



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES**

CARRERA DE AGROINDUSTRIA

INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN

Modalidad: Proyecto de Investigación

TEMA:

**“EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN DEL CACAO
SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero (a) Agroindustrial

Línea de investigación: Gestión, producción, productividad, innovación y desarrollo socioeconómico.

Autor: Mayra Alexandra Orbe Chamorro

Director: Ing. Luis Armando Manosalvas Quiroz Msc.

Ibarra 2023



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

| DATOS DE CONTACTO | | | |
|-----------------------------|--|------------------------|------------|
| CÉDULA DE IDENTIDAD: | 0401990155 | | |
| APELLIDOS Y NOMBRES: | Orbe Chamorro Mayra Alexandra | | |
| DIRECCIÓN: | Ibarra, El Olivo | | |
| EMAIL: | maorbec@utn.edu.ec | | |
| TELÉFONO FIJO: | (06)2272147 | TELÉFONO MÓVIL: | 0987762366 |

| DATOS DE LA OBRA | | | |
|--------------------------------|--|-----------------------------------|--|
| TÍTULO: | Efecto de los parámetros de fermentación del cacao sobre la actividad antioxidante | | |
| AUTOR (ES): | Orbe Chamorro Mayra Alexandra | | |
| FECHA: DD/MM/AAAA | 14/11/2023 | | |
| SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO | | | |
| PROGRAMA: | <input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO | <input type="checkbox"/> POSGRADO | |
| TÍTULO POR EL QUE OPTA: | Ingeniera Agroindustrial | | |
| ASESOR /DIRECTOR: | Ing. Luis Armando Manosalvas MSc. | | |

2. CONSTANCIAS

La autora manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es la titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los catorce días del mes de noviembre de 2023

EL AUTOR:

Mayra Alexandra Orbe Chamorro

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, 14 de noviembre del 2023

Ing. Luis Armando Manosalvas. MSc
DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

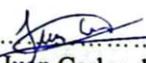


Ing. Luis Armando Manosalvas. MSc
C.C.: 1001772134

APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificador del trabajo de Integración Curricular "EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN DEL CACAO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE" elaborado por **Mayra Alexandra Orbe Chamorro**, previo a la obtención del título de Ingeniero (a) Agroindustrial, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(f): 
Ing. Luis Armando Manosalvas. MSc
C.C.: 1001772134

(f): 
Ing. Juan Carlos de la Vega MSc.
C.C.: 1002958856

(f): 
Ing. Jimmy Nuñez MSc.
C.C.: 1756606339

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres Aníbal y Alicia por hacer realidad este sueño y por nunca dejar de creer en mí.

Mayra Orbe

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgen María quienes me dieron fuerza y fortaleza en mis momentos difíciles y en quienes me apoye cuando más necesite.

A mis padres Alicia y Aníbal, por confiar y ser un pilar fundamental en el desarrollo de esta carrera. A mi padre, quien, a pesar de todas las dificultades, nunca dejó de creer en mí y me brindó apoyo económico. A mi madre, quien, con su sabiduría y sus consejos, me guió por el camino correcto.

A mis hermanos, Luis y Evelyn, por brindarme sus consejos y ánimos, ayudándome a perseverar y mantenerme firme durante todo este trayecto.

A mi familia por estar siempre ahí, apoyarme cuando más necesite especialmente a mi Tía Mónica por que supo motivarme y estar siempre ahí.

A mi Universidad Técnica del Norte por brindarme la oportunidad de formarme académicamente. Asimismo, quiero extender un agradecimiento quienes forman parte de esta prestigiosa institución, a mis Maestros, quienes han transmitido sus conocimientos y me han guiado en mi crecimiento profesional, especialmente al Ing. Armando Manosalvas, Ing. Juan Carlos de la Vega e Ing. Jimmy Nuñez. Del mismo modo, quiero agradecer al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Asociación productora de Lita quienes nos brindaron su conocimiento y apoyo en cada uno de los objetivos planteados.

A mis amigos y compañeros quienes han estado a mi lado de una u otra forma a lo largo de este trayecto. Su amistad, apoyo y compañía han sido fundamentales para hacer de este camino una experiencia inolvidable.

RESUMEN

Adicionalmente, se realizó un ensayo de escalado del mejor tratamiento (T1) a escala de producción. El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo que genera beneficios económicos en varios países y es una fuente de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. La cantidad de sustancias químicas presentes en los granos de cacao depende del manejo postcosecha, donde la fermentación es la etapa más importante. Sin embargo, las dificultades de este manejo afectan significativamente a la calidad de la semilla. Por lo tanto, la investigación fue dirigida a evaluar los parámetros de fermentación y su impacto en el contenido de compuestos funcionales de los granos de cacao en las variedades CCN-51 y Nacional, que son de interés en las zonas productoras. Para el análisis de los datos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con dos factores: tiempo de fermentación y variedad, con las variables de respuesta de contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante, determinados por el método Folin Ciocalteu y ABTS, respectivamente. Los análisis estadísticos mostraron que la cantidad de polifenoles y actividad antioxidante varió significativamente en función del tiempo y la variedad en las diferentes muestras tomadas. Además, el clon CCN-51 sin fermentar tuvo mayor contenido de metabolitos y actividad antioxidante. Asimismo, al finalizar la fermentación fue el genotipo que logró conservar estos compuestos con relación a la variedad Nacional., donde no se encontró variación en el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante en los granos.

Palabras clave: Fermentación, polifenoles, antioxidantes, cacao

ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a crop that generates economic benefits in several countries and is a source of bioactive compounds beneficial to health. The amount of chemical substances present in cocoa beans depends on post-harvest handling, where fermentation is the most important stage. However, difficulties in this process significantly affect seed quality. Therefore, the research was aimed at evaluating fermentation parameters and their impact on the content of functional compounds in cocoa beans of the CCN-51 and Nacional varieties, which are of interest in producing areas. For data analysis, a completely randomized design with two factors was used: fermentation time and variety, with the response variables being total polyphenol content and antioxidant capacity, determined by the Folin-Ciocalteu and ABTS methods, respectively. Statistical analyses showed that the number of polyphenols and antioxidant activity varied significantly depending on time and variety in the different samples taken. Furthermore, the unfermented CCN-51 clone had a higher content of metabolites and antioxidant activity. Likewise, at the end of the fermentation process, this genotype managed to preserve these compounds in relation to the Nacional variety. Additionally, a scaling trial of the best treatment (T1) was conducted on a production scale, where no variation in the content of bioactive compounds and antioxidant activity in the beans was found.

Keywords: Fermentation, polyphenols, antioxidants, cocoa

LISTADO DE SIGLAS

INIAP. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

CCN. Colección Castro Naranjal

APL. Asociación de Productores de Lita

INIAP. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

INEN. Instituto Ecuatoriano de Normalización

NTE. Norma Técnica Ecuatoriana

CIE. Comisión Internacional de Iluminación

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE TABLAS | xiii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xiv |
| ÍNDICE DE ANEXOS | xv |
| INTRODUCCIÓN..... | 16 |
| PROBLEMA | 16 |
| JUSTIFICACIÓN | 17 |
| Objetivos..... | 18 |
| Objetivo General..... | 18 |
| Objetivos Específicos | 18 |
| HIPÓTESIS | 18 |
| Alternativa | 18 |
| Nula..... | 18 |
| CAPÍTULO I..... | 19 |
| MARCO TEÓRICO | 19 |
| 1.1 Cacao..... | 19 |
| 1.1.1 Botánica..... | 19 |
| 1.1.2 Taxonomía del Cacao | 21 |
| 1.2 Tipos de Variedades de Cacao en Ecuador..... | 21 |
| 1.2.1 Cacao Nacional..... | 21 |
| 1.2.2 Cacao CCN-51..... | 22 |
| 1.3 Composición del Grano de Cacao..... | 23 |
| 1.4 Fermentación..... | 24 |
| 1.4.1 Etapas de la Fermentación..... | 24 |
| 1.5 Métodos de Fermentación del Cacao | 27 |

| | | |
|---------------------------|--|----|
| 1.5.1 | Fermentación en Montón..... | 27 |
| 1.5.2 | Fermentación en Cajas de Madera..... | 27 |
| 1.5.3 | Fermentación en Tambor Giratorio | 27 |
| 1.6 | Clasificación y Características del Grano Fermentado | 28 |
| 1.7 | Factores que Influyen en la Fermentación | 28 |
| 1.7.1 | Variedad..... | 28 |
| 1.7.2 | Tiempo de fermentación | 29 |
| 1.7.3 | Microorganismos | 29 |
| 1.7.4 | Temperatura..... | 30 |
| 1.7.5 | Remoción o Volteo..... | 31 |
| 1.7.6 | Color | 32 |
| 1.8 | Componentes Bioactivos del Cacao..... | 33 |
| 1.8.1 | Compuestos fenólicos en el cacao | 33 |
| 1.8.2 | Actividad Antioxidante del Cacao..... | 35 |
| 1.9 | Efecto de los Parámetros de Fermentación sobre la Calidad Funcional del Cacao | 36 |
| 1.9.1 | Tiempo de fermentación sobre el contenido de polifenoles y actividad antioxidante..... | 36 |
| 1.9.2 | Variedad de cacao sobre el contenido de polifenoles y actividad antioxidante | 37 |
| 1.10 | Métodos para Evaluar la Capacidad Antioxidante..... | 39 |
| 1.10.1 | Método 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS+) | 39 |
| 1.10.2 | Método del poder reductor (DPPH)..... | 40 |
| 1.11 | Psicometría | 40 |
| 1.11.1 | Diagrama Psicrométrico | 40 |
| 1.11.2 | Propiedades de la psicometría | 41 |
| CAPÍTULO II..... | | 42 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | | 42 |
| 2.1 | Caracterización del Área de Estudio..... | 42 |

| | | |
|------------------------------|---|----|
| 2.1.1 | Fase Experimental | 42 |
| 2.1.2 | Fase de Laboratorio | 44 |
| 2.2 | Materiales y Equipos..... | 45 |
| 2.3 | Descripción de la Metodología | 47 |
| 2.3.1 | Cuantificación de los Principales Compuestos Fenólicos responsables de la Actividad Antioxidante en el Cacao..... | 47 |
| 2.3.2 | Evaluación del Efecto del Tiempo de Fermentación sobre la Actividad Antioxidante en las Variedades de Cacao | 50 |
| 2.3.3 | Determinación de la Actividad Antioxidante del Mejor Tratamiento a Escala de Fermentación Productiva..... | 52 |
| 2.4 | Manejo del Proceso de Fermentación | 53 |
| 2.4.1 | Descripción del Proceso | 53 |
| CAPITULO III | | 59 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 59 |
| 3.1 | Compuestos Fenólicos responsables de la Actividad Antioxidante en el Cacao..... | 59 |
| 3.2 | Efecto del Tiempo de Fermentación sobre la Actividad Antioxidante..... | 61 |
| 3.2.1 | Capacidad Antioxidante | 62 |
| 3.2.2 | Temperatura..... | 69 |
| 3.2.3 | Humedad del grano..... | 71 |
| 3.2.4 | Porcentaje de fermentación | 71 |
| 3.2.5 | Colorimetría..... | 72 |
| 3.2.6 | Solidos solubles | 75 |
| 3.3 | Actividad Antioxidante del Mejor Tratamiento a Escala de Fermentación Productiva ... | 76 |
| 3.3.1 | Polifenoles totales..... | 76 |
| 3.3.2 | Capacidad Antioxidante | 78 |
| 3.3.3 | Temperatura..... | 79 |

| | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|----|
| 3.3.4 | Porcentaje de fermentación | 80 |
| CAPITULO IV | | 81 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 81 |
| 4.1 | Conclusiones | 81 |
| 4.2 | Recomendaciones | 81 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 82 |
| ANEXOS | | 93 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabla 1 | Botánica del cacao | 20 |
| Tabla 2 | Taxonomía del cacao | 21 |
| Tabla 3 | Composición química del cotiledón de cacao fresco..... | 23 |
| Tabla 4 | Características de granos fermentados | 28 |
| Tabla 5 | | 35 |
| Tabla 6 | Actividad Antioxidante en el grano de cacao | 36 |
| Tabla 7 | Propiedades de la psicometría | 41 |
| Tabla 8 | Condiciones climatológicas | 42 |
| Tabla 9 | Condiciones ambientales en función del tiempo(días) | 43 |
| Tabla 10 | Condiciones climatológicas de las áreas de estudio | 45 |
| Tabla 11 | Materiales y Equipos de campo..... | 45 |
| Tabla 12 | Materiales y Equipos de la fase experimental | 46 |
| Tabla 13 | Tratamientos | 49 |
| Tabla 14 | Variables de estudio..... | 51 |
| Tabla 15 | Análisis de varianza para Capacidad Antioxidante | 62 |
| Tabla 16 | Color en los granos de cacao de dos variedades..... | 73 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Temperatura durante la fermentación | 31 |
| Figura 2 Cambios físicos en los granos de cacao en función del tiempo | 32 |
| Figura 3 Diagrama psicrométrico | 40 |
| Figura 4 Propiedades Psicrométricas del Aire a la Presión Biométrica de la Parroquia de Lita.... | 44 |
| Figura 5 Diseño de cajones fermentadores..... | 49 |
| Figura 6 Corte y extracción de cacao CCN-51..... | 53 |
| Figura 7 a) Selección de semillas de cacao b) Pesado de semillas de cacao..... | 54 |
| Figura 8 Pre- acondicionamiento de Cacao..... | 54 |
| Figura 9 Proceso de fermentación a) Fermentación productiva b) Fermentación escala piloto..... | 55 |
| Figura 10 Volteo de semillas de cacao | 56 |
| Figura 11 Fermentación variedad Nacional | 56 |
| Figura 12 Secado de semillas de cacao | 57 |
| Figura 13 Diagrama de flujo del proceso de fermentación | 58 |
| Figura 14 Contenido de Polifenoles en función del tiempo de dos variedades de cacao | 59 |
| Figura 15 Capacidad antioxidante en los diferentes tratamientos | 63 |
| Figura 16 Actividad antioxidante en relación con la variedad durante la fermentación | 64 |
| Figura 17 Actividad antioxidante en relación con el tiempo de fermentación..... | 65 |
| Figura 18 Curva de capacidad antioxidante en función del tiempo y la variedad..... | 67 |
| Figura 19 Diagrama de Pareto de diferentes factores sobre la actividad antioxidante..... | 68 |
| Figura 20 Correlación de Polifenoles y Capacidad Antioxidante | 69 |
| Figura 21 Relación temperatura y tiempo en las dos variedades de cacao..... | 70 |
| Figura 22 Tratamientos en el espacio de Cielab a) Variedad CCN-51 b) Variedad Nacional | 74 |
| Figura 23 Cambios de color durante la fermentación | 75 |
| Figura 24 Contenido de polifenoles en dos tipos de fermentaciones | 77 |
| Figura 25 Capacidad antioxidante en granos de cacao..... | 78 |
| Figura 26 Relación de temperatura y tiempo | 79 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|-----|
| Anexo 1 Determinación de compuestos fenólicos o polifenoles totales | 93 |
| Anexo 2 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de decoloración del catión radial ABTS+ | 98 |
| Anexo 3 Porcentaje de fermentación..... | 102 |
| Anexo 4 Determinación colorimétrica | 107 |
| Anexo 5 Prueba de Kruskal Wallis | 108 |
| Anexo 6 Prueba Tukey para polifenoles en las variedades de cacao | 109 |
| Anexo 7 Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) | 109 |
| Anexo 8 Prueba Tukey 5% | 109 |
| Anexo 9 Prueba Tukey de Fermentación Productiva y escala piloto..... | 110 |
| Anexo 10 Resultados del INIAP Polifenoles y Capacidad antioxidante..... | 111 |

INTRODUCCIÓN

PROBLEMA

En la actualidad, el cultivo de cacao se ha convertido en una actividad agrícola importante en Ecuador, debido a que contribuye al sector económico del país. Algunos productores dependen de los ingresos generados por este cultivo ya que es uno de los principales productos de exportación y representa el área agrícola más sembrada en el país (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2021);(Durango, Caicedo, Vera, Sotomayor, Saini, & Chávez, 2019).

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es una especie vegetal que se cultiva en climas tropicales y su principal producto son las almendras o granos de cacao, que se utilizan como materia prima para la fabricación de chocolates, manteca y otros derivados. La composición bioquímica de la semilla depende de la genética, manejo del cultivo y la postcosecha. Entre estos procesos está la fermentación, la cual es una etapa fundamental para el desarrollo de color, aroma, sabor y propiedades químicas y físicas particulares (Arvelo et al., 2017).Sin embargo, la mayoría de los productores carecen de procesos estandarizados, asistencia técnica y control de los parámetros de fermentación. En consecuencia, se obtienen granos de cacao con sabores amargos, alta acidez, astringencia y propiedades fisicoquímicas inadecuadas para su comercialización (INFOCACAO, 2017).

Asimismo, este fruto es conocido por ser una fuente de compuestos bioactivos y antioxidantes que ayudan en la salud previniendo enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, bacterianas, cardiogénicas y degenerativas (Aprotosoai et al., 2016). En este contexto, la fermentación es esencial puesto que un inadecuado manejo del proceso conlleva a la pérdida de

polifenoles responsables de la actividad antioxidante los cuales proporcionan propiedades funcionales en el ser humano (Chacón Ortiz et al., 2021).

Es así, que dentro de la producción cacaotera la fermentación interviene directamente en la calidad del cacao y se considera un factor importante para la innovación de productos. Por lo tanto, es necesario identificar adecuadamente las condiciones y tiempos en el proceso de fermentación y conocer el impacto que este proceso tiene sobre los compuestos bioactivos con el fin de dar un valor agregado a los productos generados por este cultivo.

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de cacao es fundamental en la economía del país debido a que genera fuentes de empleo, beneficia a numerosas familias y contribuye al desarrollo de la región. Sin embargo, el inadecuado manejo del proceso de postcosecha ha limitado la capacidad de los productores para mejorar las características del grano. Por lo tanto, la implementación de esta investigación permitirá mejorar la etapa de fermentación y obtener un producto con propiedades físicas y químicas aptas para comercializarse. Además, fortalecerá la rentabilidad de la producción de cacao en la zona.

Por otro lado, en la industria cacaotera el mercado es competitivo debido a la demanda del producto, por tal motivo es necesario tener enfoques innovadores para satisfacer de manera eficiente las necesidades de los consumidores. En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo transmitir a los cacaoteros la importancia que tiene el proceso de fermentación del cacao y la conservación polifenoles y actividad antioxidante. Pues son la herramienta para generar nuevas estrategias de negocio y posicionarse en el mercado internacional.

En este sentido, la importancia del estudio permitirá que los agricultores amplíen su conocimiento sobre los parámetros del proceso de fermentación y puedan conservar las

propiedades funcionales para obtener un cacao de calidad con el propósito de fortalecer el ámbito social, económico y financiero que podrían tener a futuro los productores.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de los parámetros de fermentación del cacao sobre la actividad antioxidante.

Objetivos Específicos

- Cuantificar los principales compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante en el cacao.
- Evaluar el efecto del tiempo de fermentación sobre la actividad antioxidante en las variedades de cacao
- Determinar la actividad antioxidante del mejor tratamiento a escala de fermentación productiva.

HIPÓTESIS

Alternativa

Ha = El tiempo del proceso de fermentación en dos variedades de cacao influyen sobre la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos

Nula

Ho = El tiempo del proceso de fermentación en dos variedades de cacao no influyen sobre la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Cacao

El cacao, también llamado *Theobroma cacao* L., es un cultivo perenne nativo de Sudamérica, se desarrolló con los aztecas en Centroamérica y luego fue introducido en Europa, donde su consumo se volvió muy popular. Este cultivo se clasifica en tres tipos de variedades: el criollo, forastero y trinitario. El criollo es un cacao procedente de Suramérica y Centroamérica caracterizado por su sabor y aroma sutil. Asimismo, forastero es cultivado en la cuenca amazónica y se lo reconoce por su forma ovalada. Finalmente, trinitario es un tipo de cacao originario en Trinidad mediante la hibridación natural del criollo y el forastero. A partir de estas variedades se obtienen diferentes tipos de cultivos, como variedades, híbridos y clones, cultivados en todo el mundo (Arvelo et al., 2017).

El cultivo del cacao es una actividad económica fundamental a nivel mundial y Ecuador es uno de los principales productores en América Latina debido a las condiciones climáticas favorables que permiten obtener un fruto con características únicas de aroma y sabor. Del mismo modo, se ha posicionado internacionalmente beneficiando así a la producción cacaotera siendo un factor importante de crecimiento económico. De tal modo que ha creado oportunidades de empleo e ingresos para muchas familias campesinas y aumentado la rentabilidad de la producción de cacao (Durango et al., 2019).

1.1.1 Botánica

La clasificación botánica del cacao lo sitúa en la categoría de las drupas, también conocidas como mazorcas. Las propiedades físicas y químicas de esta planta varían según

diversos factores, tales como la variedad, genética, tipo de suelo y fertilización aplicada durante el cultivo (Tabla 1).

Tabla 1

Botánica del cacao

| Descripción | Características |
|---------------------------|---|
| Género | <i>Theobroma</i> |
| Familia | <i>Malvaceae</i> |
| Latitud | 15°S y los 18°N en ambientes húmedos |
| Temperaturas mínimas | 16 °C |
| Temperaturas máximas | 33 °C |
| Crecimiento | Zonas tropicales |
| Raíces del árbol | 1,50 a 2m |
| Niveles de lluvia | 1250 a 3000 mm - 1500 y 2000 mm. |
| Tallo | Orto trópico (vertical) en la primera fase |
| Formación | 4 o 5 ramas secundarias "horquetas". |
| Clasificación botánica | Drupas o bayas |
| Tamaños | 10 y 42 cm |
| Forma del fruto | “Oblonga, elíptica, ovada, irregular”(Ramírez Guillermo et al., 2018) |
| Superficie del fruto | Llana o áspera |
| Color | Colores violetas o en su defecto verde |
| Ápice | Depende del genotipo: Agudo, obtuso, atenuado entre otros. |
| Cáscara | Gruesa, delgada o intermedia |
| Epicarpio y el endocarpio | Carnosos |
| Mesocarpio | Fino y leñoso |
| Semillas | 30 y 60 |
| Tamaño de la semilla | Longitud: 15 y 40 mm y diámetro: 10 y 22 mm |

Nota. Tomado de Perea Villamil (2019).

1.1.2 Taxonomía del Cacao

El género *Theobroma cacao* es una planta nativa de la Amazonia y domesticada en Mesoamérica y Amazonas (Watson et al., 2013). Actualmente, esta especie es ampliamente cultivada debido a su importancia en la producción de chocolate, licor y manteca de cacao. A continuación, se presenta la clasificación taxonómica para este cultivo (Tabla 2) (Arvelo et al., 2017).

Tabla 2

Taxonomía del cacao

| | |
|--------------|---------------------------|
| Reino | <i>Plantae</i> |
| División | <i>Magnoliophyta</i> |
| Clase | <i>Magnoliopsida</i> |
| Orden | <i>Malvales</i> |
| Familia | <i>Malvaceae</i> |
| Género | <i>Theobroma</i> |
| Especie | <i>Theobroma cacao</i> L. |

Nota. Tomado de (Arvelo et al., 2017).

1.2 Tipos de Variedades de Cacao en Ecuador

De acuerdo con la normativa del Instituto Ecuatoriano de Normalización, (2018), en Ecuador existen dos variedades importantes de cacao:

1.2.1 Cacao Nacional

El "Cacao Nacional" es el producto insignia de Ecuador, destacándose por sus características únicas de aromas frutales, florales e incluso notas especiadas, su sabor a nuez, frutas, especias y otros sabores sutiles. Además, el clima y la ubicación geográfica de las

regiones de producción del cacao ecuatoriano son ideales para obtener granos de alta calidad. Según, las estadísticas publicadas por ANECACAO (2015), Ecuador produce el 63% del cacao fino de calidad en el mundo, siendo un producto valorado y demandado por el mercado internacional.

Asimismo, esta variedad se utiliza en la elaboración de chocolate refinado, debido a su aroma, sabor y textura suave, que lo hace atractivo para los consumidores. En Latinoamérica, Ecuador lidera la exportación de este tipo de cacao, seguido por Venezuela, Panamá y México. Además, se observa un creciente interés en incrementar la producción y exportación de cacao de calidad (ANECACAO, 2015b).

El cacao Nacional es cultivado en diversas regiones, entre ellas la cuenca alta de los ríos Daule y Babahoyo, que desembocan en el río Guayas(Salas Rivera, 2014). Antiguamente, el cacao producido en estas zonas se transportaba hasta el puerto de Guayaquil para su exportación, es así como se lo denominó "cacao arriba", debido a su origen en las zonas altas de los ríos (PRO-ECUADOR, 2013). Este tipo de cacao es especialmente apreciado por los productores, ya que su proceso de fermentación es relativamente corto, aproximadamente cuatro días en las condiciones locales (Jiménez Barragán et al., 2016).

1.2.2 Cacao CCN-51

Es una variedad originaria de Ecuador y fue desarrollada mediante la clonación de cruces selectivos entre las variedades criollo y el forastero, con el objetivo de obtener una variedad resistente y productiva. Una de las características distintivas de este cacao es el color del fruto más rojo durante la maduración. Además, el contenido de grasa y pulpa de este cacao es superior con relación a la variedad Nacional, por lo que es demandado en ciertos sectores del mercado, como en la elaboración a gran escala de chocolate y su aplicación en la creación de

otros productos derivados. La capacidad de producción del clon CCN-51 y su resistencia a plagas y enfermedades es superior que la variedad Nacional. Sin embargo, CCN-51 requiere cuidados y un proceso de producción más orgánico debido al uso de pesticidas y fertilizantes en su cultivo (ANECACAO, 2015a).

1.3 Composición del Grano de Cacao

La pulpa que envuelve las semillas del cacao presenta una textura mucilaginosa y contiene principalmente azúcares (10-15%), especialmente sacarosa, pectina (1-1.50%), agua (80-90%) ácido cítrico (1-3%), proteínas (0.50-0.70%) y minerales como calcio, potasio, sodio, magnesio, hierro y zinc (8-10%) y vitamina C (Sarbu & Csutak, 2019). Además, en la Tabla 3 se detallan varios componentes que se encuentran en el cotiledón del cacao fresco (Carmen & Erazo, 2019; Steinau et al., 2017).

Tabla 3

Composición química del cotiledón de cacao fresco

| Componente | % |
|---------------------------|----------|
| Grasa | 54.00 |
| Agua | 32.50 |
| Proteína | 11.50 |
| Ácidos orgánicas y aromas | 9.50 |
| Celulosa | 9.00 |
| Ácidos tánicos y color | 6.00 |
| Sales minerales | 2.60 |
| Teobromina | 2.50 |
| Azúcares | 2.50 |
| Cafeína | 1.00 |

Nota. Tomado de Steinau et al., (2017).

1.4 Fermentación

La fermentación es fundamental para el procesamiento del cacao debido a que ocurre una serie de reacciones que generan cambios fisicoquímicos en los granos. Además, es responsable del desarrollo de los precursores del sabor y aroma característicos de este fruto (López Hernández & Criollo Nuñez, 2022).

1.4.1 Etapas de la Fermentación

La fermentación inicia con la recepción del cacao en baba, se realiza un control de calidad para verificar que el cacao cumpla con características similares en cuanto a color, humedad, temperatura y concentración de azúcar. Además, se registra el volumen de cacao que se procesa, con el fin de optimizar costos y asegurar la trazabilidad del producto.

Posteriormente, el cacao requiere un período de 8 a 12 horas para el pre acondicionamiento, debido a que, algunas variedades de cacao contienen mayor cantidad de pulpa y ayuda a reducir la acidez del cacao para acelerar el proceso de fermentación.

Finalmente, se introduce una cantidad que oscila entre 60 y 200 kg de cacao fresco, dependiendo del método de fermentación. Una vez concluida la primera etapa de fermentación del cacao, se realiza el primer volteo, que generalmente ocurre alrededor de las 48 horas. Posteriormente, se realiza un volteo cada 24 horas para mantener una temperatura óptima de 48^a 51 °C. Asimismo se considera la actividad de microorganismos, las variaciones en el pH y la disminución de los azúcares presentes (Conservación y gobernanza en el piedemonte Amazónico, 2021).

Durante el proceso químico que ocurre en la fermentación del cacao, diferentes cepas de microorganismos interactúan entre sí y transforman el azúcar contenido en la pulpa de la semilla

en alcohol. Posteriormente, el alcohol se oxida y se transforma en ácido acético con ayuda de bacterias, lo cual provoca la muerte del embrión. Además, ocurren dos reacciones importantes: la hidrólisis de proteínas y la oxidación de polifenoles las cuales se explican a continuación: (Marseglia et al., 2019).

1.4.1.1 Glucolisis. La glucólisis es el catabolismo anaeróbico oxidativo, es decir es una descomposición de glucosa en piruvato, adenosín trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) mediante varias reacciones. Además, el desarrollo de la glucólisis se lleva a cabo en dos etapas:

La primera se denomina gasto energético o etapa preparativa, ocurren cinco reacciones con el propósito que la molécula de glucosa se transforme en dos moléculas de gliceraldehído, es caracterizada por su naturaleza degradativa, sin involucrar procesos de oxidación. En lugar de obtener ATP, se consumen dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Plaza Díaz et al., 2013).

La segunda es la obtención de energía o etapa oxidativa de la misma manera que la primera etapa ocurren cinco reacciones en las que el NAD se reduce a $\text{NADH} + \text{H}^+$, mientras que se generan cuatro moléculas de ATP mediante la transferencia de grupos fosfato al ADP (adenosín difosfato). Además, se produce una molécula de piruvato (la forma ionizada del ácido pirúvico) a partir de cada molécula de gliceraldehído, y dos piruvatos por cada glucosa.

Finalmente, en la vía glucolítica, se obtienen dos moléculas de piruvato, dos de ATP y dos de NADH. A pesar de que se han generado cuatro moléculas de ATP, se han consumido dos en la formación de la fructosa 1,6-bisfosfato (Plaza Díaz et al., 2013).

1.4.1.2 Fermentación Alcohólica. Al inicio de la fermentación actúa un grupo de microorganismos denominados levaduras, las cuales convierten la glucosa y la fructosa del

mucilago de las semillas mediante la glucólisis en ácido pirúvico y posteriormente en alcohol. Esta etapa ocurre en condiciones anaerobias y con un pH 4 por un lapso de 24 a 36 horas. Además, se ha comprobado que en esta fase se desarrollan metabolitos secundarios que contribuyen a los precursores del sabor y aroma del cacao (Teneda William, 2017).

1.4.1.3 Fermentación Láctica. En esta fase intermedia, actúan otro tipo de microorganismos conocidos como bacterias, estas cepas están presentes desde el inicio, pero su predominio se desarrolla entre las 48 y 96 horas. Estas bacterias poseen la capacidad de convertir los azúcares y algunos ácidos orgánicos en ácido láctico (Solarte Rangel, 2022);(Conservación y gobernanza en el piedemonte Amazónico, 2021).

1.4.1.4 Fermentación Acética. Finalmente, esta etapa se desarrolla a partir de las 48 horas, debido a la remoción del oxígeno en la masa se crea un ambiente aeróbico, estas condiciones permiten la proliferación de bacterias ácido acéticas las cuales se encargan de oxidar el alcohol y transformarlo en ácido acético. La oxidación del etanol se realiza en dos etapas: en la primera, el etanol se oxida a acetaldehído mientras que en la segunda el acetaldehído se transforma en ácido acético, se forman otros productos como acetato de etilo, butanol, isopropanol, compuestos intermedios de acetaldehído y ácidos orgánicos. En un lapso de 72 a 96 horas, las reacciones que ocurren durante el proceso de fermentación provocan un incremento de la temperatura hasta alcanzar los 50 °C. Las sustancias generadas a lo largo de este proceso conllevan a una disminución del pH. Simultáneamente, el aumento de la temperatura resulta en la muerte del embrión. Además, ocurre una reacción de hidrólisis de sacarosa y proteínas, estas son fundamentales, ya que son precursoras del sabor y aroma distintivos del grano (Teneda William, 2017).

1.5 Métodos de Fermentación del Cacao

La etapa de fermentación del cacao es esencial en su proceso, ya que se desarrollan los sabores característicos del chocolate. A continuación, se presentan diversos métodos utilizados en la fermentación del cacao:

1.5.1 Fermentación en Montón

El método en montón consiste en colocar el cacao sobre hojas de plátano o material que impida contacto directo con el suelo; además, se realizan perforaciones en las hojas para acelerar el drenaje del exceso de líquido; posteriormente, se remueve el cacao de un lado a otro para lograr una fermentación uniforme. Después de cada volteo, se vuelve a cubrir con las hojas. El tiempo de fermentación varía según el genotipo del cacao utilizado (Nogales, 2021).

1.5.2 Fermentación en Cajas de Madera

Actualmente, el método utilizado para fermentar cacao son los cajones de madera y las dimensiones de estos dependerán de la cantidad utilizada en el proceso; generalmente las cajas son de la misma dimensión para lograr un fermentado homogéneo y se ubican de forma escalonada para facilitar el volteo también se utiliza cajones de forma lineal (Nogales, 2021).

1.5.3 Fermentación en Tambor Giratorio

El método consiste en un fermentador de madera diseñado en forma cilíndrica para mantener las condiciones de fermentación. Además, es apto para fermentar grandes cantidades de cacao sin embargo la desventaja de este es que no logra tener una fermentación homogénea y el costo de construcción es elevado (Neira Mosquera et al., 2020).

1.6 Clasificación y Características del Grano Fermentado

Para evaluar la calidad de la fermentación del cacao, se realiza el análisis de punto de corte, que consiste en dividir el grano y evaluar subjetivamente basándose en la Norma NTE INEN-ISO 1114. Según Aguilar, (2016) el grano fermentado es clasificado en función de atributos específicos, los cuales se encuentran descritos en la Tabla 4.

Tabla 4

Características de granos fermentados

| Características | Concepto |
|------------------------|--|
| Color | Marrón |
| Tamaño | Hinchado |
| Interior de la semilla | Grietas y estrías profundas |
| Testa | Suelta |
| Sabor | Frutal, nuez, cítrico, amargo ligero y aromático |
| Textura | Firme y quebradizo |

Nota. Tomado de (Aguilar, 2016).

1.7 Factores que Influyen en la Fermentación

Existen diversos factores que influyen durante el proceso de fermentación, los cuales son:

1.7.1 Variedad

Existen tres tipos de cacao: criollo, forastero y trinitario que durante el tiempo evolucionaron y se modificaron mediante cruces de variedades para formar diferentes clones, cada genotipo formado tiene diferentes características fisicoquímicas y organolépticas. De igual manera cada genotipo tiene un comportamiento distintivo, por ejemplo: El cacao fino de aroma requiere un periodo de fermentación corto en comparación con otras variedades como el CCN-51, ya que ambos genotipos necesitan diferentes tiempos para adquirir perfiles de sabores

característicos. Asimismo, las variedades de cacao presentan diferentes perfiles de sabor y aroma después de la fermentación (Cruz et al., 2015).

1.7.2 Tiempo de fermentación

El tiempo depende de las variedades que se fermenten, por ejemplo: el cacao criollo requiere un tiempo de fermentación de uno a dos días, Nacional se demora tres y cuatro días y trinitario de cinco a siete días. Una fermentación prolongada puede resultar en sabores indeseables, mientras que una fermentación insuficiente puede afectar la calidad del cacao (Pancardo Lagunas, 2016).

Por otro lado, se debe tener en cuenta las condiciones climatológicas, localidad geográfica y el tipo de cultivo para definir el tiempo de fermentación. Sin embargo, el periodo que se estima para las diferentes variedades es entre 5 y 7 días. Además, es importante estudiar la zona para optimizar el tiempo de fermentación y mejorar el proceso de fermentación (Moreira et al., 2018).

1.7.3 Microorganismos

La diversidad de población microbiana durante la fermentación del cacao es amplia sin embargo se han realizado estudios utilizando métodos y técnicas para el recuento e identificación de la microbiota. Entre estos microorganismos se encuentran aquellos que interactúan durante la primera etapa anaeróbica, como las levaduras (*Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, y *Saccharomyces*). Posteriormente sucede la segunda etapa aeróbica en donde las bacterias ácido láctico (*Lactobacilli*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus*) y las bacterias ácido acético (*Acetobacter*) se vuelven predominantes debido a la presencia de oxígeno desencadenando varias reacciones dentro del grano.

Las reacciones bioquímicas que suceden durante el proceso de fermentación dependen de la cantidad de microorganismos presentes al inicio de la fermentación de tal modo que durante el proceso se logre producir los diferentes compuestos metabólicos que provocan la muerte del embrión y son responsables del color, sabor y aroma del cacao (Ureña & Sandoval, 2021; Viesser et al., 2021).

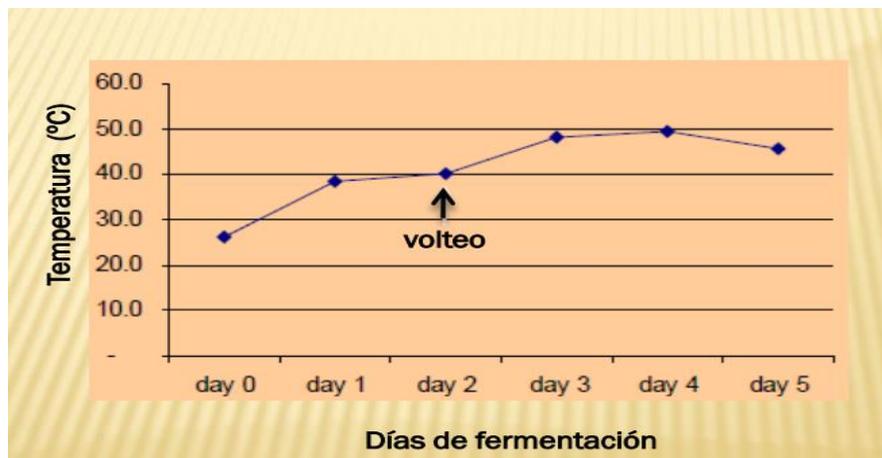
1.7.4 Temperatura

Durante la fermentación suceden varias reacciones que favorecen al aumento de temperatura de la masa de cacao. En la primera etapa del proceso fermentativo la temperatura inicial oscila entre 24 a 48 °C, rango óptimo para el desarrollo de las levaduras. Posteriormente se activan las bacterias ácido lácticas y acéticas y la temperatura aumenta hasta los 50°C, producto de la interacción de los microorganismos se forma ácido acético y láctico el cual provoca la muerte del cotiledón y la formación de precursores del sabor (Cruz et al., 2015).

La fermentación se realiza en un lugar cálido para promover el aumento de temperatura de tal modo que el proceso sea uniforme. Además, se debe evitar la exposición al viento para prevenir cambios bruscos de temperatura y contaminación de partículas externas. Asimismo, se sugiere edificar una construcción que resguarde el recipiente de la exposición solar, con el fin de prevenir el impacto de la luz ultravioleta sobre los microorganismos (Lambert, 2021). En la Figura 1 podemos observar la temperatura en función del tiempo de fermentación del cacao.

Figura 1

Temperatura durante la fermentación



Nota. Tomado de Lambert (2021)

1.7.5 Remoción o Volteo

El proceso de volteo del cacao tiene la finalidad de liberar de CO₂, aumentar la aireación, promover el crecimiento de las bacterias acéticas y lograr una fermentación uniforme. El volteo debe empezar a las 48 horas de iniciada la fermentación, luego se lo hará cada 24 horas hasta completar el tiempo de fermentación, generalmente son 5 a 7 días. Además, se debe tener en cuenta que el tiempo de volteo se ejecuta a la misma hora (Lambert, 2021). En la Figura 2 se observa los cambios físicos del cacao a medida que el tiempo avanza.

Figura 2

Cambios físicos en los granos de cacao en función del tiempo



Nota. Tomado de Lambert (2021)

1.7.6 Color

Los tonos que se encuentran en los alimentos se originan de una variedad de compuestos, mayormente de origen orgánico. Algunos de estos se generan durante las etapas de manipulación y procesamiento, mientras que otros son pigmentos naturales o aditivos colorantes sintéticos (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).

El cambio de color durante la fermentación del cacao es un indicador de que los procesos bioquímicos están ocurriendo en los granos de cacao. Además, este cambio es fundamental para el proceso de secado y tostado. En su estado fresco, los granos de cacao contienen pigmentos de antocianidina en tonalidades púrpuras, específicamente 3- β -D-galactosil- y 3- α -L arabinosilcianidinas. Durante el proceso de fermentación, estas sustancias son descompuestas por las glicosidasas, resultando en un color púrpura más tenue, fenómeno conocido como el aclaramiento de los cotiledones (E. Afoakwa et al., 2012).

Para la medición del color la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) ideó un modelo cromático que representa la totalidad de colores perceptibles por el ojo humano mediante la definición de un espacio cromático utilizando tres conjuntos de coordenadas: CIE XYZ, CIE L*a*b*, y CIE L*C*h °. De estos, se considera que el modelo CIE L*a*b*, es el más apropiado para la medición de color en contextos industriales (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).

1.8 Componentes Bioactivos del Cacao

Los compuestos bioactivos, también conocidos como fitoquímicos, son sustancias químicas presentes en alimentos de origen vegetal, poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas. Los principales grupos de compuestos bioactivos son polifenoles, carotenoides, carbohidratos bioactivos y fitoesteroles (Goudar et al., 2023; Prasedya et al., 2021).

1.8.1 Compuestos fenólicos en el cacao

Los compuestos fenólicos están presentes en frutas, vegetales y granos se caracterizan por sus beneficios para la salud. Específicamente, estos compuestos ayudan a prevenir enfermedades crónicas, cardiovasculares, neurogenerativas y digestivas.

El cacao es uno de los alimentos conocidos por contener alta cantidad de compuestos fenólicos entre ellos están los flavonoides, proantocianidinas (taninos condensados) y ácidos fenólicos. Algunos de estos compuestos químicos son los responsables de las características sensoriales como el sabor astringente que posee el cacao antes de someter al proceso de fermentación (Mikołajczak & Tańska, 2021).

1.8.1.1 Polifenoles Totales

“En los frutos de cacao se pueden distinguir 3 tipos de polifenoles: catequinas o flavan-3-oles (37 %), antocianinas (4 %) y proantocianidinas (58 %). La principal catequina es (-)-epicatequina con un máximo de hasta 35 % del contenido de polifenoles. También se han encontrado en cantidades menores (+)-catequina, (+)-galocatequina y (-) epigalocatequina” (Zapata et al., 2013, p.393). Además de los polifenoles el cacao contiene metilxantinas como: teobromina (3,7%) y cafeína (0,2%) (Melo et al., 2021).

A pesar de los efectos positivos en la salud, los fenoles y las metilxantinas presentes en el cacao pueden tener un impacto desfavorable en el sabor, aportando astringencia y amargor, lo que influye sobre la estabilidad y digestibilidad de los productos con altos niveles de estos compuestos químicos (Melo et al., 2021). Por lo tanto, se requieren procesos adicionales como la fermentación, el secado y el tostado para obtener las características sensoriales únicas y contrarrestar estos efectos negativos en el grano de cacao (De Vuyst & Weckx, 2016).

Con respecto a la cantidad de estos compuestos varía según la variedad y la región de donde proviene. Es fundamental destacar que el procesamiento de postcosecha puede afectar en un 70% el contenido de estas sustancias, lo que impide establecer una cantidad fija de polifenoles en el cacao (Fang et al., 2020). Adicionalmente se recopiló datos de varias investigaciones en las cuales se indica el contenido de polifenoles en granos de las variedades de cacao (Tabla 5).

Tabla 5

Contenido de polifenoles en el grano de cacao

| Variedad de Cacao | Lugar | Polifenoles Totales (mg Ac. Gálico/g) | Referencias |
|--------------------------|--------------|--|---------------------------|
| Nacional | Ecuador | 47.37±7.02 | (Samaniego et al., 2020a) |
| | Ecuador | 36.83 ± 7.89 | |
| | Ecuador | 52.86±12.40 | |
| CCN-51 | Ecuador | 50.02 | (Burbano, 2020) |
| | Colombia | 36.68±2.08 | (Pallares et al., 2016) |
| | Colombia | 95.41±2.50 | (Borja et al., 2022) |
| Forastero | Brasil | 77.31 ± 2.25 | (Brito et al., 2017) |

1.8.2 Actividad Antioxidante del Cacao

Los antioxidantes son sustancias químicas que el organismo humano utiliza para contrarrestar los radicales libres. Estas moléculas inestables son altamente reactivas que introducen oxígeno en las células, desencadenando la oxidación de sus componentes, alteraciones en el ADN y una serie de cambios variados que aceleran el proceso de envejecimiento del organismo (Bouayed & Bohn, 2010; Cruz et al., 2015).

El cacao es conocido por ser una fuente de compuestos fenólicos y antioxidantes ya que contiene alrededor del 6% al 4% respectivamente (Urbańska & Kowalska, 2019). Sin embargo, la composición puede cambiar debido a diferentes factores, como el genotipo de las plantas, las condiciones agroclimáticas, el proceso de postcosecha (fermentación y secado) y el procedimiento industrial. Durante el proceso de beneficio y posterior tostado del cacao, se produce una pérdida de los compuestos polifenólicos presentes en los granos causando una disminución en la capacidad antioxidante (Fang et al., 2020). A continuación, se presenta en la (Tabla 6) los datos recopilados de las investigaciones sobre la actividad antioxidante.

Tabla 6*Actividad Antioxidante en el grano de cacao*

| Variedad | Lugar | Actividad Antioxidante ($\mu\text{mol Trolox/g}$) | Referencias |
|-----------------|--------------|---|-----------------------------------|
| Forastero | Brasil | 1296.57 \pm 52.50 | (Brito et al., 2017) |
| CCN-51 | Colombia | 969.42 \pm 68.44 | (Pallares Pallares et al., 2017b) |
| UTVE01 | Colombia | 31.18 \pm 0.54 | (Borja Fajardo et al., 2022) |
| CCN-51 | | 52.12 \pm 4.71 | |
| UTLM02 | | 9.24 \pm 2.86 | |
| UTGC01 | | 56.17 \pm 1.74 | |

1.9 Efecto de los Parámetros de Fermentación sobre la Calidad Funcional del Cacao

Las propiedades funcionales de los granos de cacao son afectadas por dos factores: tiempo de fermentación y variedad de cacao. Durante el proceso de postcosecha (fermentación y secado) se registra una pérdida significativa de polifenoles, disminuyendo por ende la capacidad antioxidante. A continuación, se detalla cada uno de los factores mencionados anteriormente y los efectos que tienen durante el proceso de fermentación.

1.9.1 Tiempo de fermentación sobre el contenido de polifenoles y actividad antioxidante

Según Barišić et al., (2019) durante el proceso de fermentación ocurre una serie de reacciones destacando la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO), la cual libera los polifenoles a medida que avanza el tiempo de fermentación como consecuencia de esta reacción la capacidad antioxidante disminuye. Sin embargo, el resultado de este proceso reduce el amargor, la astringencia y aumenta el color marrón del grano. Asimismo, Wollgast & Anklam,

(2000) evidenciaron que el proceso de oxidación y la difusión en sudaciones de fermentación provoca la disminución de polifenoles en los granos de cacao durante el proceso.

Además, según Pallares Pallares et al., (2017) observaron que el contenido de polifenoles y actividad antioxidante disminuyó con valores registrados de 78.10 a 33.30 mg Ácido galico/g y 1055.20 a 347.30 $\mu\text{molTE/g}$ respectivamente. Asimismo Cortez et al., (2023) estudiaron la actividad antioxidante en dos variedades de cacao Criollo y CCN-51, durante la fermentación observó una correlación inversa entre el proceso fermentativo y la actividad antioxidante. Sin embargo, la variedad Criollo tuvo una mayor retención de estos compuestos. A pesar de que el contenido de polifenoles y actividad antioxidante se ve afectada por el tiempo de fermentación existen otros factores como la procedencia geográfica de donde se obtiene el cacao que pueden afectar a estas sustancias químicas (Urbańska & Kowalska, 2019).

Además, la (-)-epicatequina se reduce un 90% de su concentración inicial. Al mismo tiempo, las catequinas forman taninos complejos y las antocianinas se hidrolizan a antocianidinas, que se polimerizan. Esto puede ser catalizado por la enzima polifenoloxidasas, la epimerización de epicatequina causada por cambios de pH durante la fermentación y la polimerización de quinonas se efectúa durante el secado del cacao (Melo et al., 2021).

1.9.2 Variedad de cacao sobre el contenido de polifenoles y actividad antioxidante

Según Onomo et al., (2015) realizaron diversos estudios en diferentes genotipos y demostraron que los clones presentan diferentes cantidades en el contenido de polifenoles registrando valores entre 112.85 a 191.24 mg/g. Además, Calvo et al., (2021) evaluaron clones de diferentes sectores y comprobó que el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante, están influenciadas por el genotipo de cacao debido a su zona geográfica, manejo del cultivo y manejo de postcosecha. De igual manera Samaniego et al., (2020) comprobaron que

existen diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales de dos zonas de Ecuador Costa Pacífica y Amazonía dando como resultado valores entre 33.55 ± 5.74 a 71.66 ± 3.94 mg Ac. Gálico/g.

Por otro lado, Borja Fajardo et al., (2022) evaluaron diferentes genotipos y registraron los valores más altos de actividad antioxidante para los clones CCN-51 y UTVE01. De la misma manera Tello Alonso et al., (2020) reportaron valores de diferentes clones que oscilan entre 752.10 ± 8.40 a 297.47 ± 7.10 μm Trolox/g en granos frescos y 85.7 ± 0.03 a 69 ± 0.02 μm Trolox/g en granos fermentados. Además, para comprobar si existen otros factores que afectan a la composición química del cacao se realizó un estudio mediante imágenes hiperespectrales las cuales demostraron que los factores la variabilidad de la actividad antioxidante entre diferentes genotipos es atribuida por factores como la variedad, ubicación geográfica, tipo de cultivo y procesamiento de postcosecha (Caporaso et al., 2018). Incluso, el grado de domesticación puede ser uno de los factores en el contenido de polifenoles totales y antioxidantes (Avenidaño Arrazate et al., 2021).

Asimismo, E. Afoakwa et al., (2012) mencionaron que, durante la transformación de los granos de cacao frescos en chocolate, la concentración de compuestos bioactivos puede verse afectada por una variedad de condiciones biológicas y de procesamiento que incluyen la fermentación en donde, Brito et al., (2017) demostraron que el contenido de polifenoles en la variedad forastero disminuye de 77.31 ± 2.25 a 53.26 ± 10.72 mg Ácido gálico/g.

Finalmente, existen diferentes factores que influyen sobre el contenido de polifenoles sin embargo para que un grano de cacao sea comercialmente aceptable en las semillas de cacao fermentados secos y sin grasa generalmente esta entre 40 y 140 mg Ac. Gálico/g y para granos no fermentados entre 150 y 200 mg Ac. Gálico.

1.10 Métodos para Evaluar la Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante se analiza mediante los siguientes métodos: capacidad de reducción del hierro (FRAP), Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC), Poder Reductor (DPPH) y 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). Estos métodos son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos presentes en las frutas para captar los radicales libres generados, contrarrestando así los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación que involucran especies reactivas de oxígeno (M. Kuskoski et al., 2005). A continuación, se proporciona información sobre los métodos más utilizados e importantes en este campo.

1.10.1 Método 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS+)

El método conocido como ABTS+ se basa en la evaluación de la actividad antioxidante, expresada en términos de equivalente a Trolox (TEAC), mediante la reducción de la coloración verde/azul generada por la interacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS+) con el antioxidante presente en la muestra (Lugo et al., 2014).

Además, este método permite evaluar tanto la capacidad antioxidante de compuestos solubles en agua como en solventes orgánicos, utilizando la misma metodología básica. Sin embargo, no se encuentra naturalmente en el cuerpo, lo que podría plantear críticas sobre su relevancia directa para funciones biológicas específicas. A pesar de ello, estudios han demostrado que la medición de la actividad antioxidante de mezclas de sustancias ha sido útil para distinguir entre los efectos aditivos y sinérgicos (Moniruzzaman et al., 2012).

1.10.2 Método del poder reductor (DPPH)

El método se basa en la determinación de la capacidad reductora de los antioxidantes frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, se disuelve en medio orgánico y sus resultados se expresa por separado, además se considera como uno de los métodos menos confiables debido a la interferencia de los carotenoides (Londoño, 2012).

1.11 Psicrometría

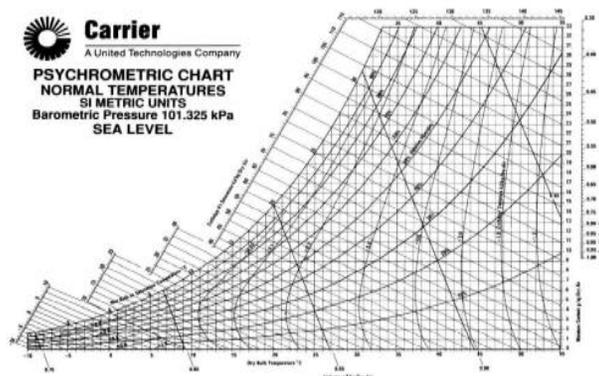
La psicrometría evalúa el contenido de humedad en el aire y las propiedades de la mezcla de aire y vapor de agua para el control de las propiedades térmicas del aire húmedo, se emplean las tablas psicrométricas las cuales proporcionan resultados altamente precisos (Singh & Heldman, 2014).

1.11.1 Diagrama Psicrométrico

El diagrama psicrométrico es una herramienta para entender la relación entre las condiciones de humedad y temperatura del aire en un espacio interior, facilitando el cálculo de la cantidad de calor o frío requerido para lograr las condiciones deseadas de temperatura y humedad; además, se representa mediante gráficas de las ecuaciones analíticas (Figura 3).

Figura 3

Diagrama psicrométrico.



1.11.2 Propiedades de la psicometría

En la Tabla 7 se presentan detalladamente cada una de las propiedades psicrométricas del aire en función de su temperatura y humedad relativa (Singh & Heldman, 2014).

Tabla 7

Propiedades de la psicometría

| Propiedades | Características |
|-----------------------------|--|
| Vapor de Agua (humedad) | Existencia de humedad en la atmósfera y su formación ocurre independientemente de la temperatura. |
| Humedad relativa (HR) | Es la relación entre la fracción molar del vapor de agua en el aire y la fracción molar del aire saturado, bajo las mismas condiciones de temperatura y se expresa mediante la siguiente fórmula: Humedad Relativa (HR)= Fracción molar del agua (X_w)/ Fracción molar del agua en saturación (X_{ws}) *100 |
| Humedad Absoluta(ha) | Se la define mediante la relación del peso del vapor de agua por unidad de volumen y se representa a través de la siguiente fórmula es: $W = \text{masa del vapor (m } vapH_2O) / \text{volumen del aire seco (Vaire seco)} + \text{volumen del vapor (VvapH}_2O)$ |
| Humedad Específica | Es la cantidad de humedad en peso necesaria para saturar un kilogramo de aire seco a una temperatura específica de saturación la fórmula es: $\infty = mv / ma = \text{masa del vapor de agua} / \text{masa del aire seco}$ |
| Porcentaje de Saturación | Es la relación entre el peso del vapor de agua y el peso necesario para saturar un kilogramo de aire seco a una temperatura de bulbo seco específica. |
| Punto de Rocío | Se refiere al punto de condensación del vapor de agua. |
| Temperatura de Bulbo Seco | Temperatura del aire sin tener en cuenta la influencia de la humedad conocida como temperatura ambiental. |
| Temperatura de Bulbo Húmedo | Representa la mínima temperatura que puede lograrse mediante la evaporación del agua en el aire. |

Nota. Tomado de Singh & Heldman, (2014)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Caracterización del Área de Estudio

El presente estudio se realizó en la provincia de Imbabura en dos fases; La primera fase consistió en la recolección de datos en campo, mientras que la segunda fase fue de carácter experimental.

2.1.1 Fase Experimental

El estudio experimental se efectuó en la parroquia rural de Lita situada a 95 km al noroccidente de Ibarra, en la Tabla 8 se detallan las condiciones climáticas que caracterizan a dicha localidad. Además, en la Tabla 9 se presentan las mediciones de temperatura de bulbo seco y humedad relativa de los días que se realizó el proceso de fermentación de las muestras de cacao, estos valores sirvieron para construir la carta psicrométrica (Figura 4).

Tabla 8

Condiciones climatológicas

| Condiciones climatológicas | Lita |
|-----------------------------------|-------------|
| Altitud: | 571 m.s.n.m |
| Temperatura media: | 21 °C |
| Humedad relativa promedio: | 94% |
| Longitud: | 78°28'1"O |
| Latitud: | 0°52'29"N |
| Precipitación anual promedio: | 3.355.2 mm |

| | |
|-----------------------------|-------------------------|
| Temperatura de bulbo seco | 38 °C |
| Temperatura de bulbo húmedo | 26.84 °C |
| Humedad relativa | 42% |
| Humedad absoluta | 21.63 g/kg |
| Presión | 2.91 kPa |
| Volumen específico | 1.07 m ³ /kg |
| Entalpía | 93.87 kJ/kg |
| Punto de rocío | 23.60 °C |

Nota. Tomado de Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología e Hidrología INAMHI (2020)

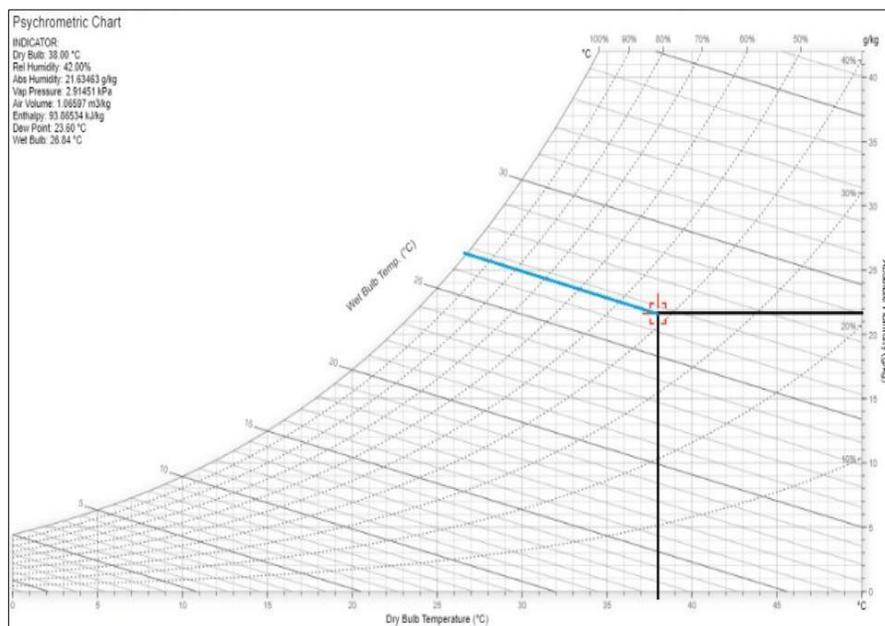
Tabla 9

Condiciones ambientales en función del tiempo(días)

| Tiempo(días) | Temperatura Ambiente | Temperatura de bulbo seco | Humedad relativa (HR) |
|---------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 1 | 37.00 | 31.90 | 49.00 |
| 2 | 31.90 | 42.20 | 38.00 |
| 3 | 38.10 | 36.90 | 50.00 |
| 4 | 35.30 | 43.00 | 36.00 |
| 5 | 36.50 | 36.00 | 38.00 |
| 6 | 32.00 | 35.50 | 39.00 |
| 7 | 33.90 | 38.40 | 47.00 |
| \bar{X} | 35.00 | 37.70 | 42.43 |

Figura 4

Propiedades Psicrométricas del Aire a la Presión Barométrica de la Parroquia de Lita



2.1.2 Fase de Laboratorio

La presente investigación se desarrolló en las Unidades Edu-productivas, localizadas en la parroquia El Sagrario, Cantón Ibarra, Provincia de Imbabura, así como en el laboratorio de nutrición del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador (INIAP) ubicado en la ciudad de Quito, provincia de Pichincha. A continuación, en la Tabla 10 se describen las condiciones climáticas de los lugares donde se realizó los experimentos.

Tabla 10*Condiciones climatológicas de las áreas de estudio*

| Condiciones climatológicas | U. Edu-productivas | INIAP |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Temperatura: | 17.7 °C | 18.8 °C |
| Altitud: | 2256 m.s.n.m. | 3050 m.s.n.m. |
| HR promedio: | 72% | 76% |
| Latitud: | 00°19'47'' Sur | 00° 22' 00'' Sur |
| Longitud: | 78°07'56'' Oeste | 78° 33' 00'' Oeste |
| Precipitación Anual Promedio: | 541.6 mm | 1127.5 mm |

Nota. Tomado de Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología e Hidrología INAMHI (2020)

2.2 Materiales y Equipos

Los elementos utilizados para llevar a cabo la investigación, como los suministros, productos químicos, dispositivos y herramientas, están descritos en la Tabla 11 y Tabla 12. Estos componentes fueron esenciales para medir y evaluar los objetivos establecidos en este estudio.

Tabla 11*Materiales y Equipos de campo*

| Materia Prima | Materiales de fermentación | Equipos |
|----------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Cacao CCN-51 | Cajas de madera | Balanza electrónica |
| Cacao Nacional | Micro fermentadores | Termómetro |
| | Marquesina | Medidor de Humedad |
| | Cajones de fermentación | HE 50 |
| | Pallets | Colorímetro |
| | Sacos de yute | Guillotina |

Costales de polietileno
Pala de madera
Hojas de plátano
Gavetas plásticas
Coche transportador
Utensilios

Tabla 12*Materiales y Equipos de la fase experimental*

| Materiales de Laboratorio | Equipos de Laboratorio | Reactivos |
|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| Micropipetas | Molino RETSCH ZM-200 | Metanol grado reactivo al 99.5% |
| Puntas para micropipetas | Extractor de grasa Soxhlet | Ácido Gálico Monohidratado |
| Celdas | Estufa | Reactivo de Folin & Ciocalteu |
| Papel aluminio | Balanza analítica | Carbonato de Sodio 99.5% |
| Frascos ámbar | Plancha magnética | Agua destilada |
| Probetas Tamiz 355µm | Agitadores magnéticos | Agua bidestilada |
| ph metro | Espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu | Trolox |
| Matraz | Refrigerador | ABTS |
| Balón aforado | | Persulfato de Potasio $K_2S_2O_8$ |
| Embudos de vidrio | | Fosfato de sodio monobásico NaH_2PO_4 grado reactivo |
| Tubos de ensayo | | Fosfato de sodio dibásico $Na_2H_2PO_4$ - H_2O grado reactivo |
| Vasos de precipitación | | |
| Papel filtro Whatman N°4 | | |
| Pipetas volumétricas | | |
| Frascos ámbar | | |
| Probetas | | |

2.3 Descripción de la Metodología

En este estudio, se optó por una metodología de enfoque cuantitativo debido a la estructura experimental y la visión objetiva del problema. Esta elección metodológica se basó en la necesidad de corroborar los resultados mediante múltiples técnicas, incluyendo la aplicación del método estadístico.

Se formuló una hipótesis con el propósito de medir el impacto del estudio propuesto, así como se ha dispuesto de un control sobre los factores del fenómeno, precisando y analizando al problema desde su fundamento y su aplicación.

2.3.1 *Cuantificación de los Principales Compuestos Fenólicos responsables de la Actividad Antioxidante en el Cacao.*

La materia prima que se empleó en el desarrollo del presente estudio fue cacao de las variedades CCN-51 y Fino de Aroma o Nacional procedentes de la parroquia de Lita, posteriormente una vez recibidas las mazorcas de cacao se realizó una selección, esto con el fin de descartar materia prima con insectos, moho, o enfermedades que afectarían en los procesos subsiguientes. Una vez que se recopilaron las muestras, se analizó bajo en los siguientes criterios:

2.3.1.1 Compuestos Fenólicos Totales. Se determinaron los compuestos fenólicos totales responsables de la actividad antioxidante, en las diferentes etapas: antes, durante y después del proceso de fermentación del cacao, según el Método Folin-Ciocalteu propuesto por (Cros et al., 1982) y adaptado por (Espín S & Samaniego I, 2016) (Anexo 1).

Los análisis de los contenidos de polifenoles en las muestras de cacao, fue realizado bajo el siguiente modelo estadístico, que consistió en:

- **Diseño:** Completamente aleatorizado (DCA)
- **Tratamientos:** 8
- **Unidades experimentales:** 24

2.3.1.2 Factores controlables.

FACTOR A: VARIEDAD DEL CACAO

- **A1:** CCN-51
- **A2:** Nacional

FACTOR B: TIEMPO DE FERMENTACIÓN

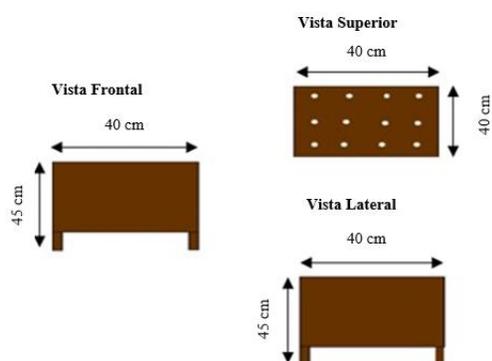
- **B1:** 0 días
- **B2:** 3 días
- **B3:** 5 días
- **B4:** 7 días

2.3.1.3 Combinaciones de factores. El modelo estadístico antes mencionado se llevó bajo el criterio del diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), considerando la heterogeneidad de las unidades experimentales dentro de cada bloque (Tabla 13). Además, el rango del factor de tiempo cero y tres días se realizó debido a que en esta fase se desarrolla la fermentación anaeróbica.

Tabla 13*Tratamientos*

| Tratamientos | Combinaciones |
|--------------|---------------|
| T1 | A1B1 |
| T2 | A1B2 |
| T3 | A1B3 |
| T4 | A1B4 |
| T5 | A2B1 |
| T6 | A2B2 |
| T7 | A2B3 |
| T8 | A2B4 |

2.3.1.1 Tamaño de unidad de experimental. Lotes de 30 kg por cada tratamiento con 24 unidades experimentales, que hacen un total de 720 kg de cacao en baba. Se realizó una fermentación escala piloto y se colocó en el interior de la marquesina cajones de madera con dimensiones de largo 40 cm; ancho 40 cm; alto 40 cm (Figura 5).

Figura 5*Diseño de cajones fermentadores*

2.3.1.2 Análisis estadístico. Se realizó pruebas estadísticas para comprobar diferencias significativas entre los tratamientos a través del software InfoStat, se evaluó la homogeneidad y normalidad de los datos con la prueba F y Shapiro-Wilks, respectivamente. Para los datos paramétricos, se aplicó el análisis de varianza (ADEVA), mientras que para los datos no paramétricos se utilizó el método de Kruskal-Wallis. Además, se realizaron las pruebas de Tukey 5% y DMS para comparar tratamientos y factores.

2.3.2 Evaluación del Efecto del Tiempo de Fermentación sobre la Actividad Antioxidante en las Variedades de Cacao

En la investigación se evaluaron dos variedades: CCN-51 y Nacional. El CCN-51 es una variedad híbrida conocida por su alto rendimiento y resistencia a enfermedades, mientras que el cacao Nacional es una variedad autóctona valorada por su sabor y aroma únicos (López Guerrero, 2017).

Las condiciones de fermentación se realizaron en cajones bajo invernadero debido a que Según Kongor et al., (2016) mencionan que la genética, el entorno en el que se desarrolla, el proceso de fermentación, secado y tostado, son factores que influyen en la calidad y composición bioquímica del cacao.

Durante la investigación, se utilizó un tiempo de fermentación de siete días para las dos variedades de cacao. Este periodo de tiempo es fundamental, ya que permite que el cacao adquiera sus sabores y aromas característicos y ayuda a eliminar la pulpa mucilaginosa que rodea las semillas para facilitar el proceso de secado (Guehi et al., 2010; Moreira et al., 2018).

La metodología se basó en el estudio de Melo et al., (2021), se empleó el método cajas de madera con dimensiones de 40 cm; ancho 40 cm; alto 45 cm. Para el período de remoción, se

consideró la información publicada en la ficha técnica la cual indica que la técnica de volteo iniciada a las 48 h es la más apta debido a que es el tiempo que dura la fermentación anaeróbica. Luego es necesario voltear la masa cada 24 h para permitir la liberación de CO₂ generado en el proceso y que su lugar sea ocupado por aire con oxígeno que garantice el proceso de oxidación (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2018). La evaluación de la capacidad antioxidante del cacao se realizó bajo el modelo estadístico presentado en el primer objetivo de la presente investigación.

2.3.2.1 Variables de estudio. Las variables de estudio que se midieron en la investigación están descritas en la Tabla 14:

Tabla 14

Variables de estudio

| VARIABLES | MÉTODO DE ANÁLISIS |
|----------------------------|--|
| Actividad antioxidante | Método ABTS usado por Kuskoski et al., (2003) y adaptado por (Espín S & Samaniego I, 2016) (Anexo 2) |
| Porcentaje de fermentación | NTE INEN 0176: 2018-02 Granos de cacao.(Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2018) (Anexo 3) |
| Sólidos solubles | Refractómetro |
| Temperatura | Termómetro digital con trazabilidad |
| Humedad | Medidor de humedad |
| Color | Colorímetro 3nh (Anexo 4) |

Nota. Fuente: Autor propio

2.3.2.2 Análisis estadístico. Se evaluó los diferentes tratamientos mediante el análisis de medias ajustadas y errores estándar, según el método LSD Fisher (Alfa=0.05) a través del software Infostat para modelos generales y mixtos.

2.3.3 Determinación de la Actividad Antioxidante del Mejor Tratamiento a Escala de Fermentación Productiva.

De acuerdo con Ferreira de Oliveira et al., (2021) el interés en investigar la composición nutricional y antioxidantes presentes en el cacao ha incrementado. Por esta razón, el objetivo fue estudiar el mejor tratamiento capaz de retener compuestos bioactivos y antioxidantes, utilizando como base los resultados obtenidos en la investigación previa.

Con el fin de obtener un ensayo reproducible, en el cual los productores puedan replicarlo y recrear exactamente todos los resultados a partir de los datos originales, se implementó una variante de fermentación a mayor escala en comparación con la fermentación escala piloto. Se empleó una capacidad de carga de 120 kg debido a que según Teneda William, (2017) se debe utilizar una cantidad de cacao fresco mayor a 100 kg por cajón. Los cajones utilizados fueron cajones tipo escalera ubicados en la Asociación Productora de Lita. Adicionalmente, el objetivo de esta investigación fue que los productores de Lita logren realizar el proceso de fermentación de manera eficiente, lo cual conlleva beneficios para su desarrollo y su posición en el mercado.

2.3.3.1 Variables de estudio. Se realizó un análisis de polifenoles totales y actividad antioxidante al inicio y al final de la fermentación según el método Folin-Ciocalteu propuesto por (Cros et al., 1982) y adaptado por Espín S & Samaniego I, (2016) (Anexo 1) y método ABTS usado por Kuskoski et al., (2003) y adaptado por Espín S & Samaniego I, (2016) (Anexo 2).

2.4 Manejo del Proceso de Fermentación

Durante el desarrollo de la investigación fue necesario supervisar cada etapa del proceso de la fermentación de la semilla, comenzando desde la cosecha, selección del grano, fermentación en cajones y secado. A continuación, se describe cada uno de los procedimientos:

2.4.1 Descripción del Proceso

2.4.1.1 Cosecha. Se recolectó las mazorcas de la finca perteneciente al Sr. Mauro Mina y se determinó su madurez fisiológica en función del color. Según lo observado, las mazorcas maduras de la variedad nacional presentan un color amarillo característico, mientras que las de la variedad CCN-51 se distinguen por su color naranja.

2.4.1.2 Cortar y extraer el grano. Con el propósito de evitar dañar la parte interna, se realizó un corte transversal en cada mazorca para así poder extraer los granos con mayor facilidad. Además, se logra evitar cualquier daño o contaminación del cacao (Figura 6).

Figura 6

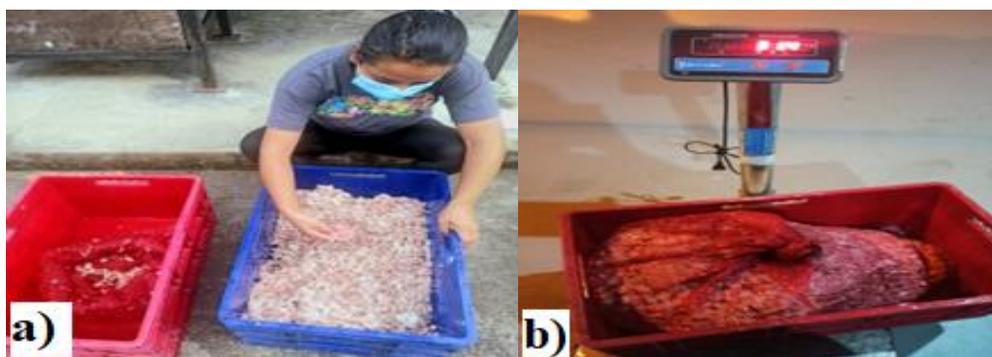
Corte y extracción de cacao CCN-51



2.4.1.3 Seleccionar y pesar. Se realizó una selección de los granos antes de comenzar el proceso. En este sentido, se opta por escoger los granos de color blanco, mientras que se apartan aquellos que presentan tonalidades amarillentas, ya que estos últimos podrían afectar negativamente la calidad del producto final. Además, se pesó cada variedad de cacao, lo que permitió un mejor control de todo el proceso de producción (Figura 7).

Figura 7

a) Selección de semillas de cacao b) Pesado de semillas de cacao



2.4.1.4 Pre- Acondicionamiento. Una vez extraído el cacao de las mazorcas, se colocó en sacos de polipropileno y se dejó escurrir en pallets durante un período de veinticuatro horas para la variedad CCN-51, mientras que para la variedad nacional el tiempo de escurrido es de ocho horas (Figura 8).

Figura 8

Pre- acondicionamiento de Cacao



2.4.1.5 Primera fermentación (alcohólica). Después de completar la etapa de pre-acondicionamiento del cacao, se colocó la cantidad necesaria en los cajones correspondientes. Para la fermentación escala piloto se utilizaron cajones de dimensiones de largo 40 cm; ancho 40 cm; alto 45 cm, mientras que para la fermentación a escala productiva se emplearon cajones de mayor tamaño, con medidas de largo 69 cm; ancho 87 cm; alto 61 cm (Figura 8). A fin de asegurar la fase aeróbica y evitar la introducción de insectos, es esencial colocar una capa de hojas de plátano, posteriormente, se agregó una capa de hojas secas y, por último, se cubrió el recipiente con un saco de yute durante un período de 48 horas (Figura 9).

Figura 9

Proceso de fermentación a) Fermentación productiva b) Fermentación escala piloto



2.4.1.6 Primer volteo. El primer volteo se realizó utilizando una paleta de madera. En el caso de la fermentación piloto, la parte superior de la masa se desplazó hacia el fondo del cajón. Por otro lado, en la fermentación a escala productiva, se efectuó el volteo mediante el cambio de cajón. El propósito de esta fase es garantizar una oxigenación uniforme de la masa y evitar que algunos granos queden sin fermentar (Figura 10).

Figura 10

Volteo de semillas de cacao



2.4.1.7 Segunda fermentación (oxidativa - acética). Durante este proceso se introdujo oxígeno en la masa de cacao mediante el volteo, lo cual promueve la conversión del alcohol a ácido acético, con la participación de bacterias acéticas (Figura 11).

Figura 11

Fermentación variedad Nacional



2.4.1.8 Segundo Volteo. A partir de esta fase se llevó a cabo volteos cada 24 horas hasta completar la fermentación de los granos de cacao. La temperatura es un factor importante en este proceso, por lo que se realizó un seguimiento estricto de esta variable durante todo el proceso. A medida que el tiempo de fermentación avanza, la superficie de los granos de cacao cambia de

color a un tono marrón, lo cual señala el inicio de la formación de los precursores del sabor a chocolate. Finalmente, la temperatura disminuyó por completo, lo que muestra que la fermentación ha llegado a su fin.

2.4.1.9 Secar. Se retiró la masa fermentada y se colocó en bandejas de madera para iniciar el proceso de secado. Estas bandejas se ubican bajo una marquesina para proteger el cacao de la humedad y otros factores ambientales que afectan la calidad durante el secado (Figura 12).

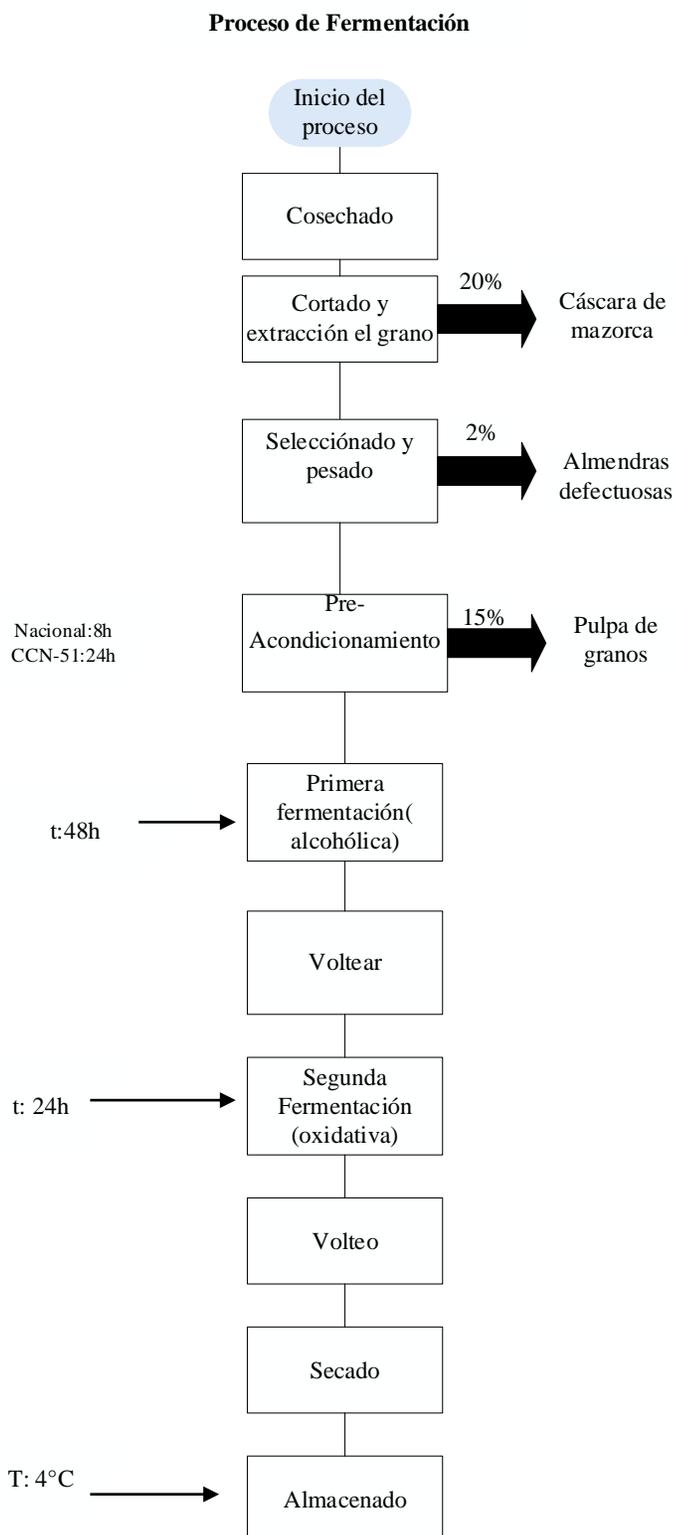
Figura 12

Secado de semillas de cacao



2.4.1.1 Almacenar. Las muestras secas se empacaron en papel aluminio y fundas transparentes asegurándose de mantenerlas a una temperatura constante de 4 °C.

En la Figura 13 se detalla el diagrama de flujo el cual se representa gráficamente mediante los símbolos y flechas de los diferentes procesos para el manejo de la fermentación del cacao.

Figura 13*Diagrama de flujo del proceso de fermentación*

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

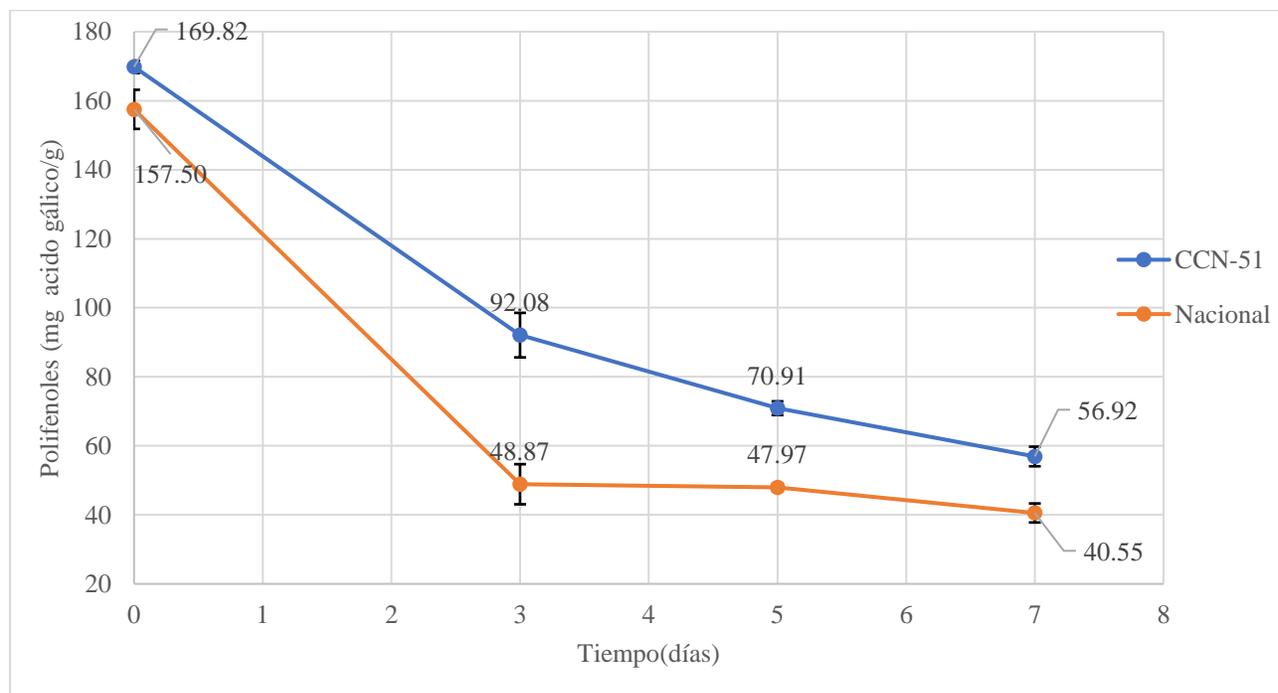
En este capítulo se analizó los resultados de la investigación denominada "Efecto de los parámetros de fermentación del cacao sobre la actividad antioxidante ". El objetivo principal es determinar si existe una correlación entre los parámetros de fermentación y la actividad antioxidante dentro del proceso de fermentación del cacao.

3.1 Compuestos Fenólicos responsables de la Actividad Antioxidante en el Cacao

Los resultados de las muestras de cacao procedentes de la parroquia Lita, se presentan en la (Figura 14), donde se indica el contenido de polifenoles totales para cada una de ellas, expresando los valores en mg Ac. Gálico/g.

Figura 14

Contenido de Polifenoles en función del tiempo de dos variedades de cacao



Durante la investigación, se observó que a medida que avanzaba el proceso de fermentación del cacao, se produjo una disminución significativa en el contenido de polifenoles (Anexo 5), tanto en la variedad CCN-51 como en la Nacional, registraron una disminución final del 67.50 % y 74.25% respectivamente. Sin embargo, a partir del tercer día, se registró una disminución del 38% para CCN-51 y 17% en Nacional con relación al séptimo día.

De acuerdo con el estudio realizado por Pallares Pallares et al., (2017) observaron patrones similares, evidenciando que el clon CCN-51 experimentó una reducción del 50.10% en su contenido de polifenoles durante el proceso de fermentación. También Cortez et al., (2023) evaluaron el comportamiento de compuestos bioactivos en dos variedades de cacao evidenciando una disminución significativa en esta variable durante el desarrollo fermentativo. Asimismo Barišić et al., (2019); Wollgast & Anklam, (2000), manifiestan la existencia de la disminución del contenido fenólico durante la fermentación debido a la actividad enzimática del polifenol oxidasa (PPO).

Por otro lado, Onomo et al., (2015) llevaron a cabo una fermentación de seis días y obtuvieron una concentración final de 142.51 mg Ac. Gálico/g, este valor supera a los obtenidos en la presente investigación. Según Urbańska & Kowalska, (2019), manifiestan que estos registros pueden variar debido al manejo del cultivo y localización geográfica de los granos de cacao utilizados. Además, estudios previos realizados por Caporaso et al., (2018) indican también que la fermentación influye en el contenido de compuestos bioactivos.

Adicionalmente, se identificó que clon CCN-51 registró valores superiores de polifenoles con relación a la variedad Nacional, un análisis estadístico confirmó la existencia de diferencias significativas entre estas variedades (anexo 6). Estos resultados concuerdan con los de Borja Fajardo et al., (2022) quienes reportaron que la variedad CCN-51 mostró mayor

contenido de polifenoles con relación a otras variedades, registrando un valor de 95.41 ± 2.50 mg de ácido gálico/g. Además, el estudio realizado por Avendaño Arrazate et al., (2021) observaron la presencia de diferencias significativas entre los genotipos, atribuyendo al grado de domesticación como la mayor influencia en dichas diferencias. Incluso, los estudios reportados por Brito et al., (2017); Calvo et al., (2021) demostraron que la variedad es otro factor importante para determinar la composición bioquímica del cacao.

Asimismo, los resultados en esta investigación se encuentran dentro del rango de polifenoles reportados por Beckett et al., (2017); Wollgast & Anklam, (2000) quienes informaron que el contenido de polifenoles en las semillas de cacao fermentados secos y sin grasa generalmente esta entre 40 y 140 mg Ac. Gálico/g y para granos no fermentados entre 150 y 200 mg Ac. Gálico/g. De igual manera, estos resultados son comparables a los obtenidos por Samaniego et al., (2020) los cuales registraron que el contenido de polifenoles en la variedad Nacional fermentado varió en un rango de 33.55 ± 5.74 a 71.66 ± 3.94 mg Ac. Gálico/g. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las diferencias están influenciadas por la zona de cultivo y otros factores mencionados anteriormente.

3.2 Efecto del Tiempo de Fermentación sobre la Actividad Antioxidante

Una vez definidos los factores (variedad y tiempo) para la fermentación del cacao y considerando el diseño completamente aleatorizado con ocho tratamientos, cada uno con sus repeticiones se evaluó la actividad antioxidante. A continuación, se describen los resultados correspondientes a la variable mencionada anteriormente y su efecto dentro del proceso de fermentación.

3.2.1 Capacidad Antioxidante

En la Tabla 15 se presentan los resultados del análisis de varianza de los tratamientos y factores evaluados. El análisis permitió comparar las varianzas entre las medias de tres repeticiones y verificar el efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Tabla 15

Análisis de varianza para Capacidad Antioxidante

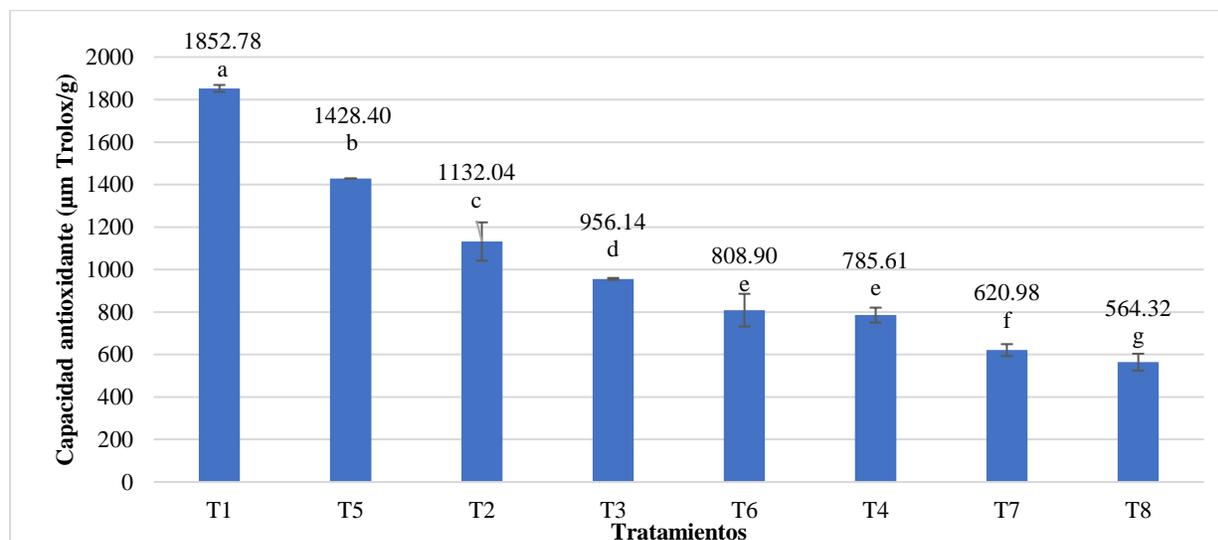
| | Grados de libertad del numerador | Grados de libertad del denominador | F-value | P-value | Significancia |
|----------------|---|---|----------------|----------------|----------------------|
| Tratamientos | 1 | 14 | 124122.78 | <0.0001 | ** |
| Factor A | 1 | 14 | 2491.35 | <0.0001 | ** |
| Factor B | 3 | 14 | 3536.03 | <0.0001 | ** |
| Interacción AB | 3 | 14 | 18.71 | <0.0001 | ** |

Nota. **Altamente Significativo.

El análisis de varianza indica que existe diferencias altamente significativas entre tratamientos, Factor A (variedad), Factor B (Tiempo de fermentación) y en la interacción AxB (variedad* tiempo de fermentación). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa. De esta manera, los resultados para capacidad antioxidante de cada uno de los tratamientos se presentan mediante un gráfico de barras (Figura 15). Las medias obtenidas se expresan en unidades equivalentes a $\mu\text{m Trolox/g}$.

Figura 15

Capacidad antioxidante en los diferentes tratamientos



Se observó que el tratamiento T1 (variedad CCN-51, sin fermentar) presentó mayor actividad antioxidante en comparación con los demás tratamientos, seguido por el tratamiento T5 (variedad Nacional sin fermentar), mientras que, los tratamientos T7 (variedad Nacional, fermentado cinco días) y T8 (variedad Nacional, fermentado siete días) mostraron niveles significativamente bajos de capacidad antioxidante. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de los tratamientos T4 (variedad CCN-51 fermentada durante siete días) y T6 (variedad Nacional fermentada durante tres días). A pesar de que T4 ha completado su proceso de fermentación, aún muestra similitudes con T6, que se encuentra solo en el tercer día de fermentación.

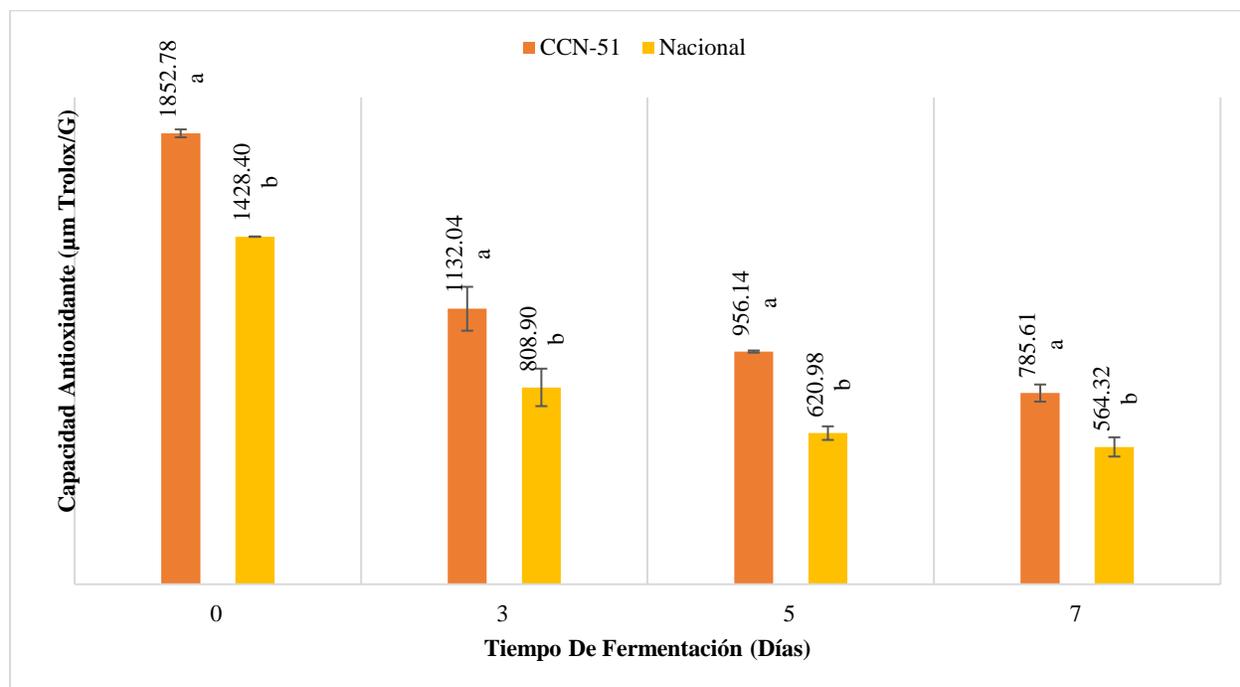
Evidentemente, los tratamientos con mayor actividad antioxidante fueron los que no tuvieron un proceso de fermentación, es decir que a medida que el factor tiempo de fermentación aumentó la capacidad antioxidante disminuyó. Según, Cortez et al., (2023) evidencian un comportamiento similar en donde el tiempo de fermentación afecta la actividad antioxidante de

los granos de cacao. Del mismo modo, estas propiedades bioquímicas están influenciados por la composición inicial del grano según su variedad.

Con el fin de establecer diferencias significativas del factor A (Variedad) y factor B (Tiempo), se llevó a cabo una comparación de las medias ajustadas y errores estándar. En la Figura 16 muestran los resultados correspondientes al factor A (Variedad), en el cual se comparó cada variedad de cacao en relación con el día de fermentación.

Figura 16

Actividad antioxidante en relación con la variedad durante la fermentación



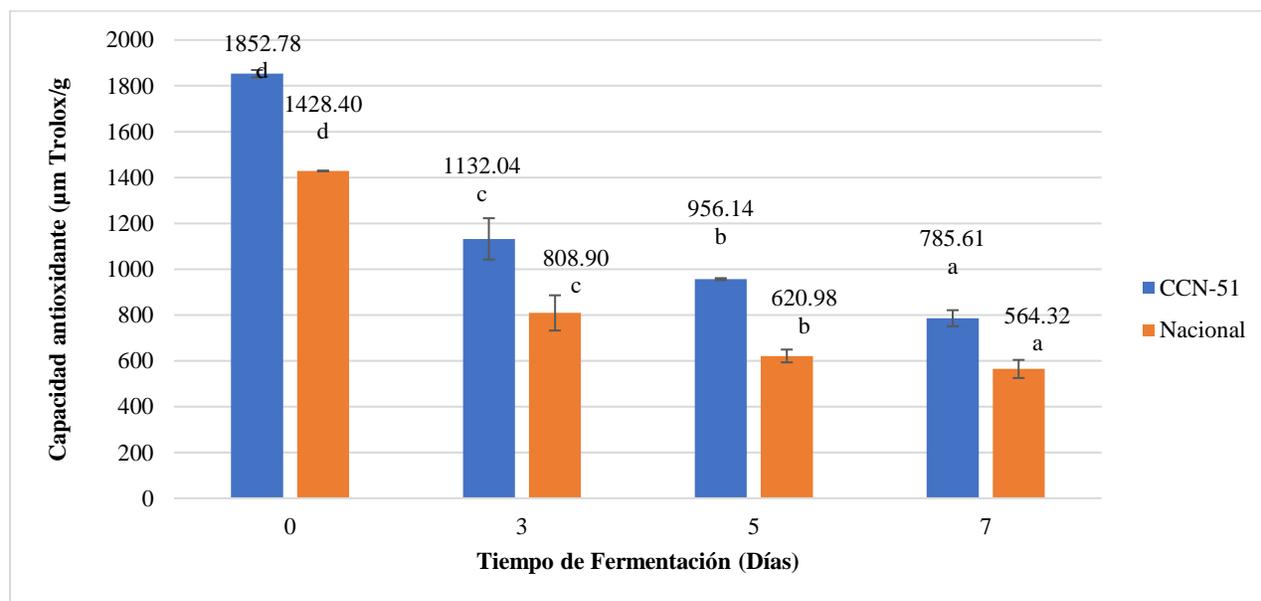
En cuanto a la variedad, CCN-51 presentó mayor capacidad antioxidante con relación a Nacional. Un resultado similar fue informado por Borja Fajardo et al., (2022) quienes encontraron que la variedad CCN-51 presentó mayor capacidad antioxidante en comparación con otras variedades de cacao. De la misma manera Avendaño Arrazate et al., (2021) evaluaron diferentes genotipos de cacao presentando diferencias significativas de actividad antioxidante

entre cada uno de ellos. Además, los datos presentados en la Figura 13 son superiores a los obtenidos por Tello Alonso et al., (2020) quienes reportaron valores de diferentes clones que oscilan entre 752.10 ± 8.40 a 297.47 ± 7.10 $\mu\text{m Trolox/g}$ en granos frescos y 85.70 ± 0.03 a 69 ± 0.02 $\mu\text{m Trolox/g}$ en granos fermentados. La variabilidad de la actividad antioxidante entre diferentes genotipos también es atribuida por factores como la ubicación geográfica, tipo de cultivo y procesamiento de postcosecha, tal como se mencionó previamente en el estudio de polifenoles.

Por otra parte, la relación entre el factor B (tiempo de fermentación) se comparó los días de fermentación por cada variedad de cacao y se observó los cambios bioquímicos durante este proceso (Figura 17).

Figura 17

Actividad antioxidante en relación con el tiempo de fermentación.



El factor tiempo de fermentación tiene un efecto significativo sobre las dos variedades de cacao presentando una disminución de actividad antioxidante de 57.60% para CCN-51 y 60.49% para Nacional durante los siete días de proceso fermentativo. Estudios previos realizados por

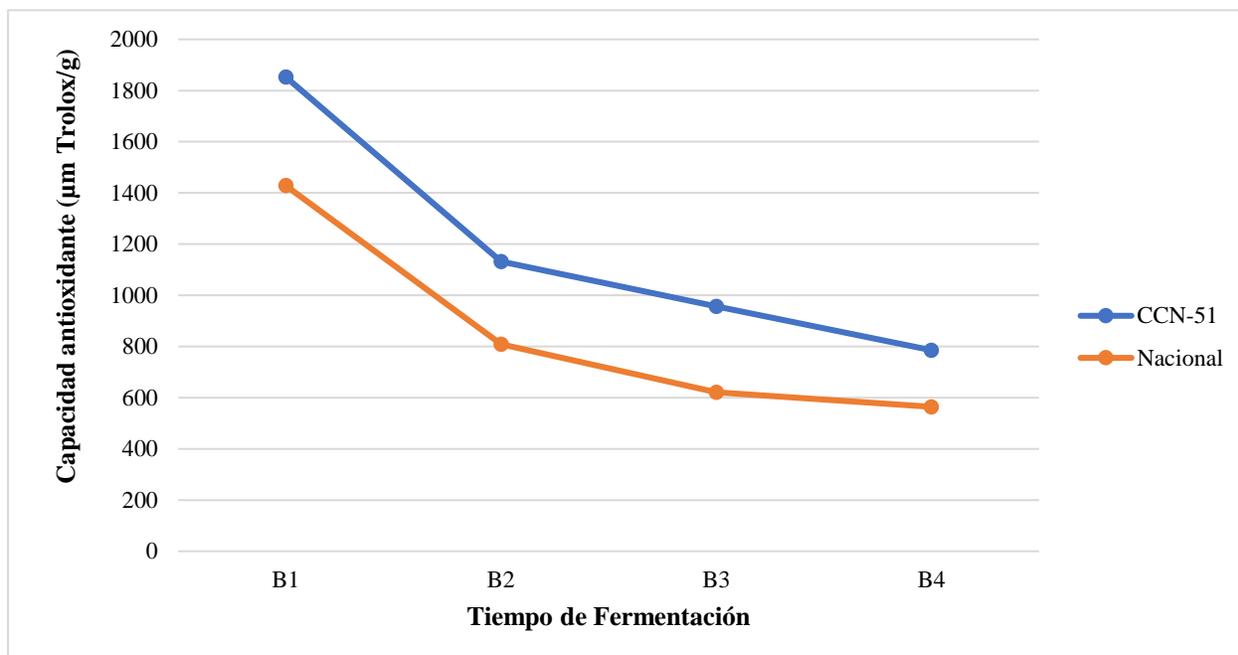
Pallares Pallares et al., (2017), encontraron una relación similar entre la actividad antioxidante y el tiempo de fermentación, se observó una disminución del 58.30% durante dicho proceso. Además, según Melo et al., (2021), observaron que hasta las 48 h existe un mayor contenido de compuestos bioactivos. Sin embargo, después de este período, se evidenció una disminución en la actividad antioxidante.

Asimismo, los resultados son comparables con los de Brito et al., (2017) quienes reportaron valores en los antioxidantes al inicio de la fermentación de $1296.57 \pm 52.50 \mu\text{m Trolox/g}$, mientras que en la etapa intermedia se obtuvo un contenido de $1155.81 \pm 365.23 \mu\text{m Trolox/g}$, y al final del proceso, se registró un valor de $789.85 \pm 212.58 \mu\text{m Trolox/g}$. De igual manera esta disminución se produce ya que durante la fermentación se pierde gran cantidad de compuestos fenólicos que confieren la actividad antioxidante entre estos están la (-)-epicatequina, (+)-catequina y quercetina. Estas transformaciones pueden ser influenciadas por la actividad de la enzima polifenoloxidasas y la epimerización de la epicatequina, provocada por cambios en el pH durante la fermentación. Adicionalmente, Fang et al., (2020) mencionan que la fermentación y el secado de los granos, pueden ocasionar una pérdida de hasta el 70% de estas sustancias también la composición del cacao está estrechamente vinculada a su variedad y origen geográfico.

En la Figura 18 se muestra gráficamente el comportamiento de la actividad de antioxidantes en función del tiempo y la variedad.

Figura 18

Curva de capacidad antioxidante en función del tiempo y la variedad

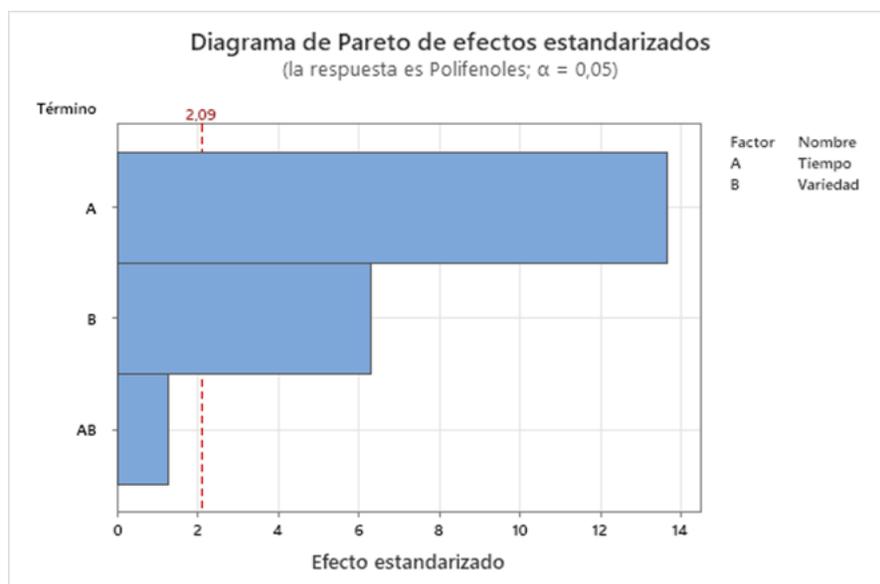


En particular, se observa que la variedad CCN-51 mostró una mayor resistencia al proceso de fermentación en comparación con la variedad Nacional, ya que experimentó una menor pérdida de antioxidantes. Por otro lado, se puede apreciar una tendencia hacia la estabilización de los niveles de antioxidantes a medida que transcurre el tiempo, llegando a un punto en el cual ambas variedades presentan un contenido similar de estos compuestos.

El diagrama de Pareto de la Figura 19 representa de manera esquemática los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza para identificar el efecto del Factor A y el Factor B que tuvo mayor incidencia sobre la capacidad antioxidante.

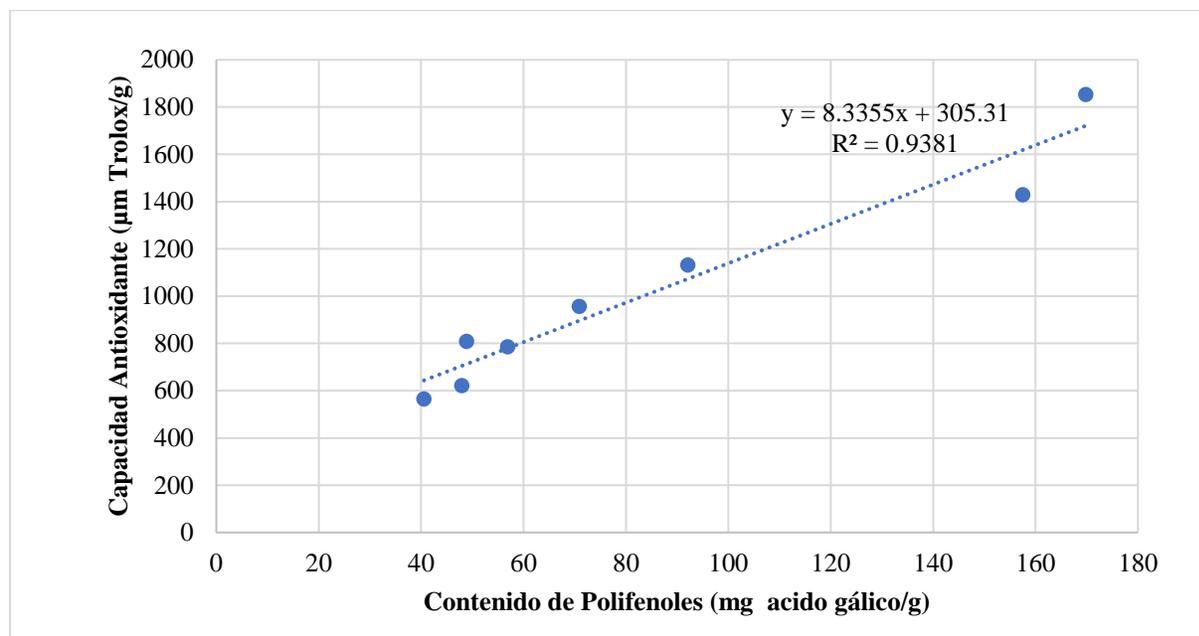
Figura 19

Diagrama de Pareto de diferentes factores sobre la actividad antioxidante



Finalmente, se observó la influencia negativa tanto el tiempo como la variedad sobre la variable de respuesta analizada. Específicamente, se determinó que el tiempo de fermentación tiene un impacto significativamente mayor en la capacidad de antioxidante del grano, mostrando además una relación inversa con la actividad antioxidante.

Además, se realizó un análisis de correlación entre las dos variables: contenido de polifenoles totales versus actividad antioxidante, donde se registró una correlación altamente positiva con un $R = 0.94$ (Figura 20), es decir que a medida que se incrementa el contenido de polifenoles aumenta la capacidad antioxidante de manera proporcional.

Figura 20*Correlación de Polifenoles y Capacidad Antioxidante*

Según Fang et al., (2020); Melo et al., (2021); Pallares Pallares et al., (2017) informaron sobre una correlación directa entre ambas variables, evidenciando una estrecha relación entre ellas. Además, se comprobó que la presencia de antioxidantes está influenciada por el contenido de polifenoles en cada genotipo de cacao.

A continuación, se abordará otro aspecto importante, a pesar de que el enfoque principal de esta investigación se haya centrado únicamente en los compuestos bioactivos. Durante el desarrollo del estudio, surgieron variables significativas que requerían medición y que experimentaron cambios durante el proceso de fermentación.

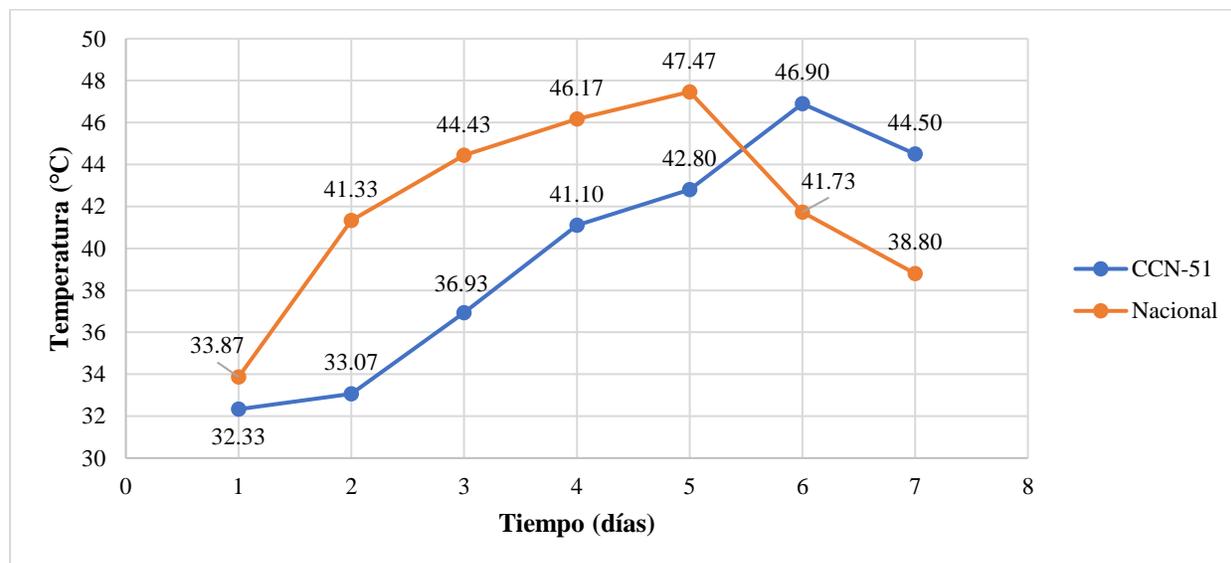
3.2.2 *Temperatura*

En la Figura 21 se presentan los resultados sobre la temperatura durante el proceso de fermentación del cacao. Estos datos fueron recopilados a lo largo de los siete días de

fermentación, y se registraron los datos cada 24 horas para obtener una visión completa de la evolución térmica durante todo el período.

Figura 21

Relación temperatura y tiempo en las dos variedades de cacao



A medida que el tiempo de fermentación del cacao avanza, se observa un incremento progresivo de la temperatura en ambas variedades. En el caso de la variedad Nacional, se alcanza una temperatura máxima al quinto día, seguido de una disminución hasta completar los días de fermentación, mientras que CCN-51, el punto máximo de temperatura se registra al sexto día, y posteriormente disminuye.

En un estudio previo realizado por Melo et al., (2021) se observó un patrón similar durante el proceso de fermentación, los valores de la temperatura y aumentos pueden variar puesto que se realiza en condiciones ambientales. Además, el incremento térmico se atribuye a la actividad enzimática tanto de las enzimas endógenas del cacao como de las enzimas exógenas de los microorganismos presentes. Dichas enzimas generan calor como resultado de reacciones metabólicas exotérmicas (De Vuyst et al., 2020). Asimismo, la disminución en la temperatura se

debe a la reducción de la población de microorganismos durante el proceso de fermentación (Sarbu & Csutak, 2019).

Adicionalmente, es importante destacar que la temperatura máxima registrada para ambos tipos de cacao fue superior a 41 °C, lo cual es suficiente para inactivar la capacidad de germinación de las semillas, al tiempo que genera los precursores del aroma y sabor característicos del chocolate (Visintin et al., 2017).

3.2.3 Humedad del grano

La humedad es un parámetro que influye en la calidad y la conservación de los granos de cacao. Durante los 7 días de fermentación, se registraron valores que oscilaron entre 21.23% a 21.47% para la variedad CCN-51 y 21.07% a 21.37% para la variedad Nacional estos datos indican que no se produjeron cambios significativos en la composición de humedad de los granos a lo largo del proceso de fermentación (Anexo 8). Es importante destacar que la medición de humedad se realizó directamente en los granos, asegurando una precisión en los resultados.

De igual manera estos resultados mostraron un comportamiento similar al reportado por Efraim et al., (2010) los cuales señalan que hubo una disminución en la humedad durante el proceso de fermentación, sin embargo, no se observaron diferencias significativas. De tal modo, estos resultados respaldan la investigación, ya que indican que la humedad no es un factor crítico en la etapa de fermentación del cacao.

3.2.4 Porcentaje de fermentación

Los granos de la variedad CCN51, fermentados durante 7 días en cajones de madera, alcanzaron una temperatura máxima de 47.80 °C a las 156 horas, con un tiempo de remoción de 48 horas. Al finalizar la fermentación, se realizó una prueba de corte en la que se seleccionaron

100 granos con un peso aproximado de 168 g, determinando un porcentaje de fermentación del 75.30%.

Por otro lado, para la variedad Nacional, se realizó un proceso de fermentación similar de siete días, alcanzando una temperatura de 48.63 °C en las 108 horas, con un tiempo de remoción de 48 horas. Al finalizar la fermentación, se efectuó una prueba de corte escogiendo 100 granos con un peso aproximado de 163 g, obteniendo un porcentaje de fermentación del 79.30%.

Analizando estos resultados podemos deducir que la variedad Nacional alcanzó una mayor temperatura y tuvo un mejor porcentaje de fermentación en comparación con la variedad CCN-51. Según Melo et al., (2021) una fermentación óptima se logra cuando la temperatura de la masa de semillas alcanza los 45 a 48 °C durante las 72 horas. Los granos se consideran de calidad cuando al menos el 50% de ellos ha sido fermentado. Este porcentaje es un punto de referencia clave para determinar la calidad de la fermentación alcanzada (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2018).

Según López & Hernández, (2011) mencionan que el porcentaje de fermentación puede variar debido a diversos factores tales como la madurez de los frutos, la variedad de cacao, el tiempo de almacenamiento, el recipiente de fermentación, la duración del proceso, la frecuencia de remoción, el volumen de la masa y las condiciones ambientales.

3.2.5 Colorimetría

Los valores correspondientes a la luminosidad (L^*), la cromaticidad (a^* y b^*) y la variación del color (ΔE^*) durante la fermentación se encuentran registrados en la Tabla 16. Además, se realizaron cálculos para determinar el croma (Chroma), el tono o matiz (Hue) y el

cambio de color (ΔE). Estos datos proporcionan información detallada sobre las características cromáticas del proceso de fermentación.

Tabla 16

Color en los granos de cacao de dos variedades

| Variedad | Tiempo(días) | L* | a* | b* | H | C* | ΔE (días) |
|----------|--------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| CCN-51 | 0 | 35.37±0.22 ^a | 5.60 ±1.79 ^a | 14.99 ±1.42 ^a | 69.84±3.99 ^a | 16.03±1.97 ^a | - |
| CCN-51 | 3 | 35.63±0.76 ^a | 3.15±0.24 ^{ab} | 13.92 ±0.45 ^a | 77.24±0.63 ^{ab} | 14.27±0.48 ^{ab} | 2.68 |
| CCN-51 | 5 | 34.58±0.52 ^a | 3.12 ±0.25 ^{ab} | 13.22 ±0.30 ^{ab} | 76.76±0.74 ^{ab} | 13.59±0.35 ^{ab} | 3.15 |
| CCN-51 | 7 | 32.84 ±0.07 ^a | 2.41 ±0.03 ^b | 11.52 ±0.08 ^b | 78.20±0.16 ^b | 11.77±0.08 ^b | 5.35 |
| Nacional | 0 | 33.20 ±0.11 ^a | 3.63± 0.50 ^a | 12.41 ±0.51 ^a | 79.40±0.08 ^a | 12.37±0.20 ^a | - |
| Nacional | 3 | 33.02 ±0.02 ^a | 2.51±0.27 ^{ab} | 12.02±0.08 ^a | 77.66±0.17 ^{ab} | 12.14±0.12 ^{ab} | 0.76 |
| Nacional | 5 | 33.01 ±0.17 ^a | 2.69 ±0.17 ^{ab} | 11.69±0.01 ^{ab} | 75.92±0.53 ^b | 12.35±0.12 ^b | 0.20 |
| Nacional | 7 | 32.83±0.25 ^a | 2.20 ±0.02 ^b | 11.05± 0.75 ^b | 76.25±0.53 ^b | 11.89±0.01 ^b | 0.46 |

Durante el proceso de fermentación del cacao, se realizó una medición del color y se observó que la luminosidad (L*) disminuye a medida que avanza la fermentación sin embargo no existen diferencias significativas. Este fenómeno sucede ya que según Afoakwa et al., (2011) las antocianinas se destruyen mediante hidrólisis enzimática, lo cual conlleva al blanqueamiento y posterior oscurecimiento de los granos.

En cuanto al componente de cromaticidad a* y b*, se observa un patrón similar, con una disminución significativa (p -valor<0.05), indicando que el valor a* presentaban un color menos rojizo y el b* menos amarillo. Según Emmanuel et al., (2012) este comportamiento también se atribuye a la descomposición de las antocianinas. Además, Fang et al., (2020) asociaron los colores amarillo y marrón con la presencia de antocianinas en los granos de cacao.

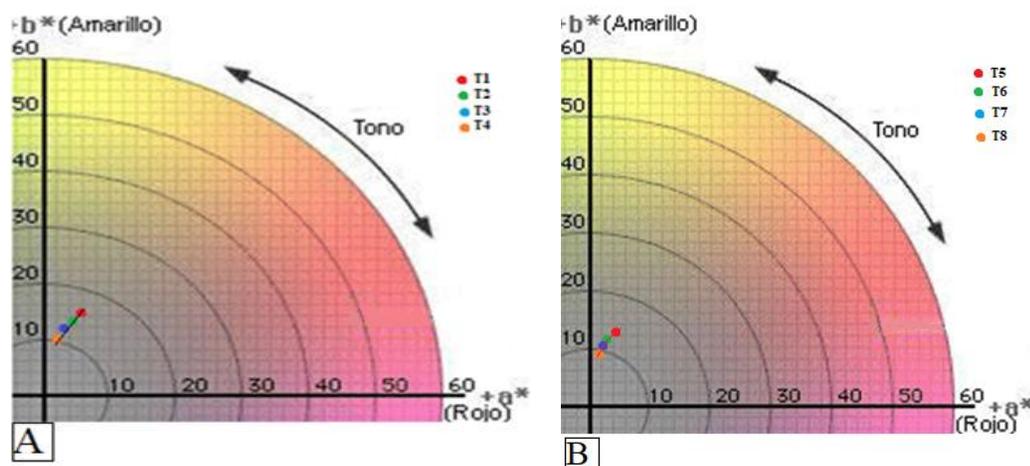
Según el estudio realizado por Chire et al., (2016), no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de color, como la luminosidad (L*) y los componentes de

cromaticidad rojo-verde (a^*) y amarillo-azul (b^*), durante el proceso de fermentación. Sin embargo, el color vario por diversos factores, como el genotipo y el procesamiento. En el presente estudio, se observaron diferencias significativas en los parámetros de color, lo cual podría atribuirse a estos factores.

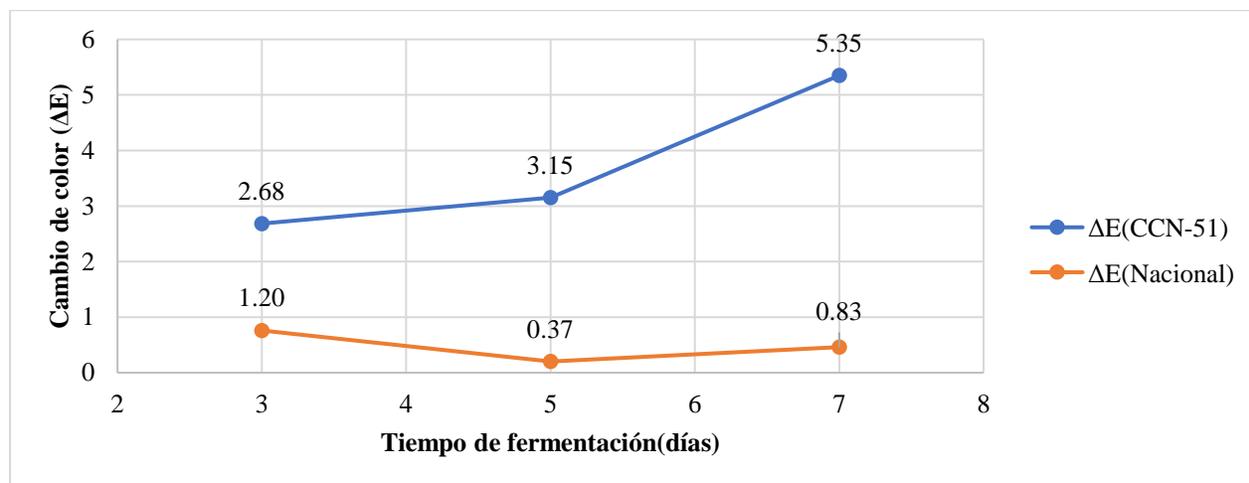
Los valores de a^* y b^* son indicadores de los colores predominantes. De acuerdo con la Figura 22, se puede apreciar que el color de las diferentes muestras experimentó una disminución significativa a lo largo del proceso de fermentación, volviéndose menos rojizo y amarillo.

Figura 22

Tratamientos en el espacio de Cielab a) Variedad CCN-51 b) Variedad Nacional



Para evaluar los cambios de color (ΔE^*) entre las variedades CCN-51 y Nacional durante la fermentación, se tomó el día cero como punto de referencia y se realizaron comparaciones con los diferentes días de fermentación. Se empleó la fórmula detallada en el (Anexo 4) para calcular el cambio de color durante este proceso. Los resultados de estos cálculos se presentaron gráficamente en la Figura 23.

Figura 23*Cambios de color durante la fermentación*

Conforme avanza el tiempo de fermentación, se puede notar un cambio de color en la variedad CCN-51 en comparación con el punto de referencia inicial (día cero). Estos cambios se vuelven más perceptibles y aumentan a medida que pasa el tiempo. Por otro lado, en la variedad Nacional, los cambios de color disminuyen hacia el quinto día y luego aumentan hacia el séptimo día. Sin embargo, estos cambios de color en la variedad Nacional no son perceptibles.

3.2.6 *Sólidos solubles*

El contenido de azúcar de variedades de cacao, CCN-51 y Fino de aroma fue de 17 °Brix, lo que indica que ambas variedades comparten una característica común en términos de dulzura. Esto puede ser atribuido a factores genéticos y ambientales que influyen en la acumulación de azúcares en la pulpa de cacao durante su desarrollo.

El estudio de Velásquez Reyes et al., (2021) proporcionan información sobre el contenido de azúcar en la pulpa fresca de distintas variedades de cacao. Los resultados indican que la variedad tipo criollo tiene un contenido de azúcar similar al de la investigación, mientras que la variedad forastera muestra una ligera diferencia en este aspecto. Estos hallazgos pueden ser

relevantes para la selección de variedades de cacao y la manipulación del proceso de fermentación para lograr perfiles de sabor deseados en la elaboración de productos a base cacao. No obstante, es necesario seguir investigando para comprender mejor las implicaciones de estas diferencias en la calidad y sabor del cacao fermentado.

En el estudio realizado por Papalexandratou et al., (2019), se encontró que las variedades de cacao O'Payo y Nugu, originarias de Nicaragua, presentaron valores de 17.50 y 17.40 °Brix, respectivamente. Estos resultados respaldan la similitud del contenido de azúcar obtenido en la presente investigación.

3.3 Actividad Antioxidante del Mejor Tratamiento a Escala de Fermentación Productiva

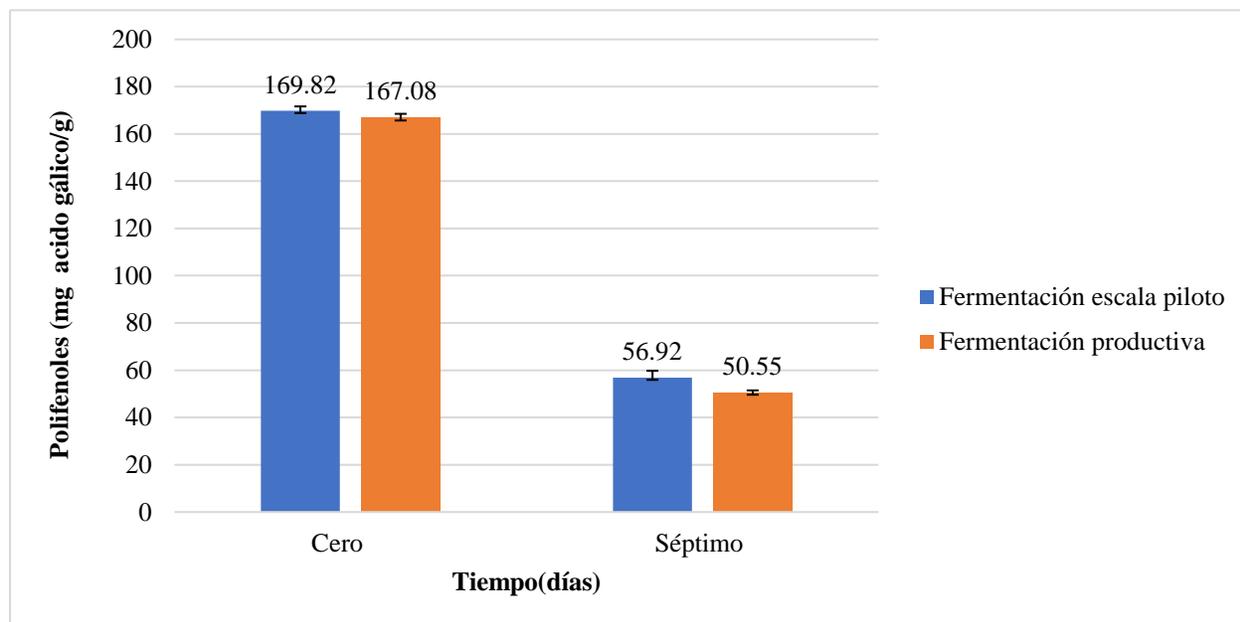
Después de identificar la variedad CCN-51 como uno de los genotipos con una mayor retención de compuestos bioactivos, se llevó a cabo la fermentación del cacao a gran escala. Durante este proceso, se realizó evaluaciones del contenido de polifenoles y antioxidantes en muestras tomadas al inicio y al final de la fermentación. A continuación, se presentan los resultados para cada una de estas muestras.

3.3.1 Polifenoles totales

En la Figura 24, se presentan los resultados de las muestras tomadas durante el desarrollo de la fermentación productiva, donde se indica el contenido de polifenoles expresados en mg Ac. Gálico/g. Además, se comparó con la fermentación escala piloto para comprender las diferencias entre estas dos.

Figura 24

Contenido de polifenoles en dos tipos de fermentaciones



El contenido de polifenoles en la fermentación productiva (cajones de 120 kg) resultó ser inferior al de fermentación escala piloto (cajones 30 kg) sin embargo, no presentaron diferencias significativas entre el contenido de polifenoles en el inicio y final de la fermentación de cacao (Anexo 9). En cuanto a la comparación entre ambas fermentaciones al inicio, se observa una similitud en la cantidad de polifenoles debido al uso de la misma materia prima.

Asimismo, al final de la fermentación, se redujo la cantidad de polifenoles de manera similar en ambas fermentaciones, no obstante, las diferencias numéricas que se presentan en las dos fermentaciones se deben a una mayor cantidad de granos no fermentados en los cajones de menor capacidad. Además, los resultados concuerdan con los estudios realizados por Penagos, (2019) el cual evaluó diversos volúmenes de fermentación, y no encontró diferencias significativas en el contenido de polifenoles presentes en la semilla.

En relación con la disminución de polifenoles durante el proceso de fermentación de cacao, se pudo observar que, tanto en la fermentación escala piloto como en la productiva, existe

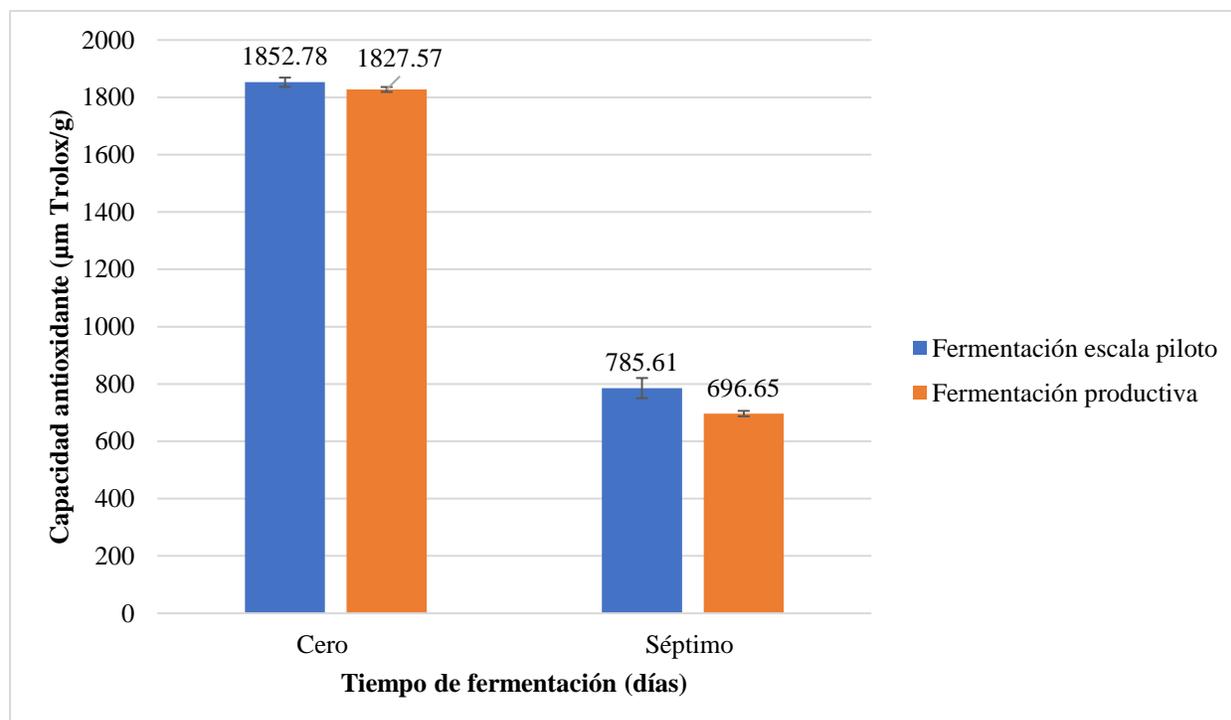
una correlación inversa entre el tiempo y el contenido de polifenoles. En este caso específico, se registró una disminución del 69.75% de polifenoles.

3.3.2 Capacidad Antioxidante

Durante la fermentación del cacao se llevó a cabo una evaluación de la capacidad antioxidante tanto antes como después de la fermentación, y se compararon los resultados con los obtenidos mediante escala piloto. Los hallazgos se muestran en la (Figura 25).

Figura 25

Capacidad antioxidante en granos de cacao



La actividad antioxidante de la fermentación productiva (cajones con volumen 120 kg) es inferior con respecto a la fermentación escala piloto (cajones con volumen de 30 kg) sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos (Anexo 9). Al igual que los polifenoles en el comienzo de la fermentación, se aprecia una semejanza en antioxidantes en ambas fermentaciones, debido al uso de la misma materia prima.

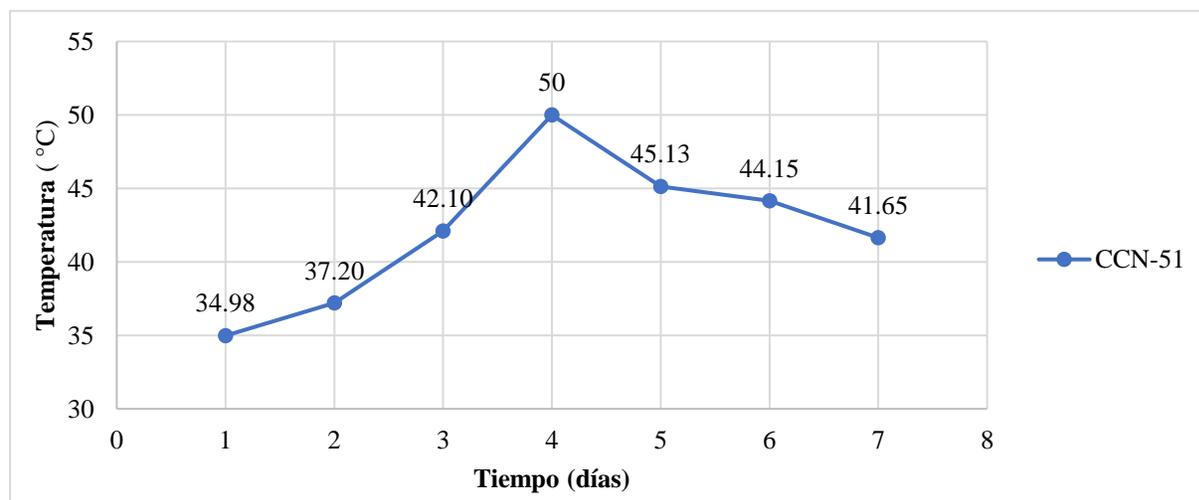
Asimismo, al final de la fermentación se observa una similitud debido a que la cantidad de masa de cacao no influyó sobre la composición bioquímica. Estos resultados son comparables con los reportados por Hernández Hernández et al., (2016) quienes informaron que la fermentación medida en diferentes capacidades no influye sobre las características de calidad del cacao. Además, durante las dos fermentaciones existió un patrón similar que disminuyó significativamente la actividad antioxidante conformen los días de fermentación avanzaron registrando una pérdida de 61.88% en la capacidad antioxidante.

3.3.3 Temperatura

Al comparar los dos tipos de fermentaciones, se pudo observar que, durante el proceso de fermentación productiva, la temperatura alcanzó niveles más altos en comparación con la micro fermentación (Figura 26). A pesar de que la temperatura aumentó con un volumen más grande, no se observó pérdidas significativas en el contenido de antioxidantes y compuestos fenólicos.

Figura 26

Relación de temperatura y tiempo



3.3.4 Porcentaje de fermentación.

Los granos de la variedad CCN-51, fermentados durante 7 días en cajones de madera con una capacidad de 120 kg, alcanzaron una temperatura máxima de 50 °C, con un tiempo de remoción de 48 horas. Al finalizar la fermentación, se realizó una prueba de corte en la que se seleccionaron 100 granos con un peso aproximado de 170 g, determinando un porcentaje de fermentación del 86%.

Este resultado se comparó con el obtenido previamente, donde se analizó que durante la fermentación productiva se logra un mayor porcentaje de granos fermentados en comparación con la fermentación escala piloto. Además, se observó que la cantidad de masa tuvo un efecto significativo en esta variable de respuesta, lo cual se reflejó en un mayor porcentaje de fermentación.

En esta investigación se realizó una comparación entre los efectos de los polifenoles y los antioxidantes en la fermentación escala piloto y productiva. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambas, si existió una diferencia en el porcentaje de fermentación lo cual nos permite inferir que los resultados que alcanzamos en esta investigación pueden extrapolarse a la fermentación productiva y a pesar de ello se alcanza el punto de una fermentación superior.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se determinó un mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante en los granos de cacao sin fermentar de la variedad CCN-51 en relación con la variedad Nacional.
- La presente investigación evidenció que el tiempo y la variedad son factores determinantes en los antioxidantes. A medida que avanzaba el tiempo de fermentación, se observó una disminución en la capacidad antioxidante en ambas variedades. Sin embargo, se encontró que la variedad CCN-51 retuvo una mayor cantidad de antioxidantes.
- No se determinó diferencias estadísticamente significativas entre el mejor tratamiento en estudio a escala piloto (30 kg) y a escala productiva (120 kg) sobre el contenido de polifenoles y actividad antioxidante. Por lo tanto, se concluye que la fermentación escala piloto es reproducible a escala productiva.

4.2 Recomendaciones

- Optimización de las variables de fermentación para conservar el contenido de compuestos bioactivos en los granos de cacao durante el proceso de fermentación para desarrollar productos de mayor calidad funcional y sensorial.

BIBLIOGRAFÍA

- Afoakwa, E. O., Quao, J., Budu, A. S., Takrama, J., & Saalia, F. K. (2011). Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), 755–764. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.581224>
- Afoakwa, E., Quao, J., Takrama, F. S., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2012). Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 19 (3)(1071–1077).
- Aguilar, H. (2016). *Manual para la Evaluación de la Calidad del Grano de Cacao*. http://www.fhia.org.hn/descargas/Proyecto_de_Cacao_SECO/Manual_para_la_Evaluacion_de_la_Calidad_del_Grano_de_Cacao.pdf
- ANECACAO. (2015a). *Cacao CCN51*. Asociación Nacional de Exportadores e Industriales de Cacao Del Ecuador. <http://www.anecacao.com/index.php/es/quienes-somos/cacaoccn51.html>
- ANECACAO. (2015b). *Historia del Cacao*. Asociación Nacional de Exportadores e Industriales de Cacao Del Ecuador. <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>
- Aprotosoiaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73–91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>
- Arvelo, M., González, D., Steven, A., Delgado, T., & Montoya, P. (2017). *Manual Técnico del Cultivo de Cacao Prácticas Latinoamericanas*. www.iica.int.
- Avendaño Arrazate, C. H., Campos Rojas, E., López Palestina, C. U., Martínez Bolaños, M., Caballero Pérez, J. F., Báez Alonso, M., Ariza Flores, R., & Cadena Iñiguez, J. (2021). Antioxidant activity in genotypes of *theobroma* spp. (malvaceae) in Mexico.

- Revista de Biología Tropical*, 69(2), 507–523.
<https://doi.org/10.15517/rbt.v69i2.41626>
- Barišić, V., Kopjar, M., Jozinović, A., Flanjak, I., Ačkar, Đ., Miličević, B., Šubarić, D., Jokić, S., & Babić, J. (2019). The chemistry behind chocolate production. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24173163>
- Beckett, S. T., Fowler, M. S., & Ziegler, G. R. (2017). *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use* (Stephen T. Beckett, Mark S. Fowler, & Gregory R. Ziegler, Eds.; 5th ed., Vol. 5).
- Borja Fajardo, J. G., Horta Tellez, H. B., Peñaloza Atuesta, G. C., Sandoval Aldana, A. P., & Mendez Arteaga, J. J. (2022). Antioxidant activity, total polyphenol content and methylxantine ratio in four materials of *Theobroma cacao* L. from Tolima, Colombia. *Heliyon*, 8(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09402>
- Borja, J. G., Horta, H. B., Peñaloza, G. C., Sandoval, A. P., & Mendez, J. J. (2022). Antioxidant activity, total polyphenol content and methylxantine ratio in four materials of *Theobroma cacao* L. from Tolima, Colombia. *Heliyon*, 8(5), e09402. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09402>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 3, Issue 4, pp. 228–237). <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Brito, B. de N., Campos Chisté, R., da Silva Pena, R., Abreu Gloria, M. B., & Santos Lopes, A. (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, 228, 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>
- Burbano, R. (2020). *Evaluación de un sistema semiautomatizado para la fermentación de Theobroma cacao L. (nacional y súper árbol) en la amazonía norte ecuatoriana* [Universidad Estatal Amazónica].

- Calvo, A. M., Botina, B. L., García, M. C., Cardona, W. A., Montenegro, A. C., & Criollo, J. (2021). Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95703-2>
- Caporaso, N., Whitworth, M. B., Fowler, M. S., & Fisk, I. D. (2018). Hyperspectral imaging for non-destructive prediction of fermentation index, polyphenol content and antioxidant activity in single cocoa beans. *Food Chemistry*, *258*, 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.039>
- Carmen, Y., & Erazo, G. (2019). *Diseño de un fermentador y secador solar piloto, para dos variedades de cacao (theobroma cacao l), en el cantón el Empalme provincia Guayas*. Universidad Internacional SEK.
- Chacón Ortiz, C. Y., Mori Culqui, P. L., Chavez, S. G., chacón Ortiz, C. Y., Mori Culqui, P. L., & Chavez Quintana, S. G. (2021). Antioxidantes y polifenoles totales de chocolate negro con incorporación de cacao (*Theobroma cacao L.*) crudo. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, *23*(4), 266–273. <https://doi.org/10.18271/ria.2021.331>
- Chire, G. C., Verona, P. A., & Guzmán, J. H. (2016). Color changes during post harvest of peruvian cocoa beans from Piura. In *Ciencia e Investigación* (Vol. 19, Issue 1).
- Conservación y gobernanza en el piedemonte Amazónico. (2021). *Manual de cosecha y poscosecha de cacao fino y de aroma*.
- Cortez, D., Quispe-Sanchez, L., Mestanza, M., Oliva-Cruz, M., Yoplac, I., Torres, C., & Chavez, S. G. (2023). Changes in bioactive compounds during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) harvested in Amazonas-Peru. *Current Research in Food Science*, *6*. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100494>
- Cros, E., Rouly, M., Villeneuve, F., & Vincent, J.-C. (1982). Recherche d'un indice de fermentation du cacao. II. Estimation de la matière colorante rouge des fèves de cacao. *Café, Cacao, Thé*, *26*(2), 115–122.

- Cruz, J. F. M., Leite, P. B., Soares, S. E., & Bispo, E. da S. (2015). Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao*, L) cultivars during fermentation. *Food Science and Technology (Brazil)*, 35(2), 279–284. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6541>
- De Vuyst, L., Leroy, F., & Luc De Vuyst, ir. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria, and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014/5838746>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5–17. <https://doi.org/10.1111/JAM.13045>
- Durango, W., Caicedo, M., Vera, D., Sotomayor, I., Saini, E., & Chavéz, E. (2019). *La cadena de valor del cacao en América latina y El Caribe*.
- Durango, W., Caicedo, M., Vera, D., Sotomayor, I., Saini, E., & Chávez, F. E. (2019). *La cadena de valor del cacao en América latina y El Caribe* (V. Sánchez, J. Zambrano, & Iglesias Cristina, Eds.).
- Efraim, P., Pezoa-García, N., Jardim, D., Nishikawa, A., Haddad, R., & Eberlin, M. (2010). Influencia de la fermentación y el secado de los granos de cacao en el contenido de polifenoles y la aceptación sensorial. *Ciencia y Tecnología en Alimentos*. 30(L1):142–150.
- Emmanuel, O. A., Jennifer, Q., Agnes, S., Jemmy, S. T., & Firibu, K. S. (2012). Influence of pulp-preconditioning and fermentation on fermentative quality and appearance of Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal* 19(1): 127-133 (2012).
- Espín Susana, & Samaniego Iván. (2016). *Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao*.
- Fang, Y., Li, R., Chu, Z., Zhu, K., Gu, F., & Zhang, Y. (2020). Chemical and flavor profile changes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) during primary fermentation. *Food Science and Nutrition*, 8(8), 4121–4133. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1701>

- Ferreira de Oliveira, A. P., Milani, R. F., Efraim, P., Morgano, M. A., & Tfouni, S. A. V. (2021). Cd and Pb in cocoa beans: Occurrence and effects of chocolate processing. *Food Control*, *119*, 107455. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107455>
- Goudar, G., Manne, M., Adi Pradeepkiran, J., & Kumar, S. (2023). *Food bioactive compounds, sources, and their effectiveness during COVID-19* (pp. 91–108). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15256-6.00008-8>
- Guehi, T. S., Dadie, A. T., Koffi, K. P. B., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, K. D., & Nemlin, G. J. (2010). Performance of different fermentation methods and the effect of their duration on the quality of raw cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*(12), 2508–2514. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2010.02424.X>
- Hernández Hernández, C., López Andrade, P. A., Ramírez Guillermo, M. A., Guerra Ramírez, D., & Caballero Pérez, J. F. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Science and Nutrition*, *4*(5), 690–695. <https://doi.org/10.1002/fsn3.333>
- INAMHI. (2020). *Servicio Meteorológico del Ecuador*. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. <https://inamhi.wixsite.com/inamhi/novedades>
- INFOCACAO. (2017). *Producción de cacao CCN-51 y fino de aroma*. http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/infocacao/InfoCacao_No14_Sept_2017.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2018). *NTE INEN 176 Granos de cacao. requisitos cocoa beans requirements*.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2018). *Fermentación y secado*. <http://tecnologia.iniap.gob.ec/images/rubros/contenido/cacao/fermenta.pdf>
- Jiménez Barragán, J. C., Rodríguez Zamora, G. A., & Saltos, R. (2016). *Beneficio post-cosecha: Protocolo 5*.
- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean

- flavour profile — A review. *Food Research International*, 82, 44–52.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.01.012>
- Kuskoski, E. M., Vega, J. M., Rios, J. J., Fett, R., Troncoso, A. M., & Asuero, A. G. (2003). Characterization of anthocyanins from the fruits of Baguagçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5450–5454.
<https://doi.org/10.1021/jf030014z>
- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4)(726–732).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Lambert, S. (2021). *Fermentación del Cacao. Aspectos Generales*.
<https://cadenacacaoca.info>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2021). *Informe de rendimientos objetivos de cacao (almendra seca)*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/informe-de-rendimientos-objetivos/rendimiento-de-cacao>
- López Guerrero, A. (2017). *Producción y Comercialización de Cacao Fino de Aroma en el Ecuador - Año 2012-2014*. <https://www.scpm.gob.ec/sitio/wp-content/uploads/2019/03/ESTUDIO-DEL-CACAO-IZ7-version-publica-ultima.pdf>
- López Hernández, M. del P., & Criollo Nuñez, J. (2022). Cambios Físicoquímicos En La Fermentación Y Secado De Materiales De Cacao En Colombia. *Ciencia En Desarrollo*, 13(2), 25–34. <https://doi.org/10.19053/01217488.v13.n2.2022.14140>
- López, M., & Hernández, E. (2018). El proceso de fermentación del CACAO (*Theobroma cacao* L.). *Agro Productividad*, 4(1). <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/572>
- Lugo, N. Z., Colinas, M. T., Bautista, C., Vázquez, T., Saldaña, H., & Martínez, T. (2014). Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes*. In *Rev. Mex. Cienc. Agríc* (Vol. 5).

- Marseglia, A., Dellafiora, L., Prandi, B., Lolli, V., Sforza, S., Cozzini, P., Tedeschi, T., Galaverna, G., & Caligiani, A. (2019). Simulated gastrointestinal digestion of cocoa: Detection of resistant peptides and in silico/in vitro prediction of their ace inhibitory activity. *Nutrients*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/nu11050985>
- Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, *42*(2), 57–66. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2014.v42n2-07>
- Melo, T. S., Pires, T. C., Engelmann, J. V. P., Monteiro, A. L. O., Maciel, L. F., & Bispo, E. da S. (2021). Evaluation of the content of bioactive compounds in cocoa beans during the fermentation process. *Journal of Food Science and Technology*, *58*(5), 1947–1957. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04706-w>
- Mikołajczak, N., & Tańska, M. (2021). Relationships between cocoa mass percentage, surface color, free phenolic compounds content and antioxidant capacity of commercially available dark chocolate bars. *Journal of Food Science and Technology*, *58*(11), 4245–4251. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04898-1>
- Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2012). Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: A review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *9*(1). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v9i1.5>
- Moreira, I. M. da V., Vilela, L. de F., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2018). Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. *Food Research International*, *109*, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.012>
- Neira Mosquera, J. A., Revilla Escobar, K. Y., Aldas Morejon, J. P., & Sánchez Llaguno, S. N. (2020). Métodos de fermentación del cacao nacional (theobroma cacao) y su influencia en las características físico-químicas, contenido de cadmio y perfiles sensoriales. *Alternativas*, *21*(3), 42–48. <https://doi.org/10.23878/alternativas.v21i3.339>
- Nogales, J. R. (2021). *Beneficio del cacao, métodos de fermentación.Poscosecha Cacao*. Poscosecha Cacao. <https://poscosechacacao.blogspot.com>

- Onomo, P. E., Niemenak, N., Djocgoue, P. F., Ondobo, M. L., & Ndoumou, D. O. (2015). Heritability of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity of Cameroonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *African Journal of Biotechnology*, *14*(36), 2672–2682. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14715>
- Pallares Pallares, A., Estupiñán A, M. R., Perea Villamil, J. A., & López Giraldo, L. J. (2017a). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista ION*, *29*(2), 7–21. <https://doi.org/10.18273/revion.v29n2-2016001>
- Pallares Pallares, A., Estupiñán A, M. R., Perea Villamil, J. A., & López Giraldo, L. J. (2017b). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista ION*, *29*(2), 7–21. <https://doi.org/10.18273/revion.v29n2-2016001>
- Pancardo Lagunas, A. (2016). *Efecto del procesamiento del cacao (Theobroma cacao L.) en la capacidad antioxidante durante la obtención de licor y cocoa*[Maestro en Ciencias Alimentarias] [Universidad Veracruzana]. <https://www.uv.mx/mca/files/2018/01/IQ.-Andres-Pancardo-Lagunas.pdf>
- Papalexandratou, Z., Kaasik, K., Kauffmann, L. V., Skorstengaard, A., Bouillon, G., Espensen, J. L., Hansen, L. H., Jakobsen, R. R., Blennow, A., Krych, L., Castro-Mejía, J. L., & Nielsen, D. S. (2019). Linking cocoa varieties and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. *International Journal of Food Microbiology*, *304*, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.012>
- Penagos, M. A. (2019). *Estandarización del proceso de fermentación de cacao (Theobroma cacao L.) en función de la relación entre la masa de grano y el volumen del cajón fermentador*[Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Universidad Nacional de Colombia.
- Perea Villamil, J. A. (2019). *Cacao desde la ciencia: de lo semilla al chocolate* (Universidad Industrial de Santander, Ed.). <https://elibro.net/es/ereader/utnorte/129274?page=21>

- Prasedya, E. S., Frediansyah, A., Martyasari, N. W. R., Ilhami, B. K., Abidin, A. S., Padmi, H., Fahrurrozi, Juanssilfero, A. B., Widyastuti, S., & Sunarwidhi, A. L. (2021). Effect of particle size on phytochemical composition and antioxidant properties of *Sargassum cristaefolium* ethanol extract. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95769-y>
- PRO ECUADOR. (2013). *Análisis del sector cacao y elaborados*. http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/06/PROEC_AS2013_CACAO.pdf
- Ramírez Guillermo, M. Á., Lagunes Espinoza, L. C., Ortiz García, C. F., Gutiérrez, O. A., & Santamaría, R. de la R. (2018). Variación morfológica de frutos y semillas de cacao (*theobroma cacao* l.) de plantaciones en tabasco, méxico. *Revista Fitotec México*, *41*(2).
- Salas Rivera, E. K. (2014). *Análisis de la competitividad del cacao fino de aroma ecuatoriano en el mercado argentino*. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Samaniego, I., Espín, S., Quiroz, J., Ortiz, B., Carrillo, W., García-Viguera, C., & Mena, P. (2020a). Effect of the growing area on the methylxanthines and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador. *Journal of Food Composition and Analysis*, *88*, 103448. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103448>
- Samaniego, I., Espín, S., Quiroz, J., Ortiz, B., Carrillo, W., García-Viguera, C., & Mena, P. (2020b). Effect of the growing area on the methylxanthines and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador. *Journal of Food Composition and Analysis*, *88*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103448>
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The Microbiology of Cocoa Fermentation. In *Caffeinated and Cocoa Based Beverages: Volume 8. The Science of Beverages* (pp. 423–446). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>
- Singh, R. P., & Heldman, D. R. (2014). *Introduction to Food Engineering (Fifth Edition)*.

- Solarte Rangel, M. L. (2022). *Caracterización de algunos compuestos de interés en los procesos de fermentación y tostado de dos especies de cacao Amazónico*. Universidad Nacional de Colombia.
- Steinau, D. I., Gonzales, R. S., & Castañeda de Abrego, V. (2017). *Evaluación de la incidencia de la fermentación en la calidad del grano de cacao trinitario en Caluco, Sonsonate, El Salvador. 1*.
- Tello Alonso, S., Avendaño Arrazate, C. H., Vásquez Murrieta, M. S., López Cortéz, M. del S., & Responsable Laboratorio. (2020). Contenido de compuestos bioactivos en *Theobroma cacao L. Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
- Teneda William. (2017). *Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao* (Universidad Internacional de Andalucía, Ed.; 23rd ed., Vol. 1).
- Urbańska, B., & Kowalska, J. (2019). Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the world. *Antioxidants*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/antiox8080283>
- Ureña, M., & Sandoval, A. (2021). *Innovación tecnológica en cacao andino Producto 6: Prototipo de fermentador portátil ecológico, optimización del proceso de fermentación*. www.fontagro.org
- Velásquez Reyes, D., Gschaedler, A., Kirchmayr, M., Avendaño Arrazate, C., Rodríguez, C., Calva Estrada, S. de J., & Lugo Cervantes, E. (2021). Cocoa bean turning as a method for redirecting the aroma compound profile in artisanal cocoa fermentation. *Heliyon*, 7(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07694>
- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Favero, G. R., de Carvalho, J. C., Goés-Neto, A., Rogez, H., & Soccol, C. R. (2021). Global cocoa fermentation microbiome: revealing new taxa and microbial functions by next generation sequencing technologies. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol.

37, Issue 7). Springer Science and Business Media B.V.
<https://doi.org/10.1007/s11274-021-03079-2>

Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., & Cocolin, L. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 31–40.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004>

Watson, R. R., Preedy, V. R., & Zibadi, S. (2013). *Nutrition and Health Series Editor: Adrienne Bendich Chocolate in Health and Nutrition*.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_4

Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). *Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification*. www.elsevier.com/locate/foodres

Zapata, S., Tamayo, A., & Rojano, B. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *SciELO*.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000300007

ANEXOS

Anexo 1

Determinación de compuestos fenólicos o polifenoles totales

Principio del método

Mediante el fraccionamiento de un extracto de cacao obtenido en una solución acuosa de Metanol al 70% y precipitaciones selectivas con gelatina, se separan compuestos fenólicos, taninos y no taninos. La concentración de estas fracciones se determina luego de la purificación sobre Polivinilpirrolidina insoluble (PVP) usando el método colorimétrico del reactivo de Folin Ciocalteu y un Espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 760 nm.

Campo de aplicación

Método aplicable a almendras de cacao secas, fermentadas, no fermentadas, polvo y licor de cacao libres de grasa.

Reactivos

- ✓ Metanol grado reactivo al 99.50 %
- ✓ Estándar Acido Gálico Monohidratado 97.50 — 102.50 %
- ✓ Reactivo de Folin & Ciocalteu, grado p.a.
- ✓ Carbonato de Sodio 99.50 %
- ✓ Agua ultrapura o bidestilada
- ✓ Polivinilpolipirrolidina, Sigma P 6755

- ✓ Gelatina sin sabor, Gel 'hada
- ✓ Cloruro de Sodio puris, 99.50 %, Fluka 71380
- ✓ Acido Clorhidrico 36.50 – 38 % HCl

Preparación de reactivos

Carbonato de Sodio al 20%: Transferir cuantitativamente 20 g de Carbonato de Sodio en un balón volumétrico de 100mL disolver y completar a volumen con agua ultrapura.

Solución acuosa de Metanol: Transferir cuantitativamente 700 ml de Metanol en un balón volumétrico de 1000 ml completar a volumen con agua ultrapura, (densidad de la solución 0.872 g/ml).

Solución de gelatina al 1%: Pesar 1.00 g de gelatina y transferir a un balón volumétrico de 100 mL. Disolver con una cantidad suficiente de agua destilada caliente y aforar a 100 mL con agua ultrapura.

Cloruro de Sodio al 10%: Pesar 10.0 g de Cloruro de Sodio y transferir a un balón volumétrico. Disolver y aforar con agua destilada.

Acido Clorhídrico 0,1N: Transferir 8.60 mL de HCl 36.5-38% a un balón volumétrico, disolver y aforar con agua destilada. La solución se estandarizo con Carbonato de Sodio anhidro (estándar primario).

Solución de gelatina / NaCl (1:1). Mezclar un volumen de la solución de gelatina al 1% con un volumen igual de NaCl al 10% y homogenizar.

Preparación de estándar primario de 200 ppm de Ácido Gálico: Transferir 0.020 g de Acido Gálico en un balón volumétrico de 100 ml, disolver y aforar con agua destilada.

Soluciones estándar para curva de calibración: A partir de la solución estándar primario de 200 ppm, transferir con precisión los volúmenes indicados en la Tabla 2 a un balón volumétrico de 10 ml y aforar con agua ultrapura:

Curva de calibración para análisis de polifenoles totales

| Volumen de estándar (ml) | Volumen de Agua (ml) | Concentración (ppm) |
|--------------------------|----------------------|---------------------|
| 0.25 | 9.975 | 5 |
| 0.50 | 9.950 | 10 |
| 2.00 | 8.00 | 40 |
| 4.00 | 6.00 | 80 |
| 5.00 | 5.00 | 100 |
| 7.00 | 3.00 | 140 |

Equipos y Materiales

- ✓ Papel filtro Whatman N° 4 y 5
- ✓ Balones volumétricos de 100 ml
- ✓ Balanza analítica de precisión 0.1 mg
- ✓ Agitador magnético
- ✓ Baño María
- ✓ Pipetas volumétricas de 5 y 1 ml
- ✓ Embudos de vidrio para filtración 12 cm de diámetro
- ✓ Espectrofotómetro UV- VIS

- ✓ Agitadores tipo Vortex
- ✓ Tubos de ensayo capacidad de 15 ml
- ✓ Papel filtro cualitativo de 16 cm
- ✓ Micropipeta automática de 100 a 1000 ml
- ✓ Puntas para micropipeta automática
- ✓ Erlenmeyer tapa rosca de 125 ml
- ✓ Vasos de precipitación de 10, 100 y 500 ml

Procedimiento

Desengrasado de la muestra: Proceda de acuerdo con lo descrito en la Sección 1. Método de preparación de muestras.

Extracción

- a) Pesar en un Erlenmeyer 1 g de polvo de cacao desengrasado con aproximación de 0.5 mg y añadir 75 ml de solución acuosa de Metanol al 70%.
- b) Mezclar en un agitador magnético a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- c) Filtrar el extracto a través de papel Whatman N°4 y aforar a 100 ml en un balón volumétrico, con solución acuosa de Metanol al 70% (Extracto crudo).

Determinación de polifenoles totales

- d) Transferir 5 ml de extracto crudo a un balón volumétrico de 50 ml y aforar con agua ultrapura (Extracto A). Se emplea para la determinación de polifenoles totales.

Cuantificación en el Espectrofotómetro uv-visible

- e) Transferir cuantitativamente en un tubo de ensayo 1 ml de los extractos A, B o C.
- f) Añadir 6 ml de agua ultrapura o bidestilada y 1 ml de reactivo de Folin & Ciocalteu, luego de tres minutos añadir 2 ml de la solución de Carbonato de Sodio al 20%; agitar en el equipo Vortex y calentar en baño maría a 40 °C por 2 minutos (Este procedimiento se realiza tanto para las muestras como para los estándares).
- g) Pasar la solución a una celda de vidrio y leer la absorbancia en un Espectrofotómetro UV-VIS bajo las siguientes condiciones:
 - ✓ Longitud de onda: 760 nm
 - ✓ Temperatura: ambiente
 - ✓ Slit: 0.2 nm

Cálculos y expresión de los resultados

La cuantificación se realiza por comparación de la absorbancia de cada extracto en la curva de calibración y utilizando la siguiente formula:

$$\frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ÁcidoGálico} = \frac{a * b * d * f}{p}$$

Donde:

a = Concentración de ácido gálico obtenida a partir de la curva de calibración (mg/g)

b = Volumen total de extracto (100 ml)

d = Factor de dilución

f = Factor para transformar unidades (f = 0.001)

p = peso de la muestra g.

El contenido de las diferentes fracciones de los polifenoles se realiza utilizando las siguientes ecuaciones:

Fenoles totales: $PT = A$ equivalentes de Ácido Gálico — B equivalentes de Ácido Gálico.

Anexo 2

Determinación de la capacidad antioxidante por el método de decoloración del catión radical

ABTS+

Principio del Método

Es un método indirecto que permite medir la habilidad del antioxidante para estabilizar el catión radical ABST+. Dicha estabilización provoca disminución de la absorbancia del catión radical.

El radical catión ABST' una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico), presenta características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm (Henriquez, Aliaga, a Lissi, 2002), el que, frente a un agente antioxidante dador de electrones, se reduce provocando la decoloración de la disolución del radical y que es determinado espectrofotométricamente (Re, y otros, 1998).

Equipos y materiales

- ✓ Papel parafilm, papel aluminio y papel toalla
- ✓ Balones de aforo 25 ml
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Baño ultrasónico
- ✓ Espectrofotómetro
- ✓ Tubos de ensayo de 10 ml

- ✓ Vasos de precipitación
- ✓ Micropipetas 1000 μL y 50 μL
- ✓ Papel Whatman 0.45
- ✓ Puntas para micropipetas
- ✓ Frascos ámbar
- ✓ Probetas

Reactivos

- ✓ Trolox: 6-hidroxy -2,5,7,8 - tetramethylroman-2-carboxylic acid (Sigma...
- ✓ ABTS (3-ethylbenzoathiazoline-6-sulfonic acid) diamonium salt
- ✓ Persulfato de Potasio
- ✓ Fosfato de sodio monobásico NaH_2PO_4 grado reactivo
- ✓ Fosfato de sodio dibásico $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ grado reactivo

Preparación de Reactivos

Solución amortiguadora de fosfatos: 75 mmol/L (pH = 7,00).

Solución A: (0.2 mol/L): Pesar 1.037 g de fosfato de sodio monobásico y llevar a 100 ml con agua destilada en un balón aforado.

Solución B: (0.02 mol/L): pesar 5.33 g de fosfato de sodio dibásico y llevar a 500 ml con agua destilada en un balón de aforo.

Mezclar 95 ml, de la solución A con 405 ml de solución B, llevar a 900 ml con agua destilada y medir el pH. Ajustar el pH con las soluciones A o B sobrantes de acuerdo a lo necesario hasta alcanzar un valor de pH = 7.0 y llevar a 1 L en un balón aforado.

Envasar la dilución en una botella y almacenar a 4 °C por un período máximo de 1 mes.

Solución Stock de ABTS

Solución de ABTS (7mM): pesar 0.0960 g de ABTS (548.68 g/mol), disolver en agua ultrapura completamente y aforar a un volumen de 25 ml. Almacenar a temperatura de refrigeración (4°C). La solución dura un mes a estas condiciones.

Solución de Persulfato de Potasio (2,45mM): pesar 0.01655 g de $K_2S_2O_8$, disolver en agua ultrapure y aforar a 25 ml. Conservar la solución en refrigeración 4 °C.

Solución Activada de ABTS+

Mezclar en proporción 1:1 la solución de ABTS (7mM) con la de $K_2S_2O_8$ (2.45mM) y dejar reposando 16 horas antes de su uso. Filtrar la solución por un papel filtro walman 0.4 y envasar en un frasco ámbar. La solución se mantiene estable 24 h, por lo que se recomienda realizarla el día del análisis.

Solución de Trabajo ABTS.+

En un frasco ámbar diluir la solución activada de ABTS.+ con buffer fosfato hasta obtener una lectura de Absorbancia de 1.1 +0.01 a una longitud de onda de 734 nm.

Preparación de la curva de calibración**Solución Madre de Trolox**

Solución madre (2000 pmol/L): pesar 0.050g de Trolox (PM 250.32 g/mol), adicionar de 15 a 20 gotas de etanol al 95% para disolver todos los cristales y llevar a 100 ml con la solución amortiguadora en un balón aforado ámbar. La preparación y manipulación del Trolox se realiza

en oscuridad o con la ayuda de luz amarilla para evitar su degradación. Envasar la dilución en una botella ámbar.

NOTA: Solo preparar para usar el día del análisis y luego descartarlo.

Curva de calibración (0-800 $\mu\text{mol/L}$): preparar las soluciones patrón como se indica en el cuadro 1. y diluir con la solución amortiguadora hasta un aforo de 10 ml.

Determinación de la Capacidad Antioxidante

- a) Transferir a un tubo de vidrio un volumen de 200 μL , de muestra debidamente diluida con buffer fosfato y adicionar 3800 μL de la solución de trabajo de ABTS.+ ($A_m = 1.1 + 0.01$).
- b) Del mismo modo transferir 200 μL , de buffer fosfato y de las soluciones patrón de Trolox y adicionar 3800 μL de la solución diluida de ABTS.+
- c) Agitar los tubos y dejar reposar por un tiempo de 45 min.
- d) Medir la absorbancia final de cada muestra por duplicado a una longitud de onda de 734 nm.
- e) Para la curva de calibración se calcula la absorbancia neta como lo indica la ecuación 1, y se grafica en función de la concentración.

Cálculos

$$\text{ABS (muestra y/o patrón trulox)} = \text{ABS (solución de trabajo inicial)} - \text{ABS (muestra 45min)} - \text{ABS (blanco)}$$

Anexo 3

Porcentaje de fermentación

| | |
|---|---------|
| NTE INEN 176 | 2018-02 |
| GRANOS DE CACAO REQUISITOS | |
| 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN | |
| <p>Esta norma establece los requisitos de calidad para los granos de cacao y los criterios para su clasificación.</p> | |
| 2. REFERENCIAS NORMATIVAS | |
| <p>Los siguientes documentos, en su totalidad o en parte, son indispensables para la aplicación de este documento. Para referencias fechadas, solamente aplica la edición citada. Para referencias sin fecha, aplica la última edición (incluyendo cualquier enmienda).</p> | |
| <p>NTE INEN-ISO 1114, Granos de cacao. Prueba de corte</p> | |
| <p>NTE INEN-ISO 2291, Granos de cacao. Determinación del contenido de humedad (Método de rutina)</p> | |
| <p>NTE INEN 177, Cacao en grano. Muestreo</p> | |
| 3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES | |
| <p>Para los efectos de esta norma, se adoptan las siguientes definiciones:</p> | |
| <p>3.1 granos de cacao Semillas provenientes del fruto del árbol <i>Theobroma cacao</i> L.</p> | |
| <p>NOTA. El grano de cacao fermentado y seco también es conocido con el nombre de "cacao beneficiado".</p> | |
| <p>3.2 cacao fino Granos de cacao que se caracterizan por tener sabores y aromas florales, frutales y otros especiales.</p> | |
| <p>NOTA. "ambal" denominación reconocida en el comercio internacional.</p> | |
| <p>3.3 cacao CCN51 Granos de cacao que se caracterizan por tener sabores frutales (nuez y cítricos) y distintivo sabor a chocolate. Las siglas CCN51 significan "Colección Castro Naranja" y el número "51" se refiere al cruce de la semilla de la cual se obtuvo esta variedad.</p> | |
| <p>3.4 granos de cacao fermentados Granos cuyos cotiledones presentan una coloración marrón o marrón rojiza y estrías profundas, o también cotiledones de una ligera coloración violeta y estrías no profundas.</p> | |
| <p>3.5 granos de cacao violetas Granos que presentan un color violeta, en al menos, la mitad de la superficie expuesta de los cotiledones.</p> | |

3.6**granos de cacao pizarrosos (pastosos)**

Granos sin fermentar que presenta en su interior un color gris negruzco o verdoso y de aspecto compacto por sobre la mitad o más de la superficie expuesta.

3.7**granos de cacao mohosos (con mohos)**

Granos que han sufrido deterioro parcial o total en su estructura interna debido a la acción de mohos.

3.8**granos de cacao defectuosos**

Granos que presentan los siguientes defectos:

3.8.1**granos de cacao dañados por insectos**

Granos que han sufrido deterioro en su estructura (perforaciones) debido a la acción de insectos.

3.8.2**granos de cacao germinados**

Granos que han sufrido deterioro en su calidad debido a un cambio evidente en su estructura por el proceso de germinación (presencia de germen o agujero).

3.8.3**granos de cacao múltiples o pelota**

Unión de dos o más granos por restos de mucilago.

3.8.4**granos de cacao negros**

Granos que se producen por enfermedades o por mal manejo postcosecha.

3.8.5**granos de cacao planos-vano o granza**

Granos cuyos cotiledones se han atrofiado hasta tal punto que cortando la semilla no es posible obtener una superficie completa de los cotiledones.

3.9**material relacionado al cacao**

Corresponde a los granos quebrados (fragmentos de granos que tienen menos de la mitad del grano entero), cascarrillas, placenta y venas.

3.10**material extraño**

Sustancias o materiales distintos al grano de cacao.

3.11**granos infestados**

Granos que contienen insectos vivos o muertos o sus fragmentos, en cualquiera de sus estados biológicos.

4. CLASIFICACIÓN

Los granos de cacao se clasifica en:

4.1 Cacao fino**4.1.1 Arriba Superior Summer Selecto (A.S.S.S)****4.1.2 Arriba Superior Selecto (A.S.S)**

NTE INEN 176

2016-02

4.1.3 Arriba Superior Época (A.S.E)**4.2 Cacao CCN51****4.2.1 Cacao Superior Selecto (C.S.S)****4.2.2 Cacao Superior Corriente (C.S.C)****5. REQUISITOS**

Los granos de cacao deben cumplir con los siguientes requisitos:

5.1 Los granos de cacao no deben presentar olor o sabor a humo, o que muestren signos de contaminación por humo;

5.2 Los granos de cacao no deben estar infestados;

5.3 Los granos de cacao deben cumplir con los requisitos físicos y de calidad indicados en la Tabla 1.

TABLA 1. Requisitos físicos y calidad para los granos de cacao

| Requisitos | Cacao Fino | | | Cacao CCN51 | | Método de ensayo |
|---|------------|-------------|-----------|-------------|---------|-------------------|
| | A.S.S.S | A.S.S | A.S.E | C.S.S | C.S.C | |
| Humedad, máximo, % ^a | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | NTE INEN-ISO 2291 |
| Peso de 100 granos, g | > 130 | > 120 a 130 | 100 a 120 | > 125 | 110-125 | ^b |
| Granos fermentados, mínimo, % | 75 | 65 | 53 | 68 | 55 | NTE INEN-ISO 1114 |
| Granos violetas, máximo, % | 15 | 21 | 25 | 18 | 26 | NTE INEN-ISO 1114 |
| Granos pizarrosos, máximo, % | 9 | 12 | 18 | 12 | 15 | NTE INEN-ISO 1114 |
| Granos mohosos, máximo, % | 1 | 2 | 4 | 2 | 4 | NTE INEN-ISO 1114 |
| TOTALES (análisis sobre 100 granos), mínimo | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| Granos defectuosos, máximo, % | 0 | 1 | 3 | 1 | 3 | ^c |
| Material relacionado al cacao, máximo, % | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | ^d |
| Material extraño, máximo, % | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ^e |

^a El símbolo % (por ciento) representa al número 0,01, que expresa a la fracción métrica.

^b masa determinada por medio de una balanza u otro instrumento equivalente.

^c determinado en 500 g de muestra.

NOTA: Se permite la presencia de granza solo en el Cacao A.S.E y en el Cacao C.S.C en un máximo del 1,5 %

6. MUESTREO

El número de unidades de muestra y los criterios sobre el nivel aceptable de calidad a ser acordados por las partes tendrá como base lo establecido en NTE INEN 177

7. ENVASADO

Los granos de cacao deben comercializarse en envases nuevos y no reutilizados que aseguren la protección del producto contra la acción de agentes externos que puedan alterar sus características químicas o físicas y resistir las condiciones de manejo, transporte y almacenamiento.

8. ROTULADO

El rotulado de los envases para los granos de cacao debe contener al menos la siguiente información:

- a) nombre de los granos de cacao de acuerdo con su clasificación;
- b) identificación del lote;
- c) razón social de la empresa y logotipo;
- d) cantidad del producto en unidades del Sistema Internacional de Unidades (SI);
- e) país de origen;
- f) puerto de destino (si aplica).

BIBLIOGRAFÍA

ISO-DIS 2451:2015, *Cocoa beans — Specification and quality requirements*.

Vicente Illingworth Carrasco. *Estudio sobre la normalización del cacao en el Ecuador. Tesis previa a la obtención del título de ingeniero en alimentos*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO. Ambato. 1973.

Cacao en Grano: Requisitos de Calidad de la Industria del Chocolate y del Cacao. CHOCOLATE, BISCUITS & CONFETIONERY OF EUROPE (CADBISCO), EUROPEAN COCOA ASSOCIATION (ECA) AND FEDERATION OF COCOA COMMERCE LTD. (FCC).

Susanne van der Kooij. *Market study of fine flavour cocoa in 11 selected countries – revised version*. ROYAL TROPICAL INSTITUTE. Amsterdam, October 2013.

ICC/REP/83:2011 Meeting of the Ad hoc Panel on Fine or Flavour Cocoa 18 September 2015. DELIBERATIONS OF THE 2010 AD HOC PANEL ON THE REVIEW OF ANNEX "C" OF THE INTERNATIONAL COCOA AGREEMENT, 2001.

Freddy Amores. *Proyecto para establecer parámetros físicos, químicos y organolépticos que permitan diferenciar entre cacao fino y ordinario. Evaluación de parámetros físicos*. INIAP. TALLER INTERNACIONAL PARA PRESENTACION DE RESULTADOS. Guayaquil, Abril 3-5/2006.

Anexo 4

Determinación colorimétrica

Durante todo el proceso de fermentación del cacao se llevó a cabo un estricto control del color de los granos. Para tal fin, se realizaron mediciones de color en 24 unidades experimentales, de las cuales se extrajeron 10 granos de cacao al azar. Estos fueron cortados longitudinalmente para evaluar su estado interno y asignarles una calificación. El promedio de las lecturas de las 10 muestras fue utilizado para la comparación. (Chire et al., 2016). Las mediciones de color, utilizando el colorímetro NR60CP con una iluminación de visualización d/8° digital, registraron los valores de L*, a* y b*. Los cambios de color ΔE^* fueron calculados mediante una ecuación específica.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Donde:

ΔE = Cambio de color total

ΔL = Luminosidad

Δa^* = Componente color rojo

Δb^* = Componente color amarillo

Anexo 5

Prueba de Kruskal Wallis

➤ Polifenoles totales

| Variable | Variedad | Tiempo | Tratamientos | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
|-------------|----------|--------|--------------|---|--------|------|----------|-------|--------|
| Polifenoles | CCN-51 | 0 | T1 | 3 | 169.82 | 1.81 | 169.10 | 22.25 | 0.0023 |
| Polifenoles | CCN-51 | 3 | T2 | 3 | 92.08 | 6.45 | 88.78 | | |
| Polifenoles | CCN-51 | 5 | T3 | 3 | 70.91 | 1.99 | 71.41 | | |
| Polifenoles | CCN-51 | 7 | T4 | 3 | 56.92 | 2.84 | 57.36 | | |
| Polifenoles | Nacional | 0 | T5 | 3 | 157.5 | 5.67 | 155.31 | | |
| Polifenoles | Nacional | 3 | T6 | 3 | 48.87 | 5.81 | 46.81 | | |
| Polifenoles | Nacional | 5 | T7 | 3 | 47.97 | 1.06 | 47.84 | | |
| Polifenoles | Nacional | 7 | T8 | 3 | 40.55 | 2.76 | 39.88 | | |

| Tratamientos | |
|--------------|-----|
| T8 | A |
| T6 | A B |
| T7 | A B |
| T4 | B |
| T3 | C |
| T2 | D |
| T5 | E |
| T1 | F |

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

➤ Capacidad Antioxidante para la Variedad CCN-51

| Tiempo | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
|--------|---|---------|-------|----------|-------|--------|
| 0 | 3 | 1852.78 | 16.20 | 1854.24 | 10.38 | 0.0156 |
| 3 | 3 | 1132.04 | 90.13 | 1097.91 | | |
| 5 | 3 | 956.14 | 4.4 | 955.38 | | |
| 7 | 3 | 785.61 | 35.21 | 767.95 | | |

➤ *Capacidad Antioxidante para la Variedad Nacional*

| Tiempo | N | Medias | D.E. | Medianas | H | p |
|--------|---|--------|-------|----------|------|--------|
| 0 | 3 | 1428.4 | 0.86 | 1428.86 | 9.97 | 0.0188 |
| 3 | 3 | 808.90 | 76.98 | 768.76 | | |
| 5 | 3 | 620.98 | 27.95 | 620.25 | | |
| 7 | 3 | 564.32 | 39.54 | 543.33 | | |

Anexo 6

Prueba Tukey para polifenoles en las variedades de cacao

| Variedad | Medias | E.E. | |
|----------|--------|------|---|
| CCN-51 | 97.43 | 1.17 | A |
| Nacional | 73.72 | 1.17 | B |

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

Anexo 7

Prueba de Shapiro-Wilks (modificado)

| Variable | n | Media | D.E. | W* | p-valor |
|------------------------|----|---------|--------|------|---------|
| Capacidad Antioxidante | 24 | 1018.65 | 420.44 | 0.85 | <0.0001 |

Anexo 8

Prueba Tukey 5%

➤ *Humedad cacao CCN-51*

| Tiempo | Medias | n | E.E. | |
|--------|--------|---|------|---|
| 0 | 21.23 | 3 | 0.06 | A |
| 3 | 21.30 | 3 | 0.06 | A |
| 5 | 21.43 | 3 | 0.06 | A |
| 7 | 21.47 | 3 | 0.06 | A |

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

➤ Humedad cacao Nacional

| Tiempo | Medias | n | E.E. | |
|---------------|---------------|----------|-------------|---|
| 0 | 22.07 | 3 | 0.17 | A |
| 3 | 21.57 | 3 | 0.17 | A |
| 5 | 21.57 | 3 | 0.17 | A |
| 7 | 21.37 | 3 | 0.17 | A |

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

Anexo 9

Prueba Tukey de Fermentación Productiva y escala piloto.

| Tipo | Medias (polifenoles inicio) | Medias (polifenoles finales) | Medias (antioxidantes inicio) | Medias (antioxidantes finales) |
|----------------------------|--|---|--|---|
| Fermentación productiva | 167.08 ^a | 50.55 ^a | 1852.78 ^a | 785.61 ^a |
| Fermentación escala piloto | 169.82 ^a | 56.92 ^a | 1827.27 ^a | 696.65 ^a |

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

Anexo 10

Resultados del INIAP Polifenoles y Capacidad antioxidante

| INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD LABORATORIO DE SERVICIO DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS Panamericana Sur Km. 1. CutajaguaTrs. 2690691-3007134. Fax 3007134 Casilla postal 17-01-340 | | | | |
|--|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------|---|
| INFORME DE ENSAYO No: 23-034 | | | | |
| **NOMBRE PETICIONARIO: | | Srta. Mayra Orbe | | **INSTITUCIÓN: |
| **DIRECCIÓN: | | Cristobal Colón | | Universidad Técnica del Norte |
| FECHA DE EMISIÓN: | | 27/03/2023 | | **ATENCIÓN: |
| FECHA DE ANÁLISIS: | | Del 03 al 27 de marzo del 2023 | | Srta. Mayra Orbe |
| | | | | 03/03/2023 |
| | | | | 10h15 |
| | | | | Polifenoles y Capacidad Antioxidante (ABTS) |
| ANÁLISIS | HUMEDAD | POLIFENOLES Ω | CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Ω | **IDENTIFICACIÓN |
| MÉTODO | MO-LSAIA-01.01 | MO-LSAIA-31 | MO-LSAIA-33 | |
| METODO REF. | U. FLORIDA 1970 | Cross, E. y Maringo, G. 1973/1982 | ABTS | |
| UNIDAD | % | mg Ac. Gálico/g | μm | |
| 23-0246 | 4,35 | 169,10 | 1835,89 | Grano de Cacao T1 R1 |
| 23-0247 | 4,33 | 168,47 | 1868,20 | Grano de Cacao T1 R2 |
| 23-0248 | 4,23 | 171,88 | 1854,24 | Grano de Cacao T1 R3 |
| 23-0249 | 4,91 | 87,95 | 1097,91 | Grano de Cacao T2 R1 |
| 23-0250 | 4,45 | 88,78 | 1234,25 | Grano de Cacao T2 R2 |
| 23-0251 | 4,86 | 99,52 | 1063,96 | Grano de Cacao T2 R3 |
| 23-0252 | 4,60 | 72,61 | 952,18 | Grano de Cacao T3 R1 |
| 23-0253 | 4,41 | 71,41 | 960,87 | Grano de Cacao T3 R2 |
| 23-0254 | 4,53 | 68,72 | 955,38 | Grano de Cacao T3 R3 |
| 23-0255 | 4,97 | 53,89 | 767,95 | Grano de Cacao T4 R1 |
| 23-0256 | 4,24 | 59,52 | 762,73 | Grano de Cacao T4 R2 |
| 23-0257 | 4,58 | 57,36 | 826,16 | Grano de Cacao T4 R3 |
| 23-0258 | 3,89 | 155,31 | 1428,94 | Grano de Cacao T5 R1 |
| 23-0259 | 3,87 | 163,93 | 1428,86 | Grano de Cacao T5 R2 |
| 23-0260 | 3,95 | 153,25 | 1427,41 | Grano de Cacao T5 R3 |
| 23-0261 | 4,73 | 46,81 | 768,76 | Grano de Cacao T6 R1 |
| 23-0262 | 4,35 | 44,37 | 760,29 | Grano de Cacao T6 R2 |
| 23-0263 | 4,19 | 55,42 | 897,65 | Grano de Cacao T6 R3 |

| INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD LABORATORIO DE SERVICIO DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS Panamericana Sur Km. 1. CutajaguaTrs. 2690691-3007134. Fax 3007134 Casilla postal 17-01-340 | | | | |
|--|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|---|
| INFORME DE ENSAYO No: 23-034 | | | | |
| **NOMBRE PETICIONARIO: | | Srta. Mayra Orbe | | **INSTITUCIÓN: |
| **DIRECCIÓN: | | Cristobal Colón | | Universidad Técnica del Norte |
| FECHA DE EMISIÓN: | | 27/03/2023 | | **ATENCIÓN: |
| FECHA DE ANÁLISIS: | | Del 03 al 27 de marzo del 2023 | | Srta. Mayra Orbe |
| | | | | 03/03/2023 |
| | | | | 10h15 |
| | | | | Polifenoles y Capacidad Antioxidante (ABTS) |
| ANÁLISIS | HUMEDAD | POLIFENOLES Ω | CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Ω | **IDENTIFICACIÓN |
| MÉTODO | MO-LSAIA-01.01 | MO-LSAIA-31 | MO-LSAIA-33 | |
| METODO REF. | U. FLORIDA 1970 | CROS E Y MARIGO G. (1982/1973) | ABTS | |
| UNIDAD | % | mg Ac. Gálico/g | μm Trolox/g | |
| 23-0264 | 4,53 | 49,08 | 649,28 | Grano de Cacao T7 R1 |
| 23-0265 | 5,05 | 46,98 | 593,40 | Grano de Cacao T7 R2 |
| 23-0266 | 4,61 | 47,84 | 620,25 | Grano de Cacao T7 R3 |
| 23-0267 | 3,92 | 39,88 | 539,69 | Grano de Cacao T8 R1 |
| 23-0268 | 3,67 | 43,59 | 609,93 | Grano de Cacao T8 R2 |
| 23-0269 | 3,45 | 38,19 | 543,33 | Grano de Cacao T8 R3 |
| 23-0270 | 4,12 | 167,39 | 1833,15 | Grano de Cacao CCN-51 |
| 23-0271 | 4,23 | 168,31 | 1831,88 | Grano de Cacao CCN-51 |
| 23-0272 | 4,09 | 165,54 | 1817,68 | Grano de Cacao CCN-51 |
| 23-0273 | 4,21 | 48,90 | 707,59 | Grano de Cacao CCN-51 |
| 23-0274 | 4,44 | 48,67 | 691,02 | Grano de Cacao CCN-51 |
| 23-0275 | 4,54 | 50,85 | 691,33 | Grano de Cacao CCN-51 |

Los ensayos marcados con Ω se reportan en base seca.

OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

| | | |
|--|---------------------------------|---|
|  <small>VERÓNICA ARIAS MAYRA ORBE</small> Quím. Verónica Arias RESPONSABLE TÉCNICO | RESPONSABLES DEL INFORME |  <small>BLADIMIR ORTIZ MAYRA ORBE</small> Ino. Bladimir Ortiz RESPONSABLE CALIDAD |
|--|---------------------------------|---|

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.

Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo

NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial, está dirigida únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por este. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información. La información entregada por el cliente y generada durante las actividades de laboratorio es de carácter confidencial, esta dirigida únicamente al destinatario de la misma y solo puede ser usada por este. Los datos marcados con Ω son suministrados por el cliente. El laboratorio no se responsabiliza por esta información.