1, POR 2, SAR, MAK, URA 3 y SNM) estaban en el rango de 2,3–2,5 (presente). en la muestra), y 29 muestras estaban entre 3,0 y 5,3 (caracterizando claramente a la muestra). Los valores de astringencia estuvieron entre 1,3 y 1,9 para 21 muestras (solo una traza), entre 2,0 y 2,5 para 12 de las muestras (presentes en la muestra) y entre 3,0 y 3,3 (caracterizando claramente la muestra) para las muestras MAN 1, CCN 4, y CCN 10. Finalmente, considerando que el cacao es un material

grado alimenticio, es muy importante realizar un manejo adecuado para evitar la presencia de sabores indeseables como podredumbre, moho, humo, residuos animales, copra, caucho, combustibles, entre otros (FDA, 2017). Esto se debe al comportamiento absorbente de la grasa de cacao, que es muy eficaz para todo tipo de contaminación. Aquí, la mayoría de las muestras no presentaron ningún sabor atípico, y solo 5 muestras tenían trazas de atípicos, L8T7 (1,9) informó un sabor atípico asociado con el plástico, CNN 12 (1,3) presentó un desagradable sabor a fruta amarga y demasiado madura persistente (rancio), REG, MON e ICS (1.0) presentaron un pequeño defecto de rancio, almacenado y vinagre. La puntuación general refleja la impresión de calidad en términos de limpieza, intensidad, complejidad del aroma y equilibrio entre los sabores de la muestra (Sukha *et al.*, 2008). Los resultados mostraron que 8 muestras tenían una puntuación general regular entre 4,9 y 6,8, y 28 muestras tenían una puntuación general alta superior a (o igual a) 7,0. L8T7 fue la muestra con la puntuación más baja (4,9), probablemente relacionada con la presencia de sabores atípicos en las trazas, y URA 1 fue la muestra con la puntuación más alta (8,8).

4.2. Optimización del método de extracción de metabolitos de cacao

Para la optimización del método de extracción, primero se evaluó el proceso de desengrasado (Sección 3.2.1), segundo, se evaluó el solvente de extracción (Sección 3.2.2.1) y tercero, se evaluó tiempo y temperatura de extracción para ello se realizó un diseño experimental 2^2 con dos factores, dos niveles y 2 réplicas en el punto central (Sección 3.2.2.2).

4.2.1 Proceso de desengrasado

Se realizaron tres tratamientos variando las veces que se hizo el proceso de desengrasado, cada tratamiento se hizo por triplicado. Al final de cada proceso se calculó la cantidad de grasa extraída como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12.

Resultados proceso de desengrasado con n-hexano en muestras de cacao en grano

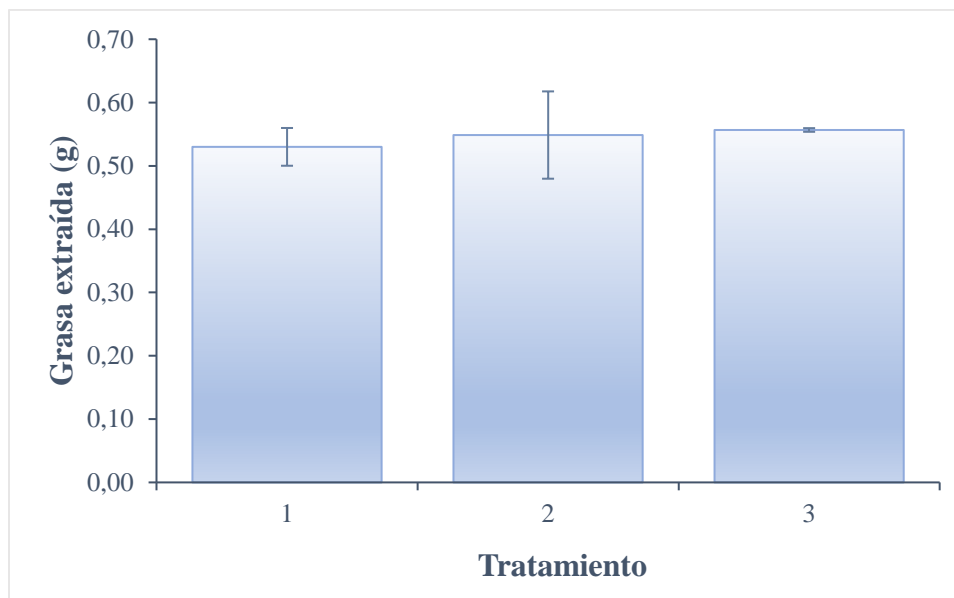
Tratamiento	Cantidad de grasa extraída (g)	\bar{X} (g)	D. E.
1	0,538	0,53	0,03
	0,555		
	0,497		
2	0,473	0,55	0,069
	0,565		
	0,608		
3	0,560	0,56	0,003
	0,555		
	0,555		

Nota1. Los análisis se realizaron con la muestra MACP01

Nota2. Tratamiento número de repeticiones de extracción con *n*-hexano (sección 3.2.1); \bar{X} : promedio y D.E: desviación estándar de la media

Figura 10.

Resultados proceso de desengrasado en la muestra MACP01



El análisis de varianza ANOVA (Tabla S3) de una vía aplicado a los datos, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (valor $p=0,7526$). En la Figura 10 se observa que una cantidad mayor de grasa extraída de los granos de cacao sucede cuando el proceso de desengrasado es 3 veces con 12 mL de hexano cada una (tratamiento 3). Sin embargo, al no ser estadísticamente significativo, se optó por realizar el proceso de desengrasado una sola vez a cada muestra de grano de cacao (tratamiento 1).

4.2.2 Evaluación del solvente de extracción

Para determinar el mejor solvente de extracción se realizó un diseño experimental generalizado, en el que se evaluaron 10 condiciones usando soluciones acuosas de metanol

(MeOH) y acetonitrilo (ACN) a diferentes concentraciones % v/v (Sección 3.2.2., Tabla 136) y como variable de respuesta se evaluó el contenido de fenoles totales.

Tabla 13.

Evaluación de solvente de extracción para metabolitos no volátiles en muestras de cacao en grano

Contenido de fenoles totales (mg Ácido gálico/g de muestra seca)		
T	\bar{X}	D. E
1	107,1	9,2
2	91,6	1,3
3	83,9	3,7
4	80,3	4,1
5	92,8	1,4
6	84,5	0,8
7	83,6	2,2
8	79,4	0,9

Nota. Muestra de cacao utilizada MACP01

Nota 1. T: tratamiento (sección 3.2.2.1); \bar{X} : promedio y D.E: desviación estándar de la media

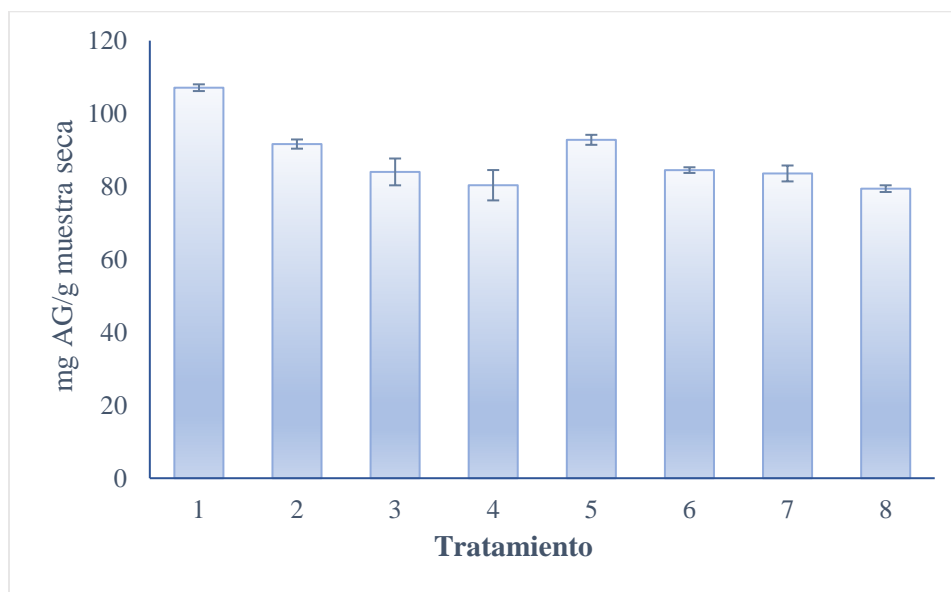
Nota 2. *1. Acetonitrilo (ac) 50% v/v; 2. Acetonitrilo (ac) 75% v/v; 3. Metanol (ac) 50% v/v; 4. Metanol (ac) 75%; 5. *Acetonitrilo (ac) 50% con H₃PO₄ (0,03%); 6. Acetonitrilo (ac) 75% - H₃PO₄ (0,03%); 7. Metanol (ac) 50% con H₃PO₄ (0,03%); 8. Metanol (ac) 75% con H₃PO₄ (0,03%).

De acuerdo al análisis estadístico ANOVA (Tabla S5), para evaluar el factor “solvente”, resultó en un valor-p de 0,00 indicando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Con base en lo anterior, se estableció que el Tratamiento 1 (ACN acuoso al 50% v/v) permitió extraer el mayor contenido de fenoles de las muestras (Figura 11), en comparación con otros tratamientos en los cuales el solvente de extracción fue metanol, acetonitrilo o soluciones acuosas

a diferentes concentraciones de estos solventes orgánicos. Con base en lo anterior, se utilizó ACN (ac) al 50% (v/v) como solvente de extracción para los demás experimentos.

Figura 11.

Contenido de fenoles totales de acuerdo a la evaluación de solventes de extracción



4.2.3 Evaluación de variables de extracción tiempo y temperatura

El diseño factorial 2^2 , se estableció dos factores, dos niveles y cuatro réplicas en el punto central, 10 experimentos en total (Tabla 14). Como factores controlables tiempo (20, 30, 40 minutos) y temperatura (25, 35 y 45°C). El contenido de fenoles totales fue la variable de respuesta.

Este diseño experimental es un modelo de diseño factorial 2^k con réplicas en el punto central, son denominados diseño factorial 2^k los diseños en los cuales cada uno de los factores cuenta con dos niveles, es decir cuando se realiza un experimento con un número de factores k en el que cada uno de estos solo puede adoptar dos niveles. Estos niveles podrían ser cuantitativos o

cualitativos y una réplica completa de tal diseño requiere realizar 2k combinaciones (Fernández, 2020). El modelo que sigue este diseño es:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo μ el efecto promedio global, τ_i el efecto del nivel i-ésimo del factor A, β_j el nivel j-ésimo del factor B, $(\tau\beta)_{ij}$ el efecto de la interacción entre τ_i y β_j , y ϵ_{ijk} un componente del error aleatorio. Con $i=1,2$; $j=1,2$; $k=1 \dots n$.

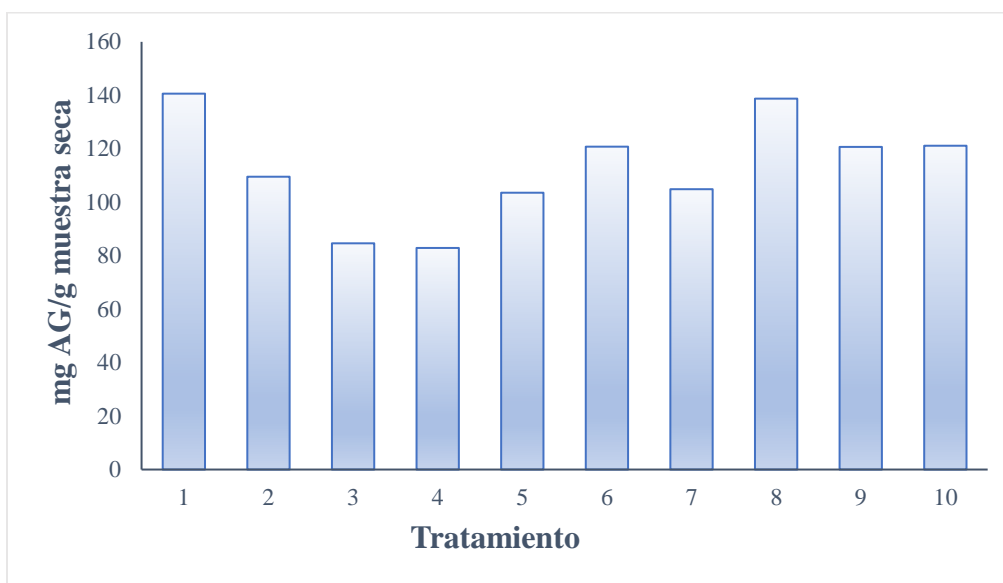
Tabla 14.

Contenido de fenoles totales [expresado en mg de ácido gálico (A.G) /g de muestra seca] de acuerdo a la evaluación de condiciones de tiempo y temperatura de extracción

No.	[A]	[B]	[A]	[B]	mg A.G/g de muestra seca
			Tiempo (min)	Temperatura (°C)	
1	-1,4	0	16	35	140,6
2	-1	-1	20	25	109,5
3	1	-1	40	25	84,6
4	0	-1,4	30	21	82,9
5	0	1,4	30	49	103,6
6	-1	1	20	45	120,8
7	1	1	40	45	104,9
8	1,4	0	44	35	138,8
9	0	0	30	35	120,7
10	0	0	30	35	121,1

Figura 12.

Contenido de fenoles totales de acuerdo a condiciones de extracción evaluadas: tiempo y temperatura



De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 12, se puede observar que los tratamientos 1 y 8, son los que presentaron mejores resultados en cuanto a la cantidad de fenoles totales extraídos. El análisis de varianza ANOVA (Tabla S8) mostró que, el tratamiento 1 es más significativo, por lo tanto, la extracción de polifenoles se ve favorecida cuando el tiempo es 16 minutos y la temperatura tiene un valor de 35°C (Tabla 11).

Diversos estudios acerca del cacao y sus aplicaciones han profundizado en el proceso de la determinación de la composición del grano y, en la actualidad, se cuenta con una diversa cantidad de metabolitos ya identificados y reportados. Los granos fermentados y secos, etapas del beneficio al que han sido expuestas las muestras usadas en el estudio, están compuestos químicamente por proteínas, azúcares, polifenoles, metilxantinas, ácidos grasos, ácidos orgánicos, entre otros.

Teniendo esto en consideración se define dos solventes de extracción: metanol, el cual se clasifica como un solvente polar prótico (Ayala, 2014) y el acetonitrilo, que es un solvente polar aprótico, los cuales, se evaluaron en diferentes proporciones de forma que existiera variación en el grado de polaridad del solvente (Sarria *et al.*, 2021). La condición óptima de solvente de extracción fue acetonitrilo (ac) al 50% (v/v), esto puede ser explicado por la afinidad del solvente y las estructuras químicas presentes en el grano mencionadas con anterioridad. Además, el acetonitrilo y el metanol son solventes compatibles con instrumentos analíticos: comúnmente utilizado en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y espectrometría de masas (MS) (Bass, 2014). Sin embargo, el acetonitrilo se usó en la extracción por SPE, ya que, asegura que los metabolitos extraídos sean compatibles con las técnicas analíticas posteriores. Su baja viscosidad permite una fácil manipulación y flujo a través de las columnas de SPE durante el proceso de extracción, lo que permite una fácil elución de los metabolitos en una matriz compleja, además, posee bajo punto de ebullición, lo que facilita su evaporación durante el proceso de concentración de las muestras, si es necesario (Lujano *et al.*, 2019).

La mayoría de las moléculas tiene estructuras con grupos polares; a menudo el acetonitrilo se mezcla con metanol o agua para optimizar sus propiedades de extracción. Para los polifenoles extraíbles, el metanol y mezclas de este con agua son los solventes más usados, se han usado otros solventes como el acetonitrilo o acetona para extraer otros compuestos fenólicos de menor polaridad (Vargas, 2020). El comportamiento de las metilxantinas también explica la tendencia del factor concentración. En la tesis de investigación elaborada por Ayala (2016) se afirma que la cafeína tiene mayor afinidad por solventes polares y la teobromina por los medianamente polares, basados en que las metilxantinas poseen átomos de nitrógeno en los heterociclos metilados.

El factor temperatura, determinado en 35 °C, se explica en cierta forma por la necesidad de mantener la integridad de la composición química de la muestra; es decir, en la etapa de fermentación, el grano de cacao alcanza temperaturas superiores a 45 °C y en el secado al sol se pueden alcanzar temperaturas superiores en 5 a 15 °C con respecto a la temperatura ambiente (Perea, 2019), siendo ambas etapas aquellas que pueden afectar la composición química de las muestras, que en este caso fue lo que se quiso evitar. Finalmente, se estableció como variables de extracción de polifenoles para las muestras de cacao: acetonitrilo (ac) al 50% (v/v) como solvente de extracción, tiempo de 16 minutos y temperatura de 35 °C. Con base a los parámetros de extracción descritos anteriormente, se llevó a cabo la extracción de los metabolitos en las 36 muestras de cacao en grano provenientes de las fincas ubicadas en Maceo (Antioquia), Manaure (Cesar), Santa Marta (Magdalena), San Vicente de Chucurí (Santander) y Norte de Santander, Colombia, (Tabla 8) y se determinó el contenido de fenoles totales (Tabla 15).

4.24 Extracción de metabolitos en muestras de cacao en grano

Teniendo en cuentas las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles: solvente acetonitrilo (ac) al 50% (v/v), tiempo de 16 minutos y temperatura de 35 °C, se realizó la extracción de los metabolitos a las treinta y seis muestras que hicieron parte de este estudio. Para cuantificar los polifenoles se realizó una curva de calibración con un R^2 de 0,9924 de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu (patrón de Acido Gálico) (Figura S2).

En la Tabla 15 se presenta la concentración de polifenoles que posee cada una de las 36 muestras estudiadas. Según los resultados, el contenido de fenoles totales varió entre 88,1 y 168,2 mg AG/g de muestra; 30 muestras presentaron un valor superior a 100 mg AG/g de muestra, lo que se considera alto contenido para granos no tostados (Aprotosoai *et al.*, 2016). Un resultado

como el anterior es deseable, ya que los polifenoles contribuyen al sabor astringente del cacao, son antioxidantes adecuados (inhiben la peroxidación de lípidos al reducir los radicales libres y quelan metales) y son responsables de los beneficios para la salud asociados con el consumo de cacao (Aprotosoai *et al.*, 2016). Como se observa en la Figura 13, la muestra N° 23 fue la que presentó la mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Tabla 15.

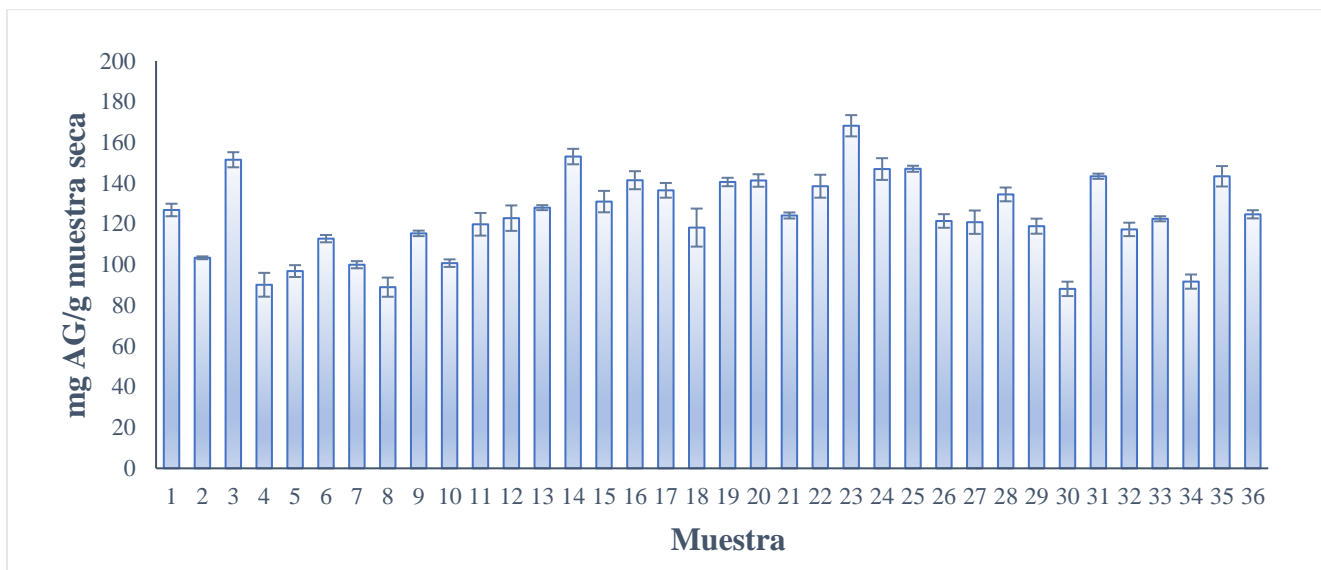
Cuantificación de fenoles totales [expresado en mg de ácido gálico (A.G) / g de muestra seca] en la extracción de metabolitos en muestras de cacao en grano

# I.D	Identificación muestra	mg A. G/g muestra seca)	
		\bar{X}	D. E
1	MAN 1	126,8	3,1
2	MAN 2	103,4	0,7
3	MAN 3	151,5	3,7
4	POR 1	90,1	5,8
5	REG	96,8	2,9
6	SAR	112,8	1,8
7	MAK	100,0	1,7
8	URA 1	88,9	4,7
9	URA 2	115,4	1,3
10	POR 2	100,7	1,9
11	SDR	119,8	5,6
12	URA 3	122,8	6,2
13	CCN 1	128,0	1,2
14	L8T7	153,1	3,8
15	CCN 2	131,0	5,3
16	CCN 3	141,4	4,4
17	CCN 4	136,5	3,6

18	CCN 5	118,2	9,3
19	CCN 6	140,6	2,1
20	CCN 7	141,3	3,1
21	CCN 8	124,1	1,5
22	CCN 9	138,5	5,6
23	CCN 10	168,2	5,2
24	CCN 11	146,9	5,3
25	CCN 12	147,1	1,5
26	CCN NO	121,4	3,3
27	MAN 4	120,8	5,7
28	MAN 5	134,5	3,4
29	SV 1	118,9	3,7
30	SV 2	88,1	3,5
31	CCN 13	143,4	1,3
32	MEZ 1	117,3	3,3
33	MAN 6	122,5	1,2
34	MON	91,7	3,5
35	ICS	143,4	5,0
36	SNM	124,7	2,0

Figura 13.

Contenido de fenoles totales en muestras de cacao en grano



4.3. Análisis cromatográfico de los extractos

Los metabolitos de cacao fueron extraídos y analizados según la metodología descrita en las secciones 3.2.2. y 3.4. Los parámetros utilizados para los análisis cromatográficos y en la detección mediante espectrometría de masas fueron descritos en las secciones mencionadas. Como resultado de este primer paso de análisis instrumental, se lograron obtener 108 archivos en formato .raw, correspondientes a los cromatogramas de iones completos del triplicado de las 36 muestras y, cuatro réplicas de control de calidad (QC). Estos archivos fueron procesados según lo descrito en la sección 3.5.2. y analizados en la plataforma XCMS para continuar el proceso de tratamiento de datos.

4.3.1. Tratamiento preliminar de los datos y obtención de las tablas de intensidad de iones

En la

Figura 14 se muestra el cromatograma de corriente iónica total obtenido del análisis mediante la técnica de UHPLC/MS, para la muestra N° 5 (REG). Es destacable que, en todas las muestras se evidenció un mayor número de señales entre 0 y 12 min.

Mediante la plataforma XCMS, y siguiendo los parámetros descritos en la sección 3.5.2., se realizaron los procesos de tratamiento de datos, entre ellos el alineamiento de los cromatogramas a lo largo de las muestras, y la corrección en la deriva del tiempo de retención. La Figura 15 muestra las gráficas de los cromatogramas de iones totales antes y después del proceso de alineamiento realizado mediante un trabajo en modo multigrupo con la plataforma XCMS. A continuación, se realizó el proceso de conversión de los cromatogramas de iones completos a tablas de intensidad de iones. Para esto se tomaron los datos de relación masa carga (m/z) promedio e intensidad relativa, y se dispusieron en forma de tablas; en estas, cada columna representó el perfil químico completo de las muestras estudiadas.

Figura 14.

Perfil cromatográfico de corriente iónica total obtenido para la muestra N° 5 (REG) mediante análisis UHPLC/MS

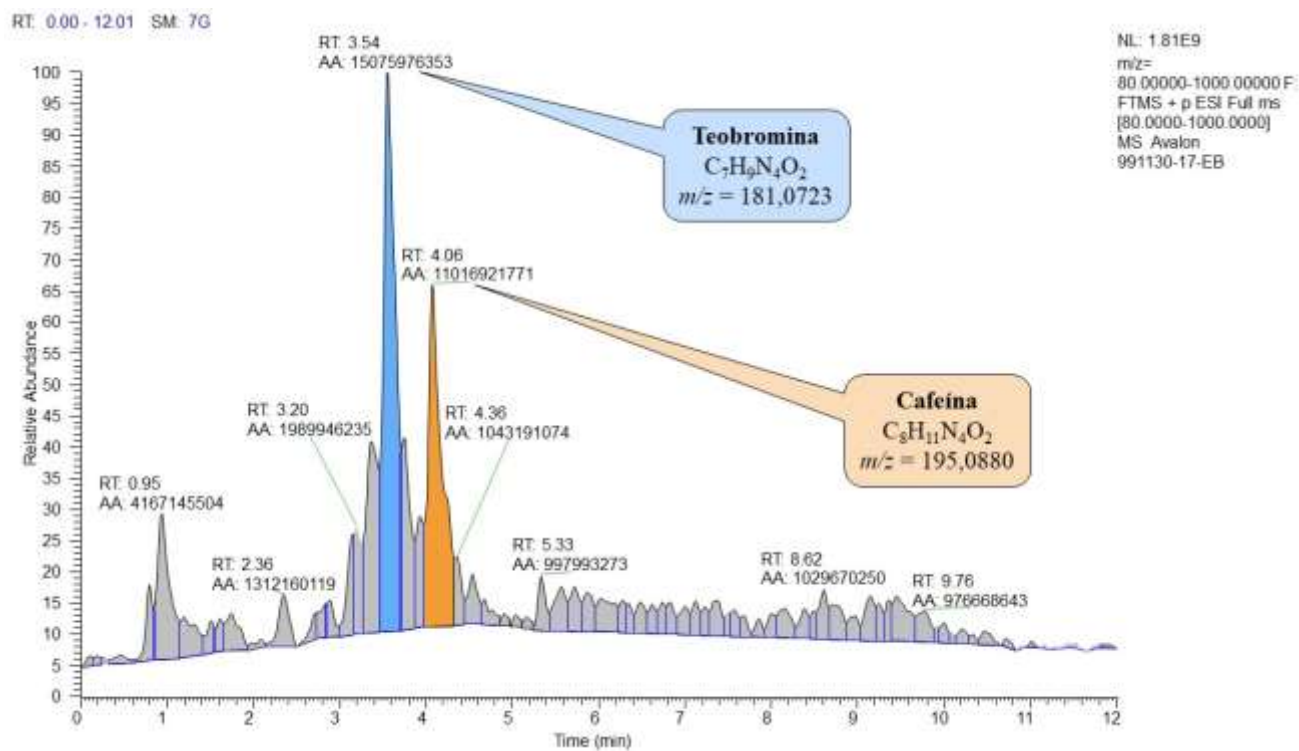
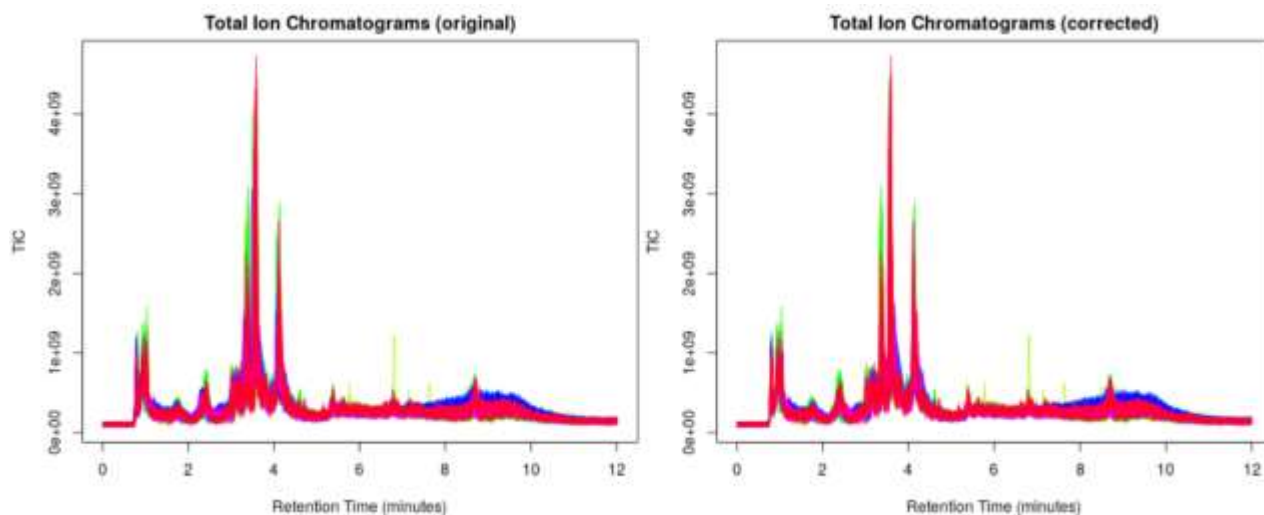


Figura 15.

Cromatogramas antes (izquierda) y después (derecha) de la corrección de los tiempos de retención y alineación de los datos mediante el uso de XCMS online



A partir de las tablas de intensidad de iones, se obtuvieron arreglos matriciales de datos, en los que se registró la intensidad relativa y relación masa/carga (m/z) de cada una de las muestras de estudio en modo de iones positivo. Como resultado de este proceso se generaron archivos delimitados por comas en Excel, que describieron los cromatogramas de iones completos de las muestras, los cuales fueron conformados por 1304 características (m/z) para el modo de adquisición positivo.

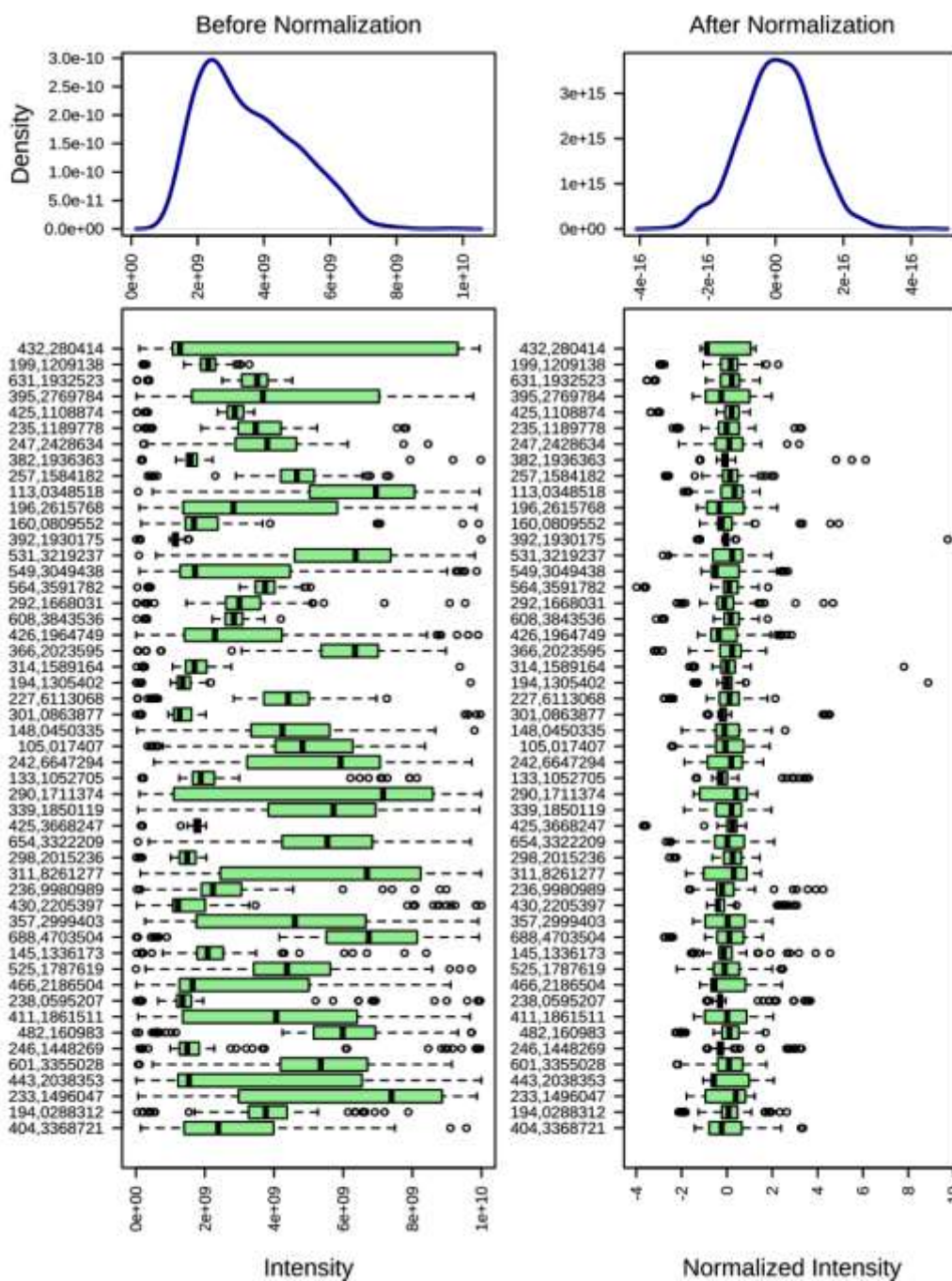
Para realizar un mejor filtrado de datos, y asegurar que las alteraciones entre los perfiles químicos de las muestras correspondieron a cambios en el metabolismo y no a factores de ruido, se realizó un filtrado con base en el coeficiente de variación de los valores de intensidad relativa de las muestras de control de calidad. Aquellas características (m/z) que presentaron un CV igual o mayor al 30% fueron retiradas de los datos consolidados en la tabla de Excel. Como resultado

de esta operación, se obtuvieron plantillas de datos, correspondientes a los perfiles metabólicos de las muestras de estudio. Estos archivos estuvieron conformados por 1204 características (m/z) para el modo de adquisición de iones positivos.

Las plantillas mencionadas en la sección anterior fueron cargadas en la plataforma de análisis bioinformático Metaboanalyst 5.0, para continuar con los análisis de datos multivariados.

Figura 16.

Box plot y kernel density plots antes y después de la normalización para las muestras y controles de calidad haciendo uso del método seleccionado: Normalization by sum, y el escalado de datos or Autoscaling



En este caso el análisis PCA determinó que se requieren de cinco componentes principales para explicar una varianza, de un 22.7%. El componente principal 1 y componente principal 2 explican el 7.9% y 4.9% respectivamente, consiguiendo una varianza acumulada del 12.8% (Figura 17). El valor de la varianza explicada es muy bajo, esto indica que casi no hay diferencias entre las muestras, por lo tanto, son muy parecidas.

Figura 17.

Varianza explicada por los componentes principales. La línea verde representa la varianza acumulada y la línea azul muestra la varianza explicada por cada uno de los componentes principales

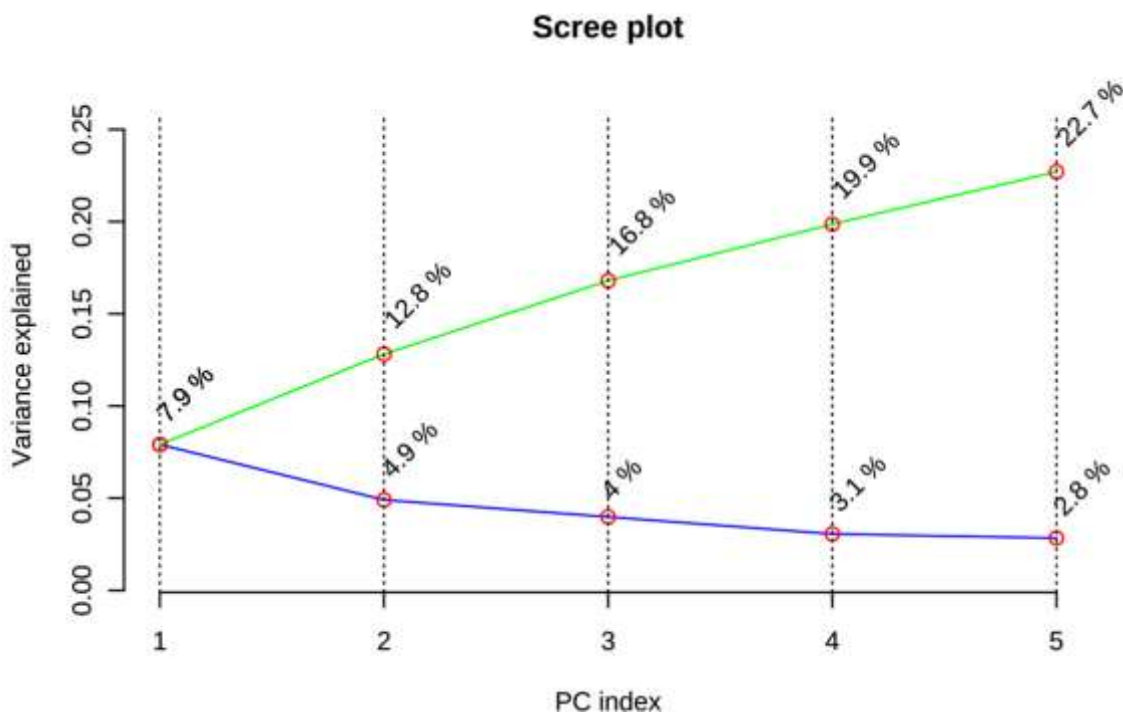
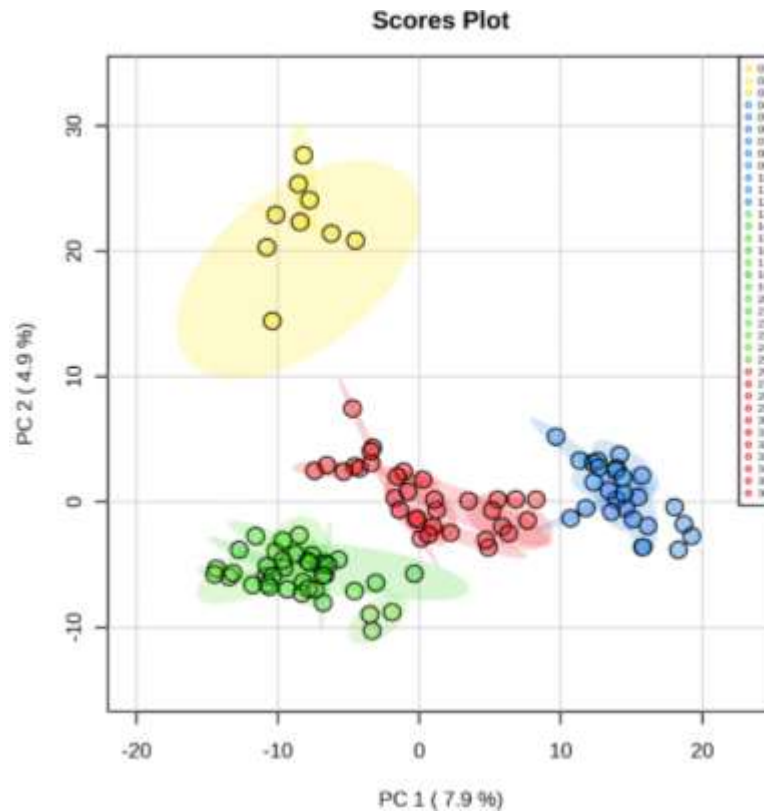


Figura 18.

Análisis de Componentes Principales (PCA) de los perfiles químicos de muestras de granos de cacao



Nota. Las muestras con los valores más cercanos en los dos primeros componentes se agruparon en el mismo grupo. Los cuatro grupos se diferenciaron por color: Amarillo (muestras 1 a 3), azul (muestras 4 a 12), verde (muestras 13 a 25) y rojo (muestras 26 a 36). Para ver el identificador de la muestra, dirigirse a la Tabla 10.

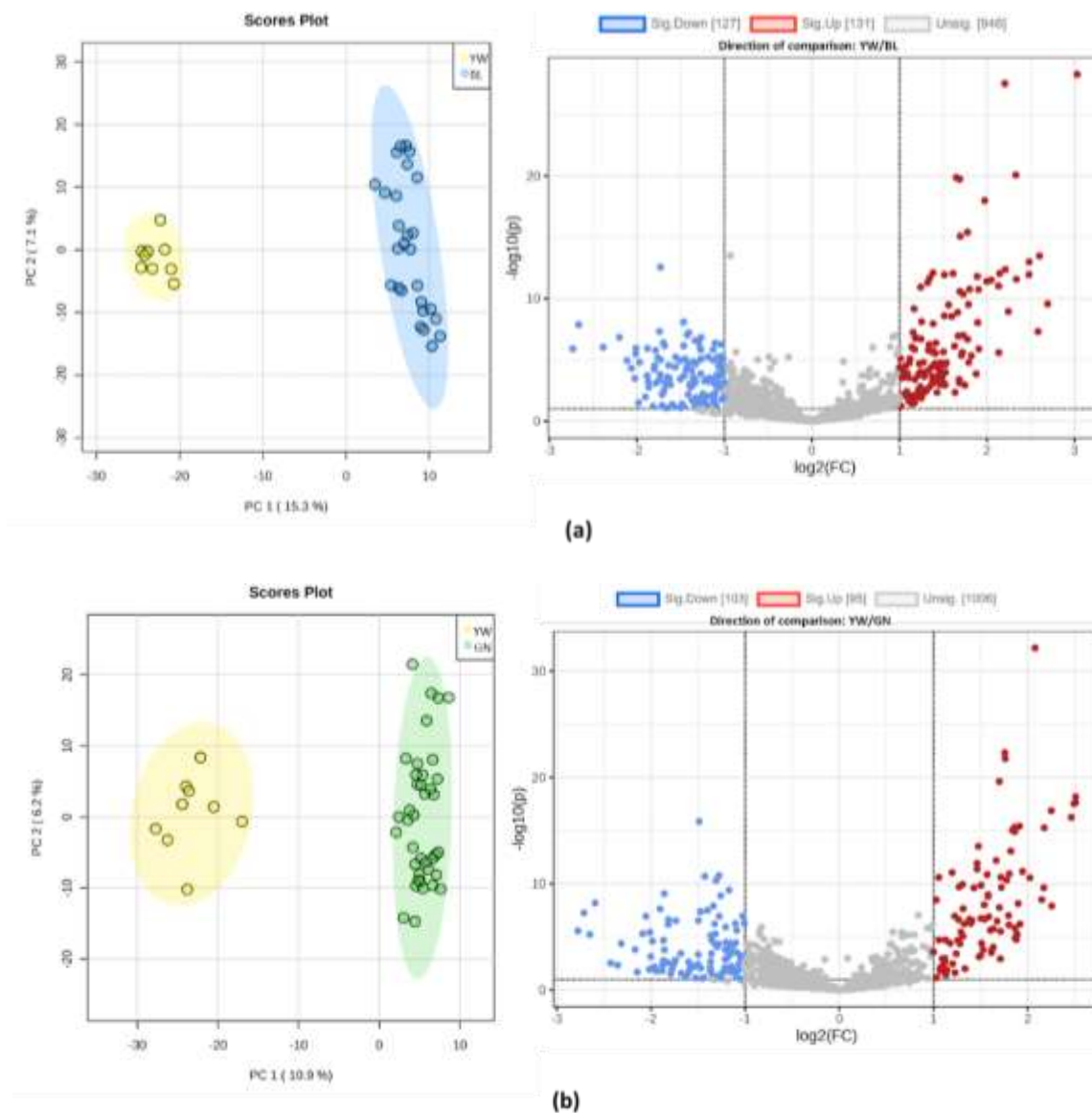
La Figura 18, muestra el gráfico de PCA con una covarianza de las muestras a través de dos ejes de coordenadas o componentes; en este sentido, es probable que las muestras agrupadas

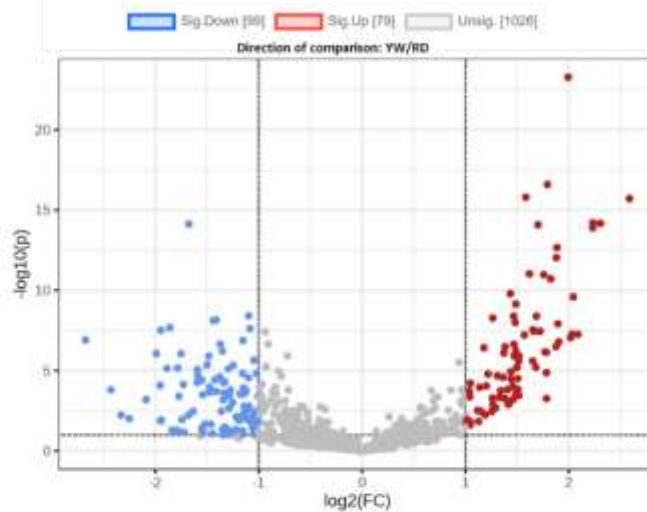
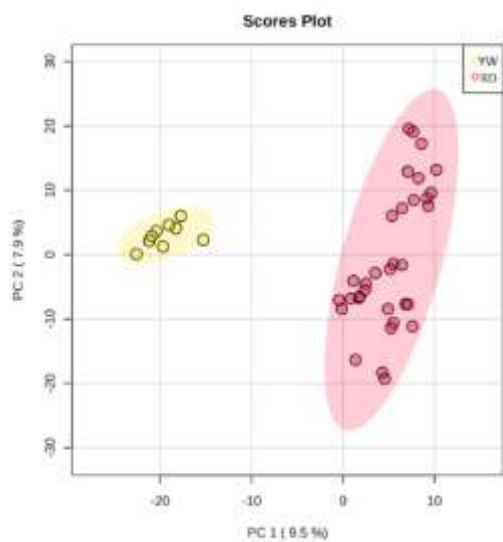
en estos componentes tengan patrones químicos similares y, por lo tanto, presenten propiedades sensoriales similares. El primer componente (PC-1) explicó el 7,9% de la varianza total, mientras que el PC2 explicó el 4,9%. Estos resultados mostraron una clara agrupación de las muestras en torno a 4 grupos principales, que se clasificaron en codificación basada en colores como se describe en Figura 18.

Después de la agrupación, los grupos se analizaron mediante métodos univariados y multivariados en pares. Por lo tanto, todas las muestras dentro del mismo grupo se compararon con cada uno de los otros grupos, definidos por código de colores como amarillo, azul, verde y rojo; estos grupos constaban de 3, 9, 11 y 13 muestras, respectivamente (Figura 18). Esto se aplicó para determinar las características (m/z) estadísticamente significativas y diferenciadas entre estos grupos.

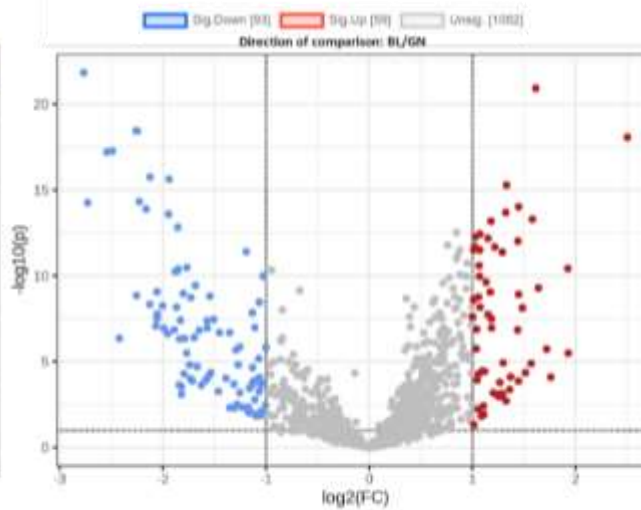
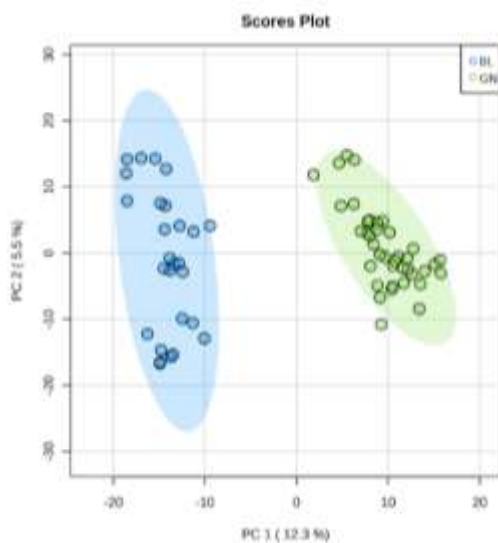
Figura 19.

Gráficas de análisis de componentes principales (izquierda) y gráficas de volcán (derecha) de grupos analizados en pares: (a) amarillo vs azul, (b) amarillo vs verde, (c) amarillo vs rojo, (d) azul vs verde, (e) verde vs rojo, (f) azul vs rojo.

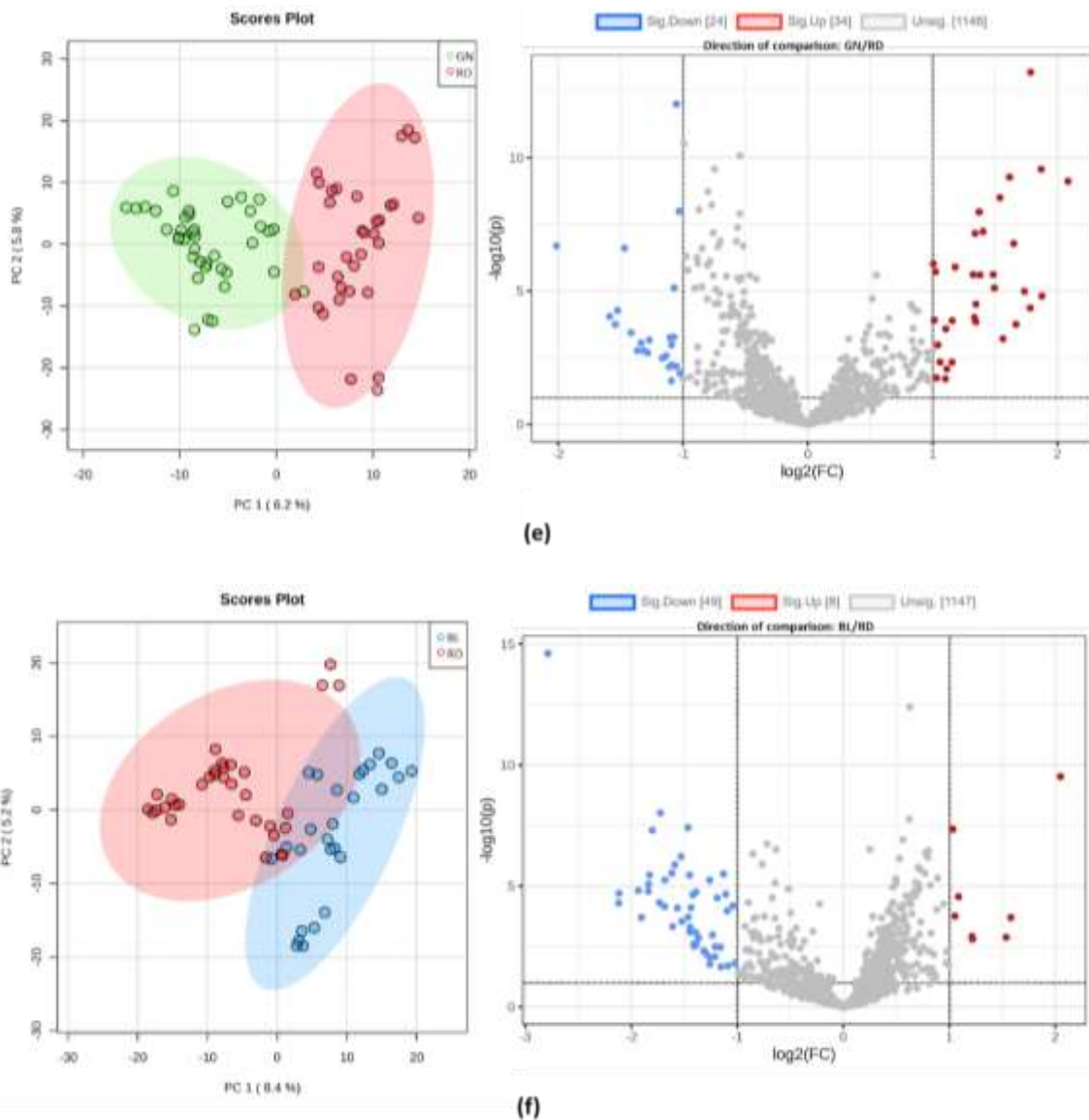




(c)



(d)



Nota. En los gráficos de volcanes, el eje y representa el valor p con un umbral de 0,1, y el eje x representa el Fold change (FC) con un umbral de 2,0.

Como se observa en la Figura 19, la mayor parte de la varianza observada en los gráficos de puntuación de PCA de los pares de grupos se atribuyó al PC1. Las parejas que presentaron una separación satisfactoria fueron amarillo/azul, amarillo/verde y azul/verde, las cuales habían

presentado valores de varianza superiores al 9% en PC1. Por otro lado, se observó que los pares de grupos que presentaban una varianza explicada inferior al 8,5% en PC1 presentaban una separación deficiente y se superponían. Por lo tanto, se concluyó que el análisis PCA no podía diferenciar el grupo rojo del azul y verde (Figura 19 e, f). Estos resultados concuerdan con los descritos en la Figura 18, donde no se observó una separación definida en el primer componente (PC1) entre los grupos rojo, azul y verde.

A partir de los análisis de PCA por pares, el siguiente número de características (m/z) aumentó significativamente: 131 para amarillo/azul, 95 para amarillo/verde, 79 para amarillo/rojo, 59 para azul/verde, 34 para verde/rojo, y 8 para azul/rojo. En contraste, se encontró el siguiente número de características significativas (m/z): 127 para amarillo/azul, 103 para amarillo/verde, 99 para amarillo/rojo, 93 para azul/verde, 24 para verde/rojo y 49 para azul/rojo. Con respecto al número de características que diferenciaban los grupos amarillo, azul y verde, las comparaciones azul/rojo y verde/rojo mostraron pocas características significativamente diferentes. Con base en los resultados generales de PCA y Volcano Plots, se encontró que las muestras correspondientes al grupo rojo tenían perfiles químicos como los de los grupos verde y azul; por lo tanto, se decidió excluir a este grupo de la siguiente parte del análisis químico.

Una vez que se seleccionaron los tres grupos de interés, se exploraron las características aumentadas y disminuidas (m/z) para encontrar el metabolito correspondiente responsable de la separación en los gráficos de puntuación. Para esto, se utilizó el análisis de fold change (FC), que describe cuánto cambia una cantidad de un grupo a otro (Witten & Tibshirani, 2007). Para discriminar las características diferenciales (m/z), se determinó que los valores de Fold change mayores (o iguales a) 2,0 están relacionados con características significativas positivas (+),

mientras que los valores menores (o iguales a) 0,5 están relacionados con características significativas negativas (-). Por ejemplo, para m/z 466,2002, se determinó un valor FC de 4,70 para la relación verde/azul, lo que indica una mayor cantidad de este analito en el grupo verde en comparación con el grupo azul. Para la relación verde/amarillo, se encontró un valor de FC de 4,03, que se correlaciona con una mayor cantidad de analito en el grupo verde en comparación con el grupo amarillo. En cambio, en la relación amarillo/azul se encontró un valor de 0,86, lo que indica que este analito no permite diferenciar los grupos azul de amarillo. Teniendo esto en cuenta, la relación m/z 466,2002 se registra como aumentada para el grupo verde (+) pero disminuida para los grupos azul y amarillo (-). Teniendo en cuenta los resultados de Fold change (FC), solo las siguientes características (m/z) se encontraron diferentes: i) para el grupo amarillo, 16 metabolitos estuvieron significativamente modulados al alza (mayor abundancia) y 15 metabolitos modulados a la baja (menor abundancia); ii) para el grupo azul, 9 metabolitos estuvieron modulados al alza y 10 metabolitos a la baja ; iii) para el grupo verde, 6 metabolitos significativos fueron modulados al alza y 3 metabolitos modulados a la baja (Tabla S1).

Las características (m/z) con significado estadístico se seleccionaron para una identificación presuntiva a través de una comparación de sus espectros de masas e iones producto diagnóstico con los reportados en la literatura y las bases de datos. La asignación de la identidad de cada característica se realizó de acuerdo con una lista de posibles candidatos proporcionada por la herramienta de búsqueda CEU mass mediator 3.0 (Gil-de-la-Fuente *et al.*, 2019). Adicionalmente la identificación se hizo de acuerdo con el nivel 2 y 3 de certeza en la identificación de metabolitos, según lo establecido por la sociedad de metabolómica, y lo reportado por Gil-de-la-Fuente y colaboradores. La Tabla S11 muestra la identificación presuntiva de los metabolitos diferenciales

comparando los espectros de masas, el error de masa del ion molecular (menor o igual a 10 ppm) y los iones producto diagnóstico reportados para cada metabolito. Algunas características (m/z) fueron reportados como candidatos desconocidos ya que no coincidían con ningún compuesto; sin embargo, debido a su significancia estadística, fueron considerados en el estudio como “anotados”.

Además, en los anexos, Tabla S11, se muestra los metabolitos identificados con mayor o menor abundancia para un grupo particular de muestras. De acuerdo con estos análisis químicos, se encontró que las quinolinas, los dipéptidos de aminoácidos (predominantes), carbohidratos, polifenoles, tioles, metilpiridinas, isoflavonoides y los fenilpropanoides estaban presentes en el grupo amarillo; ésteres de ácido cinámico, monoterpenoides, diterpenoides, fenoles y aminoácidos para el grupo azul; y derivados de ácidos carboxílicos, flavonoides y naftalenos para el grupo verde. Por el contrario, se encontró que las siguientes clases de compuestos estaban en menor abundancia: tripéptidos, derivados de aminoácidos, alfa-aminoácidos, lactonas terpénicas, naftalenos, lípidos, ácidos dicarboxílicos, quinolinas e indoles para el grupo amarillo; quinolinas, isoquinolinas, piperidinas, nucleósidos, bencenoides, monoterpenoides, y aminoácidos para el grupo azul; y diterpenos, flavonoides y alcaloides para el grupo verde.

4.3.2. Relación de análisis fisicoquímicos, sensoriales y metabólico

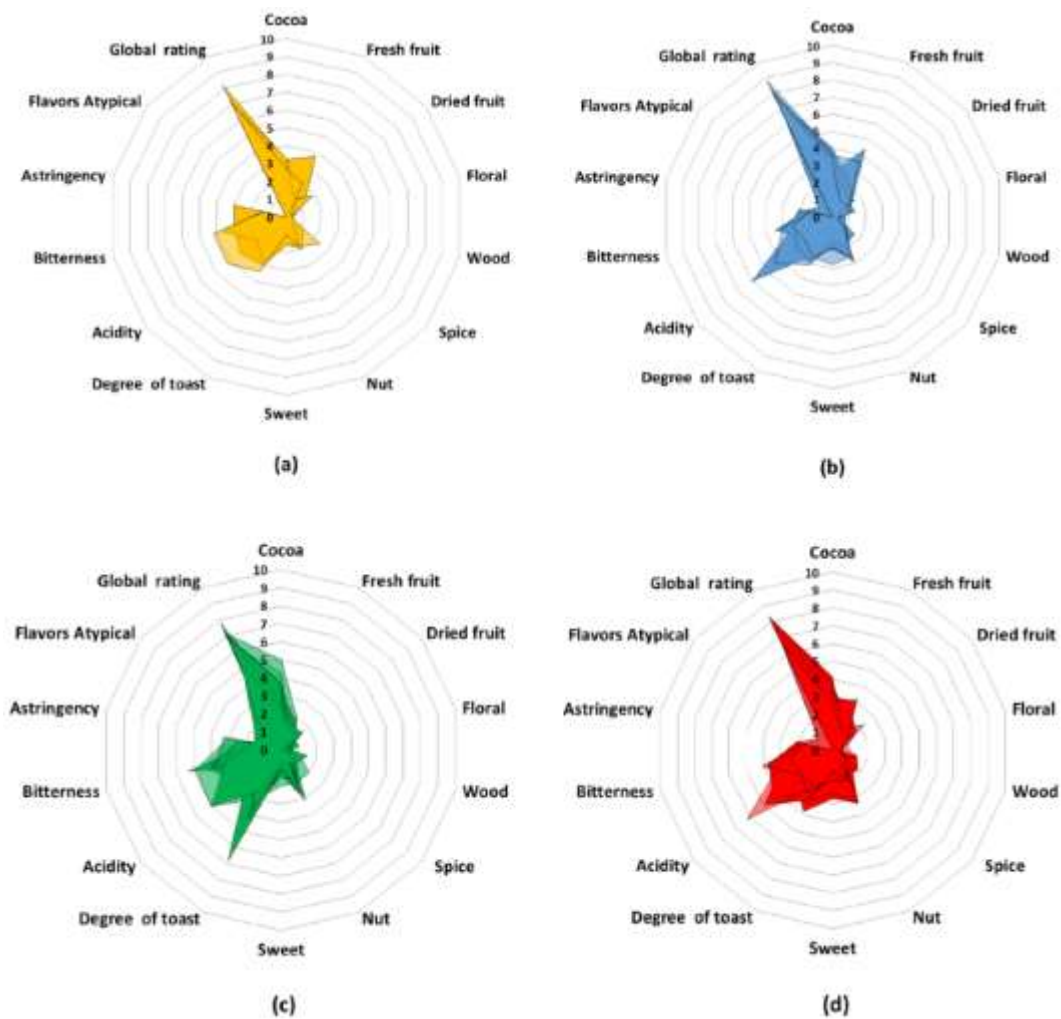
Para construir un análisis global y encontrar posibles características representativas que expliquen la agrupación en los grupos amarillo, azul, verde y rojo en el análisis PCA, se relacionaron los resultados fisicoquímicos y sensoriales con los resultados metabolómicos. Inicialmente es importante señalar que las muestras pertenecientes al grupo amarillo correspondieron a granos de cacao de la región del Cesar, y las muestras del grupo verde fueron recolectadas de la región de Antioquia. En contraste, las muestras de los grupos azul y rojo tuvieron

un origen de producción diverso: el grupo azul se construyó con siete muestras de Antioquia, una de Santander y una de Norte de Santander; y el grupo rojo se construyó con seis muestras de Antioquia, una de Santander, tres del Cesar y una del Magdalena. La amplia variedad, en términos de origen, de las muestras de cacao del último grupo puede explicar por qué no se diferenciaba completamente de los otros grupos, lo que lleva a un patrón químico similar al de los grupos azul y verde.

La mayoría de los resultados de las pruebas químicas (excepto la concentración de cadmio) no son lo suficientemente diferentes como para diferenciar este grupo de muestras, ya que todas las muestras estaban en rangos superpuestos muy similares. El contenido de fenoles totales estuvo en los siguientes rangos: 103,4–151,5 (amarillo), 88,9–122,8 (azul), 118,2–168,2 (verde) y 88,1–143,4 (rojo), los cuales estuvieron de acuerdo con los resultados metabolómicos, donde los compuestos fenólicos se incrementaron para el grupo amarillo y azul. La proporción de teobromina/cafeína estuvo en los siguientes rangos: 1,9–2,1 (amarillo), 1,7–4,8 (azul), 1,5–3,5 (verde) y 1,4–3,8 (rojo), disminuyendo en el grupo verde. A diferencia de estos parámetros anteriores, la concentración de cadmio logró diferenciar al grupo azul de los demás, ya que cinco de las siete muestras pertenecientes a este grupo, excedieron los niveles permitidos de este elemento químico, mientras que las muestras de los demás grupos (a excepción de una muestra del grupo rojo) estaban dentro de los valores permitidos. Es interesante que estas cinco muestras provinieron de las regiones de Santander, Norte de Santander y Urabá, donde el alto contenido de Cd es característico de estas regiones (Calderón, 2023). Por otro lado, la mayoría de los análisis sensoriales no tuvieron características que permitieran la diferenciación de los grupos, como se puede observar en los diagramas radiales (Figura 20).

Figura 20.

Gráficos radiales del análisis sensorial de las muestras de cacao agrupadas según los resultados del PCA: (a) grupos amarillo, (b) azul, (c) verde y (d) rojo.



Las únicas características diferenciadoras fueron la fruta fresca y los sabores atípicos. Los valores de la fruta fresca estuvieron en los siguientes rangos: 1,1 a 3,8 (amarillo), 0,3 a 4,4 (azul), 0,0 a 2,0 (verde) y 0,6 a 3,2 (rojo). Aquí, el grupo verde se diferencia de los demás porque tiene notas menores de frutas cítricas, frutas tropicales y bayas. De acuerdo con los resultados químicos,

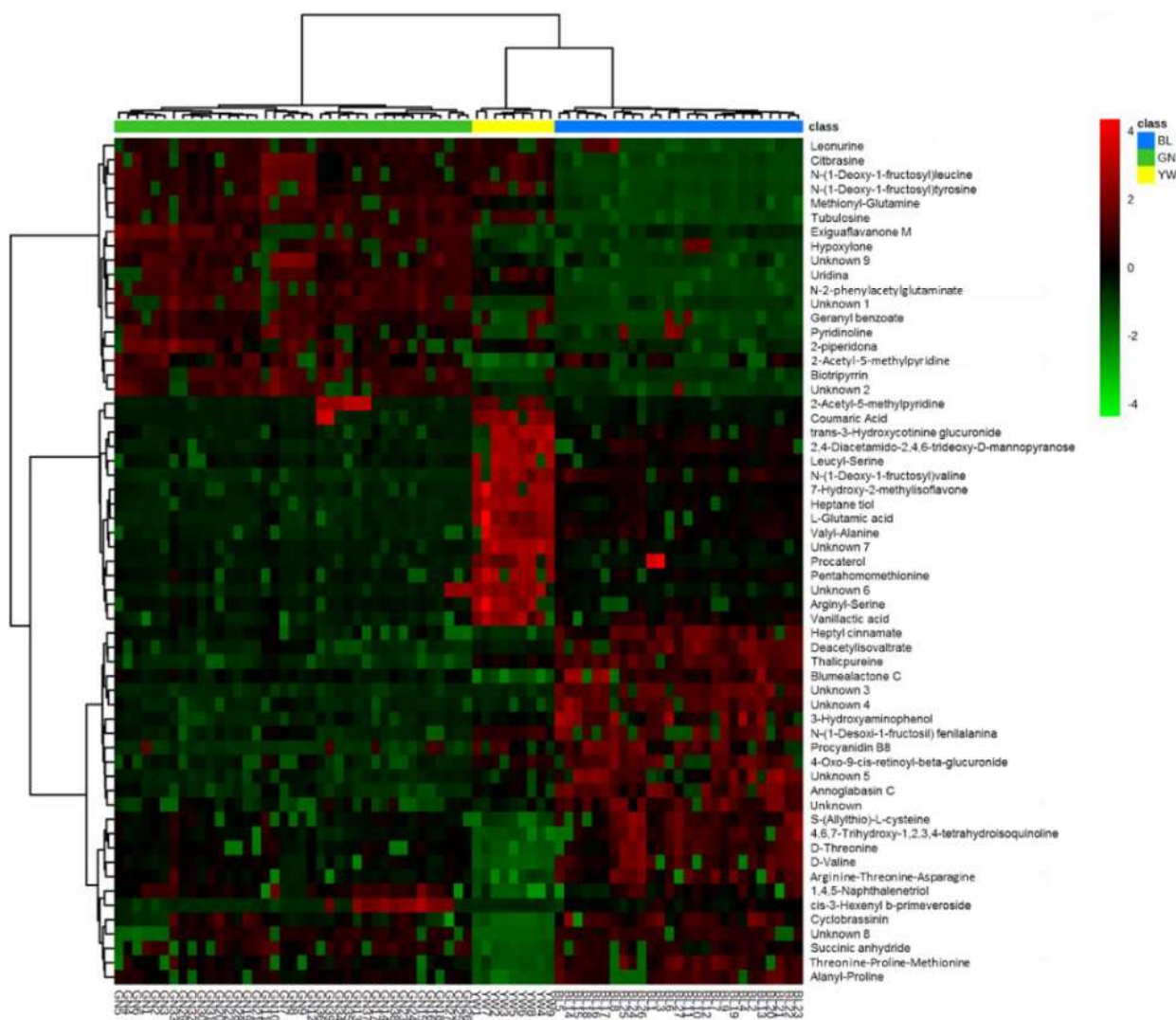
los diterpenos y flavonoides (asociados a este tipo de fruta) disminuyeron para el grupo verde y aumentaron en los grupos amarillo y azul. En cuanto a los sabores atípicos, las muestras del grupo amarillo fueron las únicas que no presentaron ningún sabor extraño, y una muestra del grupo verde fue la única con mayor valor en esta característica.

Durante el proceso de fermentación del cacao se producen diferentes cambios químicos que determinarán la calidad del cacao. Este proceso comienza con el crecimiento de microorganismos, que convierten los azúcares de la pulpa que rodea los granos en etanol. Luego, este etanol comienza a oxidarse en ácido acético (condiciones aeróbicas), ácido láctico (condiciones anaeróbicas), dióxido de carbono y agua, lo que provoca un aumento de la temperatura y la descomposición de la pulpa (Zapata *et al.*, 2013). Este aumento de la temperatura y la concentración de ácido acético mata el grano de cacao. La muerte provoca la ruptura de las paredes celulares permitiendo que ocurran cambios químicos complejos gracias a la mezcla de sustratos y enzimas que hacen que se desarrolle el sabor y el color del chocolate (ICCO, 2023). Entre los cambios más importantes se encuentran la oxidación de polifenoles (epicatequina, catequina, procianidina, cianidina, leucocianidina), formación de taninos (asociados a sabores astringentes), catabolismo de proteínas (responsables de la liberación de aminoácidos hidrófobos y oligopéptidos hidrófilos asociados a la generación de notas aromáticas), fermentación y degradación de azúcares y ácidos orgánicos, reacciones de Maillard de aminoácidos y azúcares (durante la etapa de tostado) que producen aldehídos, ésteres, alcoholes, cetonas y pirazinas, relacionados con notas a nuez, frutales y florales (Calvo *et al.*, 2021). Para visualizar el comportamiento de los metabolitos diferenciales para cada grupo, se construyó un mapa de calor relacionando las intensidades de cada compuesto identificado (identificación presuntiva), Figura

21. Los metabolitos con una abundancia significativamente mayor se representan en rojo, mientras que los metabolitos con menor abundancia se muestran en color verde.

Figura 21.

Mapa de calor de los metabolitos identificados (identificación presuntiva) para cada grupo de muestras



Nota. En el lado derecho se muestran las etiquetas de los metabolitos identificados, en la parte superior los grupos (verde, amarillo y azul) y en la parte inferior se listan los códigos de las muestras.

En la gráfica del mapa de calor (Figura 21), en el lado derecho se puede observar los metabolitos identificados, los cuales se encuentran reportados en la Tabla S11. En las muestras del grupo amarillo se caracterizaron por una mayor presencia de dipéptidos (que consisten de leucina, serina, valina y fenilalanina), quinolinas como 4,6,7-Trihidroxi-1,2,3,4-Tetrahidroisoquinolina, carbohidratos como N-(1-Deoxi-1-fructosa)fenilalanina, fenoles como 3-Hidroxiaminofenol, tioles como el Heptanotiol e isoflavonoides como la 7-Hidroxi-2-metil isoflavona, mientras que derivados de aminoácidos como la Alanil-Prolina y la Valina (que contienen valina, alanina y prolina), terpenos como el Deacetilisoaltrato (asociado a las flores), lípidos (benzoato de geranilo), compuestos naftalénicos (1,4,5-naftalenetriol), ácidos dicarboxílicos (anhídrido succínico), quinolinas (citbrasina), indoles (ciclobraassinina) y tripéptidos como N-(1-Deoxi-1-fructosil) tirosina y otros que contenían aminoácidos como treonina, prolina, metionina, arginina y asparagina, que probablemente se convirtieron en dipéptidos durante la digestión enzimática, fueron disminuidos. Las muestras de este grupo presentaron una amplia diversidad de compuestos diferenciales que son de gran interés nutricional, y los derivados peptídicos pueden ser utilizados para estudiar sus propiedades de utilidad para diferentes industrias (farmacéutica, cosmética, entre otras). Las muestras del grupo azul eran ricas en ésteres de ácido cinámico como cinamato de heptilo (producto de las reacciones de Maillard), monoterpénoides como deacetilisoaltrato (asociados con frutas cítricas), fenoles (3-Hidroxiaminofenol), y péptidos de metionina y de glutamina (Metionil-Glutamina). Estas muestras tenían una menor abundancia de quinolinas

(Procatérol) y piperidinas bencenoides (2-piperidona y Leonurina). Sin embargo, es interesante que las muestras del grupo azul fueron las únicas con una disminución del nucleósido de uridina, que desempeña un papel en la vía de la glucólisis de la galactosa (Rogers *et al.*, 1989), en la cual, la galactosa se transforma en glucosa por acción de las enzimas: galactoquinasa (GALK), galactosa-1-fosfato-uridil transferasa (GAL1PUT) y uridin difosfato galactosa 4' epimerasa (UDPGAL). La deficiencia de cualquiera de ellas ocasiona alteración del metabolismo de la galactosa, acumulándose galactosa dentro del organismo, produciendo lesiones en el hígado y el sistema nervioso central. (Cornejo y Raimann, 2004)

Finalmente, las muestras del grupo verde fueron las que presentaron menor variedad de compuestos, tanto aumentada como disminuida. Eran ricos en derivados del ácido carboxílico como el Cinamato de heptilo y Anhídrido succínico, flavonoides como Exiguaflavanona M y Procianidina B8 y compuestos de naftaleno como el 1,4,5-naftalenetriol y pobres en diterpenos como 4-Oxo-9-cis-retinoil-beta-glucurónido y alcaloides como Talicpureína.

El estudio realizado usando metabolómica no dirigida con UHPLC-HRMS, junto con análisis sensoriales y fisicoquímicos, de las 36 muestras deja como resultados que no hubo diferencias en la calidad sensorial, contenido de polifenoles y la relación teobromina/cafeína. Sin embargo, el análisis estadístico multivariado permitió diferenciarlas en cuatro grupos, y el análisis físico mostró una agrupación similar. Los metabolitos responsables de dicha agrupación se investigaron con análisis estadístico univariado y presuntamente se identificaron mediante la comparación de espectros de masas experimentales con los informados en las bases de datos. Se identificaron alcaloides, flavonoides, terpenoides, péptidos, quinolinas y compuestos de azufre

como discriminantes entre grupos. Se sugiere que los perfiles químicos podrían ser clave en futuros estudios de control de calidad y caracterización específica del cacao fino y de aroma.

5. Conclusiones

En el proceso de optimización del método de extracción de metabolitos -no volátiles- de muestras de cacao seco mediante extracción en fase sólida (SPE), se realizó el proceso de desengrasado una vez usando 12 mL de *n*-hexano. Así también se estableció que las condiciones óptimas de extracción fueron cuando el solvente es acetonitrilo 50% v/v, temperatura de 35°C y tiempo de 16 min.

El presente estudio, un enfoque de metabolómica no dirigida basado en UHPLC/HRMS combinado con análisis estadístico multivariado y univariado, permitió con éxito discriminar muestras de granos de cacao e identificar marcadores químicos diferenciales relacionados con las propiedades fisicoquímicas y sensoriales asociadas con la calidad del cacao. Además, aunque la caracterización química (contenido de cadmio y polifenoles) y sensorial de las 36 muestras fue bastante similar, los análisis físicos, junto con el enfoque metabolómico, permitieron encontrar diferencias químicas y clasificar las muestras en cuatro grupos o clústers. En la composición química de las muestras, se identificaron alcaloides, flavonoides, terpenoides, péptidos, quinolinas y compuestos de azufre como discriminantes entre grupos de muestras.

De acuerdo a los análisis sensoriales, las únicas características diferenciadoras fueron la fruta fresca y los sabores atípicos. Los valores de la fruta fresca estuvieron en los siguientes rangos: 1,1 a 3,8 (amarillo), 0,3 a 4,4 (azul), 0,0 a 2,0 (verde) y 0,6 a 3,2 (rojo). Aquí, el grupo verde se diferencia de los demás porque tiene notas menores de frutas cítricas, frutas tropicales y bayas. De acuerdo con los resultados químicos, los diterpenos y flavonoides (asociados a este tipo de fruta) disminuyeron para el grupo verde y aumentaron en los grupos amarillo y azul. En cuanto a los

sabores atípicos, las muestras del grupo amarillo fueron las únicas que no presentaron ningún sabor extraño, y una muestra del grupo verde fue la única con mayor valor en esta característica.

6. Recomendaciones

Se recomienda realizar un enfoque de metabolómica dirigida utilizando estándares de referencia de sabor y aroma como complemento a los análisis sensoriales y al presente estudio. Esta investigación representa un método alternativo porque el perfil químico puede representar una herramienta para el control de calidad de los granos de cacao, que podría complementar los análisis regulatorios realizados por los catadores y permitir una mejor distinción entre cacao fino y ordinario.

Otra recomendación podría ser ampliar el número de muestras de cacao y ampliar el número de fincas en las que se realizó el muestreo para tener resultados más rigurosos que permitan asociar con parámetros de calidad.

7. Divulgación de resultados y productos académicos derivados

Paula Bacca; David Granada; William Hidalgo. Metabolic Analysis Of Fine/Flavour Cocoa From Maceo (Antioquia) And Manaure (Cesar) Associated With Organoleptic And Physicochemical Properties. Modalidad póster. 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, Cartagena de Indias, 11 - 15 de octubre de 2021.

Bacca-Villota, P., Acuña-García, L., Sierra-Guevara, L., Cano, H., & Hidalgo, W. (2023). Untargeted Metabolomics Analysis for Studying Differences in High-Quality Colombian Cocoa Beans. *Molecules*, 28(11), 4467. Artículo publicado

Referencias Bibliográficas

- Agro Negocios. (2018). Federación nacional de cacaoteros espera una producción de 60.000 toneladas. <https://www.agronegocios.co/agricultura/la-federacion-nacional-de-cacaoteros-espera-tener-una-produccion-de-60-000-toneladas-en-2019-2801777#:~:text=Agro-Federaci%C3%B3n%20Nacional%20de%20Cacaoteros%20espera%20una%20producci%C3%B3n%20de%2060.000%20toneladas,toda%20la%20historia%20de%20Fedecacao>.
- Agro Negocios. (2019). “Tenemos 176.050 hectáreas sembradas de cacao”, presidente de Fedecacao. <https://www.agronegocios.co/agricultura/tenemos-176-050-hectareas-sembradas-de-cacao-eduard-baquero-lopez-presidente-ejecutivo-de-fedecacao-2923404>
- Agro Negocios. (2023). Conozca los cinco productos agroexportables en los que debería invertir durante 2023. <https://www.agronegocios.co/agricultura/conozca-los-cinco-productos-agroexportables-en-los-que-deberia-invertir-durante-2023-3558975#>.
- Aguilar, H. (2016). Manual para la evaluación de la calidad del grano de cacao. *La Lima, Honduras, Editorial FHIA*.
- Al-Owaisi, M., Al-Hadiwi, N., & Khan, S. (2014). GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extracts of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(12), 964-970.
- Allen, F., Pon, A., Wilson, M., Greiner, R., & Wishart, D. (2014). CFM-ID: a web server for annotation, spectrum prediction and metabolite identification from tandem mass spectra. *Nucleic acids research*, 42(W1), W94-W99.
- Amoa-Awua, W., (2015). Methods of cocoa fermentation and drying. *Cocoa and coffee fermentations*, 71-128.
- ANDI. (2023). Asociación Nacional de Empresarios de Colombia ¿Cuál es el impacto de la producción de chocolates y confitería en la economía colombiana? <https://www.andi.com.co/Home/Noticia/17392-cual-es-el-impacto-de-la-produccion-de>
- AOAC. (2023). Association of Official Analytical Chemists AOAC Official Method 999.10; Lead, Cadmium, Zinc, Copper, and Iron in Foods. Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion. <https://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285281.pdf>
- Aprotosoiaie, A., Luca, S., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products—An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73-91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>

- Ayala, G., (2014). Validación de un método para la determinación de flavonoides y metilxantinas por cromatografía líquida de alta eficiencia-aplicación en el análisis de grano de cacao. Universidad Industrial de Santander, .
- Ayala, J., (2016). *Evaluación de la técnica de extracción líquido-líquido para la remoción de metilxantinas de extractos de cacao*. . Universidad I. de S. 55.
- Barrientos, L., Oquendo, J., Garzón, M., & Álvarez, O. (2019, 2019/01/01/). Effect of the solar drying process on the sensory and chemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivated in Antioquia, Colombia. *Food Research International*, 115, 259-267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.084>
- Batista, L., (2009). *Guía técnica: el cultivo de cacao en la República Dominicana*. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (CEDAF).
- Bass, V.(2015). Obtención de extractos polifenólicos con actividad biológica a partir de harinas elaboradas con subproductos de limon italiano.
- Calavia, R., Annanouch, F., Correig, X., & Yanes, O. (2012). Nanostructure initiator mass spectrometry for tissue imaging in metabolomics: future prospects and perspectives. *Journal of proteomics*, 75(16), 5061-5068.
- Caligiani, A., Cirlini, M., Palla, G., Ravaglia, R., & Arlorio, M. (2007). GC-MS detection of chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry*, 19(4), 329-334.
- Calvo, A., Botina, B., García, C., Cardona, W., Montenegro, A., & Criollo, J. (2021, Aug 18). Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Sci Rep*, 11(1), 16746. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95703-2>
- Carreño, L. (9 de febrero de 2020). La disputa gremial por los aranceles a las prendas de vestir. *El Espectador*. <https://www.elespectador.com/economia/la-disputa-gremial-por-los-aranceles-las-prendas-de-vestir-articulo-903768>
- Carrillo, L., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014, Jun 01). 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/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- Castellanos, Ó., Torres, L., Fonseca, S., Montañez, V., & Sánchez, A. (2007). Agenda Prospectiva de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Cadena Productiva de Cacao-Chocolate en Colombia. *Biogestión*.

- Cayuela, L. (2011). Análisis multivariante. *Tulipán: Área de Biodiversidad y Conservación, Universidad Rey Juan Carlos*.
- Ceron, C., De los Rios-Carmenado, I., & Fernández, S. (2018, Mar 01). Illicit crops substitution and rural prosperity in armed conflict areas: A conceptual proposal based on the Working With People model in Colombia. *Land Use Policy*, 72, 201-214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2017.12.038>
- Chatzimitakos, T., & Stalikas, C. (2016). Qualitative alterations of bacterial metabolome after exposure to metal nanoparticles with bactericidal properties: a comprehensive workflow based on H NMR , UHPLC-HRMS and metabolic databases qualitative alterations of bacterial metabolome after exposure. *Journal of proteome research*, 15(9), 3322–3330. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00489>
- Chen, Y., Li, E., & Xu, L. (2022, Apr 15). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>
- Chetschik, I., Pedan, V., Chatelain, K., Kneubühl, M., & Hühn, T. (2019, Apr 10). Characterization of the Flavor Properties of Dark Chocolates Produced by a Novel Technological Approach and Comparison with Traditionally Produced Dark Chocolates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(14), 3991-4001. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06800>
- Contreras, C. (2017). Análisis de la cadena de valor del cacao en Colombia: generación de estrategias tecnológicas en operaciones de cosecha y poscosecha, organizativas, de capacidad instalada y de mercado
- Cornejo, V., & Raimann, E. (2004). Alteración del metabolismo de la galactosa. *Revista chilena de nutrición*, 31, 170-176
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018, sep 21). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Cuadras, C. M. (2007). *Nuevos métodos de análisis multivariante* (Vol. 20). CMC editions Barcelona.
- Cui, X., & Churchill, G. A. (2003). Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome biology*, 4, 1-10.
- Daglia, M. (2012, apr 01/). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>

- Danezis, G., Tsagkaris, A., Brusic, V., & Georgiou, C. (2016). Food authentication: state of the art and prospects. *Current Opinion in Food Science*, 10, 22-31.
- Del Rosario, M., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., Ramos, G., & Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100(2), 459-467.
- Di Guida, R., Engel, J., Allwood, J., Weber, R., Jones, M., Sommer, U., Viant, M., & Dunn, W. (2016). Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics*, 12, 93. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1030-9>
- Ebbels, T., & De Iorio, M. (2011). Statistical data analysis in metabolomics. In M. P. H. Stumpf, D. J. B. Balding, & M. Girolami (Eds.), *Handbook of statistical systems biology* (pp. 163–180). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/doi:10.1002/9781119970606.ch8>
- EC–European Commission. (2014). Commission Regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L, 138, 75.
- El Moussaoui, A., Jawhari, F., Almehdi, A., Elmsellem, H., Fikri, K., Bousta, D., & Bari, A. (2019, 2019, Dec 01). Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of *Withania frutescens*.L. *Bioorganic Chemistry*, 93, 103337. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103337>
- End, M. (2015). *Cocoa Beans: Chocolate & Cocoa Quality Requirements; CAOBISCO/ECA/FCC*: Brussels, Belgium.
- Escobar, S., Santander, M., Zuluaga, M., Chacón, I., Rodríguez, J., & Vaillant, F. (2021, Dec 15). Fine cocoa beans production: Tracking aroma precursors through a comprehensive analysis of flavor attributes formation. *Food Chemistry*, 365, 130627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130627>
- Espín, S., Samaniego, I., Wakao, H., & Jiménez, J. (2007). La relación teobromina/cafeína asociada a la calidad del cacao Ecuatoriano.
- Fayeulle, N., Preys, S., Roger, J., Boulanger, R., Hue, C., Cheynier, V., & Sommerer, N. (2020). Multiblock Analysis to Relate Polyphenol Targeted Mass Spectrometry and Sensory Properties of Chocolates and Cocoa Beans. *Metabolites*, 10(8), 311. <https://www.mdpi.com/2218-1989/10/8/311>

- FDA. (2017). MPM: V-4. Chocolate, Sugars, and Related Products Macroanalytical Procedures Manual (MPM) <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/mpm-v-4-chocolate-sugars-and-related-products>
- Fedecacao. (2019). *Economía Internacional del cacao*. <https://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/internacionales>
- Fedecacao. (2021a). Cacao ¿Qué está pasando con los precios? <https://www.fedecacao.com.co/post/cacao-qu%C3%A9-est%C3%A1-pasando-con-los-precios>
- Fedecacao. (2021b). Minagricultura anuncia plan de renovación de diez mil hectáreas de cacao en 2021. <https://www.fedecacao.com.co/post/minagricultura-anuncia-plan-de-renovaci%C3%B3n-de-diez-mil-hect%C3%A1reas-de-cacao-en-2021>
- Fedecacao. (2022a). Economía Nacional, Producción Nacional de Cacao. <https://www.fedecacao.com.co/economianacional>
- Fedecacao. (2022b). Producción cacaotera presentó una reducción del 10% en 2022 por lluvias. <https://www.fedecacao.com.co/post/producci%C3%B3n-cacaotera-present%C3%B3-una-reducci%C3%B3n-del-10-en-2022-por-lluvias>
- Fedecacao. (2023). Cacao, esencial en reforma agraria y en sustitución de cultivos ilícitos: ministra de Agricultura <https://www.fedecacao.com.co/post/cacao-esencial-en-reforma-agraria-y-en-sustituci%C3%B3n-de-cultivos-il%C3%ADcitos-ministra-de-agricultura>
- Fernández Bao, S. (2020). Diseño de experimentos: Diseño factorial (Master's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).
- Figueira, A., & Scotton, D. (2020). *Theobroma cacao cacao*. In *Biotechnology of fruit and nut crops* (pp. 282-313). CAB International Wallingford UK.
- García-Jerez, A., Quintana-Fuentes, L., & Moreno-Martínez, E. (2022). Determination of the grain index and husk percentage of regional cocoa genotypes FSV41, FEAR5 and FLE2 and universal genotype CCN 51. *Ingeniería y competitividad*, 24(2).
- Gardea, A., García-Bañuelos, M., Orozco-Avitia, J., Sánchez-Chávez, E., Sastré-Flores, B., & Ávila-Quezada, G. (2017). Cacao (*Theobroma cacao* L.). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition*, 921-940.
- Gerlich, M., & Neumann, S. (2013). MetFusion: integration of compound identification strategies. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(3), 291-298.

- Gil-de-la-Fuente, A., Godzien, J., Saugar, S., Garcia-Carmona, R., Badran, H., Wishart, D., Barbas, C., & Otero, A. (2019, Feb 01). CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 797-802. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00720>
- Gil, J. (2012). Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacao colombiano durante los procesos de pre e industrialización. *Universidad de Antioquia. Medellín*.
- González, R. (14 de marzo de 2024). El Grupo Nutresa apuesta a la agroindustria de cacao con inversiones por \$1,5 billones. *La República*. <https://www.larepublica.co/empresas/acuerdo-de-grupo-nutresa-para-invertir-1-5-billones-durante-10-anos-3820559>
- Hamidpour, R., Hamidpour, M., Hamidpour, S., & Shahlari, M. (2015, Apr 01). Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaricidal, and repellent activities. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5(2), 66-70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.008>
- Hopfgartner, G., Varesio, E., Theodoridis, G., Gika, H., & Wilson, I. (2013). Tandem mass spectrometry hyphenated with HPLC and UHPLC for targeted metabolomics. In *Metabolomics in practice* (pp. 21–37). <https://doi.org/doi:10.1002/9783527655861.ch2>
- Hori, K., Kiriya, T., & Tsumura, K. (2016). A liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics approach for the discrimination of cocoa beans from different growing regions. *Food analytical methods*, 9, 738-743.
- ICCO. (2022). International Cocoa Organization Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics.
- ICCO. (2023). International Cocoa Organization Harvesting & Post-Harvest Processing.
- ICONTEC. (2021). Cocoa Beans. Specification and Quality Requirements; Colombian, Institute of Technical Standards and Certification: Bogota, Colombia.
- Infobae. (2023). Así es el impacto de la producción de chocolates y confitería en la economía colombiana. <https://www.infobae.com/colombia/2023/02/21/asi-es-el-impacto-de-la-produccion-de-chocolates-y-confiteria-en-la-economia-colombiana/>
- Instituto Roche. (2019). Informe anticipado de Ciencias Ómicas. [https://www.institutoroche.es/static/archivos/Informes_anticipando CIENCIAS OMICA S.pdf](https://www.institutoroche.es/static/archivos/Informes_anticipando_Ciencias_OMICA_S.pdf)

- ISO. (2016). ISO 13299: 2016. Sensory analysis-Methodology-General guidance for establishing a sensory profile.
- Jiménez, C. (2015). Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. *Producción+ Limpia*, 10(1), 89-104.
- Jin, W., Riley, R., Wolfinger, R., White, K., Passador-Gurgel, G., & Gibson, G. (2001, Dec 01). The contributions of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, 29(4), 389-395. <https://doi.org/10.1038/ng766>
- Júnior, P., dos Santos, V., Lopes, A., de Souza, J., Pina, J., Júnior, G., & Marinho, P. (2020). Determination of theobromine and caffeine in fermented and unfermented Amazonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans using square wave voltammetry after chromatographic separation. *Food Control*, 108, 106887.
- Li, Y., He, D., Li, B., Lund, M., Xing, Y., Wang, Y., Li, F., Cao, X., Liu, Y., Chen, X., Yu, J., Zhu, J., Zhang, M., Wang, Q., Zhang, Y., Li, B., Wang, J., Xing, X., & Li, L. (2021, Apr 01). Engineering polyphenols with biological functions via polyphenol-protein interactions as additives for functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 470-482. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.009>
- López, S. M. (2014). *Cacao y café, alimentos ricos en fitoquímicos con propiedades beneficiosas en salud* Universidad Complutense de Madrid].
- Lujano, E., Manganiello, L., Contento, A., & Ríos, Á. (2019). Identificación y cuantificación de (+)-Catequinas y Procianidinas en cacao procedente de Ocumare de la Costa, Venezuela. *Revista INGENIERÍA UC*, 26(2), 192-201.
- Marseglia, A., Acquotti, D., Consonni, R., Cagliani, L., Palla, G., & Caligiani, A. (2016). HR MAS 1H NMR and chemometrics as useful tool to assess the geographical origin of cocoa beans—Comparison with HR 1H NMR. *Food Research International*, 85, 273-281.
- Mayorga-Gross, A., Quirós-Guerrero, L., Fourny, G., & Vaillant, F. (2016). An untargeted metabolomic assessment of cocoa beans during fermentation. *Food Research International*, 89, 901-909.
- Menguy, L., Prim, D., Carlin-Sinclair, A., & Marc, I. (2009). The determination of methylxanthines in chocolate and cocoa by different separation techniques: HPLC, instrumental TLC, and MECC. *Journal of Chemical Education*, 86(11), 1307.
- Miller, J., & Miller, J. (2018). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (7th Edition). Pearson education

- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombia. (2021). Cadena de Cacao; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombia's Government: Bogotá, Colombia.
- Noguera, L. (2014). CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES REGIONALES PROMISORIOS DE CACAO COLOMBIANO: FÍSICA, QUÍMICA; FUNCIONAL Y ORGANOLÉPTICA. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. *C:/Users/User/Downloads/fvm939e.pdf*.
- Northen, T., Yanes, O., Northen, M., Marrinucci, D., Uritboonthai, W., Apon, J., Golledge, S., Nordström, A., & Siuzdak, G. (2007). Clathrate nanostructures for mass spectrometry. *Nature*, 449(7165), 1033-1036.
- OECD. (2022). AJG Simoes, CA Hidalgo. The Economic Complexity Observatory: An Analytical Tool for Understanding the Dynamics of Economic Development. Workshops at the Twenty-Fifth AAAI Conference on Artificial Intelligence.
- Ordoñez, E., Quispe, C., & García, L., (29 Noviembre de 2020). Cuantificación de fenoles, antocianinas y caracterización sensorial de nibs y licor de cinco variedades de cacao, en dos sistemas de fermentación. *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 473-481. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.04.02>
- Ortega, N., Romero, M.-P., Macià, A., Reguant, J., Anglès, N., Morelló, J., & Motilva, M. (2008). Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(20), 9621-9627.
- Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J., Chang, L., Hacariz, O., Basu, N., & Xia, J. (2022). Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nature protocols*, 17(8), 1735–1761. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00710-w>
- Perea-Villamil, J. (2019). *El cacao desde la ciencia: de la semilla al chocolate*. 172.
- Perea-Villamil, J., Aranzazu, H., Cadena, C., & Matínez, G. (2013). Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares.
- Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2015). Macromolecular Antioxidants or Non-Extractable Polyphenols in Fruit and Vegetables: Intake in Four European Countries. *Food Res. Int. Ott. Ont* 2015, 74, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.007>.
- Perez, M., & Cajiao, S. (2019). DIAGNÓSTICO DE LA CADENA DE CACAO en Colombia, con énfasis en CFA orgánico y sostenible. https://www.colombiamascompetitiva.com/wp-content/uploads/2021/09/CC_Guia-diagnostico-de-la-cadena-de-cacao-140721.pdf

- ProColombia. (2018). Compradores de Norteamérica, Asia y Europa buscan cacao colombiano. <https://prensa.procolombia.co/compradores-de-norteamerica-asia-y-europa-buscan-cacao-colombiano>
- Procolombia. (2023). Oportunidades de exportar cacao colombiano en el mercado global. <https://www.colombiatrade.com.co/noticias/cacao-colombiano-oportunidad-de-exportacion>
- Proos, R. (2020). Perfeccionando la Identificación de Metabolitos Utilizando una Adquisición Independiente de los Datos para Metabolómica. SCIEX, USA.
- Ramli, N., Hassan, O., Said, M., Samsudin, W., & Idris, N. (2006). Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of food processing and preservation*, 30(3), 280-298.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M. (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/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>
- Rogers, S., Bovee, B., & Segal, S. (1989). Effect of uridine on hepatic galactose-1-phosphate uridyltransferase. *Enzyme*, 42(1), 53-60.
- Rojas, F., & Sacristán, E. (2013). *Guía ambiental para el cultivo del cacao*.
- Ruiz, C. Y. (2012). Aplicación del análisis de componentes principales como técnica para obtener índices sintéticos de calidad ambiental. *UCV-Scientia*, 4(2), 145-153.
- Sánchez, A., Castellanos, Ó., & Domínguez, P. (2008). Mejoramiento de la poscosecha del cacao a partir del roadmapping. *Ingeniería e Investigación*, 28(3), 150-158.
- Sarria-Villa, R., Gallo, J., & Benítez, R. (2021). Extracción de compuestos fenólicos y contenido de catequina en cortezas de tres especies forestales del Cauca-Colombia. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 15(29), 19-27.
- Schnermann, P., & Schieberle, P. (1997, Mar 01). Evaluation of Key Odorants in Milk Chocolate and Cocoa Mass by Aroma Extract Dilution Analyses. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(3), 867-872. <https://doi.org/10.1021/jf960670h>
- Seguine, E., & Meinhardt, L. (2014). Cacao flavor through genetics—anatomy of fine flavor. *Manuf. Confect*, 25-30.

- Seyfried, C., & Granvogl, M. (2017). Characterization of key odorants of dark chocolate by means of the sensomics approach. ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY,
- SIC. (2011). SUPERINTENDENCIA, DE INDUSTRIA Y COMERCIO, Cadena productiva del cacao: diagnóstico de libre competencia. *Bogotá: Superintendencia de Industria y Comercio.*
- Smilde, A., Hendriks, M., Westerhuis, J., & Hoefsloot, H. (2013). Data processing in metabolomics. *Metabolomics in practice: successful strategies to generate and analyze metabolic data*, 261–284.
- Sotelo, A., & Alvarez, R. (1991). Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cacao bean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39(11), 1940-1943.
- STANDARD, B., & ISO, B. (2003). Sensory analysis—Methodology—General guidance for establishing a sensory profile.
- Sukha, D. (2017). Cocoa of Excellence Technical Committee, Elements of a harmonized international standard for cocoa quality and flavour assessment.
- Sukha, D., Butler, D., Umaharan, P., & Boulton, E. (2008). The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology*, 226, 405-413.
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A., & Westerhuis, J. (2012). Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(1), 3–16. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0330-3>
- Tenenhaus, M., Vinzi, V., Chatelin, Y., & Lauro, C. (2005, Jan 01). PLS path modeling. *Computational Statistics & Data Analysis*, 48(1), 159-205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csda.2004.03.005>
- Theodoridis, G., Gika, H., & Wilson, I. (2013). LC-MS-Based nontargeted metabolomics. In *Metabolomics in practice* (pp. 93–115). <https://doi.org/doi:10.1002/9783527655861.ch5>
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S., & Vijayakumar, R. (2018). An introductory chapter: secondary metabolites. *Secondary metabolites-sources and applications*, 3-21.
- Tran, P., Van de Walle, D., De Clercq, N., De Winne, A., Kadow, D., Lieberei, R., Messens, K., Tran, D., Dewettinck, K., & Van Durme, J. (2015). Assessing cocoa aroma quality by multiple analytical approaches. *Food Research International*, 77, 657-669.

- Tuenter, E., Delbaere, C., De Winne, A., Bijttebier, S., Custers, D., Foubert, K., Van Durme, J., Messens, K., Dewettinck, K., & Pieters, L. (2020). Non-volatile and volatile composition of West African bulk and Ecuadorian fine-flavor cocoa liquor and chocolate. *Food Research International*, 130, 108943.
- Urbańska, B., Derewiaka, D., Lenart, A., & Kowalska, J. (2019). Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process. *European Food Research and Technology*, 245, 2101-2112.
- USAID. (2021). CACAO PARA LA PAZ (CFP) (COLOMBIA). https://www.usaid.gov/sites/default/files/2023-03/Cacao%20for%20Peace_Espanol_FactSheet_2.22.23.pdf
- Villamizar, A. (14 de marzo de 2024) ¿Qué tanto afecta la crisis mundial de cacao al mercado colombiano?. *El Colombiano*. <https://www.elcolombiano.com/negocios/como-afecta-la-crisis-de-los-precios-del-cacao-al-mercado-colombiano-EG24000206>
- Witten, D., & Tibshirani, R. (2007). A comparison of fold-change and the t-statistic for microarray data analysis. *Analysis*, 1776, 58-85.
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001, Oct 28). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109-130. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- Yanes, Ó. (2015). Metabolómica: la ciencia ómica más multidisciplinaria. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*, 186, 7-10.
- Zapata, A. (02 de diciembre de 2023) Las tres estrategias del Gobierno para impulsar al cacao colombiano. *El Colombiano*. <https://www.elcolombiano.com/negocios/agro/las-tres-estrategias-del-gobierno-para-impulsar-al-cacao-colombiano-IG23258624>

Apéndices

Los apéndices están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS.