



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

Uso de enzimas y levaduras como estrategia para disminuir la presencia de cadmio en el proceso de fermentación de almendras de *Theobroma cacao L.*

ROCIO NATIVIDAD MOREJÓN LUCIO

Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, presentado ante el Instituto de Posgrado y Educación Continua de la ESPOCH, como requisito parcial para la obtención del grado de

MAGÍSTER EN AGROINDUSTRIA MENCIÓN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

RIOBAMBA - ECUADOR

Mayo - 2022

©2022, Rocio Natividad Morejón Lucio

Se autoriza la reproducción total o parcial con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

CERTIFICACIÓN:

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA QUE:

El **Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, titulado “Uso de enzimas y levaduras como estrategia para disminuir la presencia de cadmio en el proceso de fermentación de almendras de *Theobroma cacao* L.”, de responsabilidad de la Srta. Rocio Natividad Morejón Lucio ha sido prolijamente revisado y se autoriza su presentación.

Tribunal:

ING. LUIS EDUARDO HIDALGO ALMEIDA Ph.D
PRESIDENTE



Firmado electrónicamente por:
**LUIS EDUARDO
HIDALGO
ALMEIDA**

ING. JAIME FABIÁN VERA CHANG MSc.
DIRECTOR



Firmado electrónicamente por:
**JAIME
FABIAN VERA**

ING. IVÁN PATRICIO SALGADO TELLO MSc.
MIEMBRO



Firmado electrónicamente por:
**IVAN PATRICIO
SALGADO TELLO**

ING. CESAR IVÁN FLORES MANCHENO Ph.D
MIEMBRO



Firmado electrónicamente por:
**CESAR IVAN
FLORES
MANCHENO**

Riobamba, mayo del 2022

DERECHOS INTELECTUALES

Yo, Rocio Natividad Morejón Lucio, declaro que soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el **Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, y que el patrimonio intelectual generado por la misma pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

ROCIO NATIVIDAD MOREJÓN LUCIO

No. Cédula 0503606220

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Rocio Natividad Morejón Lucio, declaro que el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autoría, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este proyecto de investigación de maestría.

Riobamba, mayo de 2022

ROCIO NATIVIDAD MOREJÓN LUCIO
No. Cédula 0503606220

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado Dios por brindarme sabiduría y fortaleza para seguir adelante en los momentos difíciles y cumplir esta meta. A mis queridos padres Elías Morejón y Marcia Lucio por su apoyo incondicional, enseñándome siempre a luchar y nunca desfallecer en el intento. A mi esposo por formar parte de mi vida, apoyarme en todo momento y ser mi aliento. También dedico con mucho amor a mi hijo por ser el principal motivo y deseo de superación. A mis hermanas y hermano Deisy, Maribel, Glenda y Jordy que han estado presentes en cada paso y decisión de mi vida, quienes también me han brindado su apoyo incondicional.

Rocio Morejón

AGRADECIMIENTO

De manera especial a mi director MSc. Jaime Vera Chang por su dedicación, tiempo y compartir conmigo sus conocimientos y experiencias. A mis asesores MSc. Iván Salgado y Dr. Iván Flores por sus acertadas sugerencias y tiempo dedicado para culminar esta investigación. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo mi Alma Mater por su apoyo y confianza, especialmente a los docentes de Posgrado por compartir sus sabios conocimientos y contribuir a mi formación profesional. A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por haber proporcionado la materia prima para desarrollar la investigación.

Rocio Morejón

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	XIV
ABSTRACT.....	XV
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Problema de investigación.....	3
1.1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.1.2. Situación problemática.....	4
1.1.3. Formulación del problema	5
1.2. Preguntas directrices.....	6
1.3. Justificación de la investigación	6
1.4. Objetivos	7
1.4.1. Objetivo general.....	7
1.4.2. Objetivos específicos	8
1.5. Hipótesis.....	8
1.5.1. Hipótesis general.....	8
1.5.2. Hipótesis específicas	8
CAPÍTULO II	9
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Antecedentes del problema.....	9
2.2. Bases teóricas	12
2.2.1. El cacao.....	12
2.2.2. Cacao Nacional.....	12
2.2.3. Fermentación del cacao	12
2.2.3.2. Microorganismos en la fermentación del cacao.....	13
2.2.3.4. Glucólisis.....	15
2.2.4. Enzimas	16
2.2.4.1. Enzima polifenol oxidasa.....	17
2.2.5. Secado	18
2.2.6. El cadmio	18
2.2.6.1. Toxicidad del cadmio para los seres humanos	19
2.2.6.2. Cadmio en el suelo y almendras de cacao.....	20
2.2.7. Mecanismos de acción en la movilización y remediación de cadmio	21
2.2.7.1. Uso de microorganismos	21
2.2.7.2. Quelantes.....	21

2.2.7.3. <i>Metalotioneínas</i>	22
2.2.7.4. <i>Fitoquelatinas</i>	22
2.2.7.5. <i>Medios ácidos</i>	22
2.2.7.6. <i>Escurrido del mucílago</i>	23
2.2.8. <i>Normas y regulaciones internacionales de cadmio en cacao</i>	23
2.2.9. <i>Calidad del cacao</i>	25
2.2.10. <i>Calidad organoléptica del licor de cacao</i>	26
2.2.10.1. <i>Evaluación sensorial del licor de cacao</i>	27
2.3. Marco conceptual	27
CAPÍTULO III.....	31
3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.....	31
3.1. Tipo y diseño de investigación	31
3.1.1. <i>Características del experimento</i>	31
3.1.2. <i>Modelo matemático</i>	32
3.2. Métodos de la investigación	32
3.2.1. <i>Método inductivo deductivo</i>	33
3.2.2. <i>Método deductivo</i>	33
3.3. Enfoque de la investigación.....	33
3.4. Alcance de la Investigación	33
3.5. Población de estudio.....	34
3.6. Unidad de análisis	34
3.7. Selección de la muestra	34
3.8. Tamaño de la muestra.....	34
3.9. Técnica de recolección de datos primarios y secundarios.	35
3.9.1. <i>Datos primarios</i>	35
3.9.2. <i>Datos secundarios</i>	35
3.10. Instrumentos de recolección de datos primarios y secundarios.....	35
3.10.1. <i>Instrumentos para procesar datos recopilados</i>	35
3.11. Procedimiento experimental	36
3.11.1. <i>Descripción del proceso experimental</i>	36
3.11.2. <i>Métodos de análisis</i>	36
3.11.2.1. <i>Análisis físico de las almendras evaluadas</i>	36
3.11.3. <i>Descripción del proceso de la elaboración de la pasta de cacao</i>	38
3.11.4. <i>Análisis sensorial</i>	39
CAPÍTULO IV.....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Temperatura, pH y acidez de las almendras de cacao durante la fermentación.....	40

4.1.1. <i>Temperatura</i>	40
4.1.2. <i>pH</i>	41
4.1.3. <i>Acidez</i>	42
4.2. Características fisicoquímicas de las almendras de cacao seco	44
4.2.1. <i>Prueba de corte</i>	44
4.2.2. <i>Humedad</i>	47
4.2.3. <i>Ceniza</i>	47
4.2.4. <i>Azúcares totales (glucosa g/kg)</i>	48
4.2.5. <i>pH</i>	50
4.2.6. <i>Acidez</i>	51
4.2.7. <i>Proteína</i>	52
4.3. <i>Cadmio</i>	55
4.3.1. <i>Tiempo de fermentación</i>	55
4.3.2. <i>Adición de cultivo iniciador</i>	56
4.3.3. <i>Interacción entre el tiempo de fermentación y levaduras y enzimas</i>	57
4.3.4. <i>Contraste ortogonal entre los tratamientos de cadmio</i>	58
4.4. Contrastes ortogonales de las variables fisicoquímicas de las almendras de cacao	59
4.5. Análisis sensorial de la pasta de cacao	62
4.6. Análisis de componentes principales de los perfiles del sabor de la pasta de cacao.....	66
4.7. Análisis de componentes principales de todas las variables fisicoquímicas y sensoriales.	68
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Niveles máximos de cadmio en la UE en cacao y productos de chocolate del Reglamento de la Comisión Europea 488/2014 del 12 de mayo de 2014.	24
Tabla 2-3:	Análisis de la varianza para el estudio de tiempos de fermentación y adición de levadura y enzimas en almendras de cacao Nacional.	31
Tabla 3-3:	Identificación y características de los tratamientos a evaluar.	32
Tabla 4-4:	pH y acidez de las almendras en la fermentación.	43
Tabla 5-4:	Prueba de corte de las almendras de cacao.	46
Tabla 6-4:	Análisis fisicoquímico de las almendras de cacao seco.	54
Tabla 7-4:	Contrastes ortogonales para los tratamientos de las variables fisicoquímicas de las almendras de cacao.	61
Tabla 8-4:	Análisis de la varianza de los sabores de las muestras del licor de cacao.	64
Tabla 9-4:	Resultado del análisis sensorial de los sabores de las muestras del licor de cacao.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-4: Valores promedios del análisis de regresión entre el tiempo y la temperatura de fermentación.	41
Figura 2-4: Interacción entre tiempos de fermentación por levaduras y enzimas.	58
Figura 3-4: Análisis de componentes principales de los perfiles del sabor de la pasta de cacao.	67
Figura 4-4: Análisis de componentes principales las variables fisicoquímicas y sensoriales. .	69

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Ficha de catación de pasta de cacao.
- ANEXO B:** Flujograma de elaboración de la pasta de cacao.
- ANEXO C:** Análisis de la varianza del pH de la fermentación.
- ANEXO D:** Análisis de la varianza de la acidez de la fermentación.
- ANEXO E:** Análisis de la varianza de la prueba de corte de las almendras de cacao.
- ANEXO F:** Análisis de la varianza de la humedad (%) de las almendras de cacao seco.
- ANEXO G:** Análisis de la varianza de cenizas (%) de las almendras de cacao seco.
- ANEXO H:** Análisis de la varianza de glucosa (g/kg) de las almendras de cacao seco.
- ANEXO I:** Análisis de la varianza del pH de las almendras de cacao seco.
- ANEXO J:** Análisis de la varianza de la acidez (%) de las almendras de cacao seco.
- ANEXO K:** Análisis de la varianza de proteína (%) de las almendras de cacao seco.
- ANEXO L:** Análisis de la varianza de cadmio de las almendras de cacao seco.
- ANEXO M:** Análisis de la varianza comparaciones ortogonales.
- ANEXO N:** Análisis de la varianza del perfil sensorial de la pasta de cacao.
- ANEXO O:** Intensidad que se expresa en la degustación del licor de cacao (escala hedónica).
- ANEXO P:** Curva de calibración de la glucosa.
- ANEXO Q:** Resultados de los análisis de laboratorio.
- ANEXO R:** Fotografías del trabajo de campo.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue utilizar enzimas y levaduras como estrategia para disminuir el contenido de cadmio durante la fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.). Se empleó un diseño completamente al azar con un arreglo bifactorial, donde el factor A corresponde al tiempo de fermentación (48, 96 y 120 horas); y el factor B midió el tipo de cultivo iniciador (fermentación; fermentación + levadura madre; fermentación + levadura madre + PPO). En total se evaluaron nueve tratamientos y los tratamientos T1, T2 y T3 fueron los controles. Se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$ para encontrar diferencias entre las medias de los tratamientos. El tratamiento T9 presentó el mayor porcentaje de fermentación con 89.33% en la prueba de corte. El T5 alcanzó 5.48% de humedad, el T7 presentó 3.54% de cenizas y 7.42 g.kg⁻¹ de glucosa. Mientras que el T2 registró 14.99% de proteína. De la interacción AxB, el T3 presentó el menor contenido de cadmio 0.20 mg.kg⁻¹ en las almendras de cacao. En la evaluación sensorial no hubo diferencias entre los tratamientos. En conclusión, el aumento en el tiempo de fermentación y la adición de levadura y enzimas permitieron una disminución del contenido de cadmio en las almendras de cacao seco. Asimismo, para el efecto principal de tiempos de fermentación, el menor contenido de cadmio se alcanzó al fermentar por 120 horas almendras de cacao.

Palabras claves: <CADMIO (Cd)>, <FERMENTACIÓN>, <ENZIMAS>, <LEVADURA DE CERVEZA (*Saccharomyces cerevisiae*)>, <ALMENDRAS DE CACAO>.

LUIS
ALBERTO
CAMINOS
VARGAS

Firmado digitalmente
por LUIS ALBERTO
CAMINOS VARGAS
Nombre de
reconocimiento (DN):
c=EC, l=RIOBAMBA,
serialNumber=06027669
74, cn=LUIS ALBERTO
CAMINOS VARGAS
Fecha: 2022.05.12
09:33:39 -05'00'



12-05-2022

0045-DBRA-UPT-IPEC-2022

ABSTRACT

The objective of this research was to use enzymes and yeasts as a strategy to reduce the cadmium content during cocoa (*Theobroma cacao* L.) fermentation. A completely randomized design with a bifactorial arrangement was used, where factor A corresponds to the fermentation time (48, 96, and 120 hours); and factor B measured the type of starter culture (fermentation; fermentation + mother yeast; fermentation + mother yeast + PPO). In total nine treatments were evaluated and treatments T1, T2, and T3 were the controls. Tukey's range test was used with a significance level of $p < 0.05$ to find differences between the means of the treatments. The T9 treatment presented the highest percentage of fermentation with 89.33% in the cut test. T5 reached 5.48% humidity, and T7 presented 3.54% ash and 7.42 g.kg⁻¹ of glucose. While T2 registered 14.99% protein. Of the AxB interaction, T3 presented the lowest content of cadmium 0.20 mg.kg⁻¹ in cocoa beans. In sensory evaluation, there were no differences between treatments. In conclusion, the increase in fermentation time and the addition of yeast and enzymes allowed a decrease in the cadmium content in dry cocoa beans. Likewise, for the main effect of fermentation times, the lowest cadmium content was reached when cocoa beans were fermented for 120 hours.

Keywords: <CADMIUM (Cd)>, <FERMENTATION>, <ENZYMES>, <BREWER'S YEAST (*Saccharomyces cerevisiae*)>, <COCOA ALMONDS>.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La exportación de cacao se va amenazada, principalmente por la presencia de cadmio en las almendras de cacao. Actualmente el Codex Alimentarius establece niveles máximos de cadmio para: Chocolate semiamargo 0.3 mg.kg^{-1} ; chocolate amargo 0.8 mg.kg^{-1} (Codex Alimentarius, 2018, pp. 46-68). Mientras que el Reglamento General de la Unión Europea (UE) estableció tanto para el chocolate y el cacao que se vende a consumidor final un nivel de 0.1 mg.kg^{-1} y 0.8 mg.kg^{-1} para las concentraciones de 30 y 70 % de pasta de cacao respectivamente (Comisión Europea, 2014, p.78).

Ecuador es uno de los principales productores de cacao fino de aroma a nivel mundial, en el 2018 exportó 315 toneladas métricas; en el 2019 el Ecuador se convirtió en el principal exportador de cacao en grano en América y llegó a ocupar el cuarto lugar a nivel mundial. Durante el 2018, las exportaciones de almendras secas representó el 93.67 % y el 6.33 % semielaborados, de los cuales los principales destinos de estos productos fueron la Unión Europea y Estados Unidos (Anecacao, 2019; Borja *et al.*, 2021).

Debido a que el cadmio puede transportarse y acumularse en las almendras de cacao lo que conlleva un gran riesgo para la salud, debido a la ingesta de alimentos contaminados con cadmio. Una vez que el cadmio es absorbido se acumula en el organismo por largos periodos. Dependiendo de la cantidad, tiempo y tipo de exposición, el cadmio es capaz de producir una serie de trastornos incluido el cáncer, también puede llegar a dañar órganos como el hígado, riñón, pulmón, huesos, placenta y testículos (Alvarez, 2021; Martínez *et al.*, 2013; Pérez y Azcona, 2012). Es por esto que la contaminación por cadmio en la alimentación humana ha generado gran preocupación a nivel mundial.

Investigaciones realizadas en varias zonas del Ecuador han identificado alto contenido de cadmio en las almendras de cacao con valores que superan el límite permitido. En la provincia de Los Ríos Mite *et al.* (2010, p.14), encontró un valor mínimo y máximo de 0.23 y 1.23 mg.kg^{-1} de cadmio en muestras de almendras de cacao. Por lo tanto, esta situación genera gran preocupación al sector público y privado puesto que representa un problema para el ingreso del producto al mercado europeo (Huamaní y Huauya, 2018, p.21).

La presencia de metales pesados en Ecuador, específicamente el cadmio, plantea investigar técnicas que permitan la reducción del mismo, mediante la adición de medios ácidos, escurrido

de las almendras, tipos de fermentadores, métodos de fermentación, tipos de secado y aplicación de agentes quelantes (Cedeño, 2020, p.13). También se ha planteado el uso de microorganismos por la capacidad que tienen para absorber metales pesados como el cadmio en sus paredes celulares gracias a los péptidoglucanos (Falcon, 2019, p.32).

La fermentación de las almendras de cacao es el proceso bioquímico capaz de transformar y eliminar macro y microelementos desde el interior del cotiledón hacia el exterior. Las levaduras desempeñan un papel fundamental en muchos procesos industriales, donde se destaca la especie *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene la capacidad de secuestrar el cadmio en sus paredes celulares y como consecuencia disminuye la concentración de cadmio en las almendras de cacao (Falcon, 2019, p.32).

Las polifenol oxidasas (PPOs) son enzimas que utilizan el oxígeno molecular para transformar los fenoles en quinonas (Morante y Agnieszka, 2017; Vázquez *et al.*, 2016). Estas enzimas son de gran importancia en la industria agroalimentaria e influyen en la calidad de los productos (Morante y Agnieszka, 2017; Narro *et al.*, 2003; Vázquez *et al.*, 2016). La adición de la enzima PPO ayuda al rompimiento de glicoproteínas, formándose péptidos y azúcares, permitiendo un mayor tiempo de acción de las levaduras (Diaz *et al.*, 2012, p.5).

Por lo anteriormente enunciado es importante evaluar el uso de enzimas y levaduras como estrategia para disminuir la presencia de cadmio en el proceso de fermentación de almendras de cacao (*Theobroma cacao* L.).

1.1. Problema de investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

Se ha detectado que los niveles de cadmio en cacao de América Latina y el Caribe superan los límites permisibles en determinadas áreas (Meter *et al.*, 2019). Muchos de los productores de cacao son vulnerables a las nuevas regulaciones establecidas por la Unión Europea. Por otra parte, el chocolate debe contener un máximo de 0.3 mg.kg⁻¹ de cadmio (Meter *et al.*, 2019, p.1). Por tal razón se presenta una necesidad apremiante de brindar soluciones a corto, mediano y largo plazo para disminuir el problema.

Una vez ingerido el cadmio puede acumularse en los riñones e hígado y afectar el sistema óseo e incluso provocar fracturas, dolor de las articulaciones, osteoporosis y la enfermedad conocida como Itai - Itai (Barraza *et al.*, 2017, p.951). También puede provocar edema pulmonar, neumonitis aguda, bronquitis, anemia y fiebre de los humos metálicos. La ingestión de alimentos que contengan altos niveles de cadmio provoca infecciones estomacales, vómitos y diarrea, e incluso podría causar la muerte (Piedraita *et al.*, 2018, pp.10-11).

La Unión Europea, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) clasifican el cadmio como agente carcinógeno de tipo I en categoría B, por sus efectos cancerígenos y efectos adversos a nivel del cerebro, riñones y huesos (Barraza, *et al.*, 2017; Piedraita *et al.*, 2018).

Sin embargo, no es reciente la preocupación internacional con respecto a la existencia de trazas de metales pesados en los tejidos del cacao (Barraza *et al.*, 2017, pp.951-953). A partir del 2014 se estableció niveles máximos de cadmio en el chocolate y derivados del cacao vendidos en la Unión Europea.

La Organización Mundial de la Salud menciona que la severidad de los signos, síntomas y alteraciones en el organismo se relaciona con las cantidades, el tiempo de exposición y con la vía de ingreso del metal (Barraza *et al.*, 2017, pp.951-953). La preocupación incrementa al conocer que el cadmio es uno de los metales más tóxicos capaz de presentar efectos en todos los procesos biológicos (Gara, 2016, p.1).

El cadmio se encuentra de forma natural en el ambiente en pequeñas concentraciones (Llatance *et al.*, 2018; Mite *et al.*, 2010). Este tipo de metal no puede ser degradado o destruido, puede ser disuelto por agentes físicos y químicos. La planta de cacao absorbe el cadmio presente en los

suelos y los concentra en las almendras, posteriormente estas se incorporan a la cadena alimenticia pudiendo acumularse y alterar el metabolismo humano (Piedraita *et al.*, 2018, pp.13-14).

El sector cacaotero de Ecuador muestra altas expectativas en cuanto al crecimiento. Actualmente, el 63 % de la producción del *T. cacao* “sabor arriba”, proviene de Ecuador, se ha distinguido por ofrecer cacao de calidad, esto hace que se convierta en el cuarto exportador mundial de cacao en grano. El sector cacaotero constituye una fuente de empleo directo para 100,000 familias de pequeños productores.

Según lo descrito en la cadena productiva del cacao en el Ecuador, la mayor concentración del cultivo de cacao se encuentra en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí, Esmeraldas y El Oro. Según la Ficha sectorial de la Corporación Financiera Nacional (2018, p.10), la provincia de los Ríos presenta una superficie cosechada de 96,200 ha, con una producción de 41,187 Tm, rendimiento de 0.4 Tm/ha, representando el 23 % de la producción nacional.

En otras investigaciones se ha demostrado que durante la fermentación del cacao ocurren procesos bioquímicos que permiten la transformación y eliminación de sustancias orgánicas desde el cotiledón hacia el exterior (Lares *et al.*, 2013, pp.41-43). Se conoce que los microorganismos como las levaduras tienen la capacidad de secuestrar el cadmio a través de sus paredes celulares por lo que disminuye el contenido de cadmio de las almendras de cacao. Del mismo modo los procedimientos utilizados durante la fermentación y el secado reducen los polifenoles y potencializan los sabores del cacao (Falcon, 2019, pp.20-24). Por lo que la presente investigación tiene como objetivo reducir la presencia de cadmio durante la fermentación por acción de levaduras y enzimas.

1.1.2. Situación problemática

En los últimos años el Ministerio de Salud Pública (2017, p.2-17), ha reportado un aumento significativo en la mortalidad por enfermedades de cáncer donde los más frecuentes son: cáncer de próstata, estómago, colón, cuello uterino y de mama, descritas como efecto de la contaminación por cadmio. En el Ecuador el cáncer es la segunda causa de muerte, se estima que la mortalidad por esta enfermedad incrementará en un 45 % hasta el 2030 (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2016, p.86).

Ecuador produce más del 60 % de la producción mundial de cacao fino de aroma. Siendo Europa y Estados Unidos los principales destinos de exportación de Ecuador. Durante los meses de enero

a mayo del 2020 se ha registrado 111,496 toneladas de cacao en grano y subproductos del exportados (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2018).

Actualmente, tanto los mercados internacionales como los consumidores requieren cada vez más productos de cacao y derivados de alta calidad, chocolates de primera, por lo que, el procesamiento requiere de tecnología actualizada. Donde, la calidad de las materias primas para la fabricación de chocolates y demás productos del cacao puede mejorarse con el control de los procedimientos durante la post-cosecha, la fermentación y el secado de las almendras (Llerena y Uriña, 2017, pp.2-3).

Después de la post-cosecha y apertura de las mazorcas de cacao inicia la fase de fermentación que dura entre 96 y 144 horas según la variedad, donde la pulpa se descompone por acción microbiana e inicia los cambios bioquímicos en el interior de las almendras que reducen el amargor y la astringencia potencializando su sabor y color.

La ingesta de alimentos provenientes de suelos y plantas contaminadas con cadmio representa el mayor riesgo para la salud humana. Ante esta problemática y la presión mundial sobre el consumo masivo de cacao la UE aplica a partir del primero de enero del 2019, el Reglamento Europeo N° 488/2014 que establece niveles máximos para cadmio en cacao y sus derivados.

Actualmente en Ecuador ya se han identificado las zonas con alto contenido de cadmio para organizar, capacitar, implementar y ordenar la producción de cacao (Barraza, Schreck, Lévêque, *et al.*, 2017; Sánchez, 2019; Zambrano, 2018). Se ha demostrado que incrementar la población microbiana durante la fermentación del cacao es una alternativa diferente e innovadora para reducir el contenido de cadmio, puede ser transmitida y replicada por los productores, aportando así al intercambio científico y tecnológico (Intriago *et al.*, 2019 pp.18-21).

1.1.3. Formulación del problema

¿La aplicación de enzimas polifenol oxidasas y levaduras durante la fermentación de almendras de cacao Nacional disminuirá el contenido de cadmio?

1.2. Preguntas directrices

- ¿Cómo influirá la fermentación alcohólica con adición de levadura madre (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzimas polifenol oxidasa a las 48, 96 y 120 horas en el contenido de cadmio de las almendras de cacao (*Theobroma cacao* L.)?
- ¿Cuál será el contenido de cadmio de los diferentes tratamientos?
- ¿Cuál será el contenido de azúcares fermentables en los diferentes tratamientos?
- ¿Influirá en los atributos sensoriales el uso de enzimas durante la fermentación del cacao?

1.3. Justificación de la investigación

El cadmio es un metal pesado tóxico que se moviliza con facilidad y se acumula en diferentes órganos provocando daños severos en la salud del consumidor (CAOBISCO/AEC/FCC, 2015; Pavicich, 2019). En la actualidad, a nivel mundial incrementa la preocupación en la cadena de comercio del cacao, específicamente a los países productores de América Latina y el Caribe debido la presencia de cadmio en las almendras de cacao y su transferencia directa al chocolate y derivados del cacao. Al hallar altos niveles de cadmio en almendras de cacao de origen ecuatoriano, disminuirá la exportación de hacia el mercado internacional (Intriago *et al.*, 2019, p.18).

Se ha demostrado que ingerir alimentos con altas concentraciones de cadmio y por tiempos prologados puede causar efectos adversos en riñones, páncreas, pulmones, huesos, testículos y placenta (Martínez *et al.*, 2013, pp.34-35). Por tal motivo, desde el 2019 la UE ha implementado mayores controles en los productos provenientes del cacao, en el mismo año se establecido un umbral de 0.6 mg.kg⁻¹ para el control del cadmio en las almendras de cacao y subproductos (Chavez *et al.*, 2016; Engbersen *et al.*, 2019). Por ello existe una necesidad apremiante en disminuir la presencia de cadmio en las almendras de cacao y superar las regulaciones impuestas por la UE, ante estas regulaciones los pequeños agricultores serán los más afectados.

Una de las principales fuentes de contaminación en la agricultura son los fertilizantes fosfatados elevando los contenidos de cadmio en el suelo (Arévalo *et al.*, 2016; Llatance *et al.*, 2018). El uso indiscriminado de pesticidas representa un gran peligro para la población rural y el medio ambiente (Gramlich *et al.*, 2018, pp.370-371). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) tanto la aplicación como la mala eliminación de los pesticidas incrementan las concentraciones de metales pesados.

Actualmente, los mercados extranjeros en específico la Unión Europea ha fijado límites máximos para el cadmio en las almendras y productos derivados del cacao. La falta de capacitaciones y el desconocimiento de nuevas tecnologías de producción de cacao, mantiene a los productores adaptados a formas convencionales, que afectan su economía. Frente a este problema, Ecuador se ve en la necesidad de implementar varias estrategias para reducir la movilidad y acumulación de cadmio desde la producción hasta la industrialización del cacao.

Por otra parte, Ecuador se caracteriza por la producción y comercialización de cacao fino de aroma. Además, durante la segunda mitad del siglo XVI el cultivo de cacao fue muy rentable, durante varias décadas generó divisas para el país, creando los primeros capitales, contribuyendo al desarrollo de sectores como la industria, la banca y el comercio (Carchi, 2016, pp.1-2).

Se desconoce si se han implementado técnicas para reducir el contenido de cadmio en las almendras de cacao durante la fermentación. Las primeras etapas de la fermentación del cacao, la pulpa de las almendras permite el crecimiento microbiano, iniciando así la acción de levaduras que tienen la capacidad de secuestrar el cadmio en sus paredes celulares. Por lo que al aumentar la población de levaduras durante la fermentación mejoraría la capacidad de absorción del cadmio y la calidad del cacao (Falcon, 2019, pp.31-33).

Así mismo, la adición de la enzima polifenol oxidasa se emplea a fin de que actúe en la fase inicial de la fermentación y ayudar al rompimiento de glicoproteínas, formando péptidos y azúcares, lo que permita mayor tiempo de acción de las levaduras (Diaz *et al.*, 2012, p.5).

De esta manera se plantea que la fermentación del cacao incide directamente sobre la reducción del cadmio en las almendras de cacao. Por ello la presente investigación se basa en la necesidad de mejorar la fase de fermentación, con el uso de enzimas polifenol oxidasas y levadura madre que podrían disminuir la presencia de cadmio y mejorar la calidad del producto e incrementar los ingresos de los productores. También, esta investigación generará un aporte científico relevante ante la problemática y permitirá establecer soluciones en cuanto al contenido de cadmio en el cacao y sus derivados de consumo nacional y de exportación.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Utilizar enzimas y levaduras como estrategia para disminuir la presencia de cadmio en el proceso de fermentación de almendras de *Theobroma cacao* L.

1.4.2. Objetivos específicos

- Realizar la fermentación de las almendras de cacao con adición de levadura madre (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzimas polifenol oxidasas a 48, 96 y 120 horas.
- Cuantificar el contenido de cadmio en los diferentes tratamientos.
- Determinar la presencia de azúcares totales y el pH en almendras de cacao.
- Evaluar los atributos sensoriales en la pasta de cacao de los diferentes tratamientos.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis general

Ha.- La utilización de enzimas y levaduras disminuirá el contenido de cadmio en el proceso de fermentación de las almendras de *Theobroma cacao* L.

Ho.- La utilización de enzimas y levaduras no disminuirá el contenido de cadmio en el proceso de fermentación de las almendras de *Theobroma cacao* L.

1.5.2. Hipótesis específicas

Ha.- Con la aplicación de levadura madre (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzimas polifenol oxidasas durante la fermentación (48, 96 y 120 horas) disminuirá el contenido de cadmio en las almendras de cacao Nacional.

H0.- Con la aplicación de levadura madre (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzimas polifenol oxidasas durante la fermentación (48, 96 y 120 horas) no disminuirá el contenido de cadmio en las almendras de cacao Nacional.

Ha.- Al menos uno de los tratamientos reducirá el contenido de cadmio en las almendras de cacao.

H0.- Ninguno de los tratamientos reducirá el contenido de cadmio en las almendras de cacao.

Ha.- La presencia de azúcares fermentables y el pH influirá durante la fermentación del cacao.

H0.- La presencia de azúcares fermentables y el pH no influirá durante la fermentación del cacao

Ha.- La utilización de levadura madre (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzimas polifenol oxidasas afectará las características sensoriales de las almendras de cacao.

H0.-. La utilización de levadura madre (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzimas polifenol oxidasas no afectará las características sensoriales de las almendras de cacao.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del problema

Según Llatance *et al.* (2018), el *Theobroma cacao L.* es una especie con tendencia a bioacumular altas concentraciones de cadmio en sus estructuras. Además menciona que el cadmio absorbido por el *Theobroma cacao L.* se acumula en los frutos. En la investigación realizada por Barraza *et al.* (2017, pp.1-3), en 31 granjas del norte de la Amazonía y Costa ecuatoriana, se determinó que el 50 % de las almendras de cacao evaluadas presentaron un contenido de cadmio por encima de 0.8 mg.kg⁻¹ sobrepasando los límites legales de chocolate negro. A demás se reportó niveles tóxicos de cadmio en plantaciones cacaoteras. También se identificaron que las almendras de 1 mg.kg⁻¹ de cadmio provenientes de las provincias de El Oro, Guayas, Esmeraldas, Los Ríos, Zamora, Francisco de Orellana y la costa de Pichincha (Mite *et al.*, 2010, pp.13-14).

Gramlich *et al.* (2018, p.370), explica que el cadmio se encuentra de forma natural en los suelos y está relacionado con la concentración de cadmio presente en las almendras de cacao. El cadmio en el suelo puede provenir de las siguientes fuentes antropogénicas: lodos industriales, fertilizantes, pesticidas, combustión del carbón (Álvarez, 2018; Mite *et al.*, 2010; Niño, 2015). La presencia de cadmio en las almendras de cacao está asociada con las propiedades físicas y químicas del suelo, además de la variedad de cacao (CAOBISCO/AEC/FCC, 2015).

Por otra parte, la ingestión de alimentos con altas concentraciones de cadmio y por tiempos prolongados es perjudicial para la salud humana (Llatance *et al.*, 2018, p.64). Mite *et al.* (2016, p.2), menciona que en Jadun, Japón en la década de los 70 se identificó el primer caso de toxicidad del cadmio, por alta concentración de cadmio presente en el cultivo de arroz provocando la enfermedad Itai - itai, caracterizada por presentar graves problemas renales y óseos. El mismo autor indica que afectó a mujeres entre 45 y 70 años que vivían junto a un río proveniente de una mina de cadmio (Engbersen *et al.*, 2019; Mite *et al.*, 2010). Según, Baron (2016) y Dahiya *et al.* (2005) la población más vulnerable ante la ingesta de cadmio por el consumo de cacao y sus derivados son los niños y adolescentes, al registrar mayor consumo de estos productos.

Una vez adsorbido el cadmio se acumula en el organismo por largos periodos y puede ocasionar efectos adversos en el ser humano. El cadmio puede causar daños en diversos órganos como el hígado, pulmón, riñón, huesos, placenta y testículos (Martínez *et al.*, 2013, pp.34-35). Otros daños causados por la toxicidad del cadmio son: osteoporosis, fractura de huesos, problemas

gastrointestinales, náuseas, dificultad respiratoria, diarrea, problemas reproductivos, cálculos renales y daños renales (Dahiya *et al.*, 2005; Zug *et al.*, 2019).

La Unión Europea, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) catalogaron al cadmio dentro del Grupo 1 y clase B, basado en sus efectos cancerígenos para los humanos (Kruszewski *et al.*, 2018, p.4). La Comisión Regulatoria de la Unión Europea según el Reglamento 488/2014, aplicado desde el 01 de Enero del 2019, establece los límites permisibles para el contenido cadmio en almendras de cacao y productos derivados del cacao (Kruszewski *et al.*, 2018, p.4). La Comisión Europea (2014, p.78), estableció:

“Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao $\leq 30\%$ 0.10 mg.kg^{-1} ; chocolate con un contenido de materia seca total de cacao $\leq 50\%$ y chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao $\geq 30\%$, 0.30 mg.kg^{-1} ; chocolate con un contenido de materia seca total de cacao $\geq 50\%$, 0.80 mg.kg^{-1} ; cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (chocolate para beber), 0.60 mg.kg^{-1} ”.

Es así que, Pérez *et al.* (2019, p.122), plantea que el uso de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) podría aplicarse como una estrategia para disminuir la translocación del cadmio hacia la planta de cacao. También, se ha demostrado que el uso del hongo *Pleurotus Ostreatus*, suele ser muy efectivo para la biorremediación de suelos contaminados con cadmio, con la capacidad de remover los metales pesados, debido a que produce una enzima extra celular capaz de catalizar una reacción que degrada la lignina (Coello, 2011, p.5). Según Vega (2021, p.19) los biorremediadores son una alternativa biológica que presenta grandes ventajas. La biodegradación del contaminante dependerá de su estructura química y las especies microbianas empleadas.

En otras investigaciones se utilizaron cepas de hongos (*Aspergillus-L007*, *Trichoderma-L006* y *Penicillium-L004*) nativos de suelos contaminados y *Galinsoga parviflor* (Albahaca silvestre) como biorremediadores. Se demostró que las cepas de hongos alcanzaron una bioabsorción del cadmio sobre el 80 % en medio líquido, mientras que la *Galinsoga parviflor* resultó ser muy efectiva y replicable para los agricultores (Nieves *et al.*, 2019, pp.96-104).

Las bacterias de la rizósfera, *Burkholderia cepaceae* y *Pseudomonas fluorescens*, son capaces de intervenir en los procesos de fitorremediación de suelos contaminados con cadmio, mediante la alteración del pH del suelo y la liberación de agentes quelantes. Convirtiéndose en una alternativa biológica para reducir los niveles de cadmio en suelos contaminados (Ayubb *et al.*, 2017, p.282).

Según la FAO (2012), la aplicación de buenas prácticas agrícolas representan una oportunidad para que los productores obtengan alimentos saludables libre de cadmio. Piedraita *et al.* (2018, pp.19-20), señala que se debe realizar periódicamente análisis de suelos para determinar los nutrientes, pH y cadmio. El mismo autor indica que los fertilizantes a base de fósforo deben ser reemplazados por abonos orgánicos. Por otra parte, aseguraron que las plantaciones de cacao jóvenes absorben mayores cantidades de cadmio que las plantas antiguas.

Dentro de los resultados obtenidos por Pavicich (2019, pp. 52-53), se evidencia que el suelo aporta el 100 %, el agua de riego y pesticida 0.28 % de cadmio presente en las almendras. Donde las muestras de almendras de cacao en este estudio presentaron contenidos $\leq 3.6 \text{ mg.kg}^{-1}$, diez veces más alta que los límites permisibles según la Comisión Regulatoria de la UE No 1881/2006.

En la investigación para determinar la acumulación de metales pesados como plomo y cadmio en almendras de cacao durante la fermentación y secado realizada por Álvarez (2018, pp. 26-28), se observó que la concentración de cadmio fue de 0.95 mg.kg^{-1} para el fermentado y para almendras secas, valores que son superiores a los establecidos por el Reglamento de la UE N° 1881/2006.

Lara (2017, pp.42-44), evaluó el contenido de cadmio en dos variedades de cacao aplicando distintos métodos de secado y determinó que las variedades de cacao Nacional y CCN-51 si influyen sobre el contenido de cadmio en las almendras de cacao, presentando mejores resultados la variedad Nacional. El mismo autor menciona que los tipos de secado (estufa, cemento y asfalto) también influyen en las concentraciones de cadmio presente en las almendras de cacao, y recomienda no utilizar el secado en estufa por presentar altos valores de cadmio.

Por otra parte Lanza *et al.* (2016, p.114), indica que el método de fermentación en madera puede disminuir los niveles de cadmio en las almendras de cacao. La fermentación de almendras de cacao con la aplicación de levaduras reduce la concentración de cadmio (Falcon, 2019, pp.31-33). El mismo autor menciona que los microorganismos tienen la capacidad de secuestrar el cadmio en sus paredes celulares. Otras investigaciones realizadas en Ecuador demuestran que las técnicas como lavar la pulpa de las almendras de cacao antes del proceso de fermentación, puede reducir la presencia de contaminantes sin afectar el proceso de fermentación (Falcon, 2019, pp.31-33).

Se ha demostrado que las levaduras actúan como biosorbentes de varios elementos metálicos. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* actúa en la fermentación del cacao, al aumentar su población durante la fermentación de las almendras de cacao se mejoraría la bioabsorción de cadmio (Falcon, 2019; Guevara, 2017).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. El cacao

Ecuador tiene alrededor de 498,794 ha de superficie de cacao (*Theobroma cacao* L.) plantada, con una producción de 309,066 t/año y un rendimiento 0.62 t/ha (Ministerio de Agricultura y Ganadería., 2018). En el país el cultivo de cacao representa la mayor superficie cultivada, por lo tanto es un rubro importante en la economía del país. El cacao ecuatoriano se caracteriza a nivel mundial en la industria del chocolate y derivados del cacao por su sabor e inconfundible aroma (Solórzano *et al.*, 2015, p.38). Un cacao de calidad se define por los sabores presentes y notas aromáticas secundarias sin presentar sabores indeseables. La falta o excesiva fermentación y la contaminación son factores que pueden afectar la calidad del cacao (CAOBISCO/AEC/FCC, 2015).

2.2.2. Cacao Nacional

También conocido como “*cacao arriba*”, distinguido por su aroma y sabor reconocido en la industria chocolatera a nivel mundial. Desde la antigüedad el *Theobroma cacao* L. ha sido reconocido como el “alimento de los dioses”. En Ecuador desde el siglo XIX se ha cultivado cacao en la cuenca del Río Guayas y a finales del mismo siglo los suizos elaboraron la primera receta de chocolate con leche (Rivera, 2017, p.13). Actualmente el cacao Nacional representa alrededor del 5 % de la producción mundial, del cual el 63 % de la producción corresponde a Ecuador, ubicándolo como el país más competitivo de América Latina (Lara, 2017, pp.12-13).

La planta de *Theobroma cacao* L. es de tipo tropical, se desarrolla en climas cálidos y húmedos, puede medir entre 4 y 8 m de alto. Además el cacao Nacional se caracteriza por presentar mazorcas de forma elíptica, ligeramente verrugoso o áspero, de construcción basal poco profunda y ápice puntiagudo y prominente, de cascara gruesa, de color verde y amarillo. Las almendras presentan aromas florales y frutales, varían en su forma, tamaño y color (violeta a morado). Se puede encontrar hasta 33 almendras en promedio por mazorca (Rivera, 2017; Zambrano, 2018).

2.2.3. Fermentación del cacao

Durante la fermentación ocurren una serie de cambios fisicoquímicos que permiten la formación precursores del color, sabor y aroma a chocolate, durante esta fase cambia: la pigmentación de las almendras de color violeta a marrón claro, la transformación astringente de los cotiledones; los azúcares de la pulpa de las almendras se transforman en alcoholes por efecto de las levaduras, lo

que posteriormente se transforma en ácido acético por acción de las bacterias acéticas (Falcon, 2019; Teneda, 2016).

En la fermentación del cacao existe una relación ordenada entre microorganismos, pH, humedad, variación de la temperatura, formación de alcoholes, ácidos y compuestos polifenólicos, esto provoca la muerte del embrión, reduce el sabor amargo y ocurren reacciones bioquímicas formadoras del chocolate. En el interior de las almendras las reacciones químicas dependen de la muerte de las células del cotiledón, con lo que sus membranas celulares se degradan y aumentan su permeabilidad, permitiendo el contacto entre los diversos compuestos celulares (Teneda, 2016, pp.47-51).

El sabor astringente que producen los polifenoles en las almendras puede dispersarse hacia las células adyacentes, donde se encuentran con diferentes enzimas encargadas de realizar las reacciones hidrolíticas gracias a las condiciones anaeróbicas de las almendras. Si no existe una degradación correcta estas ingresan al grano seco y provocan el color violeta de la almendra lo que indica errores durante la fermentación (Falcon, 2019, pp.14-16).

2.2.3.1. Azúcares fermentables

La pulpa del cacao es de color blanco y cuando alcanza la madurez necesaria el tegumento de la semilla toma una consistencia mucilaginosa y aromática. La pulpa mucilaginosa presenta células esponjosas parenquimatosas con 10-13 % de azúcares, 2-3 % de pentosas, 1-2 % de ácido cítrico y 8-10 % de sales (Guerra, 2019). El proceso fermentativo se da inicio por acción de los microorganismos a partir de los azúcares contenidos en la pulpa, esta es rica en glucosa, fructosa y sacarosa. También presenta un valor de acidez entre 3.3 y 4.0 % por la presencia de ácido cítrico lo que favorece el proceso fermentativo (Romero, 2012, p.906). En 100 g de pulpa fresca de cacao se presenta 4.35 g de sacarosa, 3.00 g de glucosa y 3.80 g de fructuosa (Guerra, 2019, p.19).

2.2.3.2. Microorganismos en la fermentación del cacao

Durante la fermentación del cacao intervienen una serie de microorganismos, en un ambiente anaerobio estos microorganismos producen sustancias que estimulan la formación de compuestos y la fermentación de las almendras (Guevara, 2017, pp.21-22). Los microorganismos (levaduras y bacterias) se encargan de transformar los azúcares de la pulpa del mucílago.

La fermentación del cacao se da en tres fases, durante la primera fase actúan diferentes tipos de levaduras (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora*, *Candida zemplinina*, *C. silvae*, *C. zemplinina* y *C. diversa*), que producen alcohol y ácidos (Otárola, 2018, pp.44-65). Al finalizar la fermentación entre las 36-38 h predominan las especies de *S. cerevisiae* y *Pichia membranaefaciens*. Cuando se realiza la fermentación en bandejas se puede presentar especies de *C. krusei* y *H. guilliermondii*, sin embargo predomina *S. cerevisiae* (Guevara, 2017; Teneda, 2016).

En las primeras 48 horas, de la segunda fase se desarrollan las bacterias lácticas *Lactobacillus* (*L. collonides*, *L. fermentum*, *L. mali* y *L. plantarum*), *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc pseudoficulneum*, y *Pediococcus acidilactici*. Por otra parte, *L. fermentum* y *L. plantarum* son bacterias propias de la fermentación. También se ha identificado una nueva bacteria láctica conocida como *Weissella fabaria*, mediante el aislamiento en fermentaciones de cacao en Ghana (Guevara, 2017, pp.23-25). En esta misma fase las levaduras contienen enzimas de tipo “pectinolítico” que permite hidrolizar las pectinas, provocando una reducción de la viscosidad del mucílago y permitiendo el ingreso de aire.

En la tercera fase del proceso de fermentación del cacao intervienen las bacterias acéticas, encargadas de transformar el etanol en ácido acético que ingresa al interior de las almendras de cacao, por acción de la temperatura. En esta etapa las enzimas junto con las proteínas y polifenoles disminuyen el amargor y astringencia (Intriago *et al.*, 2019; Teneda, 2016). La presencia de bacterias acéticas se da en un ambiente aerobio y un rango de pH entre 7 a 4.5 (Guevara, 2017; Teneda, 2016). Las bacterias acéticas que se han aislado en la fermentación del cacao, son: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*. La primera *Gluconobacter oxydans* es la primera en aparecer, luego se encuentra *A. syzygii* y *A. pasteurianus*, y al final de la fermentación se presenta *A. tropicalis* (Guevara, 2017; Teneda, 2016).

Entre las 48 a 60 h, se presenta la cuarta fase de la fermentación, donde hay presencia de bacterias del género *Bacillus* debido al incremento de la temperatura. Al remover la masa fermentativa permite la presencia de *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* también se presentan pequeños grupos de *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*. Estos microorganismos son encargados de producir una variedad de enzimas catalizadoras de reacciones (Teneda, 2016, pp.46-49). Se ha demostrado que el cacao criollo no debe exceder de 96 h de fermentación mientras que el cacao forastero y trinitario la fermentación se puede realizar hasta 192 h (Teneda, 2016, p.51). Además fermentar por periodos prolongados puede provocar sabores y olores indeseables en el cacao (Del Aguila, 2017; Otárola, 2018).

2.2.3.3. *Levaduras*

Las levaduras son hongos que producen enzimas, que se encuentran distribuidas en la naturaleza, y que producen cambios bioquímicos (Cardenas, 2017, p.17). Generalmente las levaduras cubren los frutos y las hojas de las plantas. Estas levaduras se reproducen por gemación multicelular o gemación polar, donde parte del protoplasma sobresale de la pared de la célula de la levadura y forma una protuberancia que aumenta de tamaño y posteriormente se desprende como célula de levadura (Otárola, 2018, p.60). La forma de la levadura puede variar desde ovoide, esférica piriforme, cilíndrica, triangular, alargada hasta en forma de un limón. Llegan a medir 1-10 μm de ancho por 2-3 μm de longitud (Teneda, 2016, p.54).

Durante la fermentación las levaduras transforman los azúcares sencillos presentes en el mucílago en etanol, degradando la pectina, alterando la estructura de las almendras y eliminando el ácido cítrico, por lo que disminuye el contenido de acidez. Las levaduras consumen el oxígeno, proporcionando un ambiente anaerobio donde se desarrollan las bacterias lácticas (Guevara, 2017, pp.21-25).

a) *Saccharomyces cerevisiae*

Muchas industrias alimenticias, emplean la especie de *S. cerevisiae*, para la fermentación alcohólica y formación de los compuestos aromáticos en la fabricación de pan, cerveza, vinos, alcohol, glicerol, invertasa, biomas (Cardenas, 2017; Otárola, 2018). Según Otárola (2018), las levaduras juegan un rol fundamental durante la fermentación del cacao, mejorando las características sensoriales del chocolate y sus productos. La presencia de microorganismos varia durante la fermentación de cacao varía en función de la finca productora, estos desarrollan distintos sabores e intervienen en la calidad del producto. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* interviene durante la fermentación del cacao, al incrementar su población se podría mejorar la absorción del cadmio, debido a la capacidad de biosorción de estos microorganismos, capaces de secuestrar y/o intercambiar iones metálicos (Falcon, 2019, pp.31-33). La utilización de cepas híbridas durante la fermentación mejora la calidad de las almendras de cacao (Otárola, 2018, p.62).

2.2.3.4. *Glucólisis*

El proceso de fermentación se da inicio con la transformación del azúcar de la pulpa de las almendras de cacao en alcohol y dióxido de carbono; tanto el pH como la temperatura se elevan. Según Teneda (2016, p.46), la glucólisis es la ruta metabólica de los carbohidratos y ocurre en el

citosol de las células, la glucólisis consiste en la degradación de glucosa, glucosa - 6- fosfato o fructosa para producir dos moléculas de piruvato, con la producción de dos moléculas de ATP (Otárola, 2018, pp.44-49).

La glucólisis es el metabolismo anaerobio de la glucosa, este proceso representa una fuente de energía para rápida para llevar a cabo las reacciones que convierte la molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, todo este proceso no requiere de oxígeno. El piruvato, origen de la glucólisis, puede convertirse en lactato a través de la fermentación láctica o en el etanol mediante fermentación alcohólica (Otárola, 2018; Teneda, 2016).

En la glucolisis se producen reacciones en dos fases, en la primera fase se transforma la glucosa en dos moléculas de tres carbonos. Durante la segunda fase se oxidan las moléculas de carbono transformándose en dos moléculas de ácido pirúvico, ATP y NADH + H⁺.

Durante la glucólisis participan 12 enzimas, diez para degradar la glucosa a piruvato, que se dividen en tres etapas: primero formación de la fructosa, 1,6- bisfosfato a partir de glucosa, segundo, formación de triosas fosfato (gliceraldehido 3-fosfato y dihidrixiacetona fosfato) a partir de fructosa 1,6-bisfosfato y tercero formación de piruvato a partir de gliceraldehido 3-fosfato (Otárola, 2018, pp.44-49). Las dos enzimas adicionales convierten el piruvato en productos de fermentación final. Estas dos últimas enzimas son esenciales durante la vía fermentativa de la levadura, específicamente piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa, que presentan requisitos de cofactor de iones metálicos magnesio y zinc. Por ende, la biodisponibilidad de los iones metálicos en los medios de fermentación puede afectar la eficiencia de la conversión de azúcar a etanol y proceso de la fermentación (Luna, 2018; Otárola, 2018).

2.2.4. Enzimas

Las enzimas son biomoléculas de origen proteico, formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, capaces de acelerar la velocidad de reacción hasta conseguir un equilibrio. Estas enzimas constituyen el tipo de proteínas más abundante y especializado que actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los sistemas biológicos, un gran número de enzimas se organizan en secuencias (Benjamin, 2011, pp.75-76).

Dentro de la célula las enzimas tienen funciones vitales como: degradar los azúcares, sintetizar las grasas y aminoácidos, replicar la información genética, participar en el reconocimiento y transmisión de señales del exterior, además se encargan de degradar subproductos tóxicos para la célula. Las enzimas funcionan en el interior de las células y también es posible extraerlas de los

organismos y utilizarlas de otras formas y en diferentes contextos (Ramírez y Ayala, 2014, pp.10-11).

Las enzimas son grandes moléculas y al igual que otros catalizadores, sólo necesitan estar presentes en pequeñas cantidades para ser efectivas. Las enzimas actúan disminuyendo las energías de activación de sustratos específicos. Realizan esta acción combinándose con el sustrato para formar un complejo enzima-sustrato (ES) que es menos estable que el sustrato sólo. Así se supera la resistencia a la reacción (Narro *et al.*, 2003, pp.19-20).

En las plantas las enzimas se encuentran entre las paredes celulares y dentro de las células tienen contacto con las sustancias fenólicas y los aminoácidos, dando inicio a las reacciones químicas (hidrolíticas) como los cambios de color en los pigmentos, que es indicador del gusto a chocolate (Santa, 2019, p.12). Muchos de los alimentos contienen gran cantidad de enzimas activas, que en la actualidad son de interés para la industria alimenticia. Estas enzimas son utilizadas como biocatalizadores para obtener productos de valor añadido (Orenes, 2006, p.25).

2.2.4.1. Enzima polifenol oxidasa

La polifenol oxidasa también conocida como fenolasa, catecol oxidasa, tirosinasa, monofenol oxidasa cresolada, *o*-difenoloxidasa, cataliza la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles, consecutivamente oxidados a ortoquinonas, que se polimerizan originando pigmentos de color marrón, rojo o negro, dependiendo de los componentes naturales presentes en los tejidos vegetales, alterando las características organolépticas y nutricionales del alimento, disminuyendo la calidad. Sin embargo estas reacciones pueden ser aprovechadas para modificar las características de otros alimentos (Guevara, 2017; Morante *et al.*, 2018). Guerrero (2009, p.28), manifiesta que se obtiene la máxima actividad de la enzima PPO cuando el pH se encuentra entre 6 y 7 a 30 °C.

La enzima PPO se encuentra ampliamente distribuida en algas, briofitos, pteridofitos, gimnospermas y angiospermas. El contenido de PPO varía según la especie, el cultivo, estado de maduración y estadio fenológico. En la industria de los alimentos la enzima PPO es de alto interés ya que influye en diversas respuestas biológicas (Jiménez y Zambrano, 2011). La enzimas PPO favorece el rompimiento de glicoproteínas, formación de péptidos y azúcares, lo que permite un mayor tiempo de acción de las levaduras (Díaz *et al.*, 2012, p.1). La PPO puede catalizar reacciones de oxidación de compuestos polifenólicos con presencia del oxígeno molecular y la presencia de los compuestos polifenólicos oxidados por la enzima, estos son responsables de las

reacciones de pardeamiento enzimático, durante la post recolección, manipulación y procesamiento de frutas y vegetales (Guerrero, 2009; Guevara, 2017; Morante *et al.*, 2018).

Falcon (2019, p.72), afirma que, durante el proceso de fermentación de las almendras de cacao, la enzima polifenol oxidasa degrada una serie de compuestos orgánicos en el interior de los cotiledones, provocando un drenaje de líquidos hacia el exterior, en lo que probablemente estén acarreado micro y macroelementos, entre ellos el cadmio. Durante el proceso de secado la enzima PPO continua actuando debido al incremento del pH y elevada captación de oxígeno, se producen las condiciones óptimas para la oxidación de los fenoles (Falcon, 2019, p.23). La utilización de PPO durante la fermentación del cacao favorece el perfil sensorial en cuanto a sabor a floral, frutal y nuez (Otárola, 2018, p.18).

Por otra parte cuando se realiza un secado violento, no se consigue un secado homogéneo debido a la interrupción de la hidrólisis enzimática de las antocianinas y como consecuencia se producen almendras de color púrpura de sabor astringente, además la testa se endurece rápidamente e impide la difusión de los ácidos volátiles que se aglomeran en la almendra generando almendras ácidas (Zambrano *et al.*, 2011, p.390).

2.2.5. Secado

El secado natural y artificial permite reducir la humedad hasta un 6-7 % y conservar las almendras de cacao. Durante el secado el pH del cotiledón incrementa debido a la eliminación del ácido acético y demás ácidos volátiles que se encuentran en la testa y de la aceleración de las reacciones de oxidación por incremento del contenido de oxígeno en el tejido de las almendras. Durante esta fase las oxidaciones no enzimáticas de los polifenoles contribuye a reducción de la astringencia y sabor amargo de los chocolates (Falcon, 2019; Gaibor y Pachacama, 2017).

2.2.6. El cadmio

El cadmio es un elemento químico divalente en todos sus compuestos estables y su ion es incoloro, su número atómico es 48. Es un metal pesado debido a su alta densidad (112.40 g.ml^{-1}) (Revoredo, 2018) . El cadmio es dúctil y de color blanco con una ligera tonalidad azulada. El punto de fusión y ebullición del cadmio es de $320.9 \text{ }^\circ\text{C}$ $765 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente (Roquise, 2013, p.21).

Según Roquise (2013, pp.21-22), el cadmio es considerado uno de más mayores agentes tóxicos que existe en la naturaleza, capaz de contaminar plantas, animales y seres humanos (Huamaní y

Huauya, 2018, p.21). El cadmio se asocia a la contaminación ambiental e industrial y presenta estas cuatro características:

- a) Efectos adversos al hombre y al medio ambiente
- b) Bioacumulación
- c) Persistencia en el medio ambiente
- d) Se transporta grandes distancias con el viento y a través de los cursos de agua.

El cadmio se encuentra distribuido en la naturaleza. La movilidad del cadmio en el medio depende de factores como el pH, el potencial redox, la cantidad de materia orgánica, cantidad de arcilla y óxidos de hierro. El cadmio que se encuentra en el medio procede principalmente de actividades industriales, metalurgia, minería, fabricación y aplicación de fertilizantes de fosfato y la quema de residuos urbanos (Gara, 2016, pp.7-9).

2.2.6.1. Toxicidad del cadmio para los seres humanos

El cadmio es uno de los metales pesados más tóxico para la salud del ser humano (Acuña *et al.*, 2017, p.173). La absorción de cadmio en los seres humanos varía entre el 3 al 5 %, según el tiempo y modo de exposición pueden manifestarse infecciones, intoxicaciones, enfermedades graves (Martínez *et al.*, 2013, p.34). El cadmio se incorpora a la cadena alimenticia, luego pasa al organismo a través de los alimentos e ingresa por la sangre hacia los tejidos y órganos, este es capaz de alterar el metabolismo humano y acumularse en los riñones y el hígado. Investigaciones realizadas han demostrado que alrededor del 80 % de la ingesta del metal proviene del consumo de alimentos. La absorción de cadmio es mayor cuando la población presenta bajo contenido de calcio, proteínas o déficit de hierro (Martínez *et al.*, 2013; Piedraita *et al.*, 2018).

El cadmio puede permanecer en el organismo entre 10 y 30 años, su excreción es lenta y se acumula en los tejidos durante el envejecimiento (Pérez y Azcona, 2012, p.203). El ser humano puede contaminarse con cadmio a través del agua, aire, suelos, alimentos y el tabaco. Consumir alimentos con elevado contenido de cadmio provoca deficiencia renal por el daño de los túbulos.

También puede producir graves infecciones estomacales, e incluso llegar a ocasionar la muerte. Respirar grandes cantidades de aerosoles de óxido de cadmio puede provocar neumonitis aguda y edemas pulmonares. Además pueden presentarse otras afecciones como fiebre de humos metálicos, alteraciones neurológicas, hipertensión, bronquitis, nefrotoxicidad, infertilidad, anemia, necrosis testicular, pérdida de la densidad ósea y fracturas, hipertensión arterial, dolor de articulaciones, osteomalacia u osteoporosis (Gara, 2016; Jiménez, 2015; Piedraita *et al.*, 2018).

2.2.6.2. Cadmio en el suelo y almendras de cacao

El cadmio es un contaminante de difícil solución una vez que ingresa a los suelos agrícolas y a la cadena alimenticia permanece por largos periodos, por lo que se considera uno de los elementos más tóxicos. El cadmio es un metal no esencial para las plantas, se produce de forma natural en la corteza terrestre y en el agua del océano, además se genera en el medio ambiente por las actividades naturales y antropogénicas (Falcon, 2019; Rodriguez, 2018). El cadmio en el suelo se encuentra menor a 1 ppm, las rocas, suelos, minerales del carbón, fertilizantes químicos, minerales y abonos orgánicos presentan trazas de cadmio.

Investigaciones realizadas han demostrado que el cadmio puede permanecer alrededor de 300 años en los suelos, de lo que el 90 % no se transforma. El cadmio se integra a los terrenos agrícolas por deposición aérea el 41 %, fertilizantes y pesticidas 54 % y a través del abono como el estiércol en un 5 % (Pérez y Azcona, 2012, p.200).

La bioacumulación de metales pesados en las plantas depende de la especie vegetal, capacidad de retención interacción suelo-planta y el origen del contaminante (Correa, 2018, p.9). En las plantas de *Theobroma cacao* L. el cadmio es absorbido, translocado y acumulado en los tejidos vegetales por presentar un comportamiento electroquímico similar a los nutrientes esenciales (Correa, 2018, p.9-10). Actualmente se conoce que el cadmio en las plantas de cacao se encuentra en forma variable en raíces, brotes, hojas y frutos (Arévalo *et al.*, 2016, p.82).

Las plantas son capaces de producir exudados radiculares que permiten tolerar la presencia de metales pesados, influyendo en los factores de solubilidad de los elementos de la solución del suelo mediante la acidificación, quelación, precipitación y procesos redox. Otro mecanismo de tolerancia son las fitoquelatinas que se activan en presencia del cadmio. En cambio, otros exudados (compuestos orgánicos) de la raíz favorecen la disponibilidad de metales pesados porque forman una capa conocida como mucílago. Los metales pesados pueden almacenarse en la raíz y transportarse mediante el xilema a los brotes (Correa, 2018; Gonzalez, 2017).

Según Llatance *et al.* (2018, p.68), la planta de *Theobroma cacao* presentó mayor acumulación de cadmio en relación a otras cinco especies tolerantes al cadmio. El mismo autor, encontró que el contenido de cadmio en la planta de cacao de mayor a menor en la siguiente escala fruto > raíz > tallo > hoja. Investigaciones realizadas en Ecuador han demostrado que el cadmio se encuentra de forma heterogénea en el fruto de cacao. Lara (2017, p.6), también identificó que el mayor contenido de cadmio se acumula en el jugo y mucílago y atraviesa la testa e ingresa directo a las almendras de cacao. El *Theobroma cacao* no debe ser utilizada como fitorremediador en suelos

contaminados con cadmio debido a la utilización del fruto en la industria alimenticia (Llatance *et al.* 2018, p.68).

2.2.7. Mecanismos de acción en la movilización y remediación de cadmio

2.2.7.1. Uso de microorganismos

Según Falcon (2019, pp.31-33), las levaduras especialmente las del grupo *Saccharomyces cerevisiae* han sido catalogadas como biosorbentes eficaces de diversos elementos metálicos. Estos microorganismos acumulan los metales como resultado del transporte activo, para actividades metabólicas. También, acumulan metales como transporte pasivo y retención de especies químicas por los constituyentes presentes en la pared celular.

Los microorganismos son capaces de absorber el cadmio en sus paredes celulares gracias a compuestos orgánicos como los polialginatos, péptidoglucanos, polisacáridos, glicoproteínas, flavonoides, otros. La biosorción de las levaduras se debe a la cantidad de compuestos orgánicos son capaces de secuestrar o intercambiar iones metálicos. Es así que, en los compuestos orgánicos los centros atrayentes de cationes son los grupos funcionales amino, hidroxilo, carboxilato, fosfato y sulfhidrilos, conocidos por su potencial nucleófilo. De modo que, la absorción sobre la superficie celular externa es un mecanismo de defensa de la biomasa ante los metales pesados tóxicos, los microorganismos producen una capa polimérica externa que permite el ingreso del metal a través de la pared celular, en el cual los iones son removidos por la solución a través del proceso de precipitación como sales (Falcon, 2019, pp.31-33).

2.2.7.2. Quelantes

Los quelantes son compuestos producidos por la reacción de un ion metálico como el ion central, con dos o más grupos funcionales del mismo ligando. Los ligantes quelantes son las quelonas capaces de formar iones hidrosolubles y complejos del tipo 1:1, con iones metálicos. Se conoce como efecto quelato a la capacidad de los ligandos multidentados para formar complejos metálicos estables, propiciando un efecto entrópico a la formación (Cedeño, 2020; Correa, 2018).

La quelación es la capacidad que tiene una molécula para formar un complejo con un metal y crear un nuevo compuesto con distintas propiedades químicas del original (Cedeño, 2020, p.13), es decir, es un proceso homeostático, donde intervienen dos tipos de moléculas.

Los quelantes intracelulares forman complejos con un ligando existente que puede ser ácidos orgánicos, proteínas de estrés térmico, aminoácidos, metalotioneínas y fitoquelatinas, los que desintoxican y mantienen estable la concentración de iones en la matriz citoplasmática (*Casa et al.*, 2008; Cedeño, 2020; Correa, 2018).

2.2.7.3. Metalotioneínas

Son proteínas de bajo peso molecular a partir de aminoácidos aromáticos presentes en todos los organismos vivos, constituyen una gran familia de proteínas intracelulares capaces de unir metales de transición y metales pesados. Las metalotioneínas en su estructura contienen largas fracciones de residuos de cisteína y muestran alto contenido metálico (Cedeño, 2020; Scott, 2007).

Entre las funciones de las metalotioneínas está la desintoxicación de los metales pesados y xenobióticos, la regulación homeostática de los metales esenciales y funciones antioxidantes celulares. Es así que se ha propuesto que las metalotioneínas participan en la absorción, transporte y extracción de metales (Scott, 2007, pp.68-69) . Navarro *et al.* (2007, p.18) sostiene que las metalotioneínas son proteínas de transporte, responsables de la quelación de metales pesados en el citoplasma de mamíferos y bacterias. Por otra parte el mismo autor piensa que estas proteínas no son decisivas durante la quelación de metales pesados en las plantas.

2.2.7.4. Fitoquelatinas

Las fitoquelatinas son péptidos de bajo peso molecular, sintetizados enzimáticamente que participan en la homeostasis y detoxificación de metales pesados. Estas fitoquelatinas están constituidos por tres aminoácidos: cisteína, glicina y ácido glutámico (Cedeño, 2020; Navarro *et al.*, 2007). Las fitoquelatinas son ligandos de gran afinidad que complejan metales pesados. La disminución de las fitoquelatinas ocasiona mayor sensibilidad a metales pesados (Navarro *et al.*, 2007, p.19). Las fitoquelatinas provienen del glutión y se polimerizan formando péptidos capaces de secuestrar metales pesados en muchas plantas y microorganismos (Cedeño, 2020, p.14).

2.2.7.5. Medios ácidos

El cadmio puede ser susceptible a disolverse de sus matrices mediante la adición de ácidos orgánicos o inorgánicos. Durante los procesos químicos en los suelos a nivel de la rizósfera, las raíces de las plantas producen ciertos ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido

cítrico, acético, fórmico y láctico. Sin embargo, el pH es fundamental en operaciones de extracción, precipitación, encapsulación o recuperación de metales (Cedeño *et al.*, 2019; Cedeño, 2020). Por lo que los medios ácidos se consideran una iniciativa para aplicar en procesos de cosecha e industrialización del cacao con resultados positivos para remover cadmio.

2.2.7.6. Ecurrido del mucílago

El mucílago del cacao es una sustancia viscosa, orgánica de origen vegetal, de bajo elevado peso molecular. El mucílago está constituido por polisacáridos con la misma cantidad de azúcares que las gomas y pectinas. Las almendras de cacao están cubiertas por una pulpa aromática que procede de tegumentos. Las almendras de cacao están constituidas por células de savia ricas en azúcares (10-13 %), pentosas (2-3 %), ácido cítrico (1-2 %) y sales (8-10 %). Durante la fermentación la pulpa es removida en hidrolizada por acción de los microorganismos (Falcon, 2019, pp.30-31).

Investigaciones realizadas demuestran que estrategias sencillas como el lavado de la pulpa de las almendras de cacao antes de realizar la fermentación, puede eliminar cantidades significativas de contaminantes sin llegar afectar la calidad del producto (Cedeño *et al.*, 2019; Cedeño, 2020; Falcon, 2019; FAO-OMS, 2019; Mite *et al.*, 2010).

2.2.8. Normas y regulaciones internacionales de cadmio en cacao

Los estudios previos han establecido que el cacao proveniente de países productores de Sudamérica con excepción de Brasil contiene más cadmio, siendo superior a los límites permitidos. Mientras que el cacao proveniente de África y Asia (Costa de Marfil, Ghana y Malasia) contiene menos cadmio. Para el contenido máximo permisible de cadmio en almendras y productos base de cacao existen normas y regulaciones que pueden variar según el país (Del Aguila, 2017; Jiménez, 2015). El Reglamento de la Comisión (UE) N° 488/2014 del 12 de mayo del 2014 definió algunos aspectos:

Los niveles de cadmio en el suelo pueden ser naturalmente altos en varias zonas de los diferentes países productores de cacao, datos que deben ser tomados en cuenta al establecer los niveles máximos de cadmio.

Para los productos que contienen diferentes niveles de cadmio se debe tomar en cuenta la relación de los niveles de cadmio en los productos de cacao se relacionan con su contenido. Asegurando que los niveles máximos para chocolates pueden ser cumplidos a mayor porcentaje de cacao (Del

Aguila, 2017, pp.18-19). A partir del 1 de enero del 2019 la UE puso en vigencia los siguientes límites de cadmio para cacao y chocolate.

Tabla 1-2: Niveles máximos de cadmio en la UE en cacao y productos de chocolate del Reglamento de la Comisión Europea 488/2014 del 12 de mayo de 2014.

Producto	Nivel máximo (mg.kg⁻¹)
Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao \leq 30%	0.10
Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao \leq 50%; chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao \geq 30%	0.30
Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao \geq 50%	0.80
Cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (chocolate para beber)	0.60

Fuente: Comisión Europea (2014).

Del Aguila (2017, p.18), indica que el contenido máximo admisible de cadmio en almendras de cacao según la UE es de 0.50 ppm. La Norma Nacional de Indonesia establece los siguientes límites máximos para cadmio: masa de cacao 1 ppm, manteca de cacao 0.50 ppm, torta prensada de cacao 0.50 ppm y productos de chocolate 0.50 ppm (Meter *et al.*, 2019, p. 1-2). La Norma 1.4.1. del Código de Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelanda sobre contaminantes y tóxicos de origen natural han definido un nivel máximo de cadmio de 0.50 mg.kg⁻¹ para productos de chocolate y cacao. El mismo umbral también fue establecido por la Federación Rusa (SanPin 2.3.2-1078-01) pero para todo el chocolate, productos de chocolate, granos de cacao y demás productos (Jiménez, 2015; Meter *et al.*, 2019).

En Estados Unidos, el estado de California determino niveles máximos para cadmio en productos de chocolate según el acuerdo Industrial 65 (19/02/2018). Los productos que superen los límites deberá venderse con una advertencia en la etiqueta del producto (Meter *et al.*, 2019, p.1). En Argentina el código alimentario argentino, en el capítulo III (Administración Nacional de Alimentos, 2012, 9) establece límites para cadmio; para chocolates y productos a base de cacao con menos de 40 % de cacao es de 0.20 mg.kg⁻¹; chocolates y productos a base de cacao con más de 40 % de cacao es de 0.30 mg.kg⁻¹ (Jiménez, 2015, pp.95-100).

Mientras que en Korea del Sur en el artículo 5 del The South Korea Food Code, numeral 3, establece para Cocoa Products or Chocolates (Code of Federal Regulations, 2011, 7), máximo 2 mg.kg⁻¹ de cadmio solo en polvo de cacao (Jiménez, 2015, pp.95-100). En Uruguay según el Reglamento bromatológico expedido por el Ministerio de Salud Pública de Uruguay establece

0.20 mg.kg⁻¹ de cadmio para productos de chocolate, sucedáneos y demás derivados (Jiménez, 2015, pp.95-100).

2.2.9. Calidad del cacao

La calidad del cacao depende de varios factores como la genética, la post-cosecha, tipo de suelo y época del año. La calidad del cacao implica cumplir ciertos criterios establecidos como la trazabilidad, perfil fisicoquímico, sensorial y microbiológico establecido en las normas de calidad del producto.

2.2.9.1. Potencial de hidrógeno (pH)

Durante el crecimiento de las levaduras el pH óptimo se encuentra entre 4,5 a 6,5 aunque en ocasiones algunas especies soportan grandes variaciones de pH 2.8 - 3.0 a 2.0 - 8.5 (Guerra, 2019, p.23). Mientras ocurre la fermentación el ácido acético disminuye el pH del cotiledón y ocasiona la ruptura de las membranas celulares permitiendo el contacto entre proteínas, polifenoles, triglicéridos, carbohidratos y enzimas endógenas (Romero, 2012, p.907). En la fermentación se debe proporcionar una adecuada aireación para mantener el pH equilibrado. Si la aireación es insuficiente impedirá la propagación de las levaduras y bacterias acéticas. Por el contrario si la aireación es excesiva permitirá el crecimiento de mohos e impedirá la formación del precursor del sabor (Quillatupa y Marisol, 2011, p.10).

2.2.9.2. Prueba de corte

La prueba de corte es subjetiva se basa en la observación visual de las superficies cortadas de una muestra de almendras y una evaluación de los granos defectuosos. Su aplicación debe ser como máximo 30 días posteriores al secado, para aislar el efecto de oxidación que continua durante el almacenamiento. La oxidación en los tejidos en los cotiledones, provoca que los colores varíen naturalmente pasando a un color marrón que es indicativo de una correcta fermentación sin alterar el sabor y aroma de las almendras (Sinche, 2011, pp.16-17) .

La prueba de corte permite determinar el grado de fermentación de las almendras de cacao mediante el siguiente procedimiento: realizar un corte longitudinal por la parte central de cada una de las 300 almendras, con la finalidad de exponer la máxima superficie de corte de los cotiledones. Inspeccionar visualmente las dos mitades de cada almendra a la luz diurna o con iluminación artificial. Deberá contarse por separado los granos que presenten defectos (Falcon, 2019; Otárola, 2018).

El porcentaje de los demás defectos de las almendras se determinarán teniendo la base de 100 almendras de la muestra, según la NT P-ISO-1114:2006, granos de cacao: prueba de corte (CAOBISCO/AEC/FCC, 2015; Falcon, 2019).

2.2.9.3. Composición química de las almendras de cacao

La composición química de las almendras de cacao varía según la variedad, ubicación geográfica, grado de madurez, fermentación y secado. Las almendras contienen agua, lípidos, compuestos polifenólicos, proteínas, purinas, teobromina, cafeína, carbohidratos y materia inorgánica (Jovellanos, 2016; Rivera, 2017).

2.2.10. Calidad organoléptica del licor de cacao

La calidad organoléptica constituye un punto importante para la exportación de las almendras de cacao. Para la industria chocolatera es un requisito fundamental durante la elaboración de chocolates finos. Las almendras de cacao de primera calidad deben adquirir el aroma y sabor característico, que solo se consigue con una buena fermentación, secado y tostado (Palacios, 2008; Solórzano *et al.*, 2015).

La sobre fermentación incrementa el contenido de ácido acético y láctico, ocasionando un aroma desagradable en las almendras de cacao.

a. Sabores básicos de las almendras de cacao

- Acidez se identifica como un sabor ácido, debido a la presencia de ácidos volátiles y no volátiles, se la percibe al centro de la lengua y hacia los lados, se asocia a las frutas cítricas y vinagre.
- El amargor, consiste en un fuerte sabor que se presenta por la falta de fermentación. Se identifica en la parte posterior del paladar y se lo asocia al café, cerveza y toronja.
- Astringencia, es una sensación que provoca una contracción en las mucosas de la boca, proporcionando una sensación seca y áspera. Se produce por la falta de fermentación, se percibe en toda la boca, lengua y garganta.
- Dulce, aquel sabor agradable que se lo percibe en la punta de la lengua.
- Salado, se lo identifica a los extremos de la lengua y provoca salivación.

En cuanto a la presencia de aromas básicos en el licor de cacao, inciden dos factores, la época de cosecha, sobre todo durante el invierno. Segundo la ausencia de fermentación representa (Bermúdez y Mendoza, 2016; Palacios, 2016; Solórzano *et al.*, 2015).

b. Sabores específicos de las almendras de cacao

- Cacao, describe el sabor típico de almendras de cacao bien fermentadas, secas y tostadas. Presenta un típico sabor típico a chocolate, cacao fermentado.
- Floral, se caracteriza por su sabor y aroma agradable a cítricos y flores de jardín con tonos perfumados.
- Frutal, son aquellos licores de cacao con sabor a fruta madura y notas dulzainas agradables. Se presenta un muy agradable.
- Nuez, se presenta un sabor similar a nuez, almendras o maní, propio de los cacaos criollos y trinitarios.

Las épocas y el porcentaje de fermentación de las almendras de cacao favorecen la presencia de aromas (Bermúdez y Mendoza, 2016; Palacios, 2016; Solórzano *et al.*, 2015; Quevedo *et al.*, 2018).

2.2.10.1. *Evaluación sensorial del licor de cacao*

Mediante la evaluación sensorial del licor de cacao puede verificarse el grado de fermentación y la calidad organoléptica del producto. Otárola (2018, pp.70-71), menciona que para exportación del producto debe verificarse dos factores importantes, el sabor y aroma, aspectos como el amargor y la astringencia son fundamentales en la industria chocolatera. Las almendras debidamente fermentadas y secas indican un producto de primera calidad. Solórzano *et al.* (2015, p.38), expresa que la acidez, amargor y astringencia son sabores básicos de la pasta de cacao fino de aroma. La evaluación sensorial es un método que utiliza un determinado grupo de panelistas entrenados o semi-entrenados para medir, analizar y evaluar las características (sabor, aroma, color, textura y apariencia) de la pasta de cacao. Mediante la cata, el degustador evalúa sensorialmente, a través de los sentidos de la vista, olfato, gusto y tacto (Palacios, 2008; Sinche, 2011; Diaz *et al.*, 2012).

2.3. **Marco conceptual**

Ácido acético.- El ácido acético se produce por acción de las bacterias acéticas, en la superficie del cacao se origina la fermentación aeróbica y transforma el alcohol en ácido acético. La temperatura para la formación de ácido acético oscila entre los 28 y 30 °C y el pH de 4.5. Durante esta etapa de la fermentación el embrión de las almendras muere (Otárola, 2018; Rivera, 2017; Teneda, 2016).

Ácido láctico.- Se origina a partir de las bacterias lácticas, encargadas de fermentar los carbohidratos, y formar ácido láctico, alcohol y dióxido de carbono, estos no desarrollan olores propios pero participan en la formación de compuestos volátiles y contribuyen a modificar el sabor de los alimentos (Guevara, 2017; Rivera, 2017).

Almendras de cacao.- Representa el sabor característico de los granos bien fermentados y tostados (CAOBISCO/AEC/FCC, 2015). Las almendras se encuentran dentro del fruto, son aplanadas u ovaladas de 2 a 4 cm de tamaño, ligeramente comprimidas y de color violeta. El tamaño, forma y número de semillas dependerá de la variedad de cacao. Están adheridas al magüey y formando hileras dentro del fruto. La testa es gruesa, el embrión se forma de dos cotiledones. Las almendras contienen grasas teobrominas, cafeína, proteínas, fibras agua y otras sustancias (Gaibor y Pachacama, 2017; Torres, 2012).

Aroma.- Hace referencia a la identificación de los compuestos volátiles que se desprenden durante el proceso de masticación y se difunden en la mucosa del paladar y la faringe. Es un importante atributo sensorial para el consumidor y es evaluado por un grupo de catadores entrenados. El aroma de las frutas se caracteriza por ser de bajo peso molecular, ligeramente hidrosoluble y volátil a temperatura ambiente. En el cacao el aroma se forma durante la fermentación gracias a la acción de las levaduras y bacterias que intervienen durante este proceso (De León *et al.*, 2006; Diaz *et al.*, 2012).

Bacterias.- Las bacterias son microorganismos unicelulares, pertenecen al reino procariota, se reproducen por fisión binaria y la mayoría son de vida libre. Las bacterias llegan a medir entre 0.5 y 3 μm . Fueron los primeros microorganismos que colonizaron la tierra por su gran capacidad de utilizar varias fuentes de energía (Guevara, 2017; Montaña *et al.*, 2010; Teneda, 2016).

Cadmio.- El cadmio es un metal pesado tóxico para las plantas, animales y seres humanos. Se lo ha considerado como contaminante el contaminante más peligroso para la industria alimentaria. Este metal se incorpora con facilidad al ambiente y transportado a través del aire y el agua llegando a la cadena alimenticia, ha legado a causar intoxicaciones masivas y en ocasiones la muerte (Echeverry y Reyes, 2016; Rodriguez, 2018).

Calidad.- Son las características de un producto o servicio que debe cumplir las necesidades y expectativas del consumidor y cumplir las especificaciones técnicas. La calidad induce a la mejora continua (Camisón y Cruz, 2006).

Enzimas.- Son moléculas origen proteico encargadas de catalizar reacciones químicas específicas en los seres vivos y llegar a un equilibrio. Son esenciales para los procesos del metabolismo celular. Están conformadas por una o varias cadenas polipeptídicas plegadas, permite la formación de un sustrato y da lugar a la reacción. Esta zona se la conoce como centro activo y en ella solo se encuentran unos pocos aminoácidos (Benjamin, 2011; Guevara, 2017).

Fermentación.- Es el proceso en que ocurren cambios fisicoquímicos del cacao, potencializa el sabor y aroma a chocolate. En el interior de la almendra cambia la pigmentación de violeta a marrón claro; cambia el sabor astringente de los cotiledones; transformación de los azúcares en alcoholes por acción de las levaduras y bacterias (Falcon, 2019; Pallares *et al.*, 2016; Sinche, 2011).

Levaduras.- Son microorganismos unicelulares, de forma esférica, ovoide, piriforme, cilíndrica, triangular e incluso alargada, llegan a medir entre 1-1 μm de ancho por 2-3 μm de longitud. Crecen en temperaturas entre 24 y 50 °C. La mayoría de las levaduras prefieren medios ligeramente ácidos con un pH entre 4.5 a 6.5. Para su nutrición requieren altas concentraciones de azúcares, minerales y sustancias nitrogenadas. Las levaduras se encuentran en el suelo, plantas y animales e incluso en el tracto digestivo de algunos animales (Teneda, 2016, p.54).

Microorganismo.- Son los seres más diversos, versátiles numerosos y primitivos, se encuentran presente en el suelo, agua y aire, son vitales en todos los ecosistemas, se interrelación constantemente con las plantas, animales y el hombre. Los microorganismos son esenciales para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida. También participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos (Montaño *et al.*, 2010, p.17).

Theobroma cacao.- Es un árbol que crece en forma silvestre en regiones húmedas tropicales de América del Sur y América Central, con temperaturas promedio de 26 °C, crece hasta los 1000 msnm. Pertenece a la familia de las Malvaceae, es un árbol perenne que llega a medir entre 5 y 8 metros de altura. Esta planta se clasifica grupos morfogeográficos: criollo, forastero y trinitario, estos presentan variaciones en el color, dimensión, fruto, flor y semillas (Rosero, 2017; Zambrano, 2018).

Toxicidad.- Es la capacidad de una sustancia para provocar daño en un organismo vivo, en función de la dosis y vía de administración, distribución de la dosis, naturaleza del organismos afectado, tipo y severidad del daño (Echeverry y Reyes, 2016; Sanz y Repetto, 1993).

Polifenol oxidasa.- La enzima polifenol oxidasa está presente en las frutas, es una enzima oxidativa de interés industrial capaz de influir en diversas respuestas biológicas. Las polifenol oxidasas y los polifenoles de los alimentos reaccionan en presencia del oxígeno y producen en pardeamiento enzimático durante el almacenamiento, manipulación y procesamiento (Guevara, 2017; Jiménez y Zambrano, 2011).

Polifenoles.- En las almendras de cacao los polifenoles se encuentran en la cascara y el cotiledón, representan entre el 10 y 12 % del peso de almendra. Los polifenoles se encargan de las modificaciones químicas al interior del cotiledón, son asociados con la actividad antioxidante y con las características sensoriales (sabor, astringencia y dureza) del producto final del cacao. Los polifenoles presentan una variedad de beneficios a la salud debido a la fermentación microbiana en el cacao y la capacidad de modular eventos oxidativos relacionados con la presencia de enfermedades cardíacas y cerebrocelulares (Del Aguila, 2017; Guevara, 2017; Otárola, 2018).

Atributos sensoriales. Son un conjunto de características percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto y tacto (color, sabor, aroma, textura y apariencia general). Esta evaluación es confiable y permite determinar la calidad sensorial del cacao. El perfil sensorial es un requisito fundamental para la elaboración de chocolates finos y demás productos a base de cacao. Los atributos sensoriales pueden variar de acuerdo a la genética del cultivo (Quillatupa y Marisol, 2011, p.26).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo y diseño de investigación

El experimento se realizó como un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo bifactorial A×B, donde el factor A correspondió al tiempo de fermentación de las almendras de cacao (48, 96 y 120 horas); mientras que en el factor B se midió el tipo de cultivo iniciador (fermentación; fermentación + levadura madre (*Saccharomyces cerevisiae*); fermentación + levadura madre (*Saccharomyces cerevisiae*) + PPO). Se evaluó nueve tratamientos, tres de ellos correspondieron al tratamiento control, el cual se le realizó únicamente la fermentación a diferentes horas. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones en total se obtuvo 27 unidades experimentales. Para cada unidad experimental se utilizó 2 kg de almendras de cacao Nacional. Para determinar diferencias entre medias de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Tabla 2-3: Análisis de la varianza para el estudio de tiempos de fermentación y adición de levadura y enzimas en almendras de cacao Nacional.

Fuente de Variación		Grados de Libertad
Total	$a \times b \times n - 1$	26
Tratamientos	$t - 1$	8
Factor T. fermentación	$(a - 1)$	2
Factor levaduras y enzimas	$(b - 1)$	2
Interacción A×B	$(a - 1) \times (b - 1)$	4
T ₁ , T ₂ , T ₃ vs todos		1
T ₄ , T ₅ , T ₆ vs T ₇ , T ₈ , T ₉		1
Error Experimental	$a \times b \times (n - 1)$	18

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021).

3.1.1. Características del experimento

Número de tratamientos:	9
Número de repeticiones:	3
Unidades experimentales:	27

3.1.2. Modelo matemático

Las fuentes de variación para esta investigación se realizaron con el siguiente modelo de experimentación:

(Ecuación 1)

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \alpha\gamma_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} es la variable de respuesta

μ es la media general

α_i es el efecto del factor A (tiempo de fermentación)

γ_j es el efecto del factor B (adición de cultivo iniciador)

$\alpha\gamma_{ij}$ es la interacción de los factores A x B

ϵ_{ijk} es el error experimental

Tabla 3-3: Identificación y características de los tratamientos a evaluar.

N°	Código	Detalle
T1	F ₁ L ₀	Fermentación 48 h testigo 1
T2	F ₂ L ₀	Fermentación 96 h testigo 2
T3	F ₃ L ₀	Fermentación 120 h testigo 3
T4	F ₁ L ₁	Fermentación 48 h y levadura madre (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
T5	F ₂ L ₁	Fermentación 96 h y levadura madre (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
T6	F ₃ L ₁	Fermentación 120 h y levadura madre (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
T7	F ₁ L ₂ P	Fermentación 48 h + levadura madre (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) + PPO ¹
T8	F ₂ L ₂ P	Fermentación 96 h + levadura madre (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) + PPO
T9	F ₃ L ₂ P	Fermentación 120 h + levadura madre (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) + PPO

1. PPO: polifenol oxidasa

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021).

3.2. Métodos de la investigación

El nivel de investigación del proyecto, es de tipo aplicada y exploratoria, ya que describe las posibles soluciones del problema principal, a través de los diseños experimentales que consisten en la aplicación de enzimas en la absorción de cadmio presentes en las almendras de cacao Nacional. En la presente investigación se aplicó el siguiente método:

3.2.1. Método inductivo deductivo

El punto de partida de la investigación es un problema y lo que se pretende es proponer una solución, basando en una tecnología adecuada. Se consideró al método inductivo como el análisis de casos particulares, a partir de observaciones de la realidad se extraen conclusiones de carácter general; en la presente investigación se procedió a la recolección de datos, categorizando las variables observadas para probar la hipótesis, pudiendo realizar generalizaciones y elaborar teorías, de este método esta investigación es de gran importancia puesto que permitió determinar la evaluación y valoración de las almendras de cacao y proponer una técnica que permita disminuir el contenido de cadmio en las almendras durante la post cosecha.

3.2.2. Método deductivo

Se ha partido de premisas generales para llegar a conclusiones de casos particulares teniendo énfasis en la teoría, la explicación y la abstracción, se ha aplicado este método puesto que el problema general es la valoración del cadmio en las almendras de cacao.

En vista que en la presente investigación se aplicó la inducción-deducción partiendo de la observación del problema, y mediante un proceso de inducción el problema direcciona a una teoría, luego se plantea la hipótesis mediante un razonamiento deductivo; por todo ello se puede afirmar que en esta investigación se utilizara el método hipotético-deductivo el mismo que es útil para el presente estudio.

3.3. Enfoque de la investigación

Este proyecto de investigación se realizó con un enfoque cuantitativo en laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Politécnica Nacional de Chimborazo ya que se recopiló información y previamente se analizó mediante datos estadísticos, de los diferentes tratamientos y variables indicativas de las almendras de cacao Nacional. Mediante este enfoque se determinó el grado de relación entre las variables a partir de los valores numéricos.

3.4. Alcance de la Investigación

Con la presente investigación se propone una técnica que permite el manejo sustentable de las almendras de cacao durante la post cosecha, brindando una alternativa para cumplir los estándares de calidad requerido por los mercados internacionales sin exceder los límites máximos

permisibles de cadmio en almendras de cacao. El alcance de los resultados abarca a todos los productores de cacao.

3.5. Población de estudio

Se estima que en el Ecuador existen alrededor de 498,794 ha de cacao plantadas con una producción de 309,066 ton de almendras secas y un rendimiento de 0.62 ton por hectárea (Ministerio de Agricultura y Ganadería., 2018). La población para esta investigación fueron las almendras de cacao Nacional provenientes de la Finca Experimental “La Represa” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo provincia de Los Ríos. La ubicación geográfica es 1° 03´ 18” de latitud Sur y de 79° 25´ 24 “de longitud Oeste a una altura de 90 msnm.

3.6. Unidad de análisis

Para la presente investigación se tomó en cuenta las almendras de cacao Nacional de la Finca Experimental La Represa a los cuales se les aplicó el instrumento de recolección de datos y posterior transporte al laboratorio y cuantificar las muestras.

3.7. Selección de la muestra

Las almendras de cacao de la variedad Nacional, se recolectaron en estado fresco y con mucílago cuando las mazorcas alcancen la madurez fisiológica. Para el proceso de fermentación se utilizó cajones micro fermentadores de madera con las siguientes dimensiones (16*29*16)cm, donde se colocaron las almendras de cacao y se adicionó los tratamientos correspondientes de forma aleatoria (Intriago *et al.*, 2019, p.18-19). Luego las cajas se cubrieron hojas de plátano para crear un ambiente anaerobio e iniciar la fase de fermentación. La masa fermentativa se removió cada 24 horas a partir de las 48 horas para garantizar una fermentación homogénea. Posteriormente las almendras fueron secadas al aire hasta alcanzar el 7 % de humedad (Guevara, 2017, p.34-35). Durante esta fase se tomaron muestras de forma aleatoria y se realizó el método de cuarteo hasta obtener 1 Kg de muestra por cada tratamiento y fueron introducidas en fundas Ziploc, etiquetadas y enviadas al laboratorio para realizar los análisis fisicoquímicos y determinar las variables en estudio.

3.8. Tamaño de la muestra

Las muestras para análisis de laboratorio estuvieron constituidas por 1 Kg de almendras de cacao tomadas de cada uno de los tratamientos a evaluarse.

3.9. Técnica de recolección de datos primarios y secundarios.

3.9.1. Datos primarios

Se obtuvo a través de la observación directa y recolección de datos para percibir la realidad exterior con la finalidad de obtener los datos previos de interés para la investigación. Mediante experimentos análisis de laboratorio de la caracterización bromatológica de la materia prima para la identificación de las variables.

3.9.2. Datos secundarios

Para esta investigación se utilizó información bibliográfica, artículos y revistas científicas.

3.10. Instrumentos de recolección de datos primarios y secundarios

Es el mecanismo que utiliza el investigador para recolectar y registrar la información, en la investigación se empleó los siguientes instrumentos:

- La libreta de notas permitió recolectar información en el instante más oportuno e imprevisto de la investigación.
- La ficha de observación se recolectó el resultado del desarrollo de destrezas que se han logrado.
- La Cámara fotográfica por medio de este instrumento se ha procedido a inmortalizar el lugar y las estrategias utilizadas en la ejecución de la investigación.
- Entrevista estructurada se ha elaborado un total de 5 ítems para analizar el criterio que poseen las autoridades sobre la propuesta del trabajo investigativo.

3.10.1. Instrumentos para procesar datos recopilados

Los resultados fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA); para la comparación de medias se aplicará la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0.05 mediante un paquete estadístico de versión libre (InfoStat) con la finalidad de determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos. Se realizará un panel de degustación para determinar las características sensoriales de las almendras de cacao los resultados obtenidos serán evaluados mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

3.11. Procedimiento experimental

Para la investigación el procedimiento experimental, tuvo como materia prima 2 kg de almendras de cacao, las cuales fueron cosechadas, fermentadas, analizadas y procesadas.

3.11.1. Descripción del proceso experimental

- Cosecha.- Se cosechó mazorcas de cacao Nacional, con madurez fisiológica y organolépticamente aptos para la fermentación.
- Selección.- Se tomaron muestras representativas de mazorcas de cacao Nacional (2 kg), seleccionando mazorcas sanas y maduras.
- Corte de las mazorcas.- Consistió en cortar las mazorcas con machete para extraer las almendras de cacao.
- Desgrane.- Consistió en extraer las almendras del interior de la mazorca y separar del maguey.
- Acondicionamiento.- Se procedió a pesar 2 kg de almendras de cacao fresco, posterior a ello se colocaron los microfermentadores tipo rohan fabricado en laurel blanco, donde se adicionó las almendras de cacao y se homogenizó adecuadamente en las cajas de fermentación. Transcurrido las 24 h se procedió a tomar la temperatura y adicionar el 0.2 % de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y 10 % de puré de banano (polifenol oxidasas) a cada unidad experimental de acuerdo a las características de cada tratamiento y finalmente se homogenizó y cubrió con hojas de plátano y plástico.
- Fermentación.- Durante esta operación ocurrió la mayoría de los cambios bioquímicos en las almendras de cacao, notándose cambios en su estructura como la descomposición del mucílago, transformación de los alcoholes, ácidos, descenso del pH produciendo reacciones bioquímicas que favorecen el desarrollo del sabor y aroma del chocolate, mediante acción de las levaduras y bacterias lácticas y acéticas.
- Secado.- Se realizó sobre madera cuya temperatura fluctuó entre 25 a 40 °C por 120 h, hasta que la humedad de las almendras sea menor a 7 %.
- Envasado.- Se colocó en fundas ziploc para evitar la humedad.

3.11.2. Métodos de análisis

3.11.2.1. Análisis físico de las almendras evaluadas

- Prueba de corte. Se consideraron los porcentajes de almendras bien fermentadas, violetas, pizarrosas, mohosas y defectuosas. Las almendras de cacao fueron evaluadas mediante la

prueba de corte que consistió en realizar cortes longitudinales a 100 almendras de cacao y analizar la coloración interna de las almendras de cacao seco, así como las estrías que se forman luego de la fermentación. Referencia norma INEN 176:2018.

- Temperatura.- Se registró a las 24, 48, 96 y 120 h de haber iniciado el proceso de fermentación de las almendras de cacao, colocando un termómetro digital calibrado de 0 a 100 °C en el centro de masa.
- Tiempo de fermentación.- Se estableció 48, 96 y 120 h, se utilizó un cronómetro.
- Humedad.- Para determinar el contenido de humedad en las almendras de cacao (NTE INEN 173), se pesó 2 g de muestra de cacao triturado, luego las muestras se colocaron en la estufa a 130°C por 2 h. Posteriormente, se colocó en el desecador, hasta que se enfríe a temperatura ambiente (30 minutos). El contenido de humedad se determinó en función del peso fresco, por diferencia con el peso de la muestra calcinada de acuerdo a la siguiente ecuación: (AOAC 13.0001/98)

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

W_0 = Peso de la muestra (g)

W_1 = Peso del crisol vacío

W_2 = Peso del crisol más la muestra calcinada

- Ceniza.- Para la determinación de cenizas se introdujo las muestras en la estufa a 600 °C por 4 h, hasta llegar a la incineración en partículas libres de carbón. Luego se colocaron los crisoles en el desecador durante 30 min. Finalmente, se pesó en una balanza analítica. Referencia N° 972.15.

Cálculos

$$\% \text{ cenizas} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100$$

Dónde:

m = Peso del crisol vacío

m_1 = Peso del crisol con la muestra fresca

m_2 = Peso del crisol con la muestra calcinada

- Proteína.- Se determinó de acuerdo al método de Kjeldahl, que consiste en someter a un digestor a 400 °C por una hora. Referencia AOAC, 970.20. Se realizó el procedimiento por triplicado en cada muestra. Se calculó el contenido de nitrógeno mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ PB} = \frac{\text{Normalidad del Hcl} * \text{Volumen HCl} * 6.25 * 0.014}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

- pH.- Para el valor del pH, primero se separó la testa del cotiledón de las almendras de cacao, luego se trituro el cotiledón utilizando una licuadora y 100 ml de agua destilada, por un periodo de 2 minutos. Después se procedió a colocar en un vaso de precipitación y con un pHmetro se registró la lectura del pH. Referencia N° 970.22.
- Acidez titulable.- Se tomó 10 g de muestra luego se colocó en un matraz volumétrico de 250 ml, se añadió 50 ml de agua destilada y agitar. Adicionar 3 gotas de fenolftaleína al 2 % y adicionar gota a gota la solución NaOH 01N. Titular hasta conseguir un color rosa persistente.
- Azúcares fermentables.- La hidrólisis ácida se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL, los cuales contenían 10 g de almendras de cacao trituradas y 50 mL de H₂SO₄ en concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3 N. Los matraces fueron incubados a 30 °C a 150 rpm en un agitador orbital por 48 h. La concentración de azúcares totales se determinó a través del método fenol sulfúrico (Dubois 1956). Se elaboró una curva de calibración con glucosa (Anexo P) como estándar para medir la absorbancia (mg glucosa/L). Como blanco se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento. Para la determinación de la glucosa de cacao por el Método Fenol-Sulfúrico, se realizó la disolución mezclaron 1 mL de muestra con 0,05 mL de fenol al 80% en tubos de ensayo y se dejaron 15 minutos en reposo, luego a los tubos se les añadieron 5 mL de H₂SO₄, se dejaron reposar por 15 min y se analizaron en un espectrofotómetro (Genesys 10vis) a una longitud de onda de 490 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado para obtener valores promedios.
- Cadmio.- Estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de bromatología de Agrocalidad. En la determinación de cadmio se utilizó el método AA (Llama) PEE/B/09.

3.11.3. Descripción del proceso de la elaboración de la pasta de cacao

- Recepción y pesado.- Se pesó las almendras de cacao fermentadas y secas con una humedad menor al 7 %.
- Limpieza y selección.- Durante esta operación las almendras de cacao, fueron seleccionadas de forma manual por tamaño y se separó las almendras deterioradas, con defectos y agentes extraños presentes fueron descartados, esta operación se realizó de forma manual.
- Tostado.- Se realizó de forma artesanal a 130 °C durante 30 minutos, con remoción constante.
- Descascarillado.- Se retiró la cascarilla adherida a las almendras de cacao de forma manual.
- Molienda.- Se llevó a cabo en un molino artesanal, donde los nibs de cacao se molieron y refinaron. Posteriormente se obtuvo una pasta de consistencia viscosa y fina.

- Refinado.- Se lo realizó en una conchadora por 12 h sin superar los 65 °C.
- Moldeado.- Se llevó a cabo a una temperatura de 45 °C, en moldes rectangulares con un peso de 400 g de pasta por molde.
- Empacado.- Se realizó de forma manual, utilizando papel aluminio y fundas ziploc.
- Almacenamiento.- La pasta de cacao fue almacenado en refrigeración.
- Evaluación.- En la pasta de cacao se evaluó las características sensoriales.

3.11.4. Análisis sensorial

Para el análisis sensorial se preparó pasta de cacao, elaborado mediante el proceso de tostado, molienda de las almendras de cacao. La evaluación sensorial se realizó a cada uno de los tratamientos y se colocaron pequeños bloques de pasta de cacao en vasos plásticos identificados con códigos numéricos de tres dígitos cada uno. Luego, los vasos plásticos se colocaron en un baño maría a una temperatura entre 45 y 50 °C para diluir la pasta y facilitar la degustación. El panel de catadores semi entrenados estuvo integrado por diez personas realizó la degustación de pasta (licor) de cacao y cuantificó los atributos asociadas al sabor y aroma: caramelo, cacao, amargo, nuez, floral, frutal, ácido y astringente, para cuantificar estas variables se aplicó una escala de 0-10, donde 0 es ausente, 1 y 2 bajo, 3 y 5 medio, 6 a 8 alto y 9 a 10 muy alto (Solórzano *et al.*, 2015, p.41).

Los catadores registraron en la ficha de evaluación (Anexo A) el valor de la intensidad de cada variable, luego se recolectaron los fichas y se procedió a la digitalización de los datos obtenidos (Solórzano *et al.*, 2015, p.41).

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Temperatura, pH y acidez de las almendras de cacao durante la fermentación

4.1.1. Temperatura

La Figura 1-4, muestra la distribución de la temperatura durante el tiempo de fermentación (24, 48, 72, 96 y 120 h) de las almendras de cacao, que puede modelarse con una distribución polinomial de tercer grado positiva ($p < 0.05$). Además, el modelo propuesto no presenta falta de ajuste ($p = 0.2356$). El modelo obtenido explica el 51 % de la variabilidad de la temperatura durante la fermentación. Los resultados reflejan un aumento regular de la temperatura en el transcurso de la fermentación.

La disminución de la temperatura posterior a las 24 h concuerda con lo expuesto por Braudeau (1970) y Enríquez (1985), quienes indican que en la primera etapa de fermentación la actividad microbiana provoca un incremento de la temperatura hasta alcanzar un máximo de 40 a 45 °C y luego desciende por la inactivación de las bacterias ácido lácticas y la muerte del embrión (Vilchez, 2016, pp.63-69). Durante la fermentación las almendras de cacao deben alcanzar entre 45 a 50 °C para permitir los cambios bioquímicos, en un tiempo de 96 a 144 h (Otárola, 2018, pp.41-46). El mismo Otárola (2018, pp.94-95), menciona que la temperatura incrementa con el tiempo de 26.6 a 48.1 °C. La mayor temperatura se registró a las 108 h, pero algunos de los tratamientos finalizan la fermentación a las 144 h con temperaturas que descienden hasta 37.7 y 40.9 °C. Palacios (2016, p.63), fermentó las almendras de cacao durante 144 h en sacos apilados y alcanzó temperaturas promedio de 47,4 y 45,1 °C para las variedades CCN-51 y ICS-6 respectivamente.

Vera *et al.* (2014, p.23) alcanzó 43 °C como temperatura promedio durante la micro fermentación de almendras de cacao por 120 h. La temperatura registrada durante la fermentación de la presente investigación coincide con Mejía *et al.*, (2018) quien registró valores entre 37 a 50 °C, aduciendo que estas temperaturas son óptimas para que las levaduras y enzimas actúen. Por otra parte Peralta (2020, p.51), sostiene que a partir de las 36 h las almendras de cacao deben alcanzar entre 40 y 55 °C para permitir el desarrollo de los microorganismos.

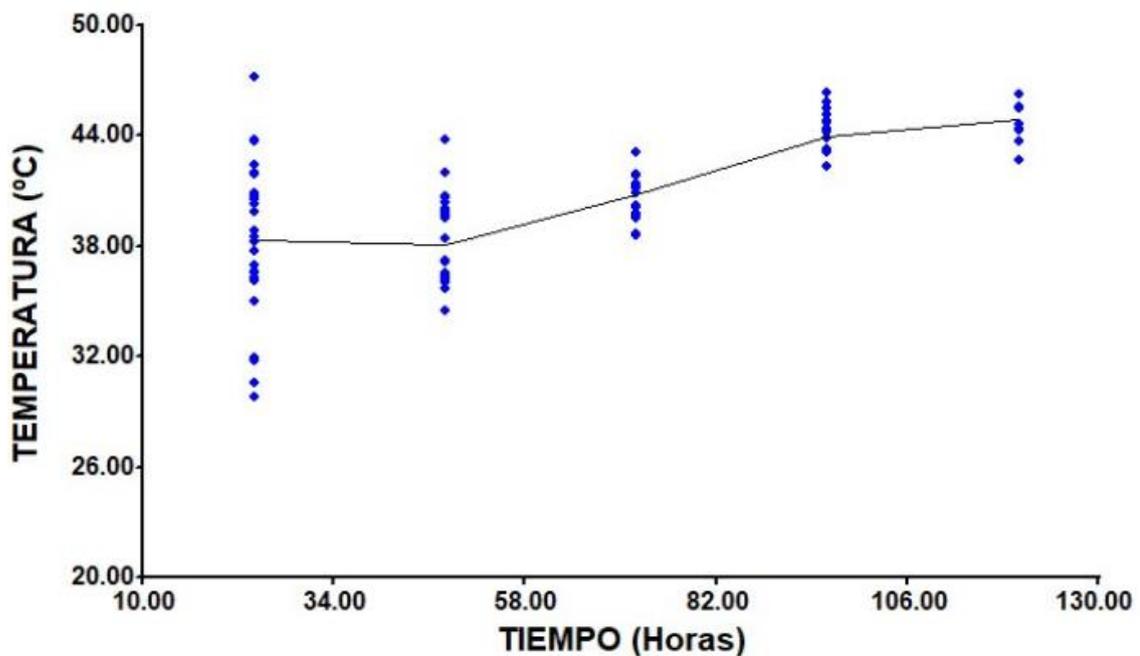


Figura 1-4: Valores promedios del análisis de regresión entre el tiempo y la temperatura de fermentación.

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021).

4.1.2. pH

Según el análisis de varianza (ADEVA), en la (Tabla 4-4), indicó que existe diferencias significativas de ($p < 0.05$) para el valor del pH en la fermentación de las almendras de cacao entre los tratamientos evaluados. El promedio general del pH de los tratamientos fue 4.59, observándose que el T7 (fermentación 48 h + levadura madre + PPO) presentó el mayor valor de pH 5.26, mientras que en el T9 (fermentación 120 h + levadura madre + PPO) obtuvo el menor valor de 4.15.

Álvarez (2008, p.6) menciona que, durante la caracterización fisicoquímica de las almendras de cacao fermentadas partió con un pH de 6.17 en almendras frescas y evaluó el pH a las 24, 48, 72, 96 y 120 h de fermentación, obtuvo valores de pH de 4.95, 4.73, 4.47, 4.29 y 4.22 respectivamente. Asimismo Santa (2019, pp.32-34), analizó el pH en almendras de cacao CCN-51 cada 24 h durante la fermentación, las almendras frescas indicaron el pH inicial de 6.20, valor que descendió a 5.81 a las 24 h de haber iniciado el proceso de fermentación y a partir de las 96 y 120 h el pH descendió a 5.00.

Rivera (2018, pp.91-94), observó una disminución en el pH de 6.12 a 5.02 en cacao CCN-51 y de 6.09 a 4.93 para el ICS-6, el valor del pH disminuyó progresivamente hasta las 96 h de fermentación, donde se mantuvo constante y a las 144 h mostró un leve incremento. Mientras que

Mejía *et al.* (2018, pp. 972-973), evaluó el pH cada 24 h por 144 h y encontró valores de pH al inicio de la fermentación cercanos a 5.00, que luego disminuyeron hasta valores por debajo de 4 al finalizar la fermentación.

Lanza *et al.* (2016); Mejía *et al.* (2018); Rivera (2018) y Santa (2019), afirman que a medida que avanza la fermentación del cacao el pH disminuye. Una vez finalizado el proceso de fermentación el pH de las almendras de cacao vuelve a incrementar debido al secado de las almendras hasta llegar a un promedio de pH de 5.5. Hechos que coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación al obtener resultados similares a los autores antes mencionados.

Durante la primera fase de la fermentación el pH es un factor fundamental para el crecimiento de las levaduras. En todos los tratamientos, se observó que el pH disminuyó a medida que transcurre el tiempo de fermentación. Esto ocurre porque la testa de las almendras de cacao es permeable y permite el ingreso del ácido acético, causante de la acidificación. En las reacciones fermentativas las levaduras consumen los azúcares y seguidamente las bacterias acéticas consumen el alcohol, esto hace que el pH descienda con el paso del tiempo y condicionada una buena fermentación.

4.1.3. Acidez

De acuerdo al análisis de varianza (ADEVA), como se puede apreciar en la Tabla 4-4 existió diferencias significativas de ($p < 0.05$) para el porcentaje de acidez de las almendras de cacao en los tratamientos analizados. La acidez de todos los tratamientos mostró un valor promedio de 0.64 %, el mayor porcentaje de acidez se identificó en el T8 (*fermentación 96h + levadura madre + PPO*) con 0.88 %, mientras que en el T1 (*fermentación 48 h testigo 1*) presentó el menor valor con 0.49 %.

La acidez en las almendras de cacao aumenta por efecto de la fermentación (Chávez, 2020; Lares *et al.*, 2013; Teneda, 2016). Del mismo modo Rivera (2018, pp.74-76), menciona que la acidez de las almendras aumenta con el tiempo de fermentación hasta las 96 h y luego tiende a descender debido a que el ácido acético disminuye gradualmente por efecto de la volatilización del mismo. Al iniciar la primera fase de la fermentación, el metabolismo de las levaduras lleva a cabo la transformación de los azúcares más sencillos del mucílago (Guevara, 2017, p.24).

Asimismo Quevedo *et al.* (2018, p.123), afirma que el incremento de la acidez está estrechamente relacionado con el ácido acético y láctico producto de la degradación del mucílago. Santa (2019, p.11), deduce que a partir del segundo y tercer día de fermentación del cacao se da inicio la fermentación aeróbica donde el ácido acético ingresa al cotiledón provocando el aumento de la

acidez. Mejía *et al.* (2018, p. 965), encontró valores cercanos a 0.45 % de ácido acético, los mismos que descendieron en el segundo día de fermentación, posteriormente fueron aumentando gradualmente. Según Chávez (2020), en su investigación encontró 0.64 % de acidez a los 0 h de fermentación, 1.77 % a las 48 h, 2.63 % a las 96 h y 2.59 % a las 120 h. Los porcentajes de acidez hallados en esta investigación se encuentran dentro de los encontrados por Chávez (2020), sin embargo son superiores a los obtenidos por Sinche (2011, p. 46) con 0.37 % y 144 h de fermentación.

Es así que durante la fermentación de las almendras de cacao el porcentaje de acidez incrementa a medida que transcurre el tiempo de fermentación. Durante las 48 y 96 h de fermentación, las muestras evaluadas mostraron un incremento de la acidez por el ácido acético resultado de la oxidación del etanol producido por las bacterias ácido acéticas y el ácido lácticas en el inicio de la fermentación aeróbica entre las 48 h y 72 h. Sin embargo a las 120 h de fermentación el porcentaje de acidez descendió, debido a que el ácido acético disminuye progresivamente de las almendras de cacao por efecto de la volatilización del mismo, Chávez (2020), encontró 0.64 % de acidez a los 0 días de fermentación, 1.77 % a las 48 h, 2.63 % a las 96 h y 2.59 % a las 120 h.

Tabla 4-4: pH y acidez de las almendras en la fermentación.

Tratamiento	pH	Acidez (%)
T1	5.09 ± 0.61 ab	0.49 ± 0.02 d
T2	4.38 ± 0.06 bc	0.87 ± 0.06 a
T3	4.17 ± 0.01 c	0.60 ± 0.06 bcd
T4	5.10 ± 0.16 ab	0.51 ± 0.03 cd
T5	4.53 ± 0.39 abc	0.64 ± 0.08 bc
T6	4.42 ± 0.23 bc	0.53 ± 0.08 cd
T7	5.26 ± 0.14 a	0.52 ± 0.03 cd
T8	4.20 ± 0.02 c	0.88 ± 0.02 a
T9	4.15 ± 0.08 c	0.71 ± 0.05 b
Promedio	4.59	0.64
C.V. (%)	5.76	7.95
p-valor	<0.0001	<0.0001
Límite inferior 0.05	4.40	0.58
Límite superior 0.05	4.78	0.70

Letras distintas indican significancia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05)

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021).

4.2. Características fisicoquímicas de las almendras de cacao seco

4.2.1. Prueba de corte

En la Tabla 5-4 se puede apreciar las medias de tratamientos de la prueba de corte de las almendras de cacao nacional fermentada y seca con el uso de enzimas y levaduras como estrategia para disminuir la presencia de cadmio. Según el análisis de la varianza, existe diferencia significativa de $p < 0.05$ en la fermentación buena, violeta y pizarrosa. Para la fermentación mohosa y defectuosa no existieron diferencias significativas de $p > 0.05$ entre las muestras analizadas. El porcentaje de las almendras de 48, 96 y 120 h de fermentación de almendras de fermentación buena, violeta, pizarrosa, mohosa y defectuosa se encuentran dentro de la (NTE INEN 176, 2018). Según Álvarez (2008), en las almendras de cacao fino de aroma el porcentaje de fermentación superior al 80 % permite adquirir las características del aroma y sabor propios del cacao.

Durante la fermentación, las primeras 48 h son fundamentales, debido a que en esta etapa las levaduras convierten el almidón y los azúcares del mucilago en etanol. Debido a esto se deduce que los tratamientos T7, T4, T2 y T1 con menor tiempo de fermentación no alcanzaron la temperatura adecuada antes de la primera remoción, que es indispensable para el desprendimiento de los precursores del sabor y aroma, y por ende estas muestras no alcanzaron la calidad total. En efecto, otras investigaciones han demostrado que el aumento del tiempo de fermentación y remoción permite obtener valores superiores al 83 % como resultado de una buena fermentación. Según Vera y Goya (2015, p.35) el grado de fermentación de las almendras de cacao es proporcional al tiempo de fermentación, es decir mientras más tiempo de fermentación mayor es el grado de fermentación de las almendras como se observa en los tratamientos T9, T6 y T3.

El porcentaje de fermentación debe ser superior al 70 % (Sinche, 2011, pp.42-43). Debido al menor porcentaje de almendras fermentadas incrementa la cantidad de almendras violetas y pizarrosas. Por lo que se deduce que no se ha alcanzado el tiempo ni la temperatura adecuada para que ocurran los cambios bioquímicos, la muerte del embrión y el cambio de color violeta a marrón (Sinche, 2011, pp.42-43). El proceso de fermentación de las almendras de cacao es esencial para conseguir un producto final de buena calidad. Pineda *et al.* (2012, p.289), manifiesta que las reacciones enzimáticas originan los precursores del aroma y sabor propios de los cacaos bien fermentados. El grado de fermentación de las almendras de cacao es proporcional al tiempo de fermentación, es decir mientras más tiempo de fermentación mayor es el grado de fermentación de las almendras.

En la fermentación del T9 (fermentación 120 h + levadura madre + PPO) obtuvo el mayor porcentaje de fermentación con 89.33 % y el T1 (fermentación 48 h testigo 1) con el menor valor 71.33 %. En otras investigaciones, la adición de aditivos, el tiempo de fermentación y la remoción permitieron obtener valores superiores al 83 % de almendras fermentadas. Este mismo efecto fue obtenido por Guevara (2017, pp.42-44) al evaluar la adición de enzimas y levaduras para mejorar su proceso fermentativo.

Los datos obtenidos en esta investigación demuestran que el menor porcentaje de almendras violeta se encontraron en el T9 (fermentación 120 h + levadura madre + PPO) con 6.67 %, mientras el mayor porcentaje se evidenció en el T1 (fermentación 48 h testigo 1) con 16 %. Datos inferiores a los encontrados por Olarte y Rincon (2019), quienes obtuvieron 20.46 y 29.54 % para las almendras procedentes de fincas de las zonas de Colón Eloy y Naranjal. También Vera y Goya (2015, p.32), obtuvieron los mayores porcentajes de almendras violeta en los híbridos DYRCYT-H 262 y DYRCYT-H-258 con 13.25 y 12.50 % respectivamente, datos que son superiores a los encontrados en esta investigación excepto el T1 y T2.

En cuanto a las almendras violetas, a medida que el tiempo de fermentación incrementa, reduce el porcentaje de almendras violeta (Olarte y Rincon, 2019; Vera y Goya, 2015). Adicionalmente, la cantidad de masa utilizada para el experimento podría incidir en la presencia de almendras violeta. El menor contenido de almendras violeta se encontró en el T9 a 120 h de fermentación con adición de enzimas y levaduras. Se conoce que para pequeñas muestras cacao, el tiempo adecuado de fermentación es de 120 h. En las almendras pizarra el T9 presentó el menor valor 3.33 % y el mayor porcentaje se registró en el tratamiento T1. Cabe mencionar que todos los tratamientos se ajustan a la (NTE INEN 176, 2018). Además estos valores son inferiores a los resultados obtenidos por Cedeño (2020) quien obtuvo el mayor valor 24.3 % de almendras pizarra en el tratamiento con quelantes EDTA. Así mismo Solórzano *et al.* (2015, p.40), halló valores de fermentación entre 0 y 18 % para almendras pizarra en asociaciones de diferentes provincias.

Rivera *et al.* (2012, p.9), en su investigación afirma que las almendras pizarra se mantuvieron alrededor del 10 %, resultado que no se vio afectado por la fermentación, y lo atribuyó a los frutos con madurez insuficiente. Por otra parte Guevara (2017, pp.40-41), presentó valores entre 1 y 3.67 % de almendras pizarra en los tratamientos con adición de levadura madre y enzimas de manzana, aguacate y banano fermentadas por 96 h. Los mayores promedios de almendras pizarra se identificaron en el híbrido DYRCYT-H-254 con 1.92 % Vera y Goya, (2015, p.31), sostienen que este defecto no se genera durante la fermentación. En cuanto al porcentaje de almendras mohosas y defectuosas (múltiples, vanas y partidas) no supera el 1 % en los tratamientos evaluados.

Tabla 5-4: Prueba de corte de las almendras de cacao.

Tratamiento	Fermentación									
	Buena		Violeta		Pizarrosa		Mohosa		Defectuosa	
T1	71.33	d	16.00	a	12.00	a	0.00	a	0.67	a
T2	76.00	cd	14.00	abc	9.33	abc	0.00	a	0.67	a
T3	80.67	abc	11.33	abc	7.33	abc	0.00	a	0.67	a
T4	76.67	cd	12.00	abc	11.33	abc	0.00	a	0.00	a
T5	82.67	abc	10.00	abc	6.67	abc	0.00	a	0.67	a
T6	86.00	ab	8.00	bc	5.33	bc	0.00	a	0.67	a
T7	77.33	cd	12.67	abc	9.33	abc	0.00	a	0.67	a
T8	82.67	abc	12.67	abc	4.00	c	0.00	a	0.67	a
T9	89.33	a	6.00	c	3.33	c	0.67	a	0.67	a
Promedio	80.30		11.41		7.63		0.07		0.59	
C.V. (%)	3.36		24.10		28.09		519.62		183.71	
p-valor	<0.0001		0.0103		0.0006		0.4690		0.9973	
Límite inferior 0.05	78.01		9.94		6.26		0.08		0.22	
Límite superior 0.05	82.58		12.88		9.00		0.23		0.96	

Letras distintas indican significancia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021).

4.2.2. Humedad

En la Tabla 6-4, se observa el contenido de humedad de las almendras, según el análisis de varianza, no presentó diferencias significativas con un $p > 0.05$ entre los tratamientos analizados. Sin embargo se identificó que el T5 (fermentación 96 h y levadura madre) presentó el menor contenido de humedad $5.48 \% \pm 0.13$. Cabe mencionar que todas las muestras se encuentran dentro de un rango menor al 7 %.

En cuanto a la humedad de cacao Nacional Andrade *et al.* (2019, pp.8-9), reportó $6.03 \% \pm 0.10$ y menciona que valores superiores al 7 % pueden ocasionar presencia de hongos y reducir la calidad del grano durante el almacenamiento lo que concuerda con (Erazo y Mendoza, 2015; Falcon, 2019; Guevara, 2017; Navia y Pazmiño, 2012; Solórzano Chavez *et al.*, 2015).

Por otra parte Lares *et al.* (2012, p.442), registró $4.31 \% \pm 0.06$ de humedad en cacao fermentado y seco, del estado de Miranda (Venezuela). Asimismo Vilchez (2016, pp.78-79), obtuvo 6.2 % de humedad en cacao CCN-51 y consideró que este valor se encuentra dentro del rango. Igualmente Álvarez (2018, pp.25-28), obtuvo valores de humedad entre 6.00 y 7.27 % en almendras frescas, fermentadas y secas. También Rivera (2018, pp.106-108) evaluó el contenido de humedad y obtuvo $5.49 \% \pm 0.07$ para cacao ICS-6 y $6.02 \% \pm 0.05$ para cacao CCN-51, lo cual es recomendable para el almacenamiento. Sin embargo Álvarez *et al.* (2010); Baron (2016) y Santa (2019), refieren que las almendras de cacao se vuelven frágiles y quebradizas cuando la humedad es menor al 6 %.

Álvarez (2019), presentó medias de humedad entre 5.30 y 7.43 %, en cacao nativo orgánico en Coopagro Linderos. Del mismo modo Sinche (2011, p.46), obtuvo 5.53 % de humedad en cacao fermentado por 144 h y seco. Palacios (2008), citado por Vera *et al.* (2014), afirma que las almendras de cacao con 5 % de humedad garantiza su almacenamiento. La Norma NTE-INEN 176 especifica que las almendras de cacao deben tener máximo 7 % de humedad. El contenido de humedad encontrado en las muestras durante esta investigación se asemeja a los valores obtenidos en otras investigaciones y se encuentran dentro del rango establecido por la norma NTE-INEN 173.

4.2.3. Ceniza

El contenido de ceniza en las almendras de cacao seco presentó diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$ entre los tratamientos como se muestra en la Tabla 6-4. En el porcentaje de ceniza se obtuvo un promedio de 3.13 % entre todos los tratamientos, el mayor porcentaje de cenizas se

encontró en el T7 (fermentación 48 h + levadura madre + PPO) con 3.54 ± 0.15 %, mientras que el T3 (fermentación 120 h testigo 3), obtuvo el menor valor de 2.76 ± 0.09 %.

Perea *et al.* (2011, p.39), afirma que para ser considerado cacao de primera el porcentaje de ceniza debe ser <4 %, para el caso de la ceniza los porcentajes obtenidos de los tratamientos se encuentran dentro de este rango. El contenido de cenizas en las almendras de cacao evaluadas en esta investigación es similar a los valores obtenidos por Álvarez *et al.* (2007) y Perea *et al.* (2011), quienes reportaron valores entre 2.8 y 3.32 %. Además Rosero (2017), obtuvo valores de 3.50% con la fermentación en cajas y 4.09 % sin fermentación e indica que esta reducción se relaciona con la mayor eliminación de agua, al difundirse a través de los poros al medio, llevando consigo minerales hidrosolubles lo que concuerda con Nogales *et al.*, (2004). Por otra parte Del Aguila (2017, p.39-41), obtuvo valores de cenizas en almendras secas entre 3.71 y 4.65 %, superiores a los obtenidos en la presente investigación.

Mientras que Larez *et al.* (2013, pp.441-442), indica que la disminución de la ceniza en las almendras de cacao fresco, fermentado y seco ocurre por la gran actividad microbiológica que se produce durante el proceso de fermentación y a la cantidad de sustratos (minerales) que requieren las levaduras. El mismo autor menciona que esta variación se debe al efecto del drenado que se produce durante la fermentación de las almendras de cacao. Igualmente Otárola (2018), al evaluar el efecto de la enzima pectolítica y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) afirma que el contenido de ceniza en cacao fresco, fermentado y seco presenta un ligero descenso por efecto de la fermentación.

4.2.4. Azúcares totales (glucosa g/kg)

En la Tabla 6-4 se muestra los valores promedio de glucosa de las almendras de cacao, existe diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$ entre los tratamientos en estudio. El contenido de glucosa de todos los tratamientos registró un promedio de 6.28 g.kg^{-1} , el T7 (fermentación 48 h + levadura madre + PPO), presentó el mayor contenido de glucosa con 7.42 g.kg^{-1} seguido de los tratamientos T4 y T8 con 7.17 y 6.90 g.kg^{-1} respectivamente mientras que el T5 presentó el menor contenido con 4.67 g.kg^{-1} de glucosa.

Rojas *et al.* (2021, pp.57-59) afirma que, el mayor consumo de azúcares fue observado después de la fase anaeróbica 72 h de fermentación. Asimismo, Zambrano *et al.*, (2010, pp.6-8) al evaluar el impacto de los azúcares en la fermentación con el crecimiento de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) a un pH entre 3 y 5 encontró una correspondencia directa entre el crecimiento y el

contenido de azúcares. El mismo autor manifiesta el crecimiento de estos microorganismos está asociado al contenido de azúcares.

Las almendras de cacao contienen entre 2 % y 4 % en peso seco de azúcares libres fructosa, sacarosa, glucosa, xilosa, arabinosa. (Quevedo *et al.*, 2018). En la fermentación ocurre la muerte del embrión de la almendra de cacao y permite una serie de reacciones bioquímicas y enzimáticas que modifican la composición química de las almendras lo que favorece la formación del aroma y sabor a cacao (Brunetto *et al.*, 2014, p.194).

Asimismo, Zambrano *et al.* (2010, pp.6-7) afirma, que las almendras de cacao sin fermentar presentan hasta el 11 % del contenido neto de glucosa más fructosa en proporciones similares (1,1). El contenido de glucosa y fructosa incrementa entre dos y ocho veces según la variedad de cacao. Además, mientras avanza el proceso fermentativo de las almendras de cacao, la fructosa incrementa (1,5 veces) sobre el contenido de glucosa (Brunetto *et al.*, 2014, p.194).

Zambrano *et al.* (2010, pp.6-8) identificó el contenido de glucosa en cotiledones frescos de dos tipos de cacao en tres cosechas oscila entre 0.94 y 2.72 mg.g⁻¹. Asimismo Camu *et al.* (2008) encontró concentraciones de glucosa que oscilan entre 1.13 y 3.09 mg.g⁻¹ en almendras de cacao fermentadas y secas. Estos valores son inferiores al contenido de glucosa encontrado en esta investigación.

El contenido de glucosa presente en las almendras de cacao Nacional es superior a los encontrados por Brunetto *et al.* (2014) quien registró valores entre 0.097 y 0.375 g.kg⁻¹ de glucosa en 90 muestras de diferentes variedades de cacao criollo venezolano tomadas antes y durante 72 h de fermentación y posterior al tostado. También Zambrano *et al.* (2010), identificó que el contenido de glucosa oscila entre 15.47 y 31.32 mg.g⁻¹ en la evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao criollo merideño durante la fermentación.

Se ha demostrado que las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* alcanzan su máximo crecimiento celular a las 24 h, también predominan durante las 72 h de fermentación, esta dominancia se atribuye a su mayor poder fermentativo y la capacidad de soportar condiciones extremas, como altos niveles de etanol y ácidos orgánicos, altas temperaturas y bajos niveles de pH (Zamudio *et al.*, 2021, 65-67).

Sin embargo, las levaduras pueden permanecer en fase estacionaria a partir de las 24 h de fermentación. Es así que a muy altas concentraciones los azúcares impiden la multiplicación de los microorganismos, ocasionando dificultades fermentativas (Cárdenas, 2017, p.16). Por otra

parte, se observa que los tratamientos con 48 h de fermentación presentan el mayor contenido de glucosa en las almendras de cacao Nacional, y a medida que avanza el proceso de fermentación, la glucosa disminuye hasta las 120 h (Tabla 6-4). Cabe mencionar que el T6 (fermentación 120 h y levadura) presentó 5.55 g.kg^{-1} de glucosa, esto podría estar asociado al comportamiento cinético, donde los microorganismos permanecen en fase estacionaria. Por otra parte, el contenido inicial de glucosa puede causar un efecto bien marcado sobre el metabolismo celular y convertirse en un fuerte inhibidor en altas concentraciones, es así que puede estar relacionada con la sobreproducción de etanol y ácido acético, causantes de efectos negativos a ciertas concentraciones (Aguilar *et al.*, 2015, p.1).

En esta investigación los resultados demuestran que existe una disminución del contenido de glucosa entre los tratamientos evaluados a medida que avanza el proceso de fermentación. En este punto, si bien la tendencia de los resultados de esta investigación concuerda con lo reportado en la bibliografía, existiendo pocas variaciones que pueden atribuirse principalmente al genotipo de cacao, condiciones edafoclimáticas, cosecha, fermentación, actividad microbiana y cuantificación.

4.2.5. pH

Como se observa en la Tabla 6-4, existen diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$ entre los valores de pH en las almendras de cacao. En el pH se identificó un promedio general de 5.71, el T1 (fermentación 48 h testigo 1) presentó el mayor valor de pH con 6.02 ± 0.08 frente al T3 (fermentación 120 h testigo 3) que presentó el menor valor de pH con 5.49 ± 0.15 . Cabe mencionar que la Norma INEN no especifica la medición del pH, pese que la presencia de acidez favorece la presencia de compuestos acéticos durante la fermentación.

Bermúdez y Mendoza (2016, p.28-29), obtuvieron valores de pH entre 6.03 y 6.35 para cacao Nacional fino de aroma del cantón Chone, fermentado por 120 h. Mientras que Loureiro *et al.* (2017), evaluó tres clones de cacao del sur de Bahía - Brasil, fermentados durante 192 h y secado, reportó valores de pH entre 5.12 y 6.3. También Intriago *et al.* (2019), obtuvo un valor promedio de pH 6.24 en cacao Nacional fermentado y secado durante 120 h. En otra investigación realizada en cacao Nacional proveniente de ocho sectores del litoral ecuatoriano obtuvo valores promedio entre 5.19 ± 0.156 y 5.54 ± 0.178 (Zambrano, 2018). Por otra parte Larez *et al.* (2013), determinó el pH de 5.04 en almendras de cacao Chuao del estado de Aragua, fermentado y secado al sol por 120 h.

Llerena y Uriña (2017), afirman que si el pH es menor a 5.0 indica la presencia de ácidos no volátiles indeseables para el desarrollo del aroma y sabor del cacao (Erazo y Mendoza, 2015, pp.72-73). Loureiro *et al.* (2016, p.5) ratifica que el pH es un atributo importante en la calidad del cacao y debe encontrarse entre 5.0 y 5.4. Por otra parte, para Perea *et al.* (2011, p.38), los valores de pH entre 5.3 y 5.6 corresponden a valores normales y aceptados por la industria. El Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (1993) considera como un cacao seco de calidad aquellos con pH más alto de 5.2. Adicionalmente, en la elaboración de chocolate el proceso conchado reduce el pH (Andrade *et al.* 2019, p8). Al relacionar las teorías y valores de pH obtenidos se puede determinar que a mayores días de fermentación el pH disminuye. Finalmente basándose en la Norma IICA los valores de pH en esta investigación son aceptables.

Bertorelli *et al.* (2009), observó el incremento del pH 5.98 en almendras fermentadas y 6.07 en almendras secas. El mismo autor sostiene que debido a la volatilización del ácido acético el pH incrementa. Según Ramos (2004), citado por Bermúdez y Mendoza (2016), el incremento del pH pudo deberse a que durante el secado desaparecen los ácidos presentes en el cotiledón y los cambios bioquímicos que ocurren en el mismo.

4.2.6. Acidez

Como se observa en la Tabla 6-4, existen diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$ según la entre los valores de acidez en las almendras de cacao. El promedio general del porcentaje de acidez es de 0.47 %, el T1 (fermentación 48 h testigo 1) presentó el menor porcentaje de acidez con $0.44 \% \pm 0.03$, frente al T8 (fermentación 96 h + levadura madre + PPO) que presentó el mayor porcentaje de acidez con $0.50 \% \pm 0.03$.

Según Larez *et al.* (2013), observo que disminuyó la acidez en las almendras de cacao después del secado al sol y atribuyó a la merma de los componentes volátiles por efecto del secado, principalmente de los ácidos orgánicos volátiles y a la formación de compuestos no volátiles precursores del flavor (Nogales *et al.*, 2004, pp.14-16). Lo que concuerda con Bermúdez y Mendoza (2016), quienes afirman que, durante la fermentación los ácidos láctico y acético migran hacia el interior del cotiledón debido a la degradación microbiana de la pulpa, incrementado el porcentaje de acidez que se reduce durante el secado de las almendras de cacao (Vázquez *et al.*, 2016).

Del Aguila (2017), identifico porcentajes de acidez entre $0.86 \% \pm 0.07$ y $1.02 \% \pm 0.06$ en almendras de cacao provenientes de tres localidades e indica que el secado en temperaturas cercanas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, las almendras retienen altos contenidos de ácido acético, propanoico, isobutírico

e isovalérico. Andrade *et al.* (2019), identificó $0.82 \% \pm 0.03$ de acidez en cacao Nacional Ecuador. Durante el proceso de conchado el cacao desarrolla los sabores del chocolate, el porcentaje de acidez disminuye debido a la volatilización del ácido acético y los aldehídos de bajo punto de ebullición (Andrade *et al.*, 2019, p.8).

Álvarez *et al.* (2010); Perea *et al.* (2011), indican que el porcentaje de acidez en las almendras de cacao, depende del proceso de fermentación y secado, aunque también puede afectar la variedad y el contenido de mucílago. En cuanto al cacao Nacional Zambrano (2018), afirma que presenta mayor acidez que el cacao CCN-51. Zambrano (2018, p.19) reportó un promedio en acidez de 4.21 %, valor que se encuentra superior a los hallados en la bibliografía revisada y los resultados de esta investigación.

4.2.7. Proteína

En la Tabla 6-4 se observa los valores promedio de proteína bruta de las almendras de cacao seco, se evidenció que existieron diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$ entre los tratamientos en estudio. La proteína presentó un promedio general de 12.70 %, el T2 (fermentación 96 h testigo 2), presentó el mayor porcentaje de proteína bruta con $14.99 \pm 0.26 \%$ y se diferencia del T8 (fermentación 96 h + levadura madre + PPO) que registró el menor porcentaje de $10.66 \pm 0.86 \%$.

El contenido de proteína encontrado en las almendras de cacao Nacional en esta investigación fue similar a los valores hallados por Zambrano (2018), en el estudio del contenido en cadmio en cacao ecuatoriano con resultados entre $9.0 \pm 3.00 \%$ y $15.07 \pm 0.16 \%$. Andrade *et al.* (2019), evaluó las propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao de Ecuador y Perú, reportando $8.60 \pm 0.20 \%$ de proteína en cacao Nacional, siendo este menor a los obtenidos en el presente estudio. Mientras que Lara (2017, pp.37-42), presentó valores de proteína entre 11.79 y 13.01 % y afirma que la variedad nacional tiene mayor contenido de proteína respecto a CCN-51.

Asimismo Sinche (2011), realizó el análisis proximal del grano de cacao a los 144 h de fermentación y obtuvo 12.9 % de proteína. También Álvarez *et al.* (2007), observó un rango de variabilidad entre 11.32 y 14.00 % durante la caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas y tostadas provenientes del estado Aragua. Por otra parte Castro *et al.* (2017), encontró $16.29 \pm 0.008 \%$ de proteína en cacao nativo de Piura, fermentado durante 96 h. Por otra parte, Vilchez (2016, pp.78-79), experimentó la disminución en las proteínas de 12.59 a 12.40 % durante la fermentación. El mismo autor indica que durante el secado del grano fermentado se reduce las proteínas.

De la misma forma Pineda *et al.* (2012), citado por Olarte y Rincon (2019, p.74) afirma que mientras más días de fermentación presenten las almendras de cacao con un secado natural el porcentaje de proteínas disminuye debido a las reacciones enzimáticas y microbiológicas, comportamiento que se evidenció en esta investigación (Lares *et al.*, 2013).

Durante la fermentación el ácido láctico y el acético ingresan al cotiledón de las almendras de cacao procediendo a la degradación de enzimática de las proteínas. Además, la disminución de las proteínas durante la fermentación ocurre por la gran actividad microbiológica que se lleva a cabo en el proceso de fermentación, en esta etapa las levaduras (microorganismos) requieren de alimento por lo que consumen las proteínas (sustratos). También la disminución de las proteínas se atribuye al drenado durante la fermentación.

Tabla 6-4: Análisis fisicoquímico de las almendras de cacao seco.

Tratamiento	PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS													
	Humedad (%)		Ceniza (%)		Glucosa (g.kg ⁻¹)		Cadmio (mg.kg ⁻¹)		pH		Acidez (%)		Proteína (%)	
T1	5.80 ± 0.21	a	3.50 ± 0.18	ab	6.81 ± 0.28	abc	0.27 ± 0.02	a	6.02 ± 0.08	a	0.44 ± 0.03	b	14.66 ± 1.54	ab
T2	5.73 ± 0.21	a	3.18 ± 0.15	abcd	6.47 ± 0.20	bc	0.24 ± 0.01	abc	5.65 ± 0.02	cd	0.45 ± 0.03	ab	14.99 ± 0.26	a
T3	5.67 ± 0.07	a	2.76 ± 0.09	d	6.04 ± 0.28	cd	0.20 ± 0.00	c	5.49 ± 0.15	d	0.48 ± 0.03	ab	13.26 ± 0.12	abc
T4	6.34 ± 0.99	a	3.11 ± 0.03	bcd	7.17 ± 0.07	ab	0.24 ± 0.03	abc	5.61 ± 0.06	cd	0.45 ± 0.01	ab	12.29 ± 0.40	bcd
T5	5.48 ± 0.13	a	3.30 ± 0.15	ab	4.67 ± 0.38	e	0.26 ± 0.03	a	5.66 ± 0.07	cd	0.46 ± 0.01	ab	12.84 ± 1.64	abcd
T6	5.64 ± 0.25	a	2.82 ± 0.09	cd	5.55 ± 0.22	d	0.21 ± 0.01	bc	5.76 ± 0.05	bc	0.48 ± 0.01	ab	12.11 ± 1.64	cd
T7	5.82 ± 0.19	a	3.54 ± 0.15	a	7.42 ± 0.29	a	0.25 ± 0.01	ab	5.93 ± 0.01	ab	0.48 ± 0.01	ab	10.72 ± 0.22	d
T8	5.98 ± 0.08	a	3.20 ± 0.23	abc	6.90 ± 0.01	abc	0.21 ± 0.01	bc	5.64 ± 0.01	cd	0.50 ± 0.03	a	10.66 ± 0.86	d
T9	5.91 ± 0.17	a	2.77 ± 0.17	d	5.53 ± 0.58	d	0.21 ± 0.01	bc	5.63 ± 0.04	cd	0.48 ± 0.01	ab	12.73 ± 0.70	abcd
Promedio	5.82		3.13		6.28		0.23		5.71		0.47		12.70	
C.V. (%)	6.35		4.68		4.81		6.74		1.20		3.92		6.73	
p-valor	0.2924		<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001		0.0069		<0.0001	
Límite inferior 0.05	5.67		3.01		5.93		0.22		5.64		0.46		12.06	
Límite superior 0.05	5.97		3.25		6.64		0.24		5.78		0.48		13.33	

Letras distintas indican significancia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05)

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021)

4.3. Cadmio

Según el análisis de varianza (ADEVA) del (Anexo L), referente al contenido de cadmio, mostró que existe diferencias altamente significativas para el tiempo de fermentación (Factor A), también existió diferencias significativas para la interacción A x B y en la aplicación de levaduras y enzimas no existió diferencia significativa.

4.3.1. Tiempo de fermentación

En el análisis de varianza (ADEVA), referente al contenido de cadmio en las almendras de cacao muestra que existió diferencias altamente significativas para el Factor A (tiempos de fermentación 48, 96 y 120 h).

En la investigación realizada por Sinche (2011, pp.42-43), indica que el tiempo de fermentación depende de la genética, el método de fermentación y la temperatura. Es así que la fermentación puede ir desde las 96 hasta 192 h. Álvarez (2019), determinó 120 h de fermentación para cacao nativo orgánico. Santa (2019) y Teneda (2016), señalan que la fermentación debe durar por lo menos 120 h y permita una serie de cambios fisicoquímicos al interior y exterior de las almendras de cacao. Arvelo *et al.* (2017, p.85), afirma que la fermentación se da entre las 120 y 144 h con remociones de la masa al segundo, cuarto y quinto día para oxigenar y homogenizar la masa. Asimismo Olarte y Rincon (2019), estableció que el clon FTA-4 requiere 144 h para una óptima fermentación.

Por otra parte Erazo y Mendoza (2015, p.70-72), durante su investigación aplicación de *Lactobacillus fermentum* en la fermentación del cacao CCN-51, afirman que a los 72 h las almendras alcanzaron una buena fermentación. Palacios (2008), considera que el cacao Nacional completa la fermentación a los 96 h con remociones de la masa cada 48 h. Rosero (2017), asegura que el tiempo de fermentación está estrechamente relacionado con la variedad de cacao e indica que en cacao Nacional la fermentación debe durar entre 96 y 120 h. Lara (2017), fermentó almendras de cacao Nacional durante 96 h y evaluó distintos métodos de secado, finalmente redujo el contenido de cadmio.

Como resultado de esta investigación se obtuvo el menor contenido de cadmio al fermentar las almendras de cacao por 120 h, con un promedio de 0.20 mg.kg⁻¹. Estos valores concuerdan con Falcon (2019), quien sostiene, a medida que aumenta el porcentaje de fermentación en las almendras de cacao CCN-51, disminuye el contenido de cadmio. Cabe recalcar que el grado de

fermentación, es proporcional al tiempo de fermentación, por lo que a mayor tiempo de fermentación aumenta el grado de fermentación de las almendras de cacao.

4.3.2. Adición de cultivo iniciador

Respecto a la utilización de levaduras y enzimas durante la fermentación de las almendras de cacao, se puede apreciar que no existe diferencia estadística debido a que se hallaron valores promedios de cadmio para los testigos 0.24 mg.kg^{-1} y el menor contenido en tratamientos con levadura y enzimas 0.22 mg.kg^{-1} .

Se ha catalogado a las levaduras como biosorbentes ante diversos metales. En varias investigaciones se propuso el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como un biosorbente. La captación de metales pesados en estos microorganismos ocurre mediante transporte activo, con fines metabólicos, así como el transporte pasivo y retención de especies químicas por los elementos presentes en la pared celular. La *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de absorber metales pesados en sus paredes celulares mediante péptidoglucanos, polisacáridos, glicoproteínas, flavonoides, polialginatos, otros, estos compuestos orgánicos son capaces de secuestrar e intercambiar iones metálicos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* interviene durante la fermentación del cacao, al incrementar su población esta podría mejorar la absorción de cadmio (Falcon, 2019, pp.31-33).

Durante la fermentación ocurren ciertos cambios en las enzimas que actúan sobre las proteínas y polifenoles (Larez *et al.*, 2013). Los macroelementos constituyen las estructuras elementales como proteínas, aminoácidos, enzimas y otros (Falcon, 2019, pp.31-33). Arvelo *et al.* (2017), sostiene que los macro y micronutrientes de las almendras de cacao pueden variar en función del tipo de grano, fermentación, secado y el procesamiento. Según la investigación realizada por Falcon (2019, pp.31-33), existe correlación positiva entre el cadmio y los macroelementos como potasio, magnesio y fósforo; aduciendo que probablemente esté relacionado con la presencia de cadmio.

Falcon (2019) y Weisburger (2001), deducen que durante la fermentación del cacao se elimina del 10 al 20 % de los compuestos solubles y probablemente esta merma se da por la pérdida de líquidos drenados durante la fermentación. Durante la fermentación de las almendras de cacao, la enzima polifenol oxidasa actúa en el interior de los cotiledones y degrada una serie de compuestos orgánicos, provocando un drenaje de los líquidos hacia el exterior, donde probablemente estén transportando nutrientes entre macro y microelementos incluyendo el cadmio (Weisburger, 2001,891-895). Sin embargo, durante la degradación enzimática el pH es fundamental, debido a

que las enzimas se activan e inactivan en función del pH. Las almendras bien fermentadas tienen un valor de pH entre 4.5 y 5.4.

Por otra parte Diaz *et al.*, (2012, p.5), sostiene que la adición de enzimas polifenol oxidasas favorece el rompimiento de las glicoproteínas, formándose azúcares y permitiendo un mayor tiempo de acción de las levaduras.

4.3.3. Interacción entre el tiempo de fermentación y levaduras y enzimas

En la interacción de los Factores A x B (tiempo de fermentación con levaduras y enzimas), el contenido de cadmio en las almendras de cacao, se encontró diferencias significativas con un $p < 0.05$. En la Tabla 6-4 se observa que el T3 (fermentación 120 h testigo 3) presentó el menor contenido de cadmio $0.20 \pm 0.00 \text{ mg.kg}^{-1}$. Mientras que, el T1 (fermentación 48 h testigo 1) presentó el mayor contenido de cadmio $0.27 \pm 0.02 \text{ mg.kg}^{-1}$. Sin embargo los T9, T8 y T6 con $0.21 \pm 0.01 \text{ mg.kg}^{-1}$ son estadísticamente iguales al contenido de cadmio del tratamiento T3.

En el estudio realizado por Armijos (2019), las almendras presentaron niveles de cadmio entre $1.93 \text{ mg.kg}^{-1} \pm 0.96$ en cacao Nacional y $1.21 \text{ mg.kg}^{-1} \pm 0.47$ en CCN-51. También en siete provincias del Ecuador se identificó 0.90 ppm en el contenido de cadmio para almendras de cacao seco (Argüello *et al.*, 2019). Así mismo Romero *et al.* (2019), sostiene que el mayor problema de cadmio radica en el litoral ecuatoriano y obtuvo las medias más altas en Guayas 1.73 mg.kg^{-1} , Esmeraldas 1.22 mg.kg^{-1} y Los Ríos 0.89 mg.kg^{-1} . Lo que difiere de Alvarez (2021), en cuanto a la provincia de Los Ríos donde determinó un promedio de 0.57 mg.kg^{-1} , con un mínimo de 0.23 mg.kg^{-1} y máximo de 1.23 mg.kg^{-1} .

Intriago *et al.* (2019, p.18), plantea que durante la fermentación y secado de las almendras de cacao puede disminuir la concentración de cadmio. Por el contrario Lanza *et al.* (2016, 109-110), no halló diferencias significativas en las concentraciones de cadmio entre almendras fermentadas, no fermentadas y tipo de recipiente, afirmando que estas se ven afectadas por el tipo de suelo, agua de riego y uso de fertilizantes. Sin embargo, el mismo autor señala que el uso de recipientes de madera tiende a reducir el contenido de cadmio de las almendras de cacao.

Durante la fermentación existe una disminución del cadmio debido a la pérdida de agua con sólidos solubles totales, transformación de azúcares en compuestos anaeróbicos y aeróbicos que permiten la pérdida de metales pesados (Intriago *et al.* 2019). Florida *et al.* (2018), analizó 20 muestras de almendras de cacao y encontró un contenido medio de 0.98 mg.kg^{-1} . Mientras que Pavicich (2019), halló concentraciones de 0.35 mg.kg^{-1} de cadmio durante su investigación.

Huamaní y Huauya (2018), reportaron valores entre 0.84 mg.kg^{-1} y 3.172 mg.kg^{-1} de cadmio en almendras de cacao orgánico en Perú. Por otra parte Zambrano (2018), identificó valores entre $0.10 \text{ mg.kg}^{-1} \pm 0.000$ y $0.28 \text{ mg.kg}^{-1} \pm 0.007$ en el estudio de contenido de cadmio del cacao Nacional en ocho zonas del Ecuador y con tres tipos de secado.

En esta investigación los contenidos de cadmio en las muestras analizadas no superan los límites permisibles del Reglamento de la Comisión Europea (2014) donde establece como contenido máximo de cadmio 0.8 mg.k^{-1} . Se aduce que el T3 es el mejor tratamiento seguido del T9, T8 y T6 por presentar los menores promedios (0.21 ± 0.01) en cuanto al contenido de cadmio.

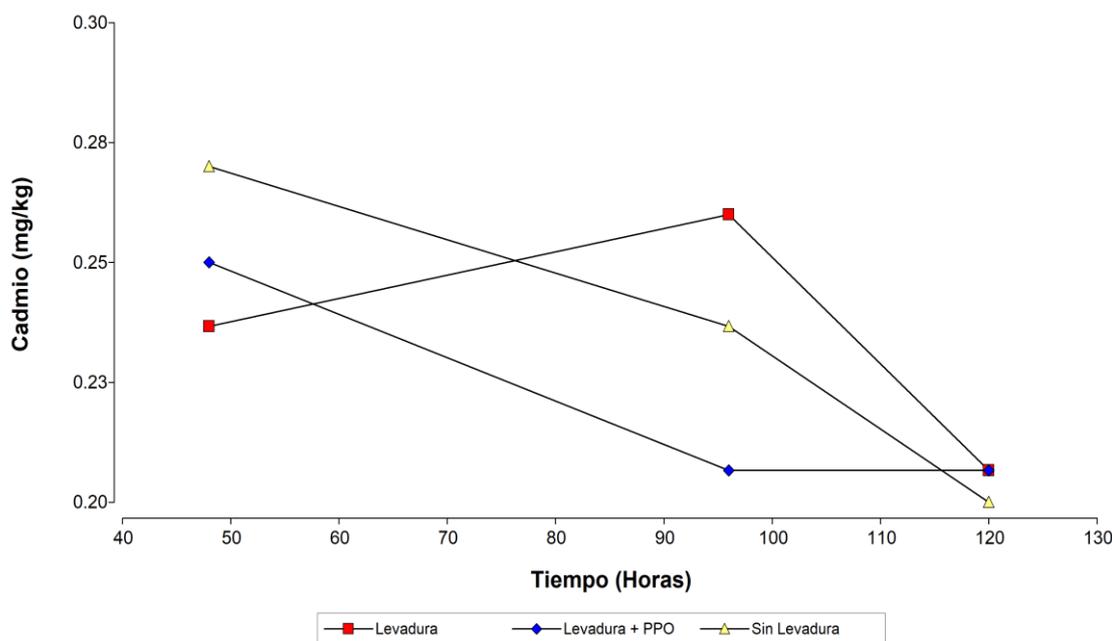


Figura 2-4: Interacción entre tiempos de fermentación por levaduras y enzimas.

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021).

4.3.4. *Contraste ortogonal entre los tratamientos de cadmio*

En el estudio se estableció comparaciones ortogonales a priori para el cadmio, donde se comparó los testigos (T1, T2 y T3) versus todos (T4, T5, T6, T7, T8 y T9), también los tratamientos con levadura (T4, T5 y T6) versus el uso de levaduras y enzimas (T7, T8 y T9).

Para el componente cadmio en las almendras de cacao seco en una primera comparación se evidenció que no hay diferencias estadísticas $p > 0.05$ en el contraste testigos versus todos los tratamientos, es decir son estadísticamente iguales entre las muestras. Del mismo modo al contrastar el uso de levaduras versus la aplicación de levaduras y enzimas se demostró que fueron significativamente iguales.

4.4. Contrastes ortogonales de las variables fisicoquímicas de las almendras de cacao

En la Tabla 7-4: se observa los contrastes ortogonales para las variables fisicoquímicas, que señala diferencia significativa ($p < 0.05$) para el porcentaje de acidez de fermentación en el segundo contraste entre los tratamientos con adición de levaduras (T4, T5, T6) con 0.56 ± 0.08 % y tratamientos con adición de enzimas (T7, T8, T9) con 0.70 ± 0.16 %. Mientras que, el porcentaje de acidez de almendra seca muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en la primera comparación entre los tratamientos testigos (T1, T2, T3) con 0.46 ± 0.03 % y los tratamientos con adición de enzimas y levaduras (T4, T5, T6, T7, T8, T9) con 0.47 ± 0.02 %. Igualmente para el segundo contraste el porcentaje de acidez de almendra mostro diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con adición de levaduras con 0.46 ± 0.02 % y los tratamientos con adición de enzimas con 0.49 ± 0.02 %.

Los tratamientos con adición de levaduras mostraron el menor porcentaje de acidez de fermentación. Según Pineda *et al.* (2012); Medina *et al.* (2020), esta disminución en el porcentaje de acidez puede ocurrir por las reacciones fermentativas que se producen debido a la acción microbiológica sobre los azúcares presentes en el mucílago y estas producen altos niveles de ácido acético, responsables de la acidificación de las almendras. Además, Perea *et al.* (2011), manifiesta que el porcentaje de acidez en las almendras de cacao depende del proceso de fermentación y el contenido de mucílago.

Por otra parte, el menor porcentaje de acidez en las almendras secas se reportó en los tratamientos testigos. En el estudio realizado por Álvarez *et al.* (2010); Nogales *et al.* (2004), observaron una disminución significativa de la acidez al comparar las almendras durante la fermentación y las almendras secas, atribuyendo esta merma principalmente al secado que tiene efecto sobre los ácidos orgánicos volátiles y a la formación de compuestos no volátiles precursores del flavor. También, el secado permite completar el proceso oxidativo producido durante la fermentación, que es fundamental en la reducción de la acidez de las almendras (Lares *et al.*, 2013).

Para la variable porcentaje de proteína también se encontró diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre los testigos con 14.30 ± 1.11 % y los tratamientos con adición de enzimas y levaduras con 11.89 ± 1.15 %. Del mismo modo para la variable proteína también se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos con adición de levaduras con 12.42 ± 0.91 % y los tratamientos con adición de enzimas con 11.37 ± 1.17 %.

El mayor porcentaje de proteínas se identificó en los tratamientos testigos en contraste a los tratamientos con adición de levaduras. Según Lares *et al.* (2013), sostiene que la disminución del

contenido de proteína en el cacao fermentado se produce por la actividad microbiológica durante el proceso de fermentación, y además, es el sustrato requerido por los microorganismos. A esto se suma el efecto del drenado del mucilago, es decir, el exudado que se produce durante la fermentación de las almendras de cacao que disminuye el contenido de proteína.

En los azúcares totales (glucosa) se evidenció diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre los tratamientos con adición de levaduras con $5.80 \pm 1.12 \text{ g.kg}^{-1}$ y los tratamientos con adición de enzimas con $6.62 \pm 0.90 \text{ g.kg}^{-1}$.

Se deduce que la adición de las PPOs de banano (*Musa paradisiaca*), incrementa el contenido de azúcares en el proceso de fermentación. De forma similar, el contenido de azúcares en la pulpa de las almendras de cacao ayuda al desarrollo de las levaduras durante el proceso de fermentación del cacao, y favorece la fermentación alcohólica, e incrementa la acidez. El crecimiento de los microorganismos está dado por el contenido de azúcares, es decir, que el crecimiento de las levaduras está estrictamente relacionado con el contenido de azúcar. En el resto de las variables evaluadas no se presentó diferencias significativas para los contrastes ortogonales realizados (Tabla 7:4).

Tabla 7-4: Contrastes ortogonales para los tratamientos de las variables fisicoquímicas de las almendras de cacao.

	CONTRASTES									
	T1 T2 T3 vs. Todos					T4 T5 T6 vs. T7 T8 T9				
	GL	SC	F	p - Valor		GL	SC	F	p - Valor	
Acidez (%) fermentación	1	2.7E-03	1.03	0.32	ns	1	0.03	11.38	0.002	*
pH fermentación	1	0.02	0.33	0.57	ns	1	0.10	1.36	0.26	ns
Humedad (%)	1	0.09	0.64	0.43	ns	1	0.03	0.24	0.63	ns
Ceniza (%)	1	3.3E-03	0.15	0.70	ns	1	0.04	1.82	0.19	ns
Glucosa (g.kg⁻¹)	1	0.32	3.49	0.08	ns	1	3.03	33.16	<0.0001	**
Cadmio (mg.kg⁻¹)	1	3.6E-04	1.51	0.24	ns	1	8.0E-04	3.32	0.09	ns
pH almendra	1	1.6E-03	0.33	0.57	ns	1	0.01	2.83	0.11	ns
Acidez almendra (%)	1	2.0E-03	5.98	0.02	*	1	4.3E-04	1.31	0.009	**
Proteína (%)	1	34.85	47.72	<0.0001	**	1	4.91	6.72	0.02	*

* indica significancia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$), ** altamente significativo $p < 0.01$, ns = no significativo

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021).

4.5. Análisis sensorial de la pasta de cacao

En el perfil sabor a cacao de acuerdo con la escala hedónica de la prueba descriptiva, se identificó la mayor intensidad 8.07 en el T5 (fermentación 96 h + levadura madre). Mientras que el T2 (fermentación 96 h testigo 2) presentó un nivel medio de 5.45. En la Tabla 9-4: se puede apreciar que el sabor a cacao presenta mayor intensidad en todos los tratamientos con respecto a los sabores específicos, los valores obtenidos sobrepasaron a los obtenidos por Solórzano *et al.* (2015), quien obtuvo un promedio de 3.50 en el sabor a cacao de distintas zonas productoras.

Por otra parte, Bermúdez y Mendoza (2016, p.31), sostienen que el sabor intenso a cacao es característico del cacao Nacional, además demuestra que el proceso de post cosecha fue el adecuado. Mientras que Olarte y Rincon (2019), atribuyen que en las muestras con secado natural la percepción del sabor a cacao fue mayor. Por otra parte Solórzano *et al.* (2015, p.42-44), afirma que el porcentaje de almendras violeta y pizarra pueden influenciar en los perfiles de calidad final de las muestras, es decir a medida que disminuye el porcentaje de fermentación reduce los perfiles del sabor.

Con respecto al sabor floral, sobresalió el T2 (fermentación 96 h testigo 2) seguido del T3 (fermentación 120 h testigo 3) con intensidad media, superando los valores obtenidos por Solórzano *et al.* (2015) en distintas zonas productoras excepto la asociación Miss Ecuador que presentó un valor de 4.20. Los valores obtenidos en esta investigación son similares a los valores encontrados por Vera *et al.* (2014), quien destacó el clon DIRCYT-C114 con una intensidad de sabor floral media. También Guevara (2017), presentó valores similares en la evaluación de pasta de cacao en el estudio realizado con adición de enzimas y levadura madre para mejorar las características organolépticas del cacao. Así mismo Quevedo *et al.* (2018), en el sabor floral obtuvo el mayor valor (2.0) en el tratamiento balde plástico y según la escala de calificación lo identificó como bueno. El sabor floral constituye uno de los principales atributos del cacao nacional (Bermúdez y Mendoza, 2016; Vera *et al.*, 2014).

El perfil frutal se destacó en el T7 (fermentación 48 h + levadura madre + PPO) con escala media, estos valores son superiores a los hallados por Olarte y Rincon (2019), durante la evaluación sensorial del clon FTA-4, quienes a las 144 h de fermentación obtuvieron mayor percepción del sabor frutal, por lo que dedujeron que el tiempo de fermentación influye en percepción del sabor frutal, lo que concuerda con esta investigación. El perfil frutal del cacao nacional está ligado al medio ambiente e higroscopia de la almendra, que proviene de plantas cercanas a árboles frutales y también el manejo pos cosecha (Cristiaens *et al.*, 2014) debido a que las almendras sufren transformaciones por efecto de la temperatura durante la fermentación y el secado. Además

Portillo *et al.* (2014), asegura el sabor frutal se relaciona con los ésteres. También el sabor frutal pudo estar asociado a adición de enzimas provenientes del banano.

El sabor a nuez sobresalió en el T3 (fermentación 120 h testigo 3), valor que es superior a los encontrados por Cedeño (2020); Solórzano *et al.* (2015), con valores de 1.17 y 3.00 respectivamente. Por otra parte Olarte y Rincon (2019), encontraron el mayor valor (4.00) a las 144 h de fermentación con secado artificial. Por otra parte Portillo *et al.* (2014), manifiesta que el complejo polipéptidos-fenoles y pirazinas intervienen en el sabor a nuez.

El sabor a caramelo fue más intenso en el T2 (fermentación 96 h testigo 2) sobrepasando a los valores hallados por (Solórzano *et al.*, 2015; Vera *et al.*, 2014). Las diferencias halladas en la calidad de la fermentación explican los vínculos entre el sabor a cacao, con el sabor a floral, frutal, nuez y caramelo, las almendras mejor fermentadas no solo desarrollan mayor intensidad en el sabor a cacao sino también notas sensoriales aromáticas característico del cacao nacional relacionadas con su base genética (Cristiaens *et al.*, 2014; Vera *et al.*, 2014).

El T8 (fermentación 96 h + levadura madre + PPO) presentó la menor intensidad (5.28) con respecto al sabor amargo similares a los encontrados por Bermúdez y Mendoza (2016). Por otra parte Otárola (2018); Quevedo *et al.* (2018); Vázquez *et al.* (2016), sostienen que el contenido de teofilina, teobromina y cafeína son responsables del sabor amargo en las almendras de cacao.

En el sabor astringente el menor valor lo presentó el T7 (fermentación 48 h + levadura madre + PPO) valor que es menor a los obtenidos por Vera *et al.* (2014) quien obtuvo alta intensidad del sabor amargo en los tratamientos DIRCYT-C103 y DIRCYT-C107. Mientras que el T5 (fermentación 96 h + levadura madre) obtuvo un valor medio. Bermúdez y Mendoza (2016), sostienen que la fermentación es fundamental para reducir los sabores básicos. Del mismo modo Otárola (2018, p.150), sostiene que la astringencia forma parte del complejo del sabor del chocolate, pero la excesiva presencia llega a ser desagradable y no puede eliminarse mediante el procesamiento industrial normal.

Por otra parte Erazo y Mendoza (2015); Quevedo *et al.* (2018); Vázquez *et al.* (2016), manifiestan que la astringencia de las almendras de cacao está relacionada con el contenido de polifenoles, antocianinas y epitecatequinas. Cabe mencionar que en las almendras violetas la intensidad de astringencia está asociada a un mayor contenido de polifenoles totales, si la fermentación es completa el contenido de polifenoles llega a reducirse hasta un 40 %.

Para el sabor ácido se identificó una intensidad media en el T1 (fermentación 48 h testigo 1) con 3.42, mientras un valor medio de 5.65 lo registró el tratamiento T8 (fermentación 96 h + levadura madre + PPO), los demás tratamientos poseen valores similares. Sin embargo los valores obtenidos en esta investigación son inferiores a los encontrados por (OlarTE y Rincon, 2019) quien halló valores de 6.0 y 7.0 para el sabor ácido.

Del mismo modo para los perfiles frutal, amargo y astringencia se observa mejores resultados en los tratamientos con adición de levaduras y enzimas. Además varias de los atributos sensoriales se ven influenciadas por el tiempo de fermentación lo que concuerda con (OlarTE y Rincon, 2019; Vázquez *et al.*, 2016).

Por otra parte Otárola (2018), deduce que la adición de levadura durante la fermentación del cacao produce resultados favorables en cuanto al sabor y aroma del cacao CCN-51, tomando en cuenta la gran cantidad de mucilago que contiene. Así mismo Guevara (2017, p.46), sostiene que la adición de enzimas y *Saccharomyces cerevisiae* a las almendras de cacao incidió positivamente sobre las características organolépticas de las almendras, demostrando que los tratamientos donde se adicionó los aditivos presentaron mejores atributos en comparación con el testigo. La calidad y el tiempo de fermentación podría explicar las posibles relaciones entre el sabor a cacao con floral, frutal y nuez (Vera *et al.*, 2014).

Tabla 8-4: Análisis de la varianza de los sabores de las muestras del licor de cacao.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor F	Valor-p
Sabor a cacao	8	1,17	0,3270
Sabor floral	8	1,06	0,3977
Sabor frutal	8	0,99	0,4536
Sabor a nuez	8	0,95	0,4795
Sabor a caramelo	8	0,67	0,7153
Sabor amargo	8	0,67	0,7148
Sabor astringente	8	0,48	0,8667
Sabor ácido	8	0,72	0,6713

Letras distintas indican significancia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05)

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021)

Tabla 9-4: Resultado del análisis sensorial de los sabores de las muestras del licor de cacao.

Tratamiento	Sabores (0-10)															
	Cacao		Floral		Frutal		Nuez		Caramelo		Amargo		Astringente		Ácido	
T1	7.93	a	1.63	a	3.47	a	2.46	a	1.14	a	6.61	a	4.44	a	3.42	a
T2	5.45	a	5.45	a	1.86	a	2.23	a	1.46	a	5.49	a	4.75	a	5.01	a
T3	6.27	a	3.45	a	2.46	a	3.86	a	0.75	a	6.13	a	5.07	a	5.41	a
T4	7.14	a	1.86	a	1.23	a	2.80	a	1.37	a	7.28	a	5.83	a	4.14	a
T5	8.07	a	1.99	a	3.22	a	1.22	a	0.53	a	5.94	a	5.91	a	5.60	a
T6	7.64	a	3.16	a	2.76	a	2.23	a	1.00	a	5.31	a	4.53	a	3.90	a
T7	7.47	a	3.20	a	3.54	a	1.82	a	0.90	a	5.44	a	4.18	a	3.64	a
T8	6.31	a	2.33	a	3.33	a	2.39	a	0.68	a	5.28	a	5.64	a	5.65	a
T9	7.14	a	3.43	a	3.07	a	2.63	a	1.06	a	5.31	a	4.26	a	3.97	a
Promedio	7.05		2.54		2.77		2.40		0.99		5.86		4.95		4.53	
p-valor	0.3270		0.3977		0.4536		0.4795		0.7153		0.7148		0.8667		0.6713	
Límite inferior 0.05	6.51		2.05		2.24		1.91		0.74		5.31		4.32		3.84	
Límite superior 0.05	7.58		3.03		3.30		2.89		1.23		6.42		5.59		5.21	

Letras distintas indican significancia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021)

4.6. Análisis de componentes principales de los perfiles del sabor de la pasta de cacao

En la Figura 3-4: se puede apreciar una variabilidad total de 58.3 % en las nueve variables sensoriales analizadas y el cadmio, definido por la componente principal 1 que se encuentra caracterizada por las variables frutal y floral, mientras que la componente principal 2 tiende a mostrar una interesante relación entre el sabor a cacao y el cadmio. El tratamiento T7 presentó el mayor vigor frutal, así mismo los tratamientos T6 y T9 se agrupan por la presencia del perfil floral y bajo en el contenido de cadmio, el T8 presenta tonalidades floral/ácido. Se identificó que el T5 presenta la mayor intensidad a cacao. En cuanto al contenido de cadmio se puede apreciar que el T1 presenta el mayor valor seguido del T5, el T3 fue una mezcla de perfiles ácido/nuez y con el menor contenido de cadmio. Los perfiles astringencia/caramelo se hallan presentes en el T2 y el T4 resulto con mayor amargor.

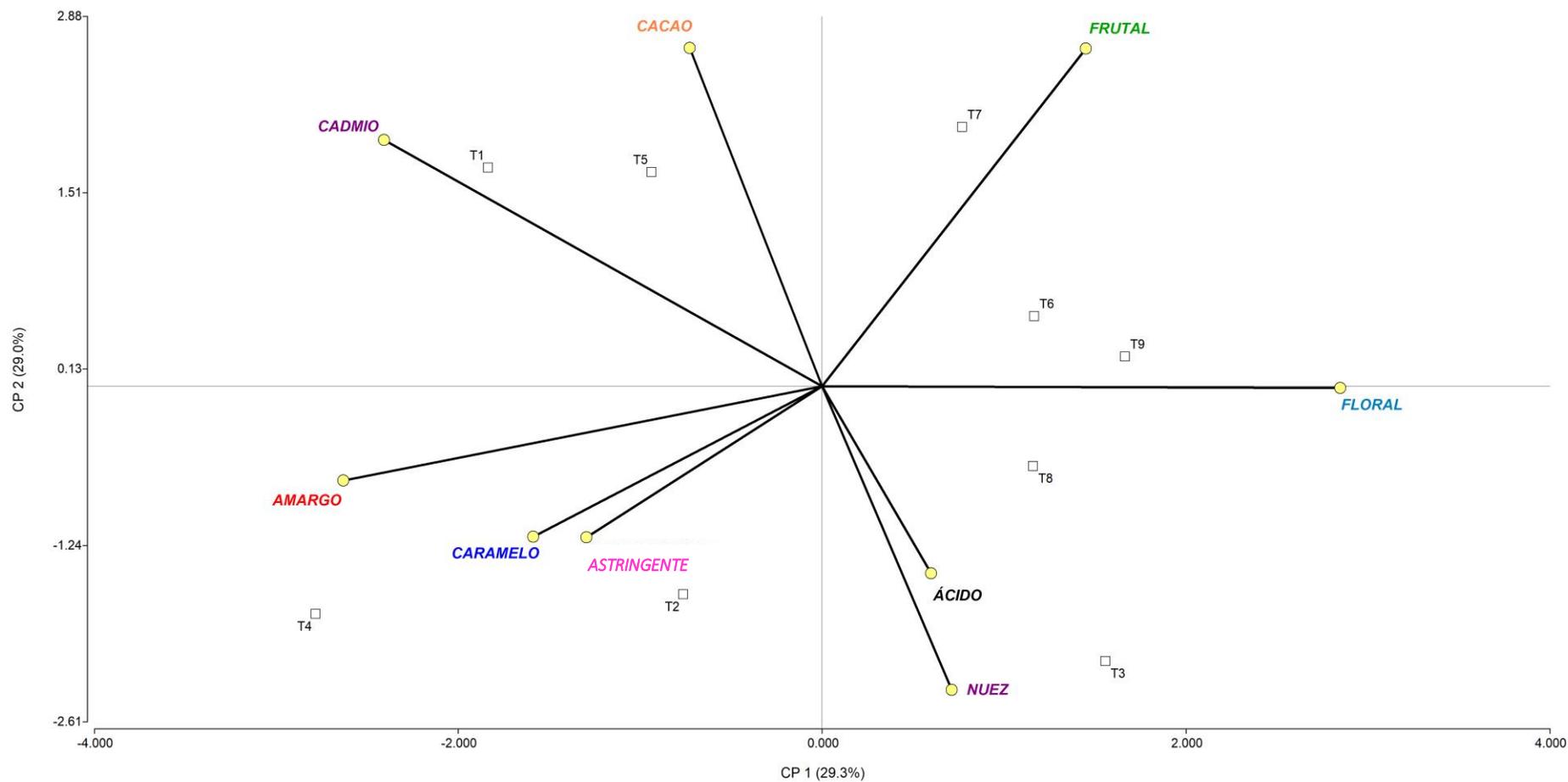


Figura 3-4: Análisis de componentes principales de los perfiles del sabor de la pasta de cacao.

Realizado por: Morejón Lucio Rocio (2021)

4.7. Análisis de componentes principales de todas las variables fisicoquímicas y sensoriales.

En la Figura 4-4: se puede apreciar una variabilidad total de 56.2 % en las 16 variables fisicoquímicas y sensoriales evaluadas, en la componente principal 1 se encuentran las variables sabor floral, acidez, y buena fermentación, mientras que la componente principal 2 se agrupan las variables sabor a cacao, cadmio, pH y cenizas. Los tratamientos T9, T8 y T6 se agrupan por presentar buena fermentación, una tonalidad floral/ácido y acidez aceptable producto del ácido acético, además muestran bajo contenido de cadmio. Se puede apreciar que el T1 presenta un alto contenido de cenizas, pH y cadmio. Cabe resaltar que el cadmio muestra una interesante relación con el pH y el perfil cacao. El tratamiento T5 se destaca por presentar una buena combinación para los sabores cacao y frutal en intensidades altas, también se evidenció un bajo porcentaje de humedad. El T3 registró el menor contenido de cadmio. El mayor porcentaje de proteína se registró en el T2, además de un perfil caramelo. El T7 presentó alto contenido de glucosa y un buen nivel de sabor frutal.

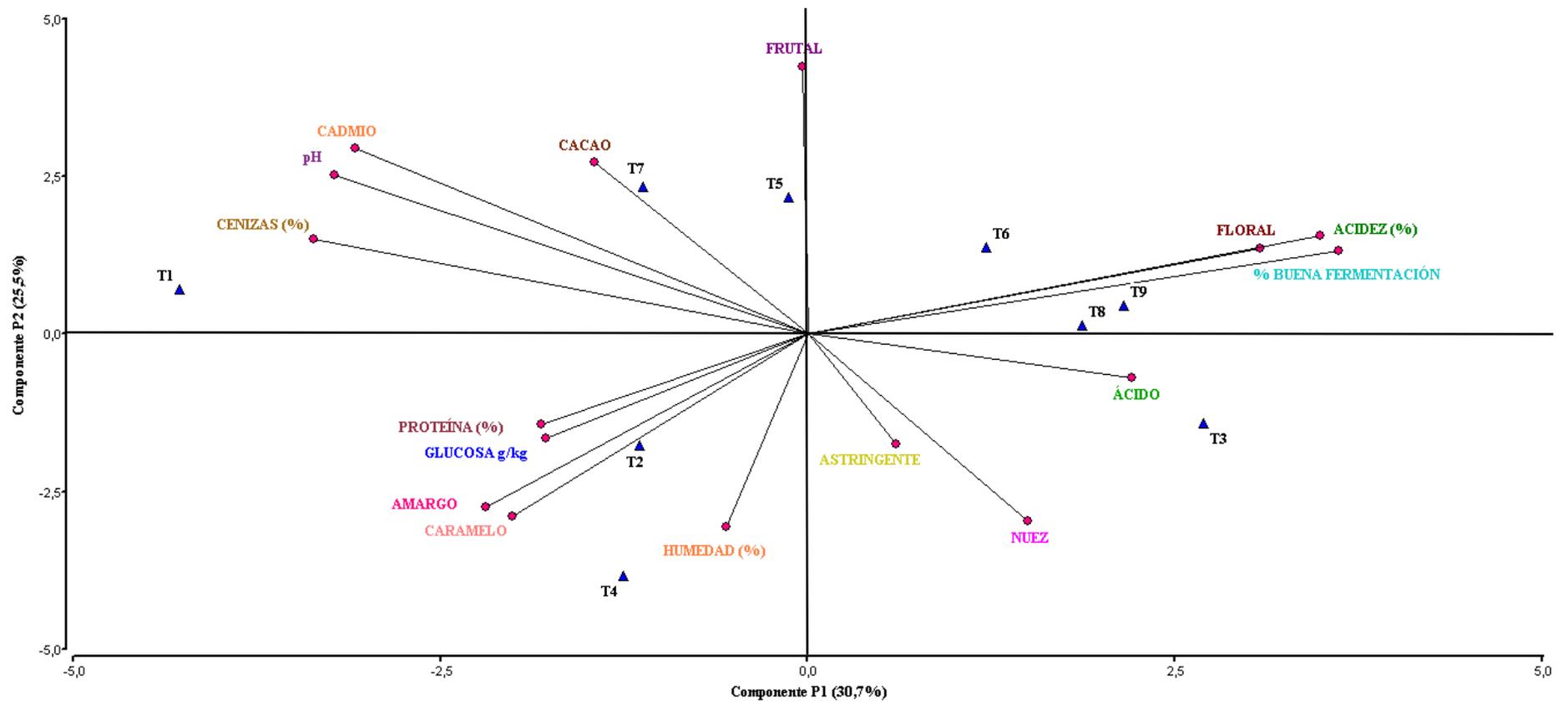


Figura 4-4: Análisis de componentes principales las variables fisicoquímicas y sensoriales.

Realizado por: Morejón Lucio Rocio (2021).

CONCLUSIONES

- De acuerdo, a los resultados de esta investigación, el T9 presentó el mejor porcentaje de fermentación. Mientras que el mayor contenido azúcares totales (glucosa) se obtuvo en el T7 (fermentación 48 h + levadura madre + PPO).
- La interacción entre tiempos de fermentación y levaduras y enzimas se concluye, que el aumento en el tiempo de fermentación y la adición de levadura y enzimas permitieron una disminución del contenido de cadmio en las almendras de cacao seco.
- Para el efecto principal de tiempos de fermentación, el menor contenido de cadmio en las almendras de cacao se obtiene al fermentar por 120 horas.
- Los valores de pH obtenidos en esta investigación disminuyen con el tiempo de fermentación.
- La evaluación sensorial demostró que el sabor a cacao fue el atributo con mayor puntaje en todos los tratamientos evaluados. En general, todos los tratamientos analizados se caracterizaron por tener una acidez, astringencia y amargor moderado. Por otra parte la adición de enzimas y levaduras en las cantidades utilizadas en esta investigación no afectó la calidad sensorial.

RECOMENDACIONES

- Evaluar otros métodos enzimáticos con microorganismos eficientes, con el fin obtener mayor disminución del cadmio en las almendras de cacao, sin llegar alterar la calidad sensorial.
- Analizar el efecto de los azúcares totales presentes en las almendras de cacao durante el proceso de fermentación.
- Realizar la fermentación del cacao utilizando otros tipos de maderas blancas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, S. P. C., Moreno, P. A. V., Gómez, L. A. S., & Cárdenas, O. E. (2017). Cadmium voltametric quantification in table chocolate produced in Chiquinquirá-Boyacá, Colombia. *Acta Agronomica*, 66(2), 172–177. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n2.58476>
- Aguilar, M., Strehaiano, P., Delia, M., & Escudero, B. (2015). Influencia de la concentración inicial de glucosa en la producción de etanol y biomasa de *Brettanomyces bruxellensis*. *Instituto Tecnológico de Veracruz*, 29, 345701. https://smbb.mx/congresos/smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_II/OII-14.pdf
- Álvarez, C., Tovar, L., García, H., Morillo, F., Sánchez, P., Girón, Cc., & De Farias, A. (2010). Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) usando dos tipos de fermentadores. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 76–87. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3909942>
- Alvarez, J. (2021). *Presencia de cadmio (Cd) en el cacao (Theobroma cacao L.) de exportación*. Universidad Técnica de Babahoyo.
- Álvarez, J. (2018). *Acumulación de metales pesados (Pb y Cd) en almendras de cacao durante el proceso de fermentación y secado*. Instituto Politécnico de Leiria.
- Álvarez, K. (2019). *Optimización y control del proceso de beneficio postcosecha del cacao nativo orgánico (Theobroma cacao L.), en Coopagro Linderos, Morropón, Piura*.
- Alvarez, R. (2008). *Caracterización fisicoquímica y nutricional de almendras del cacao (Theobroma cacao L.) frescas y fermentadas provenientes de la región de Rio Chico, estado Miranda-Venezuela*. January.
- Andrade, J., Rivera, J., Chire, G. C., & Ureña, M. O. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*, 10(4), 1–12. <https://doi.org/10.29019/enfoque.v10n4.462>
- Anecacao. (2019). *Sector exportador de cacao*.
- Arévalo, E., Obando, M., Zúñiga, L., Arévalo, C., Baligar, V., & He, Z. (2016). Metales pesados en suelos de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en tres regiones del Perú. *Ecología Aplicada*, 15(2), 81. <https://doi.org/10.21704/rea.v15i2.747>
- Argüello, D., Chavez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Science of the Total Environment Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans : A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*, 649, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>
- Armijos, I. (2019). *Comparación de los niveles de cadmio en cacao tipo Nacional en la parroquia Río Bonito, provincia de El Oro-Ecuador*. Universidad Técnica de Machala.
- Arvelo, M., González, D., Maroto, S., & Montoya, P. (2017). Manual técnico del cultivo de cacao Buenas prácticas para América Latina. In *Instituto Interamericano de Cooperación para la*

- Agricultura*. file:///C:/Users/usuario/Downloads/BVE17089191e.pdf
- Ayubb, N., Cerra, A., Chamorro, L., & Pérez, A. (2017). Resistencia a cadmio (Cd) de bacterias endófitas y bacterias rizosféricas aisladas a partir de *Oriza sativa* en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(2), 281. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.n2.2017.610>
- Baron, L. (2016). *Perfil del riesgo en inocuidad asociada a la presencia de residuos de cadmio en cacao (Theobroma cacao L.)*. 80. http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/21262/43112010_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Barraza, F., Schreck, E., L, T., Uzu, G. C., L, F., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., & Maurice, L. (2017). *Contaminación ambiental bioacumulación cadmio y bioaccesibilidad gástrico en el cacao : Un. 229*, 950–963. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>
- Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., & Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, 229, 950–963. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>
- Benjamin, F. (2011). *Las enzimas* (Vol. 2). <https://addi.ehu.es/bitstream/10810/14292/4/4-Cap?tulo I. Las enzimas.pdf>
- Bermúdez, K., & Mendoza, C. (2016). *Post-cosecha y secado del grano del cacao Nacional fino y de aroma para la determinación de perfiles físicos, bromatológicos y organolépticos. 72*. <http://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/562>
- Borja, K., Vite, H., Garzón, V., & Carvajal, H. (2021). Análisis de las exportaciones del cacao ecuatoriano en grano en el periodo 2008 al 2018. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 4(1), 147–155.
- Brunetto, M. del R., Orozco, W., Delgado, Y., Clavijo, S., Gallignani, M., Ayala, C., & Zambrano, A. (2014). Desarrollo de un método analítico para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de cacaos criollos venezolanos. *Revista Cubana de Química*, XXVI, 181–201.
- Camisón, C., & Cruz, S. (2006). *Gestión de la Calidad: Conceptos, enfoques, modelos y sistemas* (A. Cañizal (ed.)).
- Camu, N., Winter, T. D. W., Addo, S., Takrama, J., Bernaert, H., & De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science Of Food and Agriculture*, 88(May), 2288–2297. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- CAOBISCO/AEC/FCC. (2015). Chocolate and Cocoa Industry Quality Requirements. In M. J. End & R. Dand (Eds.), *Revista Brasileira de Medicina* (Vol. 69, Issue 12).
- Carchi, M. (2016). *Efecto de biorreguladores y anillado sobre el rendimiento y calidad del fruto*

- del cacao (Theobroma cacao L.)*. Universidad de Guayaquil.
- Cardenas, Y. (2017). *Rendimiento de alcohol del mucílago de cacao (Theobroma cacao L.) de los clones CCN-51 E IMC-67 CON EL USO DE LEVADURA COMERCIAL (Saccharomyces cerevisiae Meyen ex E.C. Hansen)*. Universidad Nacional de Ucayali.
- Casa, N. M., Río, L. A., & Sandalio, L. M. (2008). *Toxicidad del Cadmio en Plantas*. 17(3), 139–146.
- Castro, M., Hernández, J. A., Marcilla, S., Córdova, J. S., Solari, F. A., & Chire, G. C. (2017). EFECTO DEL CONTENIDO DE GRASA EN LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Theobroma cacao L.* “CACAO.” *Ciencia e Investigación*, 19(1), 19–23. <https://doi.org/10.15381/ci.v19i1.13623>
- Cedeño, P., Altamirano, A., Duicela, L., & Cedeño, G. (2019). *Alternativa de remoción de cadmio en granos de cacao*. 1–8.
- Cedeño, W. (2020). *Remoción de cadmio en almendras de cacao en proceso poscosecha con agentes quelantes, medios ácidos, lavado y presecado*.
- Chávez, A. (2020). Efecto de las condiciones de fermentación y secado, en las características Físico químicas del cacao (*Theobroma cacao L.*) cultivar CCNN 51. *Universidad Nacional Agraria*.
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., & Baligar, V. C. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*, 150, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>
- Codex Alimentarius. (2018). *Contaminantes de los alimentos*.
- Coello, J. M. (2011). Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. In *Espol*. ESCUELA Superior Politécnica del Litoral.
- Comisión Europea. (2014). Reglamento (UE) No 488/2014 de la Comisión de 12 de mayo de 2014. In *EFSA Journal* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975>
- Corporación Financiera Nacional. (n.d.). *FICHA SECTORIAL : Cacao y Chocolate*.
- Correa, J. (2018). *Efecto de enmiendas cálcicas y orgánicas en la absorción de cadmio en plantones de cacao (Theobroma cacao l.) en la Región San Martín*. Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto.
- Cristiaens, J., Franco, L., Yaksi, E., & Verstrepen, K. (2014). The Fungal Aroma Gene ATF1 Promotes Dispersal of Yeast The The fungal aroma genen ATF1 promotes dispersal of yeast cells through insect vectors. *CellPres*, 9(2), 425–432. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.034>
- Dahiya, S., Karpe, R., Hegde, A. G., & Sharma, R. M. (2005). Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. *Journal of Food Composition*

- and Analysis*, 18(6), 517–522. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.05.002>
- De León, F., Pelayo, C., Escalona, H., Fernández, B., & Pérez, L. (2006). *El aroma de las frutas*. 32–39.
- Del Aguila, E. (2017). Determinación de cadmio y plomo en granos de cacao, frescos, secos y en licor de cacao (*Theobroma cacao*) [Universidad Nacional Agraria de la Selva]. In *Repositorio Institucional - UNAS*. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1269>
- Díaz, L., Pinoargote, M., & Castillo, P. (2012). Análisis de las Características Organolépticas del Chocolate a partir de Cacao CCN51 Tratado Enzimáticamente y Tostado a Diferentes Temperaturas. *Escuela Superior Politécnica Del Litoral (ESPOL)*, 102. <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/21432>
- Echeverry, A., & Reyes, H. (2016a). A. Echeverry y H. Reyes Recibido Agosto 25 de 2015 – Aceptado Febrero 19 de 2016. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 19, 22–32.
- Echeverry, A., & Reyes, H. (2016b). Determination of the concentration of cadmium in a Colombian chocolate with 65% of cocoa, and foreign chocolates with different cocoa percentages. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 10(19), 22–32. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-83672016000100004
- Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., & Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of the Total Environment*, 678, 660–670. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001>
- Erazo, R., & Mendoza, C. (2015). *Evaluación de la aplicación de Lactobacillus fermentum y Acetobacter aceti, en la fermentación del cacao CCN-51 y su efecto en la calidad de las almendras* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10232/3/T-ESPE-002777.pdf>
- Falcon, G. (2019). Cadmio y polifenoles totales en la fermentación de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) clon CCN-51. In *Universidad Nacional Agraria de La Selva*.
- FAO-OMS. (2019). *Comité Del Codex Sobre Contaminantes De Los Alimentos*. 53(9), 1689–1699.
- FAO. (2012). *Manual de Buenas Prácticas Agrícolas para el Productor Hortofrutícola 2 Edición, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Oficina Regional para America Latina y el Caribe*.
- Florida, N., Lineker, S., Melchor, C., & Gómez, R. (2018). *EL pH y la Adsorción de cadmio en almendras de cacao orgánico (Theobroma cacao L .) en Leoncio Prado Huánuco, Perú*. 27(1), 1–8.
- Gaibor, E. I., & Pachacama, R. G. (2017). Diseño e implementación de un secador de semillas de cacao en la hacienda La Esmeralda. In *Universidad Técnica De Cotopaxi* (Vol. 1). <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
- Gara, S. B. (2016). Ecotoxicología del cadmio: riesgo para la salud de la utilización de suelos

- ricos en cadmio. *Universidad Complutense*, 23.
http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/GARA_SANCHEZ_BARRON.pdf
- Gonzalez, C. E. (2017). Evaluación de la concentración mínima aceptable e identificación de metales pesados en el grano de cacao del Ecuador [UTMACH]. In *Utmach*.
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/7751/1/Muñoz.pdf>
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., & Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment*, 612, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>
- Guerra, V. K. (2019). *Evaluación de levaduras a partir de dos variedades de mucílago de cacao (Theobroma cacao) para su uso en procesos fermentativos*.
- Guerrero, C. A. (2009). *Inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (Cavensh valery) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Guevara, K. (2017). “Adición de enzimas y levaduras sobre los cambios químicos y organolépticos del cacao (*Theobroma cacao* L) Clon CCN-51.”
<http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2145/1/T-UTEQ-0024.pdf>
- Huamaní, H., & Huauya, M. (2018). Efecto de materia orgánica en el contenido de cadmio en almendras de cacao orgánico en Perú. *Investigación y Amazonía, Tingo María*, 8(5), 22–26.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, I. (1993). *Manual para análisis de cacao en laboratorio*.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2016). Compendio estadístico. *INEC*.
- Intriago, F. G., Talledo, M. V., Cuenca, G. J., Macías, J. R., Álvarez, J. R., & Menjívar Flores, J. C. (2019). Evaluación del contenido de metales pesados en almendras de cacao (*Theobroma cacao* L) durante el proceso de beneficiado. *Pro Sciences*, 3(26), 17–23.
<https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol3iss26.2019pp17-23>
- Jiménez, C. (2015). Global legal status of cadmium in cacao (*Theobroma cacao*): a fantasy or a reality. *Producción + Limpia*, 10(1), 89–104.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552015000100009&lang=pt
- Jiménez, M. E., & Zambrano, M. L. (2011). Cuantificación de cobre en polifenoloxidasas de frutas tropicales por espectrofotometría de absorción atómica. In *Informacion Tecnologica* (Vol. 22, Issue 2). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000200003>
- Jovellanos, E. (2016). *Estudio del Contenido de Compuestos Bioactivos del Cacao y su aplicación en la Obtención de un Ingrediente Rico en (Poli)fenoles para el Diseño de un Chocolate Enriquecido*. Universidad de Murcia.
- Kruszewski, B., Obiedziński, M. W., & Kowalska, J. (2018). Nickel, cadmium and lead levels in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers.

- Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 127–135.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.012>
- Lanza, J. G., Churión, P. C., Liendo, N. J., & López, V. H. (2016). Evaluación Del Contenido De Metales Pesados En Cacao. *Saber*, 28(1), 106–115.
- Lara, V. (2017). *Evaluación del contenido de cadmio en dos variedades de cacao (Theobroma cacao L.) considerando distintos métodos de secado en la localidad de Luz de América*.
- Lares, M., Gutiérrez, R., Pérez, E., & Álvarez, C. (2012). *Efecto del tostado sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas, composición proximal y perfil de ácidos grasos de la manteca de granos de cacao del estado Miranda, Venezuela*. 12(2), 439–446.
- Lares, M., Pérez, E., Álvarez, C., Perozo, J., & El Khori, S. (2013). Cambios de las propiedades físico-químicas y perfil de ácidos grasos en cacao de Chuao, durante el beneficio. *Agronomía Tropical*, 63(1–2), 37–47.
http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2013000100004&lang=pt
- Llatance, W. O., Saavedra, C. J. G., Castillo, W. G., & Mondragón, E. P. (2018). Bioacumulación de cadmio en el cacao (*Theobroma cacao*) en la Comunidad Nativa de Pakun, Perú. *Revista Forestal Del Perú*, 33(1), 63–75.
http://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/rfp/article/view/1156/pdf_29
- Llerena, K. E., & Uriña, Z. B. (2017). *Uso de cultivos iniciadores (Starter) en la fermentación de cacao tipo Nacional clon 103 y CCN51 en la Estación Experimental Pichilingue ubicada en Quevedo- Provincia de Los Ríos* (Issue 48) [Universidad de Guayaquil].
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/28030/1/TESIS-FINAL-MARZO.pdf>
- Loureiro, G., Araujo, Q., Sodré, G., Valle, R., Souza, J., Ramos, E., Comerford, N., & Grierson, P. (2016). Cacao Quality: Highlighting Selected Attributes. *Food Reviews International*, 9129(April). <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175011>
- Loureiro, G., Araujo, Q., Valle, R., Andrade, G., & Moreira, M. (2017). *Influencia de factores agroambientales sobre la calidad del clon de cacao (Theobroma cacao L.) PH-16 en la región cacaotera de Bahia, Brasil*. 4(12), 579–587.
<https://doi.org/10.19136/era.a4n12.1274>
- Luna, T. (2018). *Producción de etanol a partir del mucílago de cacao (Theobroma cacao) mediante fermentación alcohólica*.
- Martínez, K., Souza, V., Bucio, L., Gómez, L., & Gutiérrez, M. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicológica Argentina*, 21(1), 33–49.
- Medina, D., Zuñiga, M., Segobia, S., Cadme, M., & Rojas, L. (2020). “Modificación bioquímica de las almendras de cacao en la etapa de postcosecha con la adición de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y melaza, para mejorar su calidad.” *RIINN*, 0474.
- Mejía, J., Coronel, R., Gálvez, D., & Vázquez, A. (2018). *Efecto de la fermentación y del tostado*

- sobre el contenido de aminos biogénicas en semillas de cacao *Effect of fermentation and roasting on the content of biogenic amines in cacao beans Aportación a la literatura científica*. 3(12), 958–979. <https://doi.org/10.19230/jonnpr.2778>
- Meter, A., Atkinson, R., & Laliberte, B. (2019). Cadmio en el cacao de América Latina y el Caribe – Análisis de la investigación y soluciones potenciales para la mitigación. In *Biodiversity International* (Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). *Cifras Agroproductivas*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
- Ministerio de Salud Pública. (2017). *Estrategía Nacional para la atención integral del Cáncer en el Ecuador*. 593 2.
- Mite, F., Carrillo, M., & Durando, W. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas de Ecuador. *Xii Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo, November*, 17–19.
- Montaño, N. M., Sandoval, A. L., Camargo, S. L., & Sánchez, J. M. (2010). Los microorganismos : pequeños gigantes. *Revista Ciencia y Cultura Elementos*, 77(0187–9073), 15–23. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29411989003.pdf>
- Morante, J., & Agnieszka, A. (2017). *Identificación de un gen codificante de polifenol oxidasa (PPO) en*. 10, 89–101.
- Morante, J., Obresk, Bru, R., & Carranza, M. (2018). *Polifenol Oxidasa Propiedades moleculares y función biológica*.
- Narro, A., Miguel, J., & Sánchez, G. (2003). *Purificación y caracterización cinética de la enzima Polifenoloxidasa de aguacate Hass (“Persea americana”, Variedad “Mill”) y del compuesto inhibitorio presente en la semilla del mismo*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Navarro, J., Aguilar, I., & López, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Asociación Española de Ecología Terrestre*, 16(2), 10–25.
- Navia, A., & Pazmiño, N. (2012). *Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación*.
- Nieves, Y., Parra, N., Villanueva, S., & Henríquez, M. (2019). Tech note: bioremediation, enemy of cadmium / Nota técnica: biorremediación, enemigo del cadmio. *Revista Ingeniería UC*, 26(1), 96–104. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24585.70249>
- Niño, I. D. (2015). Cuantificación de cadmio en cacao proveniente del occidente de Boyacá por la técnica analítica de voltamperometría [Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia]. In *Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*. <http://repositorio.uptc.edu.co/bitstream/001/1425/2/TGT-174.pdf>
- Nogales, J., Graziani, L., & Ortiz, L. (2004). Cambios físicos y químicos durante el secado al sol

- del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera. *Agronomía Trop*, 21(6), 5–20.
- NTE INEN 176. (2018). Granos de cacao. Requisitos NTE INEN 176-5. *Norma Técnica Ecuatoriana*, 5, 8. http://181.112.149.204/buzon/normas/nte_inen_176-5.pdf
- Olarte, D., & Rincon, J. (2019). Evaluación fisicoquímica y sensorial de cacao en grano variedad clonal fta-4 producido en el departamento de arauca, beneficiado mediante dos métodos de fermentación y secado. In *Universidad de los Llanos*. https://repositorio.unillanos.edu.co/bitstream/001/1614/1/EVALUACION_FISICOQUIMICA_Y_SENSORIAL_DE_CACAO_EN_GRANO_VARIEDAD_CLONAL_FTA-4_PRODUCIDO_EN_EL_DEPARTAMENTO_DE_ARAUCA%2C_MEDIANTE_DOS_MÉTODOS_DE_FERMENTACION_Y_SECADO.pdf
- Orenes, E. (2006). *Purificación y clonación de sistemas enzimáticos para la bioconversión de monofenoles en difenoles: polifenol Oxidasa, tirosinasa y Fenol hidroxilasa*.
- ORTIZ DE BERTORELLI, Ligia; GRAZIANI DE FARINAS, Lucía y ROVEDAS L, Gervaise. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Trop*. [online]. 2009, vol.59, n.2, pp.119-127. ISSN 0002-192X.
- Otárola, A. (2018). *Efecto de la enzima pectolítica y levadura (Saccharomyces cerevisiae) en la fermentación y calidad del cacao Var. criollo (Theobroma cacao)*. Universidad Nacional Federico Villarreal.
- Palacios, Á. (2008). *Establecimientos de parámetros (físicos, químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao (Theobroma cacao L.) producido en dos zonas identificadas al Norte y Sur del Litoral Ecuatoriano*.
- Palacios, G. (2016). *Efecto de la temperatura y tiempo de tostado en los caracteres sensoriales y en las propiedades químicas de granos de cacao (Theobroma cacao L .) procedente de Uchiza , San Martín – Perú para la obtención de NIBS (Vol. 121, Issue 7)*. Universidad Nacional Mayor De San Marcos.
- Pallares, A., Estupiñán, M. R., Perea, J. A., & López, L. J. (2016). *Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51 Impact of fermentation and drying in polyphenol content and antioxidant capacity of cocoa variety CCN-51 Impacto da fermentação e secag*. 29(2), 7–21. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18273/revion.v29n2-2016001>
- Pavich, K. E. (2019). Insumos utilizados en el cultivo de cacao y su contribución en los niveles de cadmio. In *Universidad de Guayaquil* (Issue Proyecto de factibilidad técnica, económica y financiera del cultivo de ostra del pacífico en la parroquia manglaralto, cantón Santa Elena, provincia de Santa Elena).
- Peralta, J. (2020). *Diseño de procesos postcosecha y evaluación de la fermentación mediante cajas de madera para cacao Nacional y CCN-51 EN LA FINCA “NAYELI” DEL CANTÓN*

BALZAR DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS.

- Perea, J., Ramirez, O., & Villamizar, A. (2011). *Caracterización fisicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano*. 9, (35-42).
- Pérez, P., & Azcona, M. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17(3), 199–205.
- Pérez, U. A., Ramírez, M. M., Serralde, D. P., Peñaranda, A. M., Wilches, W. A., Ramírez, L., & Rengifo, G. A. (2019). Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) como estrategia para reducir la absorción de cadmio en plantas de cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Terra Latinoamericana*, 37(2), 121. <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.479>
- Piedraita, C., Gallego, J., José, H., & Tamayo, C. (2018). *Implementación De Buenas Prácticas Agrícolas En Cultivos De Cacao Theobroma Cacao L. Como Estrategia Para Prevenir La Presencia De Cadmio En La Cadena Cacaotera*. (1st ed.). https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/5250/1/implementacion_practicas_agricolas_cacao.pdf
- Pineda, R., Chica, M., Echeverri, L., Otiz, A., Olarte, H., & Riaño, N. (2012). Influencia de la fermentación y el secado al sol sobre las características del grano de cacao TSH 565 ICS 60. *Vitae*, 19, S288–S290.
- Portillo, A., Portillo, E., Arenas, L., & Chacón, B. R. I. (2014). *Efecto del año y tiempo de fermentación sobre las características químicas del cacao Porcelana Effect of the year and fermentation time on the development of the chemical characteristics of Porcelain cocoa Introducción*. 699–711.
- Quevedo, J., Romero, J., & Tuz, I. (2018). Calidad físico química y sensorial de granos y licor de cacao (*Theobroma cacao L.*) usando cinco métodos de fermentación. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(1), 115–127.
- Ramírez, J., & Ayala, M. (2014). Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria Universidad Autonoma de Mexico*, 15(12), 1–13. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>
- Revoredo, A. (2018). *Efecto del tratamiento con 3 cepas de estreptomicetos en la acumulación de cadmio en plantas de Theobroma cacao L.* (Issue November) [Universidad Peruana Cayetano Heredia]. http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/1475%0Ahttp://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1475/Efecto_RevoredoMarquina_Andrea.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Rivera, D., Mecías, F., Guzmán, Á., Peña, M., Medina, H., Casanova, L., Barrera, A., & Nivelá, P. (2012). Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (. *Ciencia y Tecnología*, 5(1), 7–12.
- Rivera, G. (2017). *Universidad técnica estatal de quevedo facultad de derecho*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

- Rivera, J. (2018). *Correlación de la porosidad con el grado de fermentación del grano de cacao peruano (Theobroma cacao L.)*. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Rodriguez, C. (2018). Niveles De Plomo Y Cadmio En Sangre De Estudiantes De La Universidad Nacional De Tumbes, Residentes En Corrales – Perú, 2018. *Universidad Nacional de Trujillo*.
- Rojas, K., Hernández, C., & Mencía, A. (2021). *TRANSFORMACIONES BIOQUÍMICAS DEL CACAO (Theobroma cacao L .) DURANTE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN CONTROLADA*. 45(1), 53–65.
- Romero, C. (2012). *Análisis de azúcares en pulpa de cacao por colorimetría y electroforesis capilar*. 12(4), 906–913.
- Romero, D., Gabriela, Y., Simbaña, K., & Navarrete, H. (2019). *Content and the relationship between cadmium, nickel, and lead concentrations in Ecuadorian cocoa beans from nine provinces*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106750>
- Roquise, M. (2013). *Bioadsorción de cadmio por biomasa de opuntia*. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Rosero, A. (2017). *Estudio de las características físico-químicas de seis clones de Theobroma cacao L. (cacao), cultivados en la estación Experimental Tropical Pichilingue con fines de agroindustrialización* (Issue 2). Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Sánchez, C. (2019). Determinación de cadmio en chocolate en polvo comercializado en el cantón Guayaquil, Provincia del Guayas - Ecuador. In *Universidad de Guayaquil*.
- Santa, E. (2019). *El oreado en la fermentación y su efecto en el contenido de ácido acético y calidad del grano de cacao (Theobroma cacao L.) CCN -51 seco*. Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Sanz, P., & Repetto, M. (1993). Glosario De Terminos Toxicologicos. In *Asociación Española de Toxicología: Vol.* (Issue).
- Scott, H. (2007). *Las metalotioneinas y el estrés quirúrgico*. 26(2), 67–72.
- Sinche, E. (2011). *Evaluación del tiempo de fermentación del grano de cacao criollo (theobroma cacao) para la obtención de la pasta* [Universidad Nacional del Centro del Perú]. <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/1890>
- Solórzano, E., Nicklin, C., Amores, F., Jiménez, J., & Barzola, S. (2015). Comparación sensorial del cacao (Theobroma cacao L.) Nacional fino de aroma cultivado en diferentes zonas del Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 8(1), 37. <https://doi.org/10.18779/cyt.v8i1.198>
- Teneda, W. (2016). *Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao (Theobroma cacao L.) Variedad Nacional y Variedad CCN51*.
- Torres, L. A. (2012). Manual de producción de cacao fino de aroma a través de manejo ecológico. In *Universidad De Cuenca*. Universidad de Cuenca.
- Vázquez, A., Ovando, I., Adriano, L., Betancur, D., & Salvador, M. (2016). *Alcaloides y*

- polifenoles del cacao , mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma.* 66.
- Vega, L. (2021). *Aplicación de métodos físico-químicos y biológicos en suelos contaminados con cadmio y plomo.*
- Vera, J., & Goya, A. (2015). Comportamiento agronómico, calidad física y sensorial de 21 líneas híbridas de cacao (*Theobroma cacao* L.). *La Técnica: Revista de Las Agrociencias.* ISSN 2477-8982, 15, 26. https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i15.539
- Vera, J., Vallejo, C., Párraga, D., Macías, J., Ramos, R., & Morales, W. (2014). Atributos físico-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 7(2), 21. <https://doi.org/10.18779/cyt.v7i2.187>
- Vilchez, N. (2016). Efecto del material del fermentador, en el grado de fermentación de granos de cacao (*Theobroma cacao* L, Clon: CCN 51. *Universidad Nacional de San Martín Tarapoto.*
- Weisburger, J. (2001). *Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols.* 891–897.
- Zambrano, A., Gómez, Á., Ramos, G., Romero, C., & Lacruz, C. (2011). *Caracterización de parámetros físicos de calidad en almendras de cacao criollo, trinitario y forastero durante el proceso de secado.* 60(4), 389–396.
- Zambrano, A., Romero, C., & Gutiérrez, M. (2010). Determinación de azúcares en cacaos durante la fermentación y torrefacción. *Agricultura Andina*, 18, 3–11.
- Zambrano, D. (2018). *Estudio del contenido en cadmio de cacao (*Theobroma cacao* L) ecuatoriano y su incidencia en el consumo humano.*
- Zamudio, B., Ayora, T., Lugo, E., & Gastélum, E. (2021). *Estudio de un consorcio de levaduras durante la fermentación de cacao y su efecto en la generación de compuestos aromáticos.* 6, 62–74.
- Zug, K. L. M., Huamaní, H. A., Meyberg, F., Cierjacks, J., & Cierjacks, A. (2019). Cadmium Accumulation in Peruvian Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Opportunities for Mitigation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4109-x>

ANEXO A: Ficha de catación de pasta de cacao.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO



INSTITUTO DE POSGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA
MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIAS MENCIÓN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y
SEGURIDAD ALIMENTARIA

FICHA DE CATACIÓN

Nombre y Apellido:

Fecha:

Nombre del producto: **Licor de cacao**

Degustar las siguientes muestras de licor de cacao y evaluar de acuerdo a cada uno de los atributos mencionados, solicito su sincera colaboración.

Instrucciones.

- Escriba el código de la muestra sobre la línea.
- Pruebe la muestra las veces que sea necesario e indique la intensidad de la característica solicitada marcando con una línea vertical sobre la línea horizontal.

CÓDIGO DE LA MUESTRA: _____

NADA

EXTREMADAMENTE

SABORES ESPECÍFICOS

Cacao

Floral

Frutal

Nuez

Caramelo

SABORES BÁSICOS

Amargo

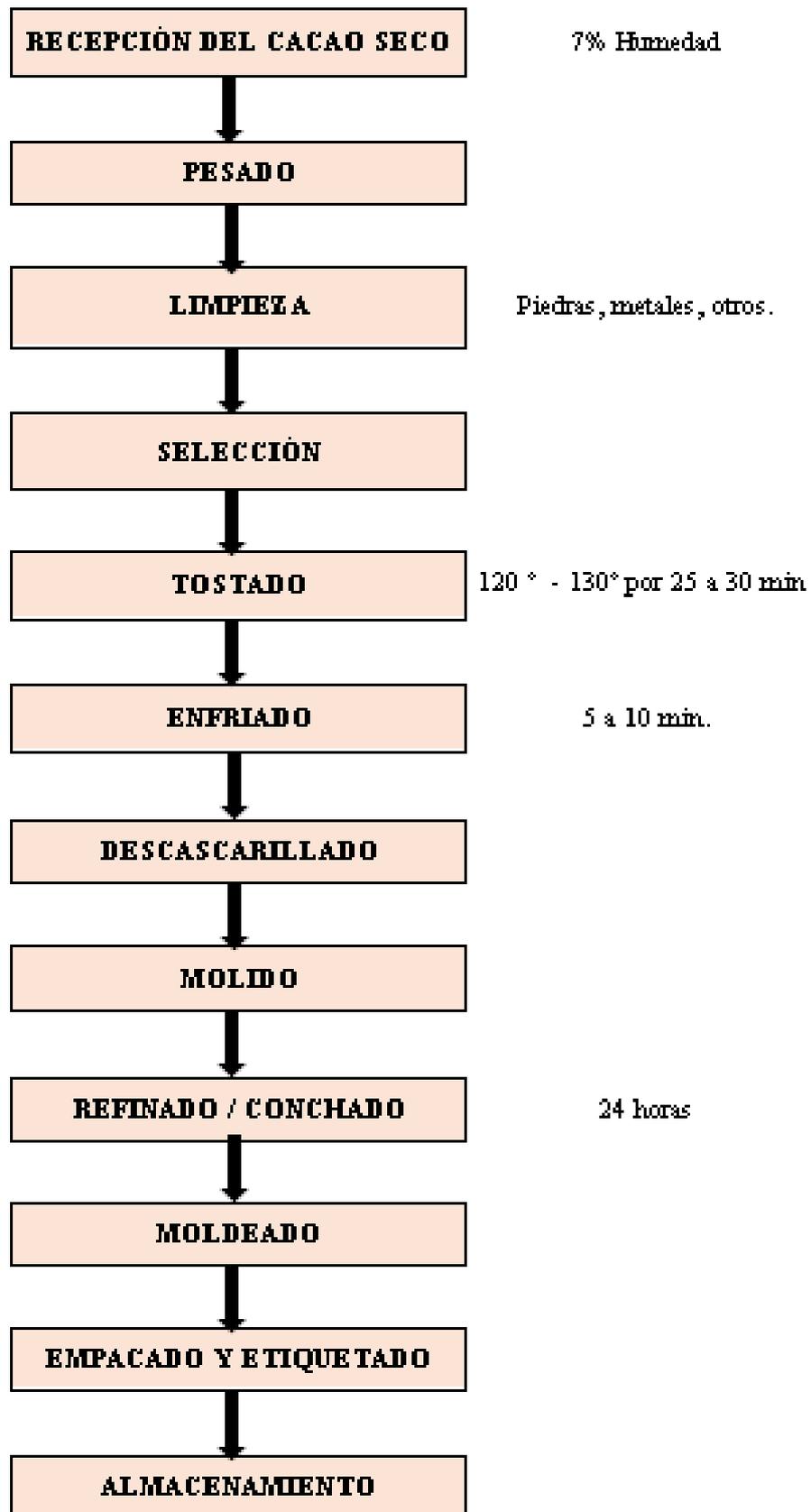
Astringente

Ácido

Comentarios:

"MUCHAS GRACIAS"

ANEXO B: Flujograma de elaboración de la pasta de cacao.



Elaborado por: Morejón Lucio Rocio (2021).

ANEXO C: Análisis de la varianza del pH de la fermentación.

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R²</u>	<u>Aj</u>	<u>CV</u>
PH FERMENTACIÓN	27	0,79	0,69	5,76	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	4,66	8	0,58	8,33	0,0001
Tratamiento	4,66	8	0,58	8,33	0,0001
Error	1,26	18	0,07		
Total	5,92	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,75634

Error: 0,0699 gl: 18

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>			
T7	5,26	3	0,15	A		
T4	5,10	3	0,15	A	B	
T1	5,09	3	0,15	A	B	
T5	4,53	3	0,15	A	B	C
T6	4,42	3	0,15		B	C
T2	4,38	3	0,15		B	C
T8	4,20	3	0,15			C
T3	4,17	3	0,15			C
T9	4,15	3	0,15			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO D: Análisis de la varianza de la acidez de la fermentación.

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R²</u>	<u>Aj</u>	<u>CV</u>
ACIDEZ FERMENTACIÓN	27	0,92	0,89	7,95	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	0,54	8	0,07	26,09	<0,0001
TRATAMIENTO	0,54	8	0,07	26,09	<0,0001
Error	0,05	18	2,6E-03		
Total	0,59	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14567

Error: 0,0026 gl: 18

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>			
T8	0,88	3	0,03	A		
T2	0,87	3	0,03	A		
T9	0,71	3	0,03		B	
T5	0,64	3	0,03		B	C
T3	0,60	3	0,03		B	C D
T6	0,53	3	0,03			C D
T7	0,52	3	0,03			C D
T4	0,51	3	0,03			C D
T1	0,49	3	0,03			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO E: Análisis de la varianza de la prueba de corte de las almendras de cacao.

FERMENTACIÓN BUENA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
F. BUENA	27	0,85	0,78	3,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	738,96	8	92,37	12,72	<0,0001
TRATAMIENTO	738,96	8	92,37	12,72	<0,0001
Error	130,67	18	7,26		
Total	869,63	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,70810

Error: 7,2593 gl: 18

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.			
T9	89,33	3	1,56	A		
T6	86,00	3	1,56	A	B	
T5	82,67	3	1,56	A	B	C
T8	82,67	3	1,56	A	B	C
T3	80,67	3	1,56		B	C
T7	77,33	3	1,56			C D
T4	76,67	3	1,56			C D
T2	76,00	3	1,56			C D
T1	71,33	3	1,56			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

FERMENTACIÓN VIOLETA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
F. VIOLETA	27	0,62	0,45	24,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	222,52	8	27,81	3,68	0,0103
TRATAMIENTO	222,52	8	27,81	3,68	0,0103
Error	136,00	18	7,56		
Total	358,52	26			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,86384

Error: 7,5556 gl: 18

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.			
T1	16,00	3	1,59	A		
T2	14,00	3	1,59	A	B	
T8	12,67	3	1,59	A	B	C
T7	12,67	3	1,59	A	B	C
T4	12,00	3	1,59	A	B	C
T3	11,33	3	1,59	A	B	C
T5	10,00	3	1,59	A	B	C
T6	8,00	3	1,59		B	C
T9	6,00	3	1,59			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

FERMENTACIÓN PIZARROSA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
F. PIZARROSA	27	0,74	0,62	28,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	229,63	8	28,70	6,25	0,0006
TRATAMIENTO	229,63	8	28,70	6,25	0,0006
Error	82,67	18	4,59		
Total	312,30	26			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,13099

Error: 4,5926 gl: 18

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.			
T1	12,00	3	1,24	A		
T4	11,33	3	1,24	A	B	
T7	9,33	3	1,24	A	B	C
T2	9,33	3	1,24	A	B	C
T3	7,33	3	1,24	A	B	C
T5	6,67	3	1,24	A	B	C
T6	5,33	3	1,24		B	C
T8	4,00	3	1,24			C
T9	3,33	3	1,24			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

FERMENTACIÓN MOHOSA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
F. MOHOSA	27	0,31	0,00	519,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,19	8	0,15	1,00	0,4690
TRATAMIENTO	1,19	8	0,15	1,00	0,4690
Error	2,67	18	0,15		
Total	3,85	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,10116

Error: 0,1481 gl: 18

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
T9	0,67	3	0,22 A
T2	0,00	3	0,22 A
T4	0,00	3	0,22 A
T3	0,00	3	0,22 A
T1	0,00	3	0,22 A
T6	0,00	3	0,22 A
T5	0,00	3	0,22 A
T8	0,00	3	0,22 A
T7	0,00	3	0,22 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

FERMENTACIÓN DEFECTUOSA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
F. DEFECTUOSA	27	0,05	0,00	183,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,19	8	0,15	0,13	0,9973
TRATAMIENTO	1,19	8	0,15	0,13	0,9973
Error	21,33	18	1,19		
Total	22,52	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,11454

Error: 1,1852 gl: 18

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
T9	0,67	3	0,63	A
T6	0,67	3	0,63	A
T7	0,67	3	0,63	A
T8	0,67	3	0,63	A
T5	0,67	3	0,63	A
T1	0,67	3	0,63	A
T2	0,67	3	0,63	A
T3	0,67	3	0,63	A
T4	0,00	3	0,63	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO F: Análisis de la varianza de la humedad (%) de las almendras de cacao seco.

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
HUMEDAD (%)	27	0,37	0,09	6,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	1,45	8	0,18	1,33	0,2924
TRATAMIENTO	1,45	8	0,18	1,33	0,2924
Error	2,46	18	0,14		
<u>Total</u>	<u>3,91</u>	<u>26</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,05760

Error: 0,1367 gl: 18

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
T4	6,34	3	0,21 A
T8	5,98	3	0,21 A
T9	5,91	3	0,21 A
T7	5,82	3	0,21 A
T1	5,80	3	0,21 A
T2	5,73	3	0,21 A
T3	5,67	3	0,21 A
T6	5,64	3	0,21 A
<u>T5</u>	<u>5,48</u>	<u>3</u>	<u>0,21 A</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO G: Análisis de la varianza de cenizas (%) de las almendras de cacao seco.

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
CENIZAS (%)	27	0,84	0,78	4,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	2,10	8	0,26	12,23	<0,0001
TRATAMIENTO	2,10	8	0,26	12,23	<0,0001
Error	0,39	18	0,02		
Total	2,49	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,41931

Error: 0,0215 gl: 18

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>					
T7	3,54	3	0,08	A				
T1	3,50	3	0,08	A	B			
T5	3,30	3	0,08	A	B			
T8	3,20	3	0,08	A	B	C		
T2	3,18	3	0,08	A	B	C	D	
T4	3,11	3	0,08		B	C	D	E
T6	2,82	3	0,08			C	D	E
T9	2,77	3	0,08				D	E
T3	2,76	3	0,08					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO H: Análisis de la varianza de glucosa (g/kg) de las almendras de cacao seco.

Análisis de la varianza

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
GLUCOSA 3N (g/kg)	27	0,92	0,89	4,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	19,66	8	2,46	26,85	<0,0001
Tratamiento	19,66	8	2,46	26,85	<0,0001
Error	1,65	18	0,09		
<u>Total</u>	<u>21,31</u>	<u>26</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,86552

Error: 0,0915 gl: 18

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>			
T7	7,42	3	0,17	A		
T4	7,17	3	0,17	A	B	
T8	6,90	3	0,17	A	B	C
T1	6,81	3	0,17	A	B	C
T2	6,47	3	0,17		B	C
T3	6,04	3	0,17			C D
T6	5,55	3	0,17			D
T9	5,53	3	0,17			D
<u>T5</u>	<u>4,67</u>	<u>3</u>	<u>0,17</u>			<u>E</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO I: Análisis de la varianza del pH de las almendras de cacao seco.

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R²</u>	<u>Aj</u>	<u>CV</u>
pH	27	0,89	0,84	1,20	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	0,66	8	0,08	17,55	<0,0001
TRATAMIENTO	0,66	8	0,08	17,55	<0,0001
Error	0,08	18	4,7E-03		
Total	0,75	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19644

Error: 0,0047 gl: 18

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>		
T1	6,02	3	0,04	A	
T7	5,93	3	0,04	A	B
T6	5,76	3	0,04	B	C
T5	5,66	3	0,04		C D
T2	5,65	3	0,04		C D
T8	5,64	3	0,04		C D
T9	5,63	3	0,04		C D
T4	5,61	3	0,04		C D
T3	5,49	3	0,04		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO J: Análisis de la varianza de la acidez (%) de las almendras de cacao seco.

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
ACIDEZ (%)	27	0,64	0,48	3,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	0,01	8	1,4E-03	4,01	0,0069
TRATAMIENTO	0,01	8	1,4E-03	4,01	0,0069
Error	0,01	18	3,4E-04		
<u>Total</u>	<u>0,02</u>	<u>26</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05252

Error: 0,0003 gl: 18

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
T8	0,50	3	0,01	A
T7	0,48	3	0,01	A B
T3	0,48	3	0,01	A B
T9	0,48	3	0,01	A B
T6	0,48	3	0,01	A B
T5	0,46	3	0,01	A B
T2	0,45	3	0,01	A B
T4	0,45	3	0,01	A B
<u>T1</u>	<u>0,44</u>	<u>3</u>	<u>0,01</u>	<u>B</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO K: Análisis de la varianza de proteína (%) de las almendras de cacao seco.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PROTEÍNA (%)	27	0,80	0,72	6,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	54,00	8	6,75	9,24	0,0001
TRATAMIENTO	54,00	8	6,75	9,24	0,0001
Error	13,14	18	0,73		
Total	67,14	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,44471

Error: 0,7302 gl: 18

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.				
T2	14,99	3	0,49	A			
T1	14,66	3	0,49	A	B		
T3	13,26	3	0,49	A	B	C	
T5	12,84	3	0,49	A	B	C	D
T9	12,73	3	0,49	A	B	C	D
T4	12,29	3	0,49		B	C	D
T6	12,11	3	0,49			C	D
T7	10,72	3	0,49				D
T8	10,66	3	0,49				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO L: Análisis de la varianza de cadmio de las almendras de cacao seco.

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
CADMIO mg.kg	27	0,82	0,74	6,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	0,02	8	2,2E-03	10,34	<0,0001
TRATAMIENTO	0,02	8	2,2E-03	10,34	<0,0001
Error	3,8E-03	18	2,1E-04		
<u>Total</u>	<u>0,02</u>	<u>26</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04157

Error: 0,0002 gl: 18

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
T1	0,27	3	0,01	A
T5	0,26	3	0,01	A
T7	0,25	3	0,01	A
T2	0,24	3	0,01	A B
T6	0,23	3	0,01	A B
T9	0,21	3	0,01	B
T8	0,21	3	0,01	B
T3	0,20	3	0,01	B
<u>T4</u>	<u>0,20</u>	<u>3</u>	<u>0,01</u>	<u>B</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO M: Análisis de la varianza comparaciones ortogonales.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cadmio	27	0.79	0.70	6.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	8	2.1E-03	8.60	0.0001
Tiempo	0.01	2	0.01	21.80	<0.0001
Levadura y PPO	1.2E-03	2	5.8E-04	2.42	0.1177
Tiempo*Levadura y PPO	4.9E-03	4	1.2E-03	5.09	0.0064
Error	4.3E-03	18	2.4E-04		
Total	0.02	26			

Contrastes

Tiempo*Levadura y PPO Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Contraste1	0.05	0.04	3.6E-04	1	3.6E-04	1.51	0.2353
Contraste2	0.04	0.02	8.0E-04	1	8.0E-04	3.32	0.0850
Total			1.2E-03	2	5.8E-04	2.42	0.1177

Coefficientes de los contrastes

Tiempo*Levadura y PPO	Ct.1	Ct.2
120 HORAS:0	2.00	0.00
120 HORAS:1	-1.00	1.00
120 HORAS:2	-1.00	-1.00
48 HORAS:0	2.00	0.00
48 HORAS:1	-1.00	1.00
48 HORAS:2	-1.00	-1.00
96 HORAS:0	2.00	0.00
96 HORAS:1	-1.00	1.00
96 HORAS:2	-1.00	-1.00

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.01867

Error: 0.0002 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.	
48 HORAS	0.25	9	0.01	A
96 HORAS	0.23	9	0.01	A
120 HORAS	0.20	9	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.01867

Error: 0.0002 gl: 18

Levadura y PPO	Medias	n	E.E.	
0	0.24	9	0.01	A
1	0.23	9	0.01	A
2	0.22	9	0.01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.04439

Error: 0.0002 gl: 18

Tiempo	Levadura y PPO	Medias	n	E.E.			
48 HORAS	0	0.27	3	0.01	A		
96 HORAS	1	0.26	3	0.01	A		
48 HORAS	2	0.25	3	0.01	A	B	
96 HORAS	0	0.24	3	0.01	A	B	C
48 HORAS	1	0.24	3	0.01	A	B	C
96 HORAS	2	0.21	3	0.01		B	C
120 HORAS	1	0.21	3	0.01		B	C
120 HORAS	2	0.21	3	0.01		B	C
120 HORAS	0	0.20	3	0.01			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

ANEXO N: Análisis de la varianza del perfil sensorial de la pasta de cacao.

SABOR A CACAO

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
CACAO	90	0,10	0,02	36,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	60,47	8	7,56	1,17	0,3270
TRATAMIENTO	60,47	8	7,56	1,17	0,3270
Error	523,00	81	6,46		
Total	583,47	89			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,62188

Error: 6,4568 gl: 81

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
5	8,07	10	0,80 A
1	7,93	10	0,80 A
6	7,64	10	0,80 A
7	7,47	10	0,80 A
9	7,14	10	0,80 A
4	7,14	10	0,80 A
8	6,31	10	0,80 A
3	6,27	10	0,80 A
2	5,45	10	0,80 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SABOR FLORAL

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
FLORAL	90	0,09	0,01	91,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	45,81	8	5,73	1,06	0,3977
TRATAMIENTO	45,81	8	5,73	1,06	0,3977
Error	436,65	81	5,39		
Total	482,46	89			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,30941

Error: 5,3908 gl: 81

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
3	3,45	10	0,73	A
9	3,43	10	0,73	A
7	3,20	10	0,73	A
6	3,16	10	0,73	A
8	2,33	10	0,73	A
5	1,99	10	0,73	A
4	1,86	10	0,73	A
2	1,82	10	0,73	A
1	1,63	10	0,73	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

FRUTAL

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
FRUTAL	90	0,09	0,00	90,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	49,84	8	6,23	0,99	0,4536
TRATAMIENTO	49,84	8	6,23	0,99	0,4536
Error	512,06	81	6,32		
<u>Total</u>	<u>561,89</u>	<u>89</u>			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,58378

Error: 6,3217 gl: 81

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
7	3,54	10	0,80	A
1	3,47	10	0,80	A
8	3,33	10	0,80	A
5	3,22	10	0,80	A
9	3,07	10	0,80	A
6	2,76	10	0,80	A
3	2,46	10	0,80	A
2	1,86	10	0,80	A
4	1,23	10	0,80	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

NUEZ

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NUEZ	90	0,09	0,00	97,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	41,49	8	5,19	0,95	0,4795
TRATAMIENTO	41,49	8	5,19	0,95	0,4795
Error	441,44	81	5,45		
Total	482,94	89			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,32752

Error: 5,4499 gl: 81

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
3	3,86	10	0,74 A
4	2,80	10	0,74 A
9	2,63	10	0,74 A
1	2,46	10	0,74 A
8	2,39	10	0,74 A
2	2,23	10	0,74 A
6	2,23	10	0,74 A
7	1,82	10	0,74 A
5	1,22	10	0,74 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CARAMELO

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CARAMELO	90	0,06	0,00	120,87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,64	8	0,95	0,67	0,7153
TRATAMIENTO	7,64	8	0,95	0,67	0,7153
Error	115,20	81	1,42		
Total	122,84	89			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,69984

Error: 1,4222 gl: 81

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
2	1,46	10	0,38	A
4	1,37	10	0,38	A
1	1,14	10	0,38	A
9	1,06	10	0,38	A
6	1,00	10	0,38	A
7	0,90	10	0,38	A
3	0,75	10	0,38	A
8	0,68	10	0,38	A
5	0,53	10	0,38	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

AMARGO

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
AMARGO	90	0,06	0,00	46,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	39,16	8	4,90	0,67	0,7148
TRATAMIENTO	39,16	8	4,90	0,67	0,7148
Error	590,20	81	7,29		
<u>Total</u>	<u>629,36</u>	<u>89</u>			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,84754

Error: 7,2864 gl: 81

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
4	7,28	10	0,85	A
1	6,61	10	0,85	A
3	6,13	10	0,85	A
5	5,94	10	0,85	A
2	5,49	10	0,85	A
7	5,44	10	0,85	A
9	5,31	10	0,85	A
6	5,31	10	0,85	A
8	5,28	10	0,85	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ASTRINGENTE

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ASTRINGENTE	90	0,05	0,00	62,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	37,26	8	4,66	0,48	0,8667
TRATAMIENTO	37,26	8	4,66	0,48	0,8667
Error	785,22	81	9,69		
Total	822,48	89			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,43790

Error: 9,6940 gl: 81

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
5	5,91	10	0,98 A
4	5,83	10	0,98 A
8	5,64	10	0,98 A
3	5,07	10	0,98 A
2	4,75	10	0,98 A
6	4,53	10	0,98 A
1	4,44	10	0,98 A
9	4,26	10	0,98 A
7	4,18	10	0,98 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ÁCIDO

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ÁCIDO	90	0,07	0,00	72,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	62,66	8	7,83	0,72	0,6713
TRATAMIENTO	62,66	8	7,83	0,72	0,6713
Error	878,36	81	10,84		
Total	941,02	89			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,69373

Error: 10,8439 gl: 81

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
8	5,65	10	1,04	A
5	5,60	10	1,04	A
3	5,41	10	1,04	A
2	5,01	10	1,04	A
4	4,14	10	1,04	A
9	3,97	10	1,04	A
6	3,90	10	1,04	A
7	3,64	10	1,04	A
1	3,42	10	1,04	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

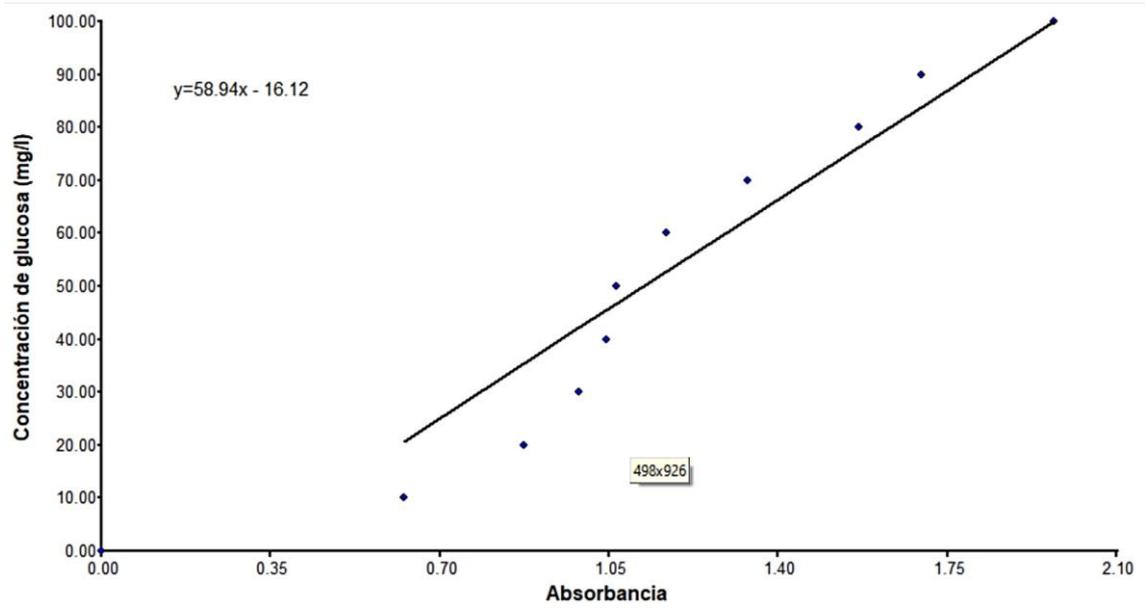
ANEXO O: Intensidad que se expresa en la degustación del licor de cacao (escala hedónica).

Tratamiento	Intensidad de sabores (0-10)							
	Cacao	Floral	Frutal	Nuez	Caramelo	Amargo	Astringente	Ácido
T1	Alta	Baja	Media	Baja	Baja	Alta	Media	Media
T2	Media	Media	Baja	Baja	Baja	Media	Media	Media
T3	Alta	Media	Baja	Media	Ausente	Alta	Media	Media
T4	Alta	Baja	Baja	Baja	Baja	Alta	Media	Media
T5	Alta	Baja	Media	Baja	Ausente	Media	Media	Media
T6	Alta	Media	Baja	Baja	Baja	Media	Media	Media
T7	Alta	Media	Media	Baja	Ausente	Media	Media	Media
T8	Alta	Baja	Media	Baja	Ausente	Media	Media	Media
T9	Alta	Media	Media	Baja	Baja	Media	Media	Media

Realizado por: Morejón Lucio Rocio (2021)

Intensidad de la escala hedónica: 0 ausente; 1 a 2 baja; 3 a 5 media; 6 a 8 alta; 9 a 10 muy alta.

ANEXO P: Curva de calibración de la glucosa.



Realizado por: Morejón Lucio Rocio (2021)

ANEXO Q: Resultados de los análisis de laboratorio.



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL**



HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

1.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

PARÁMETROS	
CODIGO	TILO
MUESTRA	Almendras de cacao
ESTADO DE LA MUESTRA	Muestras congeladas (fermentación) Muestras secas
NOMBRE DE LA MUESTRA	Almendras de cacao
FECHA DE INICIO DE LOS ANÁLISIS EN EL LABORATORIO	20/05/2021
LUGAR DE MUESTREO	ESPOCH – LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL
ANÁLISIS SOLICITADO	pH, acidez, proteína, humedad, ceniza, glucosa

• **RESULTADOS**

Tabla. N°1.- ANALISIS DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECAS

PARÁMETROS	RESULTADOS		
	R1	R2	R3
pH de la fermentación	5,71	5,07	4,49
Acidez de la fermentación (%)	0,49	0,51	0,48
Proteína (%)	13,12	16,19	14,66
Humedad (%)	5,98	5,85	5,57
Ceniza (%)	3,71	3,37	3,42
pH	6,05	6,08	5,93
Acidez (%)	0,44	0,46	0,41
Glucosa (g/kg)	7,0875	6,5276	6,8076

REALIZADO POR:

FUENTE. LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL

DIRIGIDO POR: B.Q. ALICIA ZAVALA

ATENTAMENTE.

Alicia Zavala

B.Q. ALICIA Z.



TÉCNICO RESPONSABLE DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL ESPOCH

FECHA DE ENTREGA: 20/07/2021



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL



HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

I.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

PARÁMETROS	
CODIGO	T2L0
MUESTRA	Almendras de cacao
ESTADO DE LA MUESTRA	Muestras congeladas (fermentación) Muestras secas
NOMBRE DE LA MUESTRA	Almendras de cacao
FECHA DE INICIO DE LOS ANALISIS EN EL LABORATORIO	20/05/2021
LUGAR DE MUESTREO	ESPOCH - LAB. DE BROMATOLOGIA Y NUTRICIÓN ANIMAL
ANALISIS SOLICITADO	pH, acidez, proteína, humedad, ceniza, glucosa

• RESULTADOS

Tabla. N°1.- ANALISIS DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECAS

PARÁMETROS	RESULTADOS		
	R1	R2	R3
pH de la fermentación	4,32	4,40	4,43
Acidez de la fermentación (%)	0,92	0,81	0,88
Proteína (%)	14,74	15,25	14,99
Humedad (%)	5,50	5,77	5,91
Ceniza (%)	3,03	3,18	3,33
pH	5,64	5,68	5,64
Acidez (%)	0,45	0,42	0,47
Glucosa (g/kg)	6,2262	6,6514	6,4869

REALIZADO POR:

FUENTE. LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL

DIRIGIDO POR: B.Q. ALICIA ZAVALA

ATENTAMENTE.

B.Q. ALICIA Z.

TÉCNICO RESPONSABLE DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL-ESPOCH

FECHA DE ENTREGA: 20/07/2021



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL



HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

I.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

PARÁMETROS	
CODIGO	T4L1
MUESTRA	Almendras de cacao
ESTADO DE LA MUESTRA	Muestras congeladas (fermentación) Muestras secas
NOMBRE DE LA MUESTRA	Almendras de cacao
FECHA DE INICIO DE LOS ANALISIS EN EL LABORATORIO	20/05/2021
LUGAR DE MUESTREO	ESPOCH - LAB. DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL
ANALISIS SOLICITADO	pH, acidez, proteina, humedad, ceniza, glucosa

• RESULTADOS

Tabla. N°1.- ANALISIS DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECAS

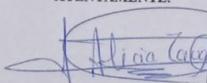
PARÁMETROS	RESULTADOS		
	R1	R2	R3
pH de la fermentación	5,27	5,07	4,95
Acidez de la fermentación (%)	0,52	0,54	0,48
Proteína (%)	11,90	12,69	12,29
Humedad (%)	5,75	7,49	5,79
Ceniza (%)	3,08	3,11	3,13
pH	5,61	5,67	5,56
Acidez (%)	0,45	0,44	0,45
Glucosa (g/kg)	7,2467	7,0993	7,1730

REALIZADO POR:

FUENTE. LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL

DIRIGIDO POR: B.Q. ALICIA ZAVALA

ATENTAMENTE.


B.Q. ALICIA Z.

TÉCNICO RESPONSABLE DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL-ESPOCH

FECHA DE ENTREGA: 20/07/2021



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL



HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

1.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

PARÁMETROS	
CÓDIGO	TSL1
MUESTRA	Almendras de cacao
ESTADO DE LA MUESTRA	Muestras congeladas (fermentación)
NOMBRE DE LA MUESTRA	Muestras secas Almendras de cacao
FECHA DE INICIO DE LOS ANÁLISIS EN EL LABORATORIO	20/05/2021
LUGAR DE MUESTREO	ESPOCH - LAB. DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL
ANÁLISIS SOLICITADO	pH, acidez, proteína, humedad, ceniza, glucosa

• RESULTADOS

Tabla. N°1.- ANALISIS DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECAS

PARÁMETROS	RESULTADOS		
	R1	R2	R3
pH de la fermentación	4,19	4,45	4,95
Acidez de la fermentación (%)	0,64	0,72	0,57
Proteína (%)	11,20	14,48	12,84
Humedad (%)	5,58	5,54	5,33
Ceniza (%)	3,14	3,40	3,37
pH	5,69	5,71	5,58
Acidez (%)	0,45	0,46	0,46
Glucosa (g/kg)	4,2820	5,0482	4,6651

REALIZADO POR:

FUENTE. LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL

DIRIGIDO POR: B.Q. ALICIA ZAVALA

ATENTAMENTE.

B.Q. ALICIA Z.

TÉCNICO RESPONSABLE DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL-ESPOCH

FECHA DE ENTREGA: 20/07/2021





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL



HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

1.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

PARÁMETROS	
CÓDIGO	T6L1
MUESTRA	Almendras de cacao
ESTADO DE LA MUESTRA	Muestras congeladas (fermentación) Muestras secas
NOMBRE DE LA MUESTRA	Almendras de cacao
FECHA DE INICIO DE LOS ANÁLISIS EN EL LABORATORIO	20/05/2021
LUGAR DE MUESTREO	ESPOCH – LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL
ANÁLISIS SOLICITADO	pH, acidez, proteína, humedad, ceniza, glucosa

• RESULTADOS

Tabla. N°1.- ANALISIS DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECAS

PARÁMETROS	RESULTADOS		
	R1	R2	R3
pH de la fermentación	4,36	4,23	4,67
Acidez de la fermentación (%)	0,57	0,44	0,59
Proteína (%)	12,25	11,98	12,11
Humedad (%)	5,35	5,82	5,74
Ceniza (%)	2,92	2,80	2,74
pH	5,81	5,71	5,77
Acidez (%)	0,48	0,47	0,49
Glucosa (g/kg)	5,3252	5,7732	5,5492

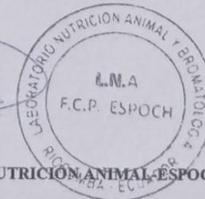
REALIZADO POR:

FUENTE. LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL

DIRIGIDO POR: B.Q. ALICIA ZAVALA

ATENTAMENTE.

B.Q. ALICIA Z.



TÉCNICO RESPONSABLE DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL ESPOCH

FECHA DE ENTREGA: 20/07/2021



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL



HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

1.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

PARÁMETROS	
CODIGO	T7L2P1
MUESTRA	Almendras de cacao
ESTADO DE LA MUESTRA	Muestras congeladas (fermentación) Muestras secas
NOMBRE DE LA MUESTRA	Almendras de cacao
FECHA DE INICIO DE LOS ANALISIS EN EL LABORATORIO	20/05/2021
LUGAR DE MUESTREO	ESPOCH - LAB. DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL
ANALISIS SOLICITADO	pH, acidez, proteína, humedad, ceniza, glucosa

• RESULTADOS

Tabla. N°1.- ANALISIS DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECAS

PARÁMETROS	RESULTADOS		
	R1	R2	R3
pH de la fermentación	5,19	5,42	5,17
Acidez de la fermentación (%)	0,53	0,49	0,54
Proteína (%)	10,94	10,50	10,72
Humedad (%)	5,97	5,61	5,88
Ceniza (%)	3,54	3,68	3,39
pH	5,93	5,92	5,94
Acidez (%)	0,48	0,48	0,49
Glucosa (g/kg)	7,7064	7,1288	7,4176

REALIZADO POR:

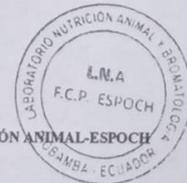
FUENTE. LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL

DIRIGIDO POR: B.Q. ALICIA ZAVALA

ATENTAMENTE

B.Q. ALICIA Z.

TÉCNICO RESPONSABLE DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL-ESPOCH



FECHA DE ENTREGA: 20/07/2021



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL



HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

1.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

PARÁMETROS	
CODIGO	T8L2P1
MUESTRA	Almendras de cacao
ESTADO DE LA MUESTRA	Muestras congeladas (fermentación) Muestras secas
NOMBRE DE LA MUESTRA	Almendras de cacao
FECHA DE INICIO DE LOS ANÁLISIS EN EL LABORATORIO	20/05/2021
LUGAR DE MUESTREO	ESPOCH - LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL
ANÁLISIS SOLICITADO	pH, acidez, proteína, humedad, ceniza, glucosa

• RESULTADOS

Tabla. N°1.- ANALISIS DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECAS

PARÁMETROS	RESULTADOS		
	R1	R2	R3
pH de la fermentación	4,17	4,21	4,21
Acidez de la fermentación (%)	0,90	0,86	0,88
Proteína (%)	11,55	9,84	10,60
Humedad (%)	5,89	6,03	6,01
Ceniza (%)	3,46	3,07	3,07
pH	5,65	5,63	5,64
Acidez (%)	0,50	0,52	0,47
Glucosa (g/kg)	6,8930	6,9107	6,9019

REALIZADO POR:

FUENTE. LABORATORIO DE BROMATOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL

DIRIGIDO POR: B.Q. ALICIA ZAVALA

ATENTAMENTE.

B.Q. ALICIA Z.



TÉCNICO RESPONSABLE DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL-ESPOCH

FECHA DE ENTREGA: 20/07/2021



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL



HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

1.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

PARÁMETROS	
CODIGO	T9L2P1
MUESTRA	Almendras de cacao
ESTADO DE LA MUESTRA	Muestras congeladas (fermentación)
NOMBRE DE LA MUESTRA	Muestras secas Almendras de cacao
FECHA DE INICIO DE LOS ANÁLISIS EN EL LABORATORIO	20/05/2021
LUGAR DE MUESTREO	ESPOCH - LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL
ANÁLISIS SOLICITADO	pH, acidez, proteína, humedad, ceniza, glucosa

• RESULTADOS

Tabla. N°1.- ANÁLISIS DE LAS ALMENDRAS DE CACAO FERMENTADAS Y SECAS

PARÁMETROS	RESULTADOS		
	R1	R2	R3
pH de la fermentación	4,25	4,11	4,10
Acidez de la fermentación (%)	0,72	0,75	0,66
Proteína (%)	12,73	13,43	12,03
Humedad (%)	6,10	5,84	5,78
Ceniza (%)	2,73	2,63	2,96
pH	5,62	5,60	5,67
Acidez (%)	0,47	0,48	0,49
Glucosa (g/kg)	4,9480	6,1150	5,5315

REALIZADO POR:

FUENTE. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL

DIRIGIDO POR: B.Q. ALICIA ZAVALA

ATENTAMENTE.

B.Q. ALICIA Z.

TÉCNICO RESPONSABLE DEL LAB. DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL ESPOCH



FECHA DE ENTREGA: 20/07/2021

ANEXO R: Fotografías del trabajo de campo.



Fermentación del cacao



Fermentación del cacao



Secado del cacao



Almendras peladas



Pesado de muestras



Prueba de corte



Elaboración de pasta de cacao



Espectrofotómetro



Determinación de humedad



Determinación de pH



Pesaje de muestras y reactivos



Barra de chocolate



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 18 / 05 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Rocio Natividad Morejón Lucio</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Instituto de Posgrado y Educación Continua
Título a optar: <i>Magíster en Agroindustria mención Gestión de la Calidad y Seguridad Alimentaria</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.

0045-DBRA-UPT-IPEC-2022

outlook.office.com/mail/fnbox/td/AAQkAGU3Nm10N2JyLWVjNWVtNDdiZC05OWU2LTksZmJlYWI2ZmRjNwAQABjKej9yIHIInprgONbb...

Gmail Sign in to your Micr... Cambridge LMS What's your nickna... Guía para Normaliz... Estudia Maestría en...

Outlook Buscar Llamada de Teams

Mensaje nuevo Eliminar Archivo No deseado Limpiar Mover a Categorizar Posponer Deshacer

Prioritarios Otros Filtrar

Coty Gonzalez
Firmas tesis
HAGALAS MANUALES PORFA
Mié 18/5

Luis Eduardo Hidalgo Almeida
FIRMA DE DOCUMENT...
Documentos firmados.
CERTIFICAC DE... +3
Mié 18/5

Stefany Catalina Maygualema Ojeda
INFORMACIÓN
-Buenos días, les comparto esta inf...
Mar 17/5

Microsoft Viva
Tu informe diario
Lun 16/5
Hola, ROCIO NATIVIDAD MOREJON...

GUSTAVO JAVIER S...
Traduccion Abstract
Lo siento, aqui esta Sent from Mail...
2022Mayo14.R...
Dom 15/5

IVAN PATRICIO SALGADO TELLO
Actas Firmadas
Saludos, envío actas firmadas Ing. I...
DEFENSA TRIB... +3
Vie 13/5

Microsoft Viva
Tu informe diario
Vie 13/5

Traduccion Abstract

GUSTAVO JAVIER SANTAMARIA ECHEVERRIA
Adjunto la traduccion. Saludos, Gustavo Santamaria B.A.M.S.C.E.L.T.A. Sent from Mail for Windows
Sáb 14/5/2022 23:40

GUSTAVO JAVIER SANTAMARIA ECHEVERRIA
Para: ROCIO NATIVIDAD MOREJON LUCIO
CC: Centro de Idiomas
2022Mayo14_RESUMEN TESTI...
14.02

Lo siento, aqui esta
Sent from Mail for Windows

ROCIO NATIVIDAD MOREJON LUCIO
Muchas gracias mi estimado. Obtener Outlook para Android
From: GUSTAVO JAVIER SANTAMARIA ECHEVERRIA <gustavo.santamaria@esPOCH.edu.ec> Se...
Dom 15/5/2022 0:22

10:10
30/05/2022