



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INDUSTRIA Y PRODUCCIÓN**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Trabajo de Integración  
Curricular previa la obtención  
del Grado Académico de  
Ingeniera en Alimentos.

**Proyecto de Investigación:**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN EL  
PERFIL DE COMPUESTOS NO VOLÁTILES Y FUNCIONALES DE CUATRO  
MATERIALES DE CACAO ECUATORIANO”

**Autora:**

Isis Kirina Sánchez Intriago

**Directora del Proyecto de Investigación:**

Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, MSc.

**Quevedo – Los Ríos - Ecuador**

**2023**



## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Isis Kirina Sánchez Intriago**, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

---

**Isis Kirina Sánchez Intriago**

**C.C # 1728204866**



## **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

La suscrita, Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, MSc., Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y el Dr. Iván Samaniego Maigua, PhD., Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), certifican que la estudiante Isis Kirina Sánchez Intriago, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN EL PERFIL DE COMPUESTOS NO VOLÁTILES Y FUNCIONALES DE CUATRO MATERIALES DE CACAO ECUATORIANO”**, previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos, bajo nuestra dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc. (UTEQ)

**DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**



## CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

La suscrita, Ing. Wilma Llerena Silva, MSc., Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y el Dr. Iván Samaniego Maigua, PhD., Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en calidad de Auspiciantes del Proyecto de Investigación titulado **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN EL PERFIL DE COMPUESTOS NO VOLÁTILES Y FUNCIONALES DE CUATRO MATERIALES DE CACAO ECUATORIANO”**, perteneciente a la Srta. Isis Kirina Sánchez Intriago, estudiante de la carrera de Ingeniería en Alimentos, que fue revisado bajo nuestra dirección según la resolución del Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Industria y Producción, que se ha desarrollado de acuerdo al Reglamento de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, y certifica que cumple con el requerimiento de análisis de URKUND, el cual evalúa los niveles de originalidad en un 98 % y similitud 2 %.



### Document Information

Analyzed document	Isis Sanchez-Tesis Aroma de cacao.pdf (D171374814)
Submitted	2023-06-27 02:08:00
Submitted by	
Submitter email	isis.sanchez2017@uteq.edu.ec
Similarity	2%
Analysis address	wllerenas.uteq@analysis.urkund.com

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc. (UTEQ)

**DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INDUSTRIA Y PRODUCCIÓN**  
**INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Título:**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN EL  
PERFIL DE COMPUESTOS NO VOLÁTILES Y FUNCIONALES DE CUATRO  
MATERIALES DE CACAO ECUATORIANO”**

Presentado al Consejo Directivo de la Facultad como requisito previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos.

Aprobado por:

**PRESIDENTA DEL TRIBUNAL**

Ing. Cyntia Erazo Solórzano, MSc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Nelson Villegas Soto, PhD.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Jorge Quintana Zamora, MSc.

Quevedo - Los Ríos - Ecuador

2023

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y mi madre por ser mis principales pilares de apoyo en todo momento.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a cada uno de los docentes de la Carrera de Ingeniería en Alimentos por los conocimientos y experiencia impartidos a lo largo de mi carrera estudiantil.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP, Estación Experimental Litoral Sur y Estación Experimental Santa Catalina por facilitarme el uso de sus instalaciones y las muestras utilizadas para el desarrollo de esta investigación

A la Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, MSc., por permitirme ser parte de este proyecto, ser mi guía a lo largo de la realización del proyecto de investigación y por su paciencia, dedicación, tolerancia y apoyo incondicional.

Al Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua, PhD., por su paciencia, generosidad y la predisposición de compartirme sus conocimientos durante mi estancia en la Estación Experimental Santa Catalina.

A mi amigos y compañeros de carrera Diana Murillo, Andrés Zamora, Gino Plúas, Jasury Mazacón, José Molina y Kerly Moreira, por brindarme su ayuda y apoyo en los momentos en que los necesite.

A mi hermana Genesis y a mi amiga Leonela que a la distancia me brindan su apoyo incondicional y me motivan a seguir adelante.

## DEDICATORIA

*El presente proyecto de investigación va dedicado a mi querido hermano, aunque ya no estes conmigo sigues siendo una de las razones por las decido seguir adelante, y seguir aprendiendo cosas nuevas todos los días.*

*A mi madre Gloria por el esfuerzo, dedicación y apoyo que me ha brindado, soy la hija más afortunada por tenerla como madre.*

*A mi hermana Genesis que estuvo brindándome su cariño y apoyándome en todo momento a pesar de la distancia.*

*A mi tutora de tesis Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, MSc., a quien considero un ejemplo a seguir, con la cual he podido mejorar como persona y de la que he podido aprender.*

***Isis Kirina Sánchez Intriago***

## RESUMEN

La determinación de los parámetros; contenido de grasa, contenido de flavonoides totales, contenido de polifenoles totales y la determinación del índice de fermentación en función de la pérdida del contenido de polifenoles totales, permiten la existencia de una diferenciación genotípica en el cacao (*Theobroma cacao. L*). Esta diferenciación en función de la caracterización fitoquímica permitirá a los productores cacaoteros del Ecuador disponer de una herramienta de calidad estandarizada evitando la adulteración de cacao hoy permitiendo al vendedor fijar un mejor precio de venta en el mercado. Para ello se midieron estos parámetros en cuatro materiales de cacao ecuatoriano de tipo Nacional y Amazónico mediante el análisis estadístico de un diseño experimental anidado, para evaluar el efecto del tipo de material o genotipo (Factor A) y el tiempo de fermentación (Factor B) sobre los componentes no volátiles y funcionales precursores del aroma de cacao ecuatoriano. Se considera como factor principal el factor A y B como factor anidado. Los resultados reportaron que el factor que más influye en la variación de datos a un nivel de confianza del 95 % es el tiempo de fermentación (Factor B), se consideró al cuarto día de fermentación (96 h) como el día óptimo de fermentación, los parámetros medidos en la investigación reportaron los siguientes datos para cada material (EET-95, EET-96, EET-103); contenido de grasa 47.35, 45.91, 44.73 y 44.36 % respectivamente; contenido de flavonoides totales 44.51, 42.17, 35.28 y 44.53 mg CE•g<sup>-1</sup> respectivamente; contenido de polifenoles totales 106.38, 126.65, 91.03 y 87.54 mg AGE•g<sup>-1</sup> respectivamente y finalmente en el índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales reportaron valores de 49.44, 50.96, 54.17 y 50.19 % respectivamente.

**Palabras claves:** Cacao, fermentación, compuestos no volátiles, polifenoles, flavonoides, caracterización.

## ABSTRACT

The determination of the parameters; fat content, total flavonoid content, total polyphenol content and the determination of the fermentation index based on the loss of total polyphenol content, allow the existence of a genotypic differentiation in cocoa (*Theobroma cacao. L*). This differentiation based on the phytochemical characterization will allow cocoa producers in Ecuador to have a standardized quality tool avoiding cocoa adulteration today, allowing the seller to set a better sale price in the market. For this, these walls were measured in four Ecuadorian cocoa materials of the National and Amazonian type through the statistical analysis of a nested experimental design, to evaluate the effect of the type of material or genotype (Factor A) and the fermentation process (Factor B). on the non-volatile and functional components that are precursors of the Ecuadorian cocoa aroma. Factor A is considered as the main factor and factor B as the nested factor. The results reported that the factor that most influences the variation of data at a confidence level of 95 % is the fermentation time (Factor B), the fourth day of fermentation (96 h) was considered as the optimal day of fermentation, The parameters measured in the investigation reported the following data for each material (EET-95, EET-96, EET-103); fat content 47.35, 45.91, 44.73 and 44.36 % respectively; total flavonoid content 44.51, 42.17, 35.28 and 44.53 mg CE•g<sup>-1</sup> respectively; total polyphenol content 106.38, 126.65, 91.03 and 87.54 mg AGE•g<sup>-1</sup> respectively and finally in the fermentation index based on the loss of total polyphenols reported values of 49.44, 50.96, 54.17 and 50.19 % respectively.

**Keywords:** Cocoa, fermentation, non-volatile compounds, polyphenols, flavonoids, characterization.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I .....	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Problema de la investigación .....	4
1.1.1. Planeamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema .....	6
1.1.3. Sistematización del problema .....	6
1.2. Objetivos .....	7
1.2.1. Objetivo General.....	7
1.2.2. Objetivos Específicos.....	7
1.3. Hipótesis .....	7
1.4. Justificación .....	8
CAPÍTULO II.....	9
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	9
2.1. Marco conceptual.....	10
2.1.1. Ácido láctico .....	10
2.1.2. Etanol .....	10

2.1.3. Genotipo.....	10
2.1.4. Alcaloide .....	10
2.1.5. Capacidad antioxidante .....	11
2.2. Marco teórico referencial.....	11
2.2.1. Cacao (Theobrama cacao L) .....	11
2.2.2. Fruto de cacao .....	12
2.2.3. Almendras de cacao .....	12
2.2.4. Variedades de cacao ecuatoriano .....	13
2.2.4.1. Clasificación por origen.....	13
2.2.4.2. Clasificación por genotipo.....	14
2.2.5. Sabor de los granos de cacao .....	15
2.2.6. Formación del aroma del cacao .....	16
2.2.7. Fermentación.....	17
2.2.8. Índice de fermentación.....	17
2.2.9. Contenido fenólico.....	17
CAPÍTULO III.....	19
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	19
3.1. Localización.....	20

3.1.1. Manejo de postcosecha .....	21
3.2. Tipo de investigación.....	22
3.3. Método de investigación .....	22
3.3.1. Método inductivo-deductivo.....	22
3.3.2. Método de medición .....	23
3.4. Fuentes de recopilación de la información .....	23
3.5. Diseño de la investigación .....	23
3.5.1. Análisis estadístico de precursores de aroma no térmico .....	23
3.5.2. Modelo estadístico .....	24
3.5.3. Esquema del ANOVA.....	25
3.5.4. Variables del estudio.....	26
3.6. Instrumentos de investigación.....	26
3.6.1. Perfil de componentes no volátiles .....	27
3.6.1.1. Preparación de la muestra. ....	27
3.6.2. Contenido de grasa.....	27
3.6.3. Componentes bioactivos .....	28
3.6.3.1. Preparación de la muestra. ....	28
3.6.3.2. Flavonoides totales.....	29

3.6.3.3. Polifenoles totales. ....	29
3.6.3.4. Índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles.....	29
3.8. Recursos humanos y materiales .....	30
3.8.1. Recursos humanos .....	30
3.8.2. Materiales y equipos .....	30
CAPÍTULO IV.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
4.1. Contenido de grasa.....	34
4.2. Contenido de flavonoides totales .....	39
4.3. Contenido de polifenoles totales .....	45
4.4. Índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales .....	51
CAPÍTULO V .....	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
5.1 Conclusiones .....	57
5.2. Recomendaciones.....	58
CAPÍTULO VI.....	59
BIBLIOGRAFÍA .....	59
6.1. Bibliografía .....	60

7.1. Anexos ..... 65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Componentes químicos presentes en las semillas de cacao .....	13
<b>Tabla 2.</b> Materiales universales de cacao .....	15
<b>Tabla 3.</b> Factores en estudio para determinar el efecto del tipo de material o genotipo y el proceso de fermentación, sobre el perfil de precursores de compuestos no volátiles y funcionales de cacao ecuatoriano .....	24
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos obtenidos para determinar el efecto del tipo de material o genotipo y el proceso de fermentación, sobre el perfil de precursores de compuestos no volátiles y funcionales de cacao ecuatoriano .....	25
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental anidado de 2 etapas .....	26
<b>Tabla 6.</b> Análisis de Varianza para el porcentaje de grasa de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	36
<b>Tabla 7.</b> Análisis de Varianza para el contenido de flavonoides totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	42
<b>Tabla 8.</b> Análisis de Varianza para el contenido de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	48
<b>Tabla 9.</b> Análisis de Varianza para el índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol de problemas del tema de investigación .....	5
<b>Figura 2.</b> Aminoácidos precursores de la formación de alcaloides .....	11
<b>Figura 3.</b> Descripción del sabor de los granos de cacao de diferentes países .....	16
<b>Figura 4.</b> Estructura química de los compuestos fenólicos simples .....	18
<b>Figura 5.</b> Ubicación geográfica de la Estación Experimental Litoral Sur (Yaguachi, Ecuador) y la Estación Experimental Santa Catalina (Pichincha, Ecuador) .....	20
<b>Figura 6.</b> Fermentación de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	22
<b>Figura 7.</b> Efecto del tipo de material y el tiempo de fermentación en el contenido de grasa de cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	35
<b>Figura 8.</b> Componentes de varianza del porcentaje de grasa de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	37
<b>Figura 9.</b> Contenido de grasa del día de fermentación óptimo de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	38
<b>Figura 10.</b> Curva de calibración promedio para la determinación de flavonoides totales .....	39
<b>Figura 11.</b> Evolución del efecto del proceso de fermentación y tipo de material en el contenido de flavonoides totales de cuatro materiales de cacao ecuatoriano.....	41
<b>Figura 12.</b> Componentes de varianza del contenido de flavonoides totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	43
<b>Figura 13.</b> Contenido de flavonoides totales cuarto día de fermentación de cada material de cacao .....	44

<b>Figura 14.</b> Curva de calibración promedio para la determinación de polifenoles totales .....	45
<b>Figura 15.</b> Efecto del tiempo de fermentación y el tipo de material en el contenido de polifenoles totales de cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	47
<b>Figura 16.</b> Componentes de varianza del contenido de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	49
<b>Figura 17.</b> Contenido de polifenoles totales a las 96 h de fermentación de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	50
<b>Figura 18.</b> Determinación del Índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano.....	52
<b>Figura 19.</b> Componentes de varianza del índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano.....	54
<b>Figura 20.</b> Pérdida de polifenoles totales en el cuarto día de fermentación de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano .....	55

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Muestreo de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano.....	65
<b>Anexo 2.</b> Manejo postcosecha de las muestras de cacao ecuatoriano.....	66
<b>Anexo 3.</b> Preparación de muestras previo a los análisis de compuestos bioactivos en cacao .....	67
<b>Anexo 4.</b> Determinación del porcentaje de grasa, flavonoides, polifenoles e índice de fermentación de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano.....	68

## CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN EL PERFIL DE COMPUESTOS NO VOLÁTILES Y FUNCIONALES DE CUATRO MATERIALES DE CACAO ECUATORIANO
Autora:	Isis Kirina Sánchez Intriago
Palabras Claves:	Cacao, fermentación, compuestos no volátiles, polifenoles, flavonoides, caracterización.
Fecha de Publicación:	2023
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2023
Resumen:	<p><b>RESUMEN</b></p> <p>La determinación de los parámetros; contenido de grasa, contenido de flavonoides totales, contenido de polifenoles totales y la determinación del índice de fermentación en función de la pérdida del contenido de polifenoles totales, permiten la existencia de una diferenciación genotípica en el cacao (<i>Theobroma cacao. L</i>). Esta diferenciación en función de la caracterización fitoquímica permitirá a los productores cacaoteros del Ecuador disponer de una herramienta de calidad estandarizada evitando la adulteración de cacao hoy permitiendo al vendedor fijar un mejor precio de venta en el mercado. Para ello se midieron estos parámetros en cuatro materiales de cacao ecuatoriano de tipo Nacional y Amazónico mediante el análisis estadístico de un diseño experimental anidado, para evaluar el efecto del tipo de material o genotipo (Factor A) y el tiempo de fermentación (Factor B) sobre los componentes no volátiles y funcionales precursores del aroma de cacao ecuatoriano. Se considera como factor principal el factor A y B como factor anidado. Los resultados reportaron que el factor que más influye en la variación de datos a un nivel de confianza del 95 % es el tiempo de fermentación (Factor B), se consideró al cuarto día de fermentación (96 h) como el día óptimo de fermentación, los parámetros medidos en la investigación reportaron los siguientes datos para cada material (EET-95, EET-96, EET-103); contenido de grasa 47.35, 45.91, 44.73 y 44.36 % respectivamente; contenido de flavonoides totales 44.51, 42.17, 35.28 y 44.53 mg CE•g-1 respectivamente; contenido de polifenoles totales 106.38, 126.65, 91.03 y 87.54 mg AGE•g-1 respectivamente y finalmente en el índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales reportaron valores de 49.44, 50.96, 54.17 y 50.19 % respectivamente.</p> <p><b>ABSTRACT</b></p> <p>The determination of the parameters; fat content, total flavonoid content, total polyphenol content and the determination of the fermentation index based on the loss of total polyphenol content, allow the existence of a genotypic differentiation in cocoa (<i>Theobroma cacao. L</i>). This differentiation based on the phytochemical characterization will allow cocoa producers in Ecuador to have a standardized quality tool avoiding cocoa adulteration today, allowing the seller to set a better sale price in the market. For this, these walls were measured in four Ecuadorian cocoa materials of the National and Amazonian type through the statistical analysis of a nested experimental design, to evaluate the effect of the type of material or genotype (Factor A) and the fermentation process (Factor B). on the non-volatile and functional components that are precursors of the Ecuadorian cocoa aroma. Factor A is considered as the main factor and factor B as the nested factor. The results reported that the factor that most influences the variation of data at a confidence level of 95 % is the fermentation time (Factor B), the fourth day of fermentation (96 h) was considered as the optimal day of fermentation, The parameters measured in the investigation reported the following data for each material (EET-95, EET-96, EET-103); fat content 47.35, 45.91, 44.73 and 44.36% respectively; total flavonoid content 44.51, 42.17, 35.28 and 44.53 mg CE•g-1 respectively; total polyphenol content 106.38, 126.65, 91.03 and 87.54 mg AGE•g-1 respectively and finally in the fermentation index based on the loss of total polyphenols reported values of 49.44, 50.96, 54.17 and 50.19 % respectively.</p>
Descripción:	87 hojas A4s: dimensiones 21 x 29,7 cm + CD - ROM
URL:	

## INTRODUCCIÓN

En Ecuador se producen 38 cultivos principales, el cacao se ubica en primer lugar con el 26,96 % de la superficie plantada. En el año 2021, se cultivó 626 956 ha de cacao, de las cuales 543 547 ha fueron cosechadas. En ese mismo año se produjo 302 094 toneladas de cacao dando un rendimiento de 0,56 de toneladas por hectárea. Se exportó 329 783,6 toneladas de cacao crudo y tostado. Los principales países destino del cacao ecuatoriano y sus derivados son Estados Unidos, Indonesia, Holanda, Malasia, México, Bélgica y Alemania. A través de los datos estadísticos obtenidos del Sistema de Información Pública Agropecuaria (SIPA), se conoce que el 22,09 % del cacao en grano exportado tuvo como destino Estados Unidos (SIPA, 2022).

En el mercado mundial el cacao es clasificado en dos grandes categorías, que son: el cacao fino de aroma conocido en Ecuador como cacao Nacional y el cacao común o a granel al que se conoce con el nombre de CCN-51. Estudios realizados sugieren que el cacao CCN-51 posee un solo genotipo diploide, mientras que el cacao Nacional o “Arriba” posee una naturaleza multigenotípica que dificulta la trazabilidad del ADN en esta variedad. Según su clasificación morfogenética las variedades de cacao se dividen en: Forastero (puede tener una reclasificación interna), Criollo, Trinitario (híbrido entre las variedades Forastero y Criollo) y por último Nacional (López, 2017; Stagnati et al., 2020).

El cacao fino presenta excelentes características sensoriales y un tiempo de fermentación muy corto; sin embargo, es una variedad susceptible a plagas y enfermedades. Este cultivo de alto rendimiento es más resistente a enfermedades, por lo que, los agricultores optan por el cultivo de cacao CCN-51, siendo cultivado para producir cacao a granel (Stagnati et al., 2020).

El Programa Nacional de Cacao del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) tiene como objetivo la identificación y selección de variedades que puedan ser usadas como clones en etapas avanzadas de desarrollo, y ser usadas en el diseño de esquemas de cruzamiento que aumenten la posibilidad de combinar en un solo material las características de interés comercial (productividad, tolerancia a enfermedades

y el sabor Arriba) para potenciar el sector cacaotero. Estos objetivos planteados por el (INIAP) surgieron como una necesidad de generar y liberar nuevas variedades de cacao fino ya que en los últimos años habían perdido competitividad frente a variedades de cacao a granel (Loor et al., 2017). La norma técnica de calidad NTE INEN 176 (Granos de Cacao. Requisitos), vigente en Ecuador clasifica los granos de cacao en dos grandes grupos; cacao fino y cacao a granel. En el cacao fino presente tres subgrupos, el cacao Arriba Superior Summer Selecto (A.S.S.S), el cacao Arriba Superior Selecto (A.S.S) y el cacao Arriba Superior Época (A.S.E). El cacao CCN-51 se divide solamente en dos subgrupos; el Cacao Superior Selecto (C.S.S) y el Cacao Superior Corriente (C.S.C). Para los requisitos físicos y de calidad, esta norma toma en cuenta el porcentaje de humedad máximo, el peso de 100 granos de cacao expresado en gramos, el porcentaje mínimo de granos fermentados, el porcentaje máximo de granos; violetas, mohosos y defectuosos, el porcentaje máximo de material relacionado al cacao y la cantidad de material extraño (INEN, 2018).

Los procesos postcosecha que intervienen en la transformación del grano de cacao a productos como el chocolate afectan al desarrollo de compuestos no volátiles. El proceso de fermentación es considerado un paso importante al momento de manipular los granos de cacao. Durante esta etapa la pulpa es degradada por la acción de microorganismos que promueven el aumento de la temperatura hasta los 50 °C, dando paso a la formación de etanol y ácido láctico, provocando la muerte del embrión, esto dará lugar a la formación del sabor y aroma característico de los granos de cacao (Predan et al., 2019).

El objetivo de este trabajo es identificar el efecto del proceso de fermentación en el desarrollo de compuestos no volátiles y funcionales de cuatro materiales de cacao pertenecientes a la colección de Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP (Estación Experimental Litoral Sur).

## **CAPÍTULO I**

### **CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problema de la investigación**

### ***1.1.1. Planteamiento del problema***

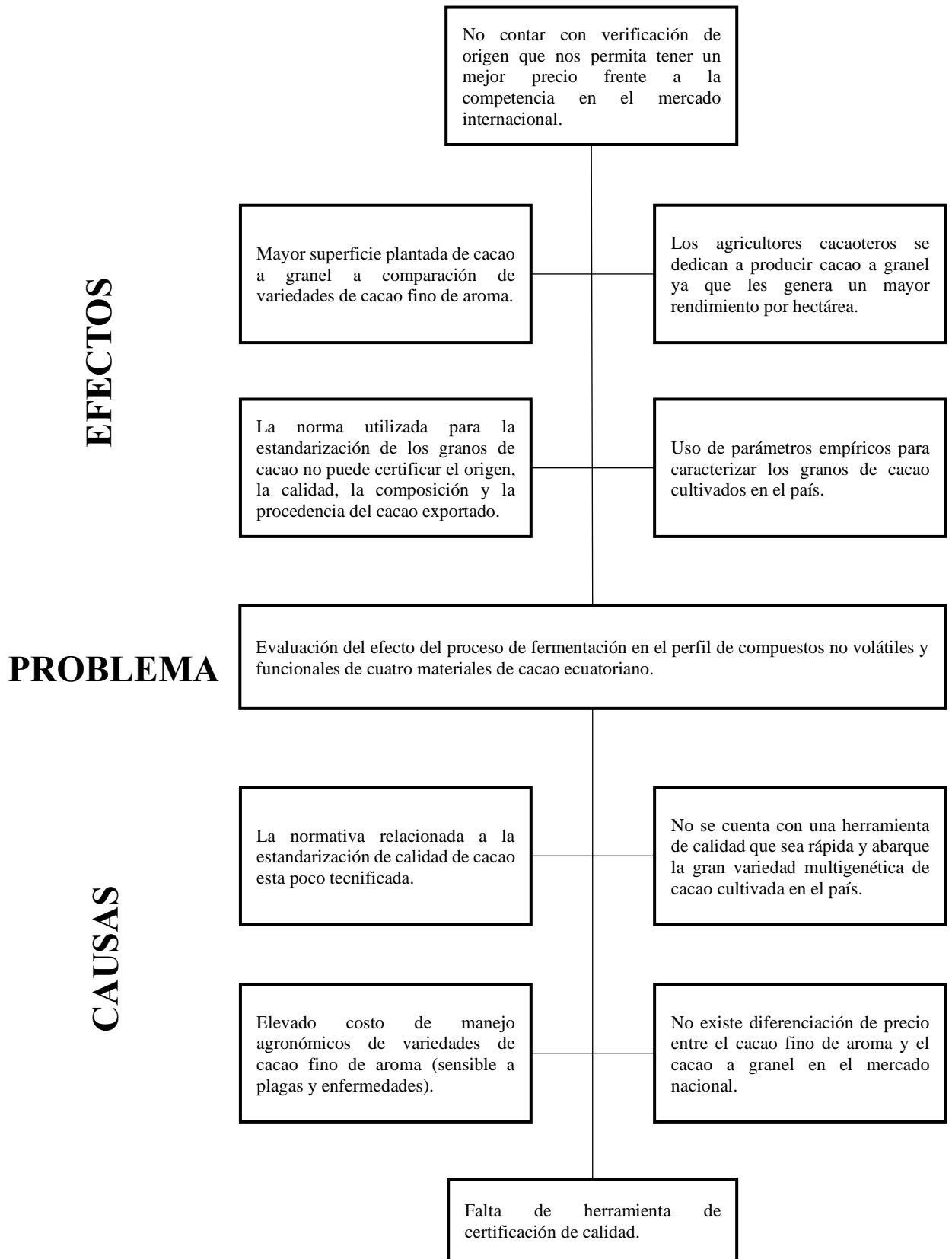
La producción de cacao fino a nivel mundial representa el 5%, sin embargo, en Ecuador, la producción total del cacao fino representa el 50% del cultivo de cacao plantado. Por el distintivo de calidad, existe casos de adulteración de cacao fino que es reemplazado por cacao a granel. Esta adulteración en ocasiones ocurre de manera accidental durante los procesos de cosecha y postcosecha (Stagnati et al., 2020).

A pesar de que se cuenta con una norma que establece los requisitos de calidad y clasificación de los granos de cacao, la norma se encuentra poco tecnificada, lo que impide certificar el origen, la composición y la procedencia del cacao. Al no contar con métodos de verificación de calidad y certificación de origen, se dificulta tener un mejor precio frente a la competencia en el mercado internacional.

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), actualmente se encuentra trabajando en el desarrollo de nuevas variedades de cacao fino con el fin de proporcionar al agricultor genotipos que puedan adaptarse adecuadamente a las diversas zonas agroecológicas, que tengan un alto rendimiento productivo, que no sean susceptibles a plagas y enfermedades y que tengan buenos atributos de calidad, ya que las variedades de cacao fino que existen en la actualidad generan un elevado costo de manejo agronómico por su baja resistencia a plagas y enfermedades. Esto ha disminuido la producción de cacao fino, promoviendo el cultivo de cacao a granel que les genera un mayor rendimiento por hectárea y no tiene una diferenciación de precio muy marcado con el cacao fino, al momento de ser comercializado (Quiroz et al., 2021).

**Figura 1.**

*Árbol de problemas del tema de investigación*



## **Diagnóstico**

La falta de una herramienta de calidad que sea rápida y capaz de abarcar la naturaleza multigenotípica del cacao fino de aroma, ha dado lugar al interés del INIAP, por el desarrollo de una herramienta objetiva para certificar la calidad de cacao ecuatoriano en mercados internacionales. Dejando de lado, parámetros empíricos pretende caracterizar los granos de cacao cultivados en el país mediante marcadores no volátiles.

## **Pronóstico**

Al no contar con una herramienta de certificación de calidad, los productores y exportadores estarían obligados a usar una norma cualitativa para comercializar los granos de cacao. Esto impedirá a los productores y comerciantes de cacao, pedir un precio justo, ya que la norma de certificación de calidad utilizada actualmente no puede certificar la calidad, origen, composición y procedencia de las almendras de cacao, lo que reduce el valor de venta de los granos de cacao en el mercado internacional.

### ***1.1.2. Formulación del problema***

¿Se podrá evaluar el efecto del proceso de fermentación en el perfil de compuestos no volátiles y funcionales de cuatro materiales de cacao ecuatoriano?

### ***1.1.3. Sistematización del problema***

¿Las nuevas variedades de cacao desarrolladas por el INIAP, presentan mejores perfiles de compuestos no volátiles y funcionales?

¿La fermentación influye en la calidad de la formación de compuestos no volátiles y funcionales presentes en las almendras de cacao?

¿Todos los materiales de cacao tipo Nacional presentan el mismo tiempo e índice de fermentación?

## 1.2. Objetivos

### *1.2.1. Objetivo General*

- Evaluar el efecto del proceso de fermentación en el perfil de compuestos no volátiles y funcionales de cuatro materiales de cacao ecuatoriano.

### *1.2.2. Objetivos Específicos*

- Medir el contenido de grasa, flavonoides totales, polifenoles totales y el índice de fermentación.
- Evaluar el efecto del proceso de fermentación en el contenido de grasa.
- Identificar el efecto del proceso de fermentación en el contenido fenólico de cacao ecuatoriano tipo Nacional.
- Determinar el índice de fermentación de cuatro materiales de cacao ecuatoriano tipo Nacional.

## 1.3. Hipótesis

La hipótesis que se contrastó en esta investigación es:

**H0:  $Ai = 0$** ; El porcentaje de variación de la concentración de componentes no volátiles y bioactivos de genotipos de cacao (factor A) no depende del proceso de

fermentación (factor B) de las almendras de cacao tipo Nacional.

**H1:  $Ai \neq 0$** ; El porcentaje de variación de la concentración de componentes no volátiles y bioactivos de genotipos de cacao (factor A) depende del proceso de fermentación (factor B) de las almendras de cacao tipo Nacional.

#### **1.4. Justificación**

El presente trabajo tiene como finalidad la evaluación de la diversificación de los cuatro cultivos de cacao Nacional que están disponibles actualmente en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), actualmente no se cuenta con información de las características de estas variedades. A través de evaluación de parámetro de calidad como el índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales, el contenido fenólico y el contenido de grasa se obtendrá la información de las características genotípicas de esas variedades de cacao. La generación de esta información será utilizada para el desarrollo de una herramienta de calidad que pueda posicionar a estas nuevas variedades como alternativas de cacao Nacional certificadas, por variedad y por origen.

El tiempo óptimo de fermentación varía de acuerdo con la variedad de cacao cultivada, al no tener datos, de esta investigación pretende identificar el tiempo óptimo de fermentación y como este proceso afecta a la formación de compuesto no volátiles y funcionales en los granos de cacao de cuatro genotipos de tipo Nacional. A partir de este proceso, se identificará los tiempos para que los granos de cacao estén fermentados, mal fermentados o sobre fermentados.

Esta herramienta permitirá la certificación de los cuatro genotipos de cacao fino de aroma para que los productores y exportadores de cacao, puedan fijar un mejor precio de venta en el mercado. Debido a que estas cuatro variedades podrán contar con una certificación de origen, calidad, composición y procedencia.

## **CAPÍTULO II**

### **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1. Marco conceptual**

### ***2.1.1. Ácido láctico***

Metabolito generado por la fermentación de carbohidratos como la sacarosa, lactosa, manitol, almidón y dextrosa. Es un ácido carboxílico producido por animales, plantas y bacterias ácido lácticas (Orozco, 2011).

### ***2.1.2. Etanol***

El etanol también conocido como alcohol etílico es un líquido incoloro y volátil de olor agradable. Se obtiene a través de la fermentación anaerobia de los hidratos de carbono o de manera sintética por medio del etileno (Téllez & Cote, 2006; Velasco, 2014).

### ***2.1.3. Genotipo***

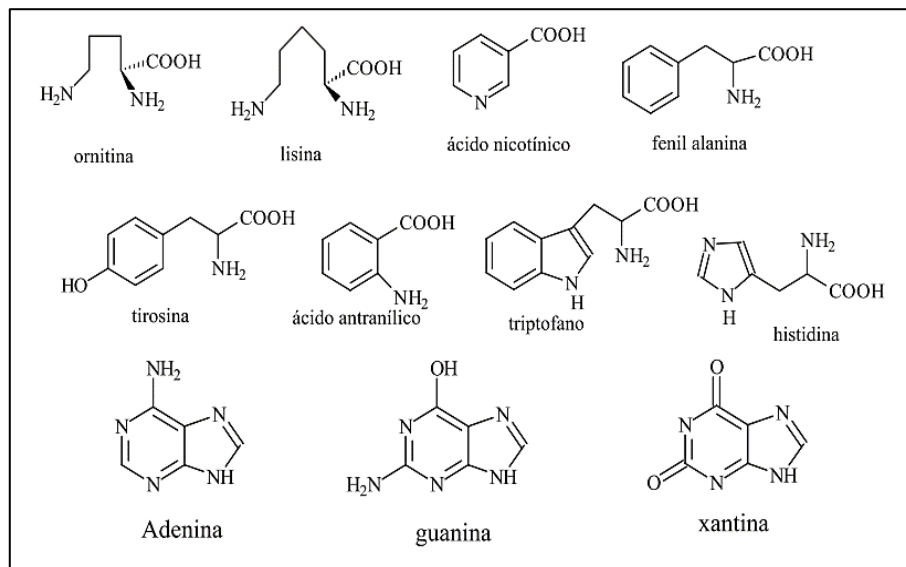
Es un conjunto de genes existentes en cada uno de los núcleos celulares formando parte de la constitución de un individuo perteneciente a una determinada especie vegetal o animal. Este define una o varias características del individuo y lo relaciona con otros individuos con el mismo grupo de genes (Zerón, 2010).

### ***2.1.4. Alcaloide***

Compuesto orgánico nitrogenado formado a partir de un aminoácido se pueden encontrar en la naturaleza normalmente en estado de sal, es producido casi de manera exclusiva en plantas; en las hojas como la cocaína, en flores como la atropina, en frutos como la piperina, en corteza como la quinina y en el raíz como la cefalina (Arango, 2008; RAE, 2022). Los aminoácidos que dan origen a los alcaloides se muestran en la Figura 2.

**Figura 2.**

*Aminoácidos precursores de la formación de alcaloides*



**FUENTE:** (Arango, 2008)

**2.1.5. Capacidad antioxidante**

Es la capacidad de una sustancia (antioxidante) para inhibir la degradación oxidativa, este compuesto con dicha propiedad reacciona con los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno; retardando la degradación oxidativa de otras moléculas. La medición de la capacidad antioxidante es utilizada para conocer la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes, para valorar la calidad de un alimento y para conocer la capacidad antioxidante en un sistema (Benítez et al., 2020).

**2.2. Marco teórico referencial**

**2.2.1. Cacao (*Theobroma cacao L*)**

El cacao es un árbol nativo de las regiones tropicales de América, cuyo nombre científico es *Theobroma cacao L*; proviene de la familia botánica *Sterculiaceae* y tiene una altura aproximada de 2 m. Es un cultivo que, predomina en zonas tropicales de constantes precipitaciones, alta humedad y radiación solar durante todo el año. Este árbol se caracteriza por la presencia de hojas, flores y frutos. La producción inicia a los cinco

o seis años de haber sido plantado, en caso de ser una especie híbrida, el árbol empieza a producir a los 2 o 3 años de haber sido plantado (Díaz, 2020; PROCOMER, 2022a; Vera et al., 2014).

### ***2.2.2. Fruto de cacao***

El fruto de cacao conocido como mazorca presenta un pericarpio carnoso que se compone de tres capas diferenciadas entre sí, el epicarpio se caracteriza por ser carnoso y rugoso, con un extracto epidérmico pigmentado, el mesocarpio es fino y duro pero lignificado, mientras que el endocarpio es carnoso y grueso. El color de la mazorca es verde cuando esta inmadura y amarilla cuando ha completado su etapa de madurez (de Souza et al., 2018). Su tamaño oscila entre 10 a 42 cm y puede pesar entre 400 a 500 g, su forma puede variar entre oblonga, elíptica, ovalada, obovada, esférica y oblata. La superficie del fruto puede ser lisa o rugosa, el interior del fruto puede contener entre 30 a 60 semillas de cacao y estas características dependerán de la variedad del cacao (Perea, 2019).

### ***2.2.3. Almendras de cacao***

Las almendras de cacao tienen forma ovoide y se encuentran recubiertas de mucilago de color blanquecino, su longitud varía entre los 15 a 40 mm; con un diámetro medio que oscila entre 10 a 22 mm (Perea, 2019). La composición química de los granos de cacao se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.***Componentes químicos presentes en las semillas de cacao*

<b>Características</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valores</b>	
pH		4.66	5.25
Acidez valorable	meq NaOH 100 $g^{-1}$	2.17	3.93
Contenido de agua	g 100 $g^{-1}$	52.95	58.15
Actividad de agua		0.97	0.99
Sacarosa	mg $g^{-1}$	7.37	11.84
Glucosa	mg $g^{-1}$	21.09	61.94
Fructosa	mg $g^{-1}$	16.82	66.43
Compuestos fenólicos	mg 100 $g^{-1}$	129.04	168.83
Nitrógeno total	g 100 $g^{-1}$	24.05	29.13

**FUENTE:** (de Souza et al., 2018).

#### ***2.2.4. Variedades de cacao ecuatoriano***

La clasificación de las variedades de cacao ecuatoriano dependerá del origen y el genotipo del grano de cacao.

##### ***2.2.4.1. Clasificación por origen.***

###### ***Cacao criollo***

Pertenece al grupo de los cacaos finos, la mazorca es alargada y su color varía entre verde a rojizo cuando este inmaduro y cambia a amarillo a anaranjado cuando este maduro, las semillas de esta variedad presentan un sabor a frutal y a nuez (Paredes, 2009).

###### ***Cacao Trinitario***

Es una variedad de cacao fino y de aroma híbrida producida por la combinación de cacao forastero y criollo. Su nombre se debe a que fueron desarrollados en Trinidad y Tobago, siendo cultivados después en Ecuador, por el cruce de estas dos variedades. Esta variedad presenta sabores frutales y florales con sabores secundarios agradables como la melaza y el caramelo (Perea, 2019).

### *Cacao Forastero Amazónico*

El nombre de esta variedad se debe a que los cultivos se encuentran distribuidos en la cuenca del río Amazonas y sus afluentes. La mazorca tiene una base con forma de cuello de botella, su color es verde cuando está inmadura y amarilla cuando ha madurado. Las semillas son aplanadas y pequeñas con cotiledones de color morado, su sabor de cacao es básico (Paredes, 2009).

#### *2.2.4.2. Clasificación por genotipo.*

Según (Perea, 2019), la clasificación de las variedades de cacao por genotipo se divide en dos subgrupos:

Dentro de esta clasificación se encuentra las variedades polinizadas de cacao Criollo y Forastero.

- **Híbridos:** Estas variedades son producidas por la polinización controlada de clones seleccionados.
- **Clones:** Son variedades de cacao producidas vegetativamente a partir de una planta original.

Los clones de cacao que actualmente se conocen se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.***Materiales universales de cacao*

<b>Clon</b>	<b>Nombre</b>	<b>Origen</b>	<b>Materiales Representativos</b>
ICS	Colegio Imperial de Agricultura Tropical	Trinidad	1, 6, 39, 40, 95
TSH	Selección trinitaria híbrida	Trinidad	565, 792
TSA	Selección trinitaria amazónica	Trinidad	SCA 6 x ICS 1 654, 644, 641
EET	Estación Experimental Tropical	Ecuador	IMC 67 x SCA 8, 62, 96, 400
CCN 51	Colección Castro Naranjal	Ecuador	51
SCA	Scavia	Perú	6, 12
IMC	Colección Iquitos Marón	Perú	67
PA	Parinari	Perú	46, 121, 150
P	Pound	Perú	7, 12
NA	Nanay	Perú	

**FUENTE:** (Perea, 2019)

### **2.2.5. Sabor de los granos de cacao**

La reclasificación de los granos de cacao incluye 10 grupos genéticos que son: Amelonado, Contamana, Criollo, Curaray, Guayana, Iquitos, Marañon, Nacional, Nanay y Puru. Esta diversidad genética otorga características agronómicas y de calidad a cada una de las variedades de cacao; como el sabor y aroma. Esto permite la secuenciación del genoma *Theobroma cacao*, lo que causa la mejora de los cultivos de cacao. Para obtener características deseadas como resistencia a enfermedades, alto rendimiento y características de calidad. Los atributos de sabor (acidez, frutal, floral y nuez) de los granos del cacao de cada variedad, se puede observar en el mapa Nacional de sabor desarrollado, por la Asociación de Exportadores de Cacao de Ecuador (ANECACAO). En la Figura 3, se demuestra que el entorno de crecimiento contribuye de manera relativa al desarrollo de sabor del producto final (granos de cacao) (Engeseth & Ac Pangan, 2018).

**Figura 3.**

*Descripción del sabor de los granos de cacao de diferentes países*



**FUENTE:** (Engeseth & Ac Pangan, 2018)

### 2.2.6. Formación del aroma del cacao

Los precursores de aroma del chocolate están desarrollados en los granos de cacao durante las etapas de cosecha y postcosecha. Estos compuestos, se forman principalmente durante las etapas de fermentación y secado por efecto del proceso metabólico de las bacterias lácticas y levaduras que degradan los azúcares presentes en las semillas. Estos inician con la producción de ácido acético y láctico, que causan la degradación de carbohidratos y proteínas que se almacenan en las semillas de cacao. Durante esta etapa, ocurre un aumento de temperatura que provoca la muerte del embrión de la semilla de cacao. Estos procesos logran que las respectivas enzimas degraden azúcares reductores, pequeños péptidos y aminoácidos libres que serán los precursores del aroma del chocolate (Ascrizzi et al., 2017).

### ***2.2.7. Fermentación***

La fermentación es un proceso microbiológico espontáneo, producido en la parte externa e interna de la semilla. La fermentación desencadena una serie de reacciones químicas que darán origen a la formación de precursores del aroma y el sabor del cacao. Se compone de varias fases cuya durabilidad y velocidad estarán influenciadas por el manejo postcosecha, la variedad genotípica, la intervención de diferentes microorganismos entre otros aspectos (PROCOMER, 2022).

### ***2.2.8. Índice de fermentación***

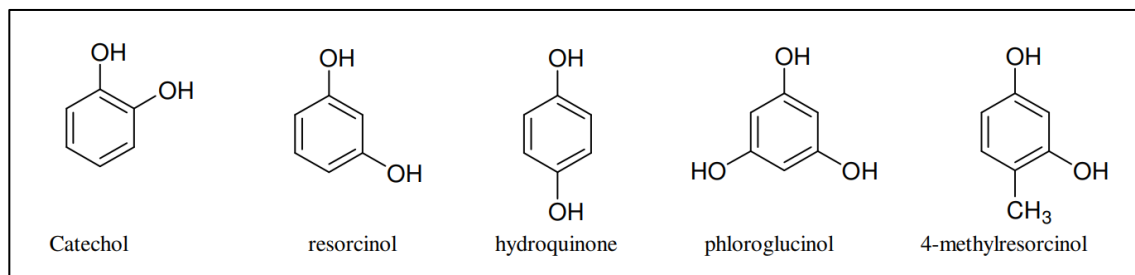
El índice de fermentación es un parámetro, que se utiliza para medir el cambio de color en los granos de cacao que mide el grado de fermentación. Se determina por espectrofotometría, evidenciando los cambios mediante la descomposición de pigmentos de antocianinas. Cuando el índice de fermentación es menor a 1.0 se entiende que los granos de cacao tuvieron una mala fermentación (García, 2019).

### ***2.2.9. Contenido fenólico***

Los compuestos fenólicos son moléculas con uno o más grupos hidroxilo (OH) unidos a un anillo aromático (fenil), la estructura química de los compuestos fenólicos simples se muestra en la Figura 4. Están presentes en hortalizas, frutas, raíces y cereales, por el anillo aromático se considera a estos compuestos antioxidantes importantes en la dieta. Forman parte de las funciones metabólicas de las plantas como el crecimiento, reproducción y la protección contra patógenos y depredadores, además de ser responsables del color y las características sensoriales de las plantas (Peñarrieta et al., 2014). Representan del 12 al 18 % de total de compuestos presentes en el cacao, siendo sus principales precursores los aminoácidos y los ácidos fenólicos, el cacao contiene mayor contenido de compuesto fenólicos que el té y el vino tinto, lo que vuelve al cacao un alimento más representativo ya que estos compuesto están relacionados con la actividad antioxidante beneficiosa para la salud humana (Cortez et al., 2023).

**Figura 4.**

*Estructura química de los compuestos fenólicos simples*



**FUENTE:** (Peñarrieta et al., 2014)

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### 3.1. Localización

Para la ejecución del estudio se tomó muestras de cacao tipo Nacional (NacionalxTrinitario y Amazónico), pertenecientes a la colección del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en la estación experimental Litoral Sur (Yaguachi, Guayas), ubicada en una de las principales zonas productoras de cacao ecuatoriano (costa del Pacífico). Para esto se recolectaron al azar 20 mazorcas por duplicado (n=40) de cada material y se trasladaron al centro de tratamiento postcosecha, para el proceso de fermentación y secado.

Las mazorcas de cacao fueron abiertas para extraer los granos de cacao que fueron colocadas en fundas de maya tipo nylon de 16 cm de ancho por 22 cm de alto, para cada material se colocó a fermentar aproximadamente 1 kg de muestra de cacao.

**Figura 5.**

*Ubicación geográfica de la Estación Experimental Litoral Sur (Yaguachi, Ecuador) y la Estación Experimental Santa Catalina (Pichincha, Ecuador)*



### ***3.1.1. Manejo de postcosecha***

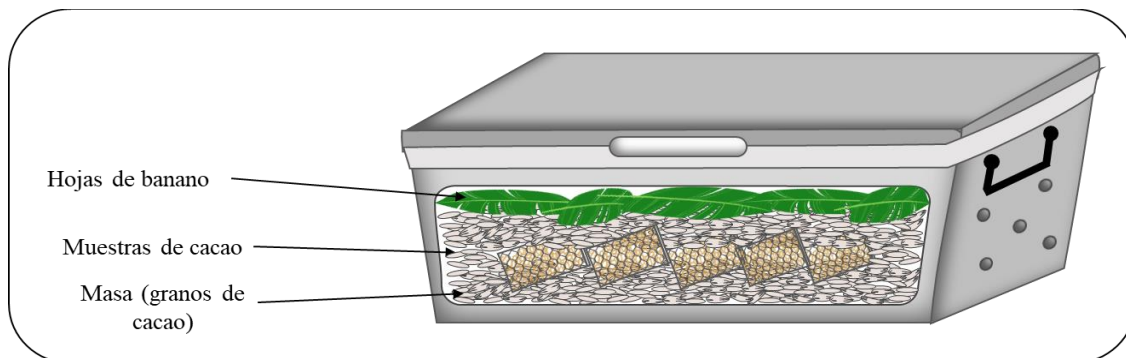
El proceso de fermentación de las muestras tomadas en campo se realizó en el Centro de Tratamiento Postcosecha de Cacao de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP, ubicada en la provincia de Guayas en la Costa del Pacífico, a una altitud de 17 msnm, con una temperatura promedio de 24.6 ° C y humedad relativa del 83%. Las almendras se fermentaron mediante cajas cooler de 100 kg de capacidad. Según lo requerido para cacao Nacional, el proceso fermentativo se realizó durante 96 h, sin embargo, para el estudio, las muestras se mantuvieron hasta las 120 horas. La remoción de masa se realizó a las 24 h y durante esta etapa se tomaron muestras de cacao de cada material a 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de secado natural al sol, hasta que se obtuvo una humedad del grano de aproximadamente 7%. Las muestras fermentadas y secas se colocaron en bolsas de papel y se transportaron al Laboratorio del Servicio de Análisis e Investigación de Alimentos LSAIA de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP (Pichincha, Ecuador) (Samaniego et al., 2020).

El proceso de fermentación mencionado (Figura 6) se realizó en fundas tipo maya pesadas con los materiales de cacao y colocados en cajas cooler de 100 kg de capacidad, previamente se colocó 30 kg de masa (granos de cacao sin fermentar), luego las muestras fueron recubiertas con otros 30 kg de masa y se colocaron hojas de banano para luego tapar el contenedor, este proceso se realizó con el fin de que el calor generado por el proceso de fermentación de los granos sea el adecuado para que las fundas de cacao se fermenten correctamente.

Paralelo a este proceso se colocó la primera funda de cada material de cacao en tendales para iniciar el proceso de secado natural al sol, contándolos desde el día 0 hasta el día 5 días de fermentación. Cada 24 horas, se extrajo una funda de cacao de cada muestra y se colocó en los tendales para que inicie el proceso de secado, de la misma manera con el resto de las muestras hasta llegar al día 5 a las 120 horas de fermentación.

## Figura 6.

### *Fermentación de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



**ELABORADO:** AUTORA

El proceso de secado tuvo una duración de 11 días hasta que los granos alcanzaron un porcentaje de humedad del 7%. Al finalizar el proceso de secado las muestras de cacao seco fueron colocadas en fundas de papel y selladas en fundas heréticas ziploc, las fundas con las muestras de cacao fueron trasladadas a los laboratorios de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP donde se procedió a continuar con el proceso de descascarillado.

### **3.2. Tipo de investigación**

En el presente trabajo realizó una investigación de tipo exploratoria puesto que se pretende caracterizar variedades de cacao de tipo fino, de las cuales no se ha realizado un estudio previo. La investigación descriptiva permite aplicar un diseño experimental que pretende conocer el índice de fermentación óptimo de cuatro variedades de cacao. Mediante la investigación experimental, se aplicó el análisis de laboratorio para determinar el efecto de fermentación en la formación de compuestos no volátiles.

### **3.3. Método de investigación**

#### ***3.3.1. Método inductivo-deductivo***

En el presente trabajo de investigación utilizó el método inductivo-deductivo aplicado en investigaciones de desarrollo teórico; partiendo del análisis de laboratorio en

cuatro materiales de cacao ecuatoriano. Esta información permite caracterizar y conocer el efecto de fermentación sobre la formación de compuestos fenólicos y el contenido de grasa (Hernández & Coello, 2011).

### ***3.3.2. Método de medición***

El método de medición se utilizó para obtener una información numérica de los datos de estudio, empleando muestras de cacao fermentado. Con el objetivo de tener magnitudes medibles que permitan tener una herramienta que pueda certificar los cuatro genotipos de cacao ecuatoriano (Hernández & Coello, 2011).

## **3.4. Fuentes de recopilación de la información**

La recopilación de datos a partir de fuentes primarias se obtuvo a partir de análisis de laboratorio, para caracterizar cuatro materiales de cacao ecuatoriano. Las fuentes secundarias de recolección de información teórico del trabajo son como artículos científicos, libros, tesis y otras fuentes de información bibliográficas utilizados como guía al momento de aplicar los análisis de laboratorio.

## **3.5. Diseño de la investigación**

### ***3.5.1. Análisis estadístico de precursores de aroma no térmico***

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un diseño experimental jerárquico o anidado, para evaluar el efecto del tipo de material o genotipo (Factor A) y el proceso de fermentación (Factor B) sobre los componentes no volátiles y funcionales precursores del aroma de cacao ecuatoriano. Se considera como factor principal el factor A y como factor anidado a B (Montgomery, 2004; Saltos, 2012), Como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.**

*Factores en estudio para determinar el efecto del tipo de material o genotipo y el proceso de fermentación, sobre el perfil de precursores de compuestos no volátiles y funcionales de cacao ecuatoriano*

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>
Genotipo de cacao	$a_0$ =Nacional EET 95
	$a_1$ =Nacional EET 96
	$a_2$ =Nacional EET 103
	$a_3$ =Amazónico IMC 67
Días de fermentación	$b_0$ =0 horas
	$b_1$ =24 horas
	$b_2$ =48 horas
	$b_3$ =72 horas
	$b_4$ =96 horas
	$b_5$ = 120 horas

**ELABORADO: AUTORA**

### **3.5.2. Modelo estadístico**

En la Tabla 4, se observan los factores, niveles y combinaciones del diseño experimental propuesto, considerando que el factor B (tiempo de fermentación) no presenta un efecto cruzado, ni combinados (Montgomery, 2004)(Saltos, 2010). El modelo matemático que rige el diseño experimental se muestra en la Ecuación 1.

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + \varepsilon_{(ij)k} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde,  $\mu$  es la media, **A** es el factor A, **B** es el factor B, el subíndice *i* es el factor principal, el subíndice *i(j)* indica la situación del nivel B dentro de A y  $\varepsilon$  es el error experimental. en la Tabla 3, se observan los factores, niveles y combinaciones de tratamientos del diseño experimental.

**Tabla 4.**

*Tratamientos obtenidos para determinar el efecto del tipo de material o genotipo y el proceso de fermentación, sobre el perfil de precursores de compuestos no volátiles y funcionales de cacao ecuatoriano*

Muestra	Código	Tratamiento	A: Genotipo	B: Días de fermentación	Replica	
					R1	R2
1	EET95- $F_{0h}$	$a_0b_0$	Nacional EET 95	0 horas		
2	EET95- $F_{24h}$	$a_0b_1$	Nacional EET 95	24 horas		
3	EET95- $F_{48h}$	$a_0b_2$	Nacional EET 95	48 horas		
4	EET95- $F_{72h}$	$a_0b_3$	Nacional EET 95	72 horas		
5	EET95- $F_{96h}$	$a_0b_4$	Nacional EET 95	96 horas		
6	EET95- $F_{120h}$	$a_0b_5$	Nacional EET 95	120 horas		
1	EET96- $F_{0h}$	$a_1b_0$	Nacional EET 96	0 horas		
2	EET96- $F_{24h}$	$a_1b_1$	Nacional EET 96	24 horas		
3	EET96- $F_{48h}$	$a_1b_2$	Nacional EET 96	48 horas		
4	EET96- $F_{72h}$	$a_1b_3$	Nacional EET 96	72 horas		
5	EET96- $F_{96h}$	$a_1b_4$	Nacional EET 96	96 horas		
6	EET96- $F_{120h}$	$a_1b_5$	Nacional EET 96	120 horas		
1	EET103- $F_{0h}$	$a_2b_0$	Nacional EET 103	0 horas		
2	EET103- $F_{24h}$	$a_2b_1$	Nacional EET 103	24 horas		
3	EET103- $F_{48h}$	$a_2b_2$	Nacional EET 103	48 horas		
4	EET103- $F_{72h}$	$a_2b_3$	Nacional EET 103	72 horas		
5	EET103- $F_{96h}$	$a_2b_4$	Nacional EET 103	96 horas		
6	EET103- $F_{120h}$	$a_2b_5$	Nacional EET 103	120 horas		
1	IMC 67- $F_{0h}$	$a_3b_0$	Amazónico IMC 67	0 horas		
2	IMC 67- $F_{24h}$	$a_3b_1$	Amazónico IMC 67	24 horas		
3	IMC 67- $F_{48h}$	$a_3b_2$	Amazónico IMC 67	48 horas		
4	IMC 67- $F_{72h}$	$a_3b_3$	Amazónico IMC 67	72 horas		
5	IMC 67- $F_{96h}$	$a_3b_4$	Amazónico IMC 67	96 horas		
6	IMC 67- $F_{120h}$	$a_3b_5$	Amazónico IMC 67	120 horas		

**ELABORADO: AUTORA**

### 3.5.3. Esquema del ANOVA

Para el diseño jerárquico o anidado del trabajo de investigación (Tabla 5) se utilizó el esquema ANOVA

**Tabla 5.***Análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental anidado de 2 etapas*

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Razón f</b>	<b>Valor p</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>A:</b> Genotipo de cacao	$bcn \sum_i (\bar{Y}_i \dots - \bar{Y} \dots)^2$	a-1= 3	$MS_A$	$MS_A/MS_E$		
<b>B:</b> (dentro de A): Tiempo de fermentación	$cn \sum_i \sum_j (\bar{Y}_{ij} \dots - \bar{Y} \dots)^2$	a (b-1) = 20	$MS_{B(A)}$	$MS_{B(A)}/MS_E$		
Residuo o error	$\sum_i \sum_j \sum_k (\bar{Y}_{ijk} \dots - \bar{Y}_{ij} \dots)^2$	ab (n-1) =24	$MS_E$			
Total corregido	$\sum_i \sum_j \sum_k (\bar{Y}_{ijk} \dots - \bar{Y}_{ij} \dots)^2$	abn-1=47				

*Nota.* Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. **A:** 4 niveles, **B:** 6 niveles y **n:** duplicado (2)

### 3.5.4. Variables del estudio

Las variables de estudio del presente trabajo de investigación son las siguientes:

#### Variables independientes

- Genotipo de cacao
- Tiempo de fermentación

#### Variables dependientes

- Contenido de grasa
- Polifenoles totales
- Flavonoides totales
- Índice de fermentación

### 3.6. Instrumentos de investigación

La evolución del proceso de fermentación en el perfil de compuestos no volátiles y funcionales de las variedades de cacao ecuatoriano se llevó a cabo mediante los siguientes análisis de laboratorio.

### ***3.6.1. Perfil de componentes no volátiles***

#### ***3.6.1.1. Preparación de la muestra.***

Para la determinación del contenido de componentes químicos no volátiles las muestras de cacao seco fueron trasladadas al Laboratorio del Servicio de Análisis e Investigación de Alimentos LSAIA de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP (Pichincha, Ecuador) donde fueron sometidas a un proceso de descascarillado manual, de descascarilló 150 g de cada día de fermentación de las muestras de cacao, los granos de cacao descascarillados fueron colocados en fundas ziploc rotuladas el con código del material y día de fermentación y almacenadas a temperaturas de congelación, las muestras, se congelarán a -20 °C y se pasaron por un molino (Retsch ZM 200) hasta obtener un tamaño de partícula < 1 mm. Posteriormente, se pesaron 5 g de cada material en duplicado en dedales de celulosa y se realizará un proceso de desengrasado mediante extracción por Soxhlet durante 12 horas con 250 mL de éter de petróleo. (Samaniego et al., 2020). El polvo desengrasado se retiró del dedal de extracción y se dejó secar durante 6 horas en un desecador. Las muestras desengrasadas se almacenaron en frascos herméticos a - 18°C, para emplearse en las diferentes determinaciones analíticas.

#### ***3.6.2. Contenido de grasa***

El contenido de grasa de las muestras de cacao se determinó mediante el método de Soxhlet, como se indica en el apartado, preparación de muestra. El contenido de grasa se determinó por gravimetría, con base en la diferencia entre el peso del polvo de cacao y el peso de la muestra desengrasada (Samaniego et al., 2020).

Siguiendo el procedimiento mencionado por Espín & Samaniego (2016), se colocaron los balones de ebullición de 250 mL con 2 núcleo de ebullición en la estufa a 105 °C durante 1 h para eliminar cualquier residuo de materia orgánica de tal manera que no influyan en peso de la muestra, luego se colocaron en el desecador durante 45 min, se dobló el papel filtro de 16x16 cm en forma de sobre de tal manera que se pudo introducir en el dedal, se pesaron 5 g de muestra de polvo de cacao y se cubrió el dedal con algodón libre de grasa, los balones con 250 mL de éter de petróleo y los dedales con la muestra se colocaron dentro del equipo Extractor Soxhlet durante 12 h, luego se retiraron los dedales

de Extractor Soxhlet y se colocaron en el desecador durante 12 h, el polvo de cacao desengrasado se almacenó en viales rotulados con el código de cada muestra y se almacenaron a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La cuantificación del contenido de polifenoles se realizó mediante la siguiente fórmula (Espín & Samaniego, 2016):

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P_1 - P_2}{P} * 100 \% \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

$P_1$  = Es el peso de balón con grasa (g)

$P_2$  = Es el peso de balón vacío tarado (g)

$P$  = Es el peso de la muestra (g)

### ***3.6.3. Componentes bioactivos***

#### ***3.6.3.1. Preparación de la muestra.***

Para la extracción de los componentes fenólicos se pesó 0,1 g de cacao en polvo y se añadió 1 mL de una disolución de acetona, agua, ácido fórmico (70:30:0,1 %; v/v/v). El proceso de extracción se realizó durante cinco ciclos combinados de agitación (Agitador Mistral Multi-Mixer; Melrose Park, USA) e inmersión en un baño ultrasónico (Cole Parmer modelo 8892; Chicago, USA) durante 5 y 10 minutos, respectivamente. La muestra se centrifugó en frío, durante 10 minutos a 4400 rpm (Damon EC DIVISION; EE.UU.) El extracto bruto de cada ciclo de extracción se recolectó en un balón volumétrico y se enrazó a 10 mL con la disolución extractora. El extracto obtenido se empleó para la cuantificación del contenido de antioxidantes y la capacidad antioxidante (Samaniego et al., 2020).

### **3.6.3.2. Flavonoides totales.**

En la determinación de flavonoides totales (TFC) se tomó una alícuota de 1 mL de extracto fenólico y se añadió 4 mL de agua, posteriormente se agregó 300 µL de nitrito de sodio (5 %; p/v) y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (18 °C), luego de esto se incorporó 300 µL de cloruro de aluminio (10 %; p/v) y se incubó nuevamente, durante 5 minutos a 18 °C. Finalmente se añadió 2 mL de hidróxido de sodio 1 N y 2,4 mL de agua (Llerena et al., 2020). La absorbancia de las muestras se midió a 490 nm con ayuda de un espectrofotómetro UVVIS Shimadzu modelo 2600 A1166 (Shimadzu Corp., Kioto, Japan). Las concentraciones calculadas por este método se reportaron empleando Catequina como estándar en mg CE•100 g<sup>-1</sup> de muestra seca (BS).

### **3.6.3.3. Polifenoles totales.**

Para la cuantificación de polifenoles totales (TPC) se tomó una alícuota de 1 mL de cada extracto y se añadió 6 mL de agua y 1 mL de reactivo de Folin&Ciocalteu. Se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente (18 °C) y se agregó 2 mL de solución de carbonato de sodio (20 %; p/v). La disolución final se incubó (Baño María Memmert; Schwabach, Alemania) a 40 °C por 2 minutos. La absorbancia de las muestras se midió a 760 nm con ayuda de un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu modelo 2600-A1166 (Shimadzu Corp., Kioto, Japan). Las concentraciones calculadas por este método se reportaron empleando ácido gálico como estándar, en mgGAE•100 g<sup>-1</sup> de muestra seca (BS) (Samaniego et al., 2020).

### **3.6.3.4. Índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles.**

El índice de fermentación se determinó en función de la concentración de polifenoles totales del primer y último día de fermentación de cada uno de los cuatro materiales de cacao.

### **3.8. Recursos humanos y materiales**

#### ***3.8.1. Recursos humanos***

Los recursos humanos utilizados durante la presente investigación fueron los siguientes:

- Estudiante Isis Kirina Sánchez Intriago.
- Tutor del proyecto de investigación Ing. Wilma Maribel Llerena Sila, MSc.
- Cotutor del proyecto de investigación Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua, MSc.

#### ***3.8.2. Materiales y equipos***

##### **Materia prima**

Para la determinación del contenido de grasa, contenido de flavonoides totales, contenido de polifenoles totales y la determinación del índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles se utilizaron las siguientes muestras de cacao ecuatoriano:

- Cacao Nacional EET 95
- Cacao Nacional EET 96
- Cacao Nacional EET 103
- Cacao Amazónico IMC 67

##### **Equipos**

Los equipos utilizados en los análisis de la fase experimental fueron los siguientes:

- Molino (Retsch ZM 200)
- Dispositivo de extracción Soxhlet
- Espectrómetro UV-Vis
- Equipo de gravimetría
- Baño maría
- Vortex

- Ultrasonido
- Balanza Analítica
- Balanza digital
- Congelador
- Refrigerador
- Desecadores
- Estufa
- Agitador
- pHmetro

### **Reactivos**

Los reactivos utilizados en los análisis de la fase experimental fueron los siguientes:

- Éter de petróleo
- Disolución metanólica al 70 %
- Solución de ácido clorhídrico al 5%
- Carbonato de sodio
- Folin
- Agua destilada
- Agua bidestilada
- Nitrito de sodio
- Cloruro de aluminio
- Hidróxido de sodio

### **Instrumentos**

- Guantes de nitrilo
- Mascarilla
- Puntas de micropipeta
- Tubos de ensayo
- Viales
- Balones de ebullición de 250 mL

- Probeta de 500 mL
- Probeta de 1000 mL
- Micropipeta de 1000  $\mu$ l
- Micropipeta de 250  $\mu$ l
- Pipetas de 10 mL
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Vasos de precipitación
- Núcleos de ebullición
- Papel filtro de 16x16 cm
- Dedales de celulosa
- Buretas de 50 mL

#### **Materiales de oficina**

- Laptop
- Impresora
- Hojas de papel bond
- Lápiz
- Lapiceros
- Libreta de apuntes

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el apartado de resultados y discusión, se presenta el estudio del efecto del genotipo de cacao y el tiempo de fermentación en el desarrollo de componentes no volátiles y funcionales de cuatro materiales de cacao, en base a los siguientes parámetros:

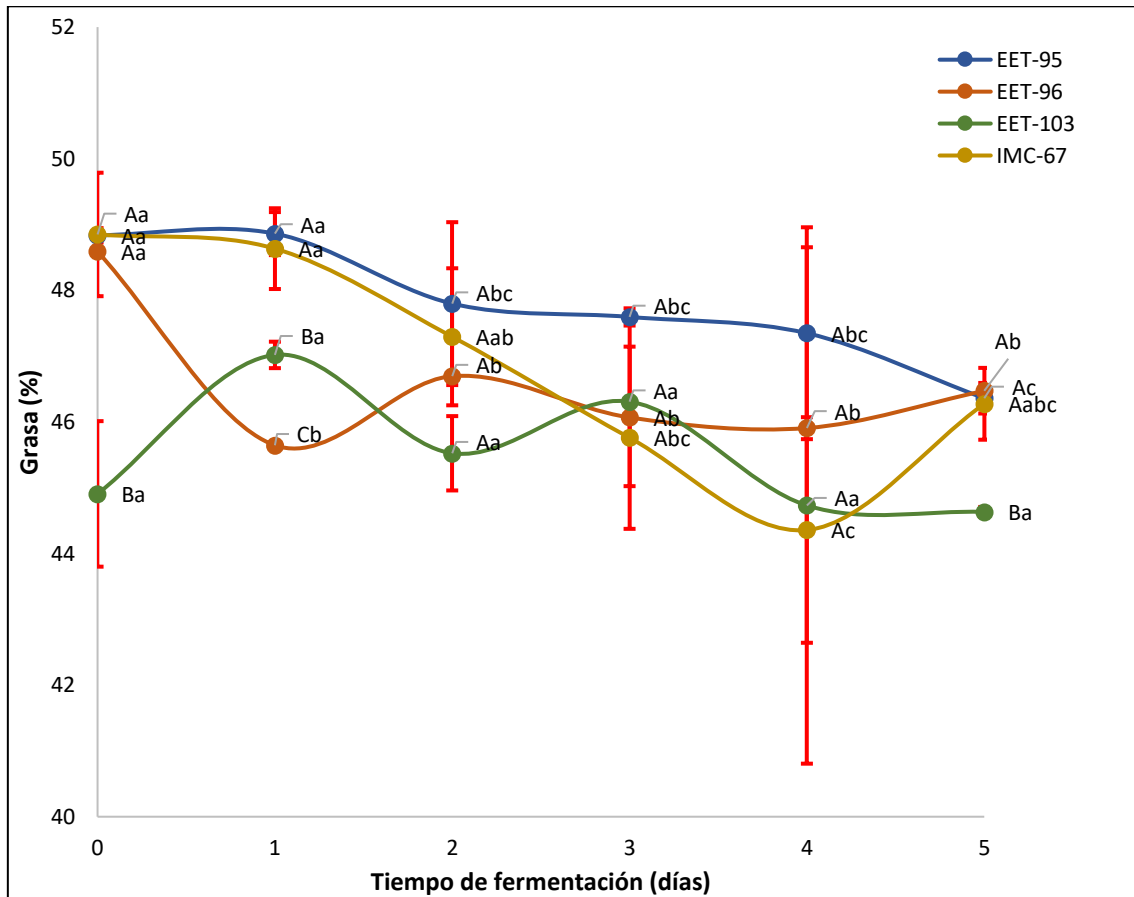
#### **4.1. Contenido de grasa**

Para la determinación del contenido de grasa de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano se tomaron muestras en duplicado de los cinco días de fermentación, tal como se muestra en la Figura 7, las diferencias más significativas ( $p < 0,05$ ) del contenido de grasa respecto al genotipo se mostraron en el día de fermentación cero y uno, ya que el contenido de grasa inicial del cacao EET-103 es menor con relación a los otros tres genotipos, mientras que en el segundo día de fermentación el material EET-103 muestra un aumento en el contenido de grasa, en el EET-96 el contenido de grasa desciende y en los materiales EET-95 e IMC-67 el contenido de grasa muestra valores similares a su contenido de grasa inicial, además durante los días dos, tres y cuatro el descenso del contenido de grasa ocurre de manera uniforme sin haber una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre materiales, para el último día de fermentación solo el material EET-103 tuvo una disminución del contenido de grasa mayor en relación a los otros tres materiales.

Al evaluar el efecto del tiempo de fermentación en cada uno de los materiales, se puede observar que el cacao EET-95 no presenta diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el contenido de grasa a partir del segundo día de fermentación, en el IMC-67 el contenido de grasa se mantiene constante en los días cero y uno, y luego empieza a descender hasta el cuarto día de fermentación, en el quinto día de fermentación ocurre un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el contenido de grasa. Para el caso del EET-96, el contenido de grasa inicial desciende de manera significativa ( $p < 0,05$ ) pero se mantiene constante en los cinco días de fermentación. Finalmente, en el cacao EET-103 el contenido de grasa es constante durante el proceso de fermentación.

**Figura 7.**

*Efecto del tipo de material y el tiempo de fermentación sobre el contenido de grasa de cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



*Nota:* A, B, C: representan la diferencia significativa que existe en el contenido de grasa según el genotipo.

a, b, c: representan la diferencia significativa que existe en el contenido de grasa con respecto al tiempo de fermentación.

n: los resultados se reportaron como el promedio de 2 muestras (réplicas) medidas en duplicado.

**ELABORADO: AUTORA**

Los resultados presentados en la Figura 7, demostraron que los materiales EET-95, EET-96 y IMC-67 poseen un porcentaje de grasa inicial mayor 48.84 %, 48.59 % y 48.85 % respectivamente a comparación del último día de fermentación (cacao sobre fermentado), por otro lado, el porcentaje de grasa inicial (cacao sin fermentar) del material EET-103 es inicialmente más bajo a comparación de los otros días de fermentación con apenas el 44.91 % de contenido de grasa. En todos los materiales el porcentaje de grasa tiene un descenso significativo a partir del segundo día de fermentación. En el material EET-95 el día de fermentación con menor porcentaje de grasa fue el quinto día con el 46.36 %, en el material EET-96 fue el segundo día con el 45,64 % y, en el material EET-

103 fue el quinto día con el 44.63 % y en el material IMC-67 fue el cuarto día de fermentación con el 44.36 %.

**Tabla 6.**

*Análisis de Varianza para el porcentaje de grasa de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Comp. Var.</b>	<b>Por ciento</b>
Total (corregido)	124,958	47			
<b>A:</b> Genotipo	31,7204	3	10,5735	0,631953	22,38
<b>B:</b> Tiempo de fermentación	59,8003	20	2,99002	0,798407	28,28
Error	33,4369	24	1,3932	1,3932	49,34

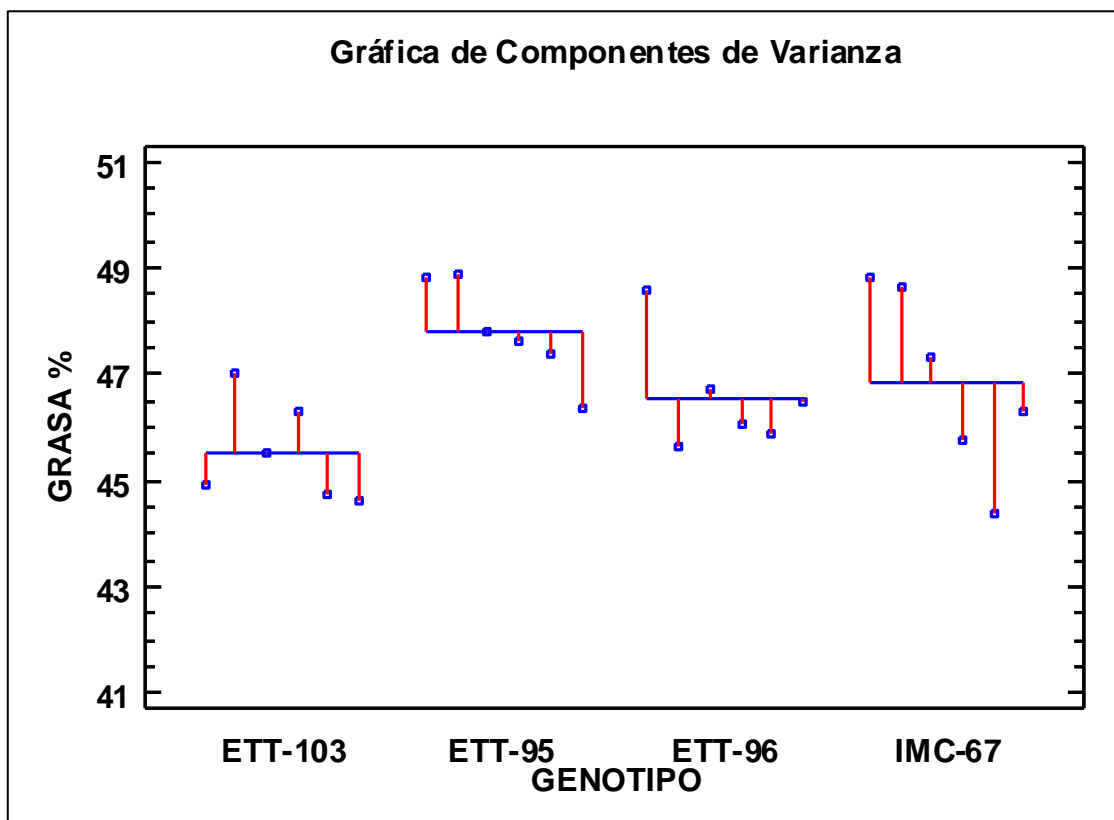
*Nota:* GL representa los grados de libertad y **Comp. Var.** Representa los componentes de varianza.

**ELABORADO:** AUTORA

El análisis de varianza (Tabla 6), permitió demostrar que existe un efecto del genotipo y el tiempo de fermentación sobre el contenido de grasa a un nivel del 95% ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, se demostró que el factor que más influye sobre el contenido de grasa es el tiempo de fermentación con una contribución del 28.28 % de la variación total de los resultados.

**Figura 8.**

*Componentes de varianza del porcentaje de grasa de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



*Nota:* Representación promedio de 2 muestras medidas en duplicado ( $n$ ) en el contenido de grasa (Grasa %) del cacao durante la fermentación (desde los días 0 al 5) en los cuatro genotipos de cacao: Nacional (EET-95, EET-96 y EET-103) y Amazónico (IMC-67).

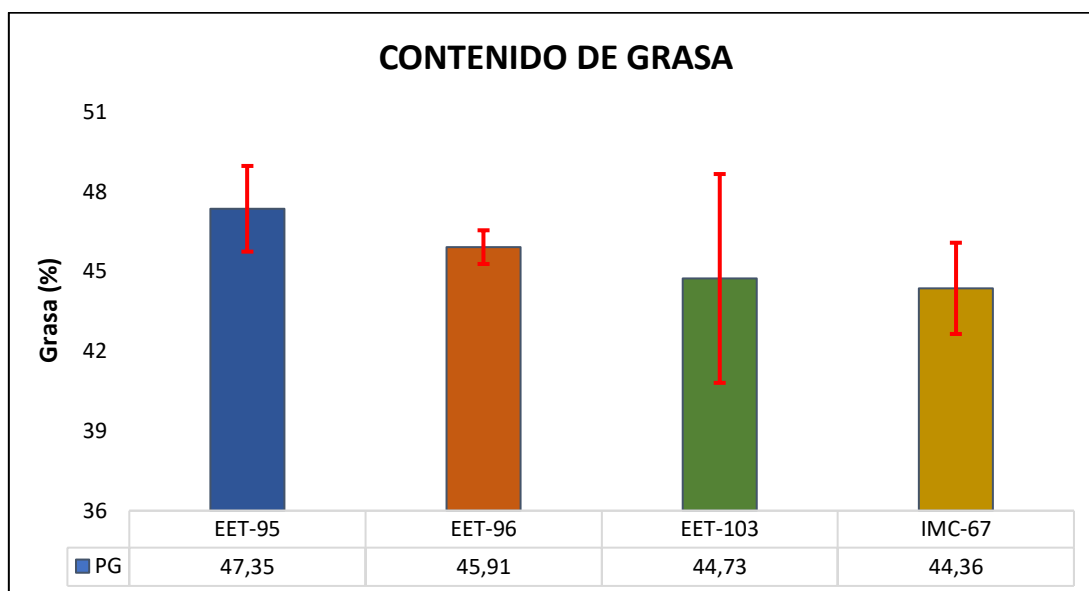
**ELABORADO:** AUTORA

A través del gráfico de componentes de varianza (Figura 8), se pudo determinar que en función del contenido de grasa existen dos grupos diferenciados entre los genotipos de cacao; el primer grupo está compuesto por el cacao EET-103, y el segundo grupo por los materiales EET-95, EET-96 e IMC-67. Sin embargo, cada material presenta un comportamiento propio durante el proceso de fermentación. Quiroz et al. (2021), en su catálogo de cultivares de cacao ecuatoriano menciona que el contenido de grasa de los materiales de cacao son los siguientes; cacao EET-95 (50 %), cacao EET-96 (47 %) y cacao EET-103 (46 %) mostrando que el material con mayor contenido de grasa es el material EET-95 seguido del EET-96 y por último el material EET-103, el material IMC-67 posee un contenido de grasa intermedio entre los materiales EET-96 y EET-95, aunque el contenido de grasa de mayor a menor porcentaje de cada genotipo coincide con los

reportados por Quiroz et al. (2021), los valores varían en función de la ubicación geográfica en la fueron cultivado los materiales, los materiales utilizados en su trabajo fueron cosechados en Tenguel, Guayaquil, Guayas muestra que los utilizados en esta investigación fueron cosechados en Yaguachi, Guayaquil, Guayas.

**Figura 9.**

*Contenido de grasa del día de fermentación óptimo de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



*Nota:* PG (■) representa el promedio de 2 muestras medidas en duplicado (n) en el contenido de grasa (Grasa %) del cacao durante la fermentación (Día 4), en los cuatro materiales de cacao: Nacional (EET-95, EET-96 y EET-103) y Amazónico (IMC-67).

**ELABORADO:** AUTORA

En la Figura 9, se observa que en el día óptimo de fermentación (Día 4), el material que presentó el mayor porcentaje de grasa fue el cacao EET-95 con un 47,35 % mientras que el material con menor porcentaje de grasa es el cacao IMC-67 con un 44,36 %.

Samaniego et al (2021), mencionan que el contenido de grasa varía según la provincia y cantón en la que se cultiva el cacao. En sus estudios realizados con muestras de cacao Nacional recolectados en 17 cantones del Ecuador, el contenido de grasa varía en el rango de  $45.61 \pm 1.27$  a  $52.13 \pm 0.58$  g, cabe resaltar que en la provincia de Guayas el porcentaje promedio de grasa de los granos de cacao reportado por el investigador fue

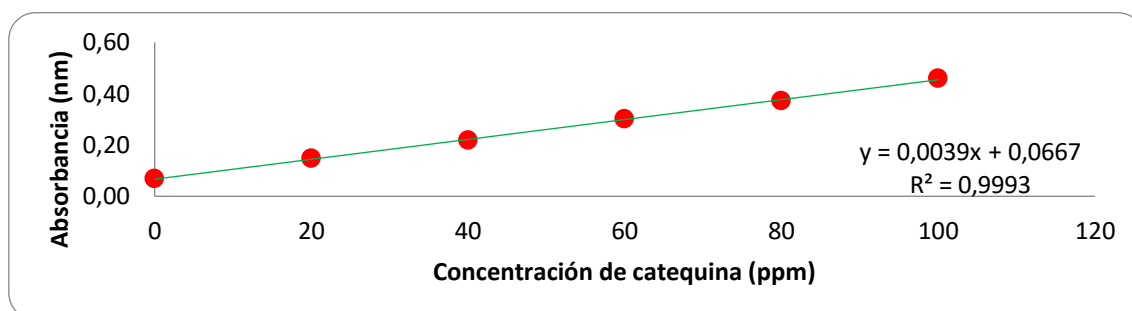
de  $46.06 \pm 0.40$  g/100 g PS, siendo estos valores ligeramente más altos que los reportados en la investigación debido a la utilización de genotipos específicos en contraste con las muestras utilizadas por el investigador.

#### 4.2. Contenido de flavonoides totales

Los fenoles del cacao como la catequina y la epicatequina y sus oligómeros y polímeros como las procianidinas son conocidos por sus altas propiedades antioxidantes al ejercer acción sobre el estrés oxidativo, dentro del grupo de flavonoides se encuentran las catequinas consideradas como los polifenoles de mayor interés en el cacao y la producción de chocolate, en alimentos los flavonoides se encuentran en mayor cantidad en forma de 3-O-glucósidos y polímeros, siendo la (2)-epicatequina el flavonoide más biodisponible y con mayor propiedad antioxidante (Allgrove & Davison, 2013).

**Figura 10.**

*Curva de calibración promedio para la determinación de flavonoides totales*



*Nota:* Representación promedio de la curva de calibración medida en 5 días diferentes, concentración de catequina expresado en mg CE•g<sup>-1</sup> en relación con la absorbancia en seis diluciones de extracto de catequina-agua.

**ELABORADO:** AUTORA

La curva de calibración mostrada en la Figura 10 muestra la relación lineal que existe en la concentración de catequina expresados en mg CE•g<sup>-1</sup> y la absorbancia a 490 nm, dando un ajuste lineal  $R^2 = 0,9993$  mostrando que los datos obtenidos del equipo fueron confiables, por ello la curva fue utilizada para la determinación de flavonoides totales en los cuatro genotipos de cacao (EET-95, EET-96, EET-103, IMC-67).

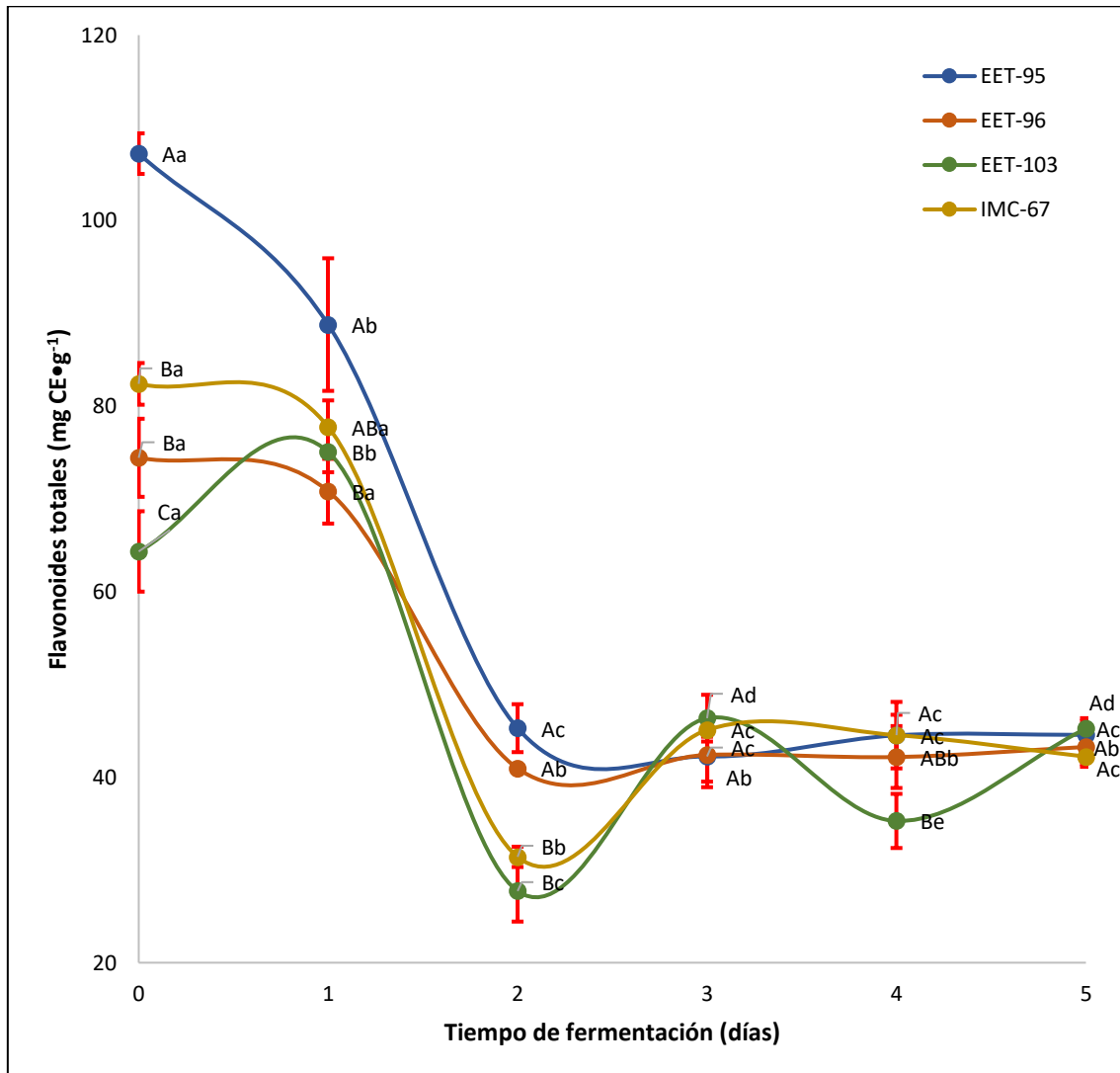
Para la determinación del contenido de flavonoides totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano se tomaron muestras en duplicado de los cinco días de

fermentación (Figura 11), los resultados reportados mostraron que los materiales EET-96 e IMC-67 tuvieron un contenido de flavonoides totales inicial similar, mientras que el que tuvo un contenido de flavonoides totales inicial más alto fue el cacao EET-95 y el más bajo el cacao EET-103, al primer día de fermentación los materiales IMC-67, EET-96 y EET-103 reportaron valores similares mientras que el cacao EET-95 solo tuvo similitud con el cacao IMC-67. El descenso de TFC tuvo similitud entre los materiales EET-95 con el cacao EET-96 y el cacao IMC-67 con el cacao EET-103, mostrando que los dos primeros tuvieron valores más altos que los dos últimos, durante los días 3, 4 y 5 no existieron diferencias significativas en el contenido de flavonoides a excepción de cacao EET-103 que reporto un contenido de flavonoides menor a los otros tres materiales en el cuarto día de fermentación.

Al evaluar el efecto del tiempo de fermentación en cada uno de los materiales, se puede observar que el cacao EET-95 tuvo un mayor descenso en TFC a comparación de los otros tres materiales debido a su alto contenido inicial de flavonoides, la diferenciación del contenido de flavonoides más significativo en los cuatro materiales de cacao se pudo observar a partir de segundo día de fermentación, los materiales EET-95, EET-96 e IMC-67 mantuvieron valores constantes en los días 3, 4, y 5, mientras que el cacao EET-103 muestra un descenso de TFC en los días 2 y 4 y un aumento de TFC en los días 3 y 5.

**Figura 11.**

*Evolución del efecto del proceso de fermentación y tipo de material en el contenido de flavonoides totales de cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



**Nota:** A, B, C: representan la diferencia significativa que existe en el contenido de flavonoides totales según el genotipo.

a, b, c, d, e: representan la diferencia significativa que existe en el contenido de flavonoides totales con respecto al tiempo de fermentación.

n: los resultados se reportaron como el promedio de 2 muestras (réplicas) medidas en duplicado.

**ELABORADO:** AUTORA

La Figura 11 indica que las muestras EET-95, EET-96, EET-103 e IMC-67 poseen un contenido de flavonoides inicial mayor (107.23 mg CE·g<sup>-1</sup>, 74.43 mg CE·g<sup>-1</sup>, 64.34 mg CE·g<sup>-1</sup> y 82.40 mg CE·g<sup>-1</sup> respectivamente) a comparación del segundo día de fermentación en el cual el contenido de flavonoides totales disminuye exponencialmente en los cuatro materiales de cacao ecuatoriano 45.29 mg CE·g<sup>-1</sup>, 40.94 mg CE·g<sup>-1</sup>, 27.73

mg CE•g<sup>-1</sup> y 31.41 mg CE•g<sup>-1</sup> respectivamente esto se debe a la difusión de estos compuesto fuera de los cotiledones por efecto del proceso de fermentación, estos compuestos se mantuvieron constantes a partir del segundo día, sin tener una disminución o aumento de flavonoides totales significativo hasta el último día de fermentación en donde se reportaron valores de 45.24 73 mg CE•g<sup>-1</sup> en el cacao EET-103, 44.56 73 mg CE•g<sup>-1</sup> en el cacao EET-95, 43.26 73 mg CE•g<sup>-1</sup> en el cacao EET-96 y 42.21 73 mg CE•g<sup>-1</sup> en el cacao IMC-97.

**Tabla 7.**

*Análisis de Varianza para el contenido de flavonoides totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Comp. Var.</b>	<b>Porcentaje</b>
Total (corregido)	19435,2	47			
<b>A:</b> Genotipo	1115,04	3	371,682	0,0	0,00
<b>B:</b> Tiempo de fermentación	18107,1	20	905,356	448,239	98,06
Error	213,043	24	8,87679	8,87679	1,94

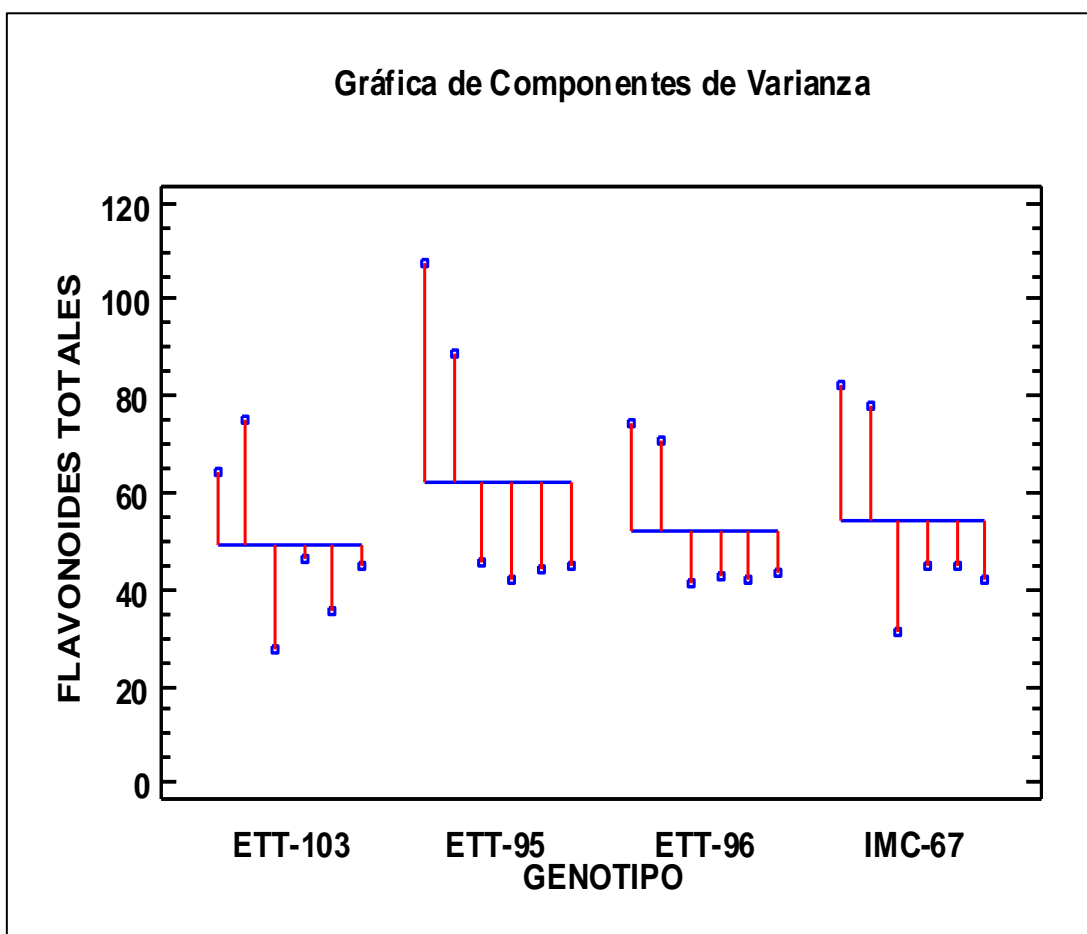
*Nota:* **GL:** representa los grados de libertad y **Comp. Var:** Representa los componentes de varianza.

**ELABORADO:** AUTORA

La Tabla 7 de análisis de varianza mostrada divide la varianza de flavonoides totales (TFC) en 2 componentes, uno para cada factor. Cada factor, después del primero, está anidado en el de arriba. Al comparar la cantidad de variabilidad con la que contribuye cada uno de los dos factores (componentes de varianza), se concluye que el factor que más contribuye a la varianza es el factor B tiempo de fermentación ya que su contribución representa 98.06% de la variación total en flavonoides.

**Figura 12.**

*Componentes de varianza del contenido de flavonoides totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



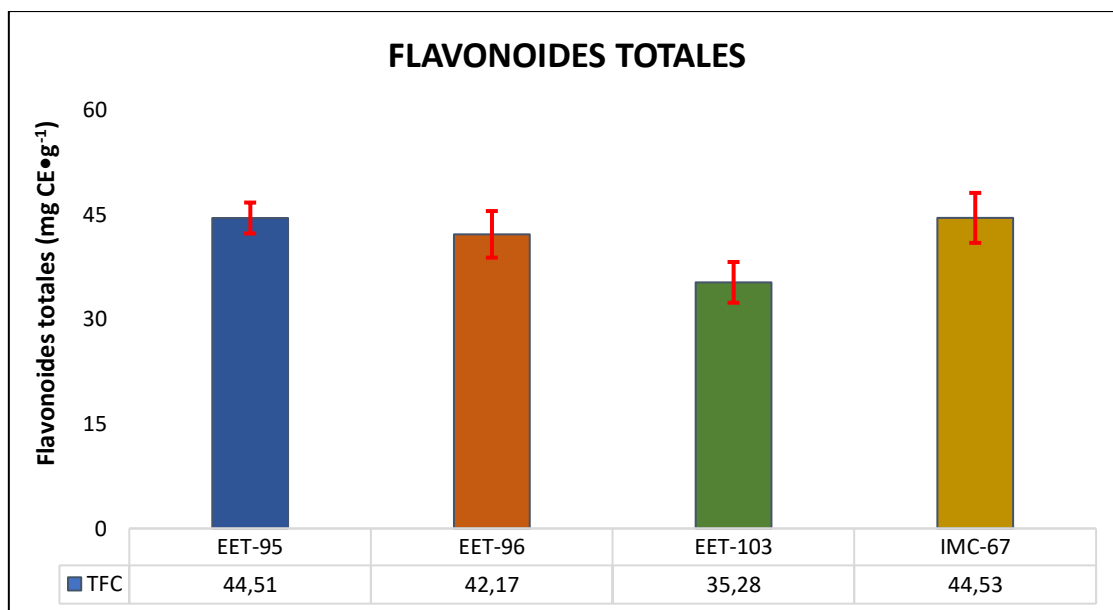
*Nota:* Representación promedio de 2 muestras medidas en duplicado (n) en el contenido de flavonoides totales (TFC) del cacao durante la fermentación (desde los días 0 al 5) en los cuatro genotipos de cacao: Nacional (EET-95, EET-96 y EET-103) y Amazónico (IMC-67).

**ELABORADO:** AUTORA

En el gráfico de componentes de varianza (Figura 8), se pudo observar que en función del contenido de flavonoides totales existen dos grupos diferenciados entre los genotipos de cacao; el primer grupo está compuesto por el cacao EET-103, y el segundo grupo por los materiales EET-95, EET-96 e IMC-67. Sin embargo, cada material presenta un comportamiento propio durante el proceso de fermentación. (Samaniego et al., 2020), menciona que la extensa diversidad edafoclimática entre las regiones de cultivo impacta de manera significativa en la composición bioactiva de los granos de cacao.

**Figura 13.**

*Contenido de flavonoides totales cuarto día de fermentación de cada material de cacao*



*Nota:* TFC (■) representa el promedio de 2 muestras medidas en duplicado (*n*) en el contenido de flavonoides totales (expresado en mg CE·g<sup>-1</sup>) del cacao durante la fermentación (**Día 4**), en los cuatro materiales de cacao: Nacional (**EET-95**, **EET-96** y **EET-103**) y Amazónico (**IMC-67**).

#### **ELABORADO: AUTORA**

De acuerdo con la Figura 13 en la que se compara el contenido de flavonoides totales en el cuarto día de fermentación ya que se considera que el cacao tiene una fermentación óptima a las 96 h, el cacao IMC-53 es el material con mayor contenido de flavonoides totales con 44.53 mg CE·g<sup>-1</sup> mientras que el material con el menor contenido de flavonoides totales en el material EET-103 con 35.28 mg CE·g<sup>-1</sup>.

El contenido de flavonoides reportados por Samaniego et al. (2020b) en cacao Nacional varía entre 3.45 a 13.16 mg/g siendo estos datos más bajos que los reportados en la presente investigación, esto se debe a que los materiales de cacao utilizados en esta investigación son variedades específicas de cacao Nacional y Amazónico mientras que el investigador mencionado utiliza una combinación de materiales de cacao Nacional.

La posibilidad de vincular los atributos de calidad de cacao a su origen geográfico es mencionado por Fanning et al. (2023), que citando a otros investigadores como Samaniego et al. (2020b) concluye que existe variabilidad en el contenido de compuestos bioactivos en relación a la región en la que el cacao es cultivado, además de

existir una buena discriminación del contenido de compuestos fenólicos en las provincias de las que se tomaron muestras, siendo la región amazónica la que reporta materiales de cacao con mayor contenido fenólico a comparación de las muestras tomadas en los cantones de la región costa.

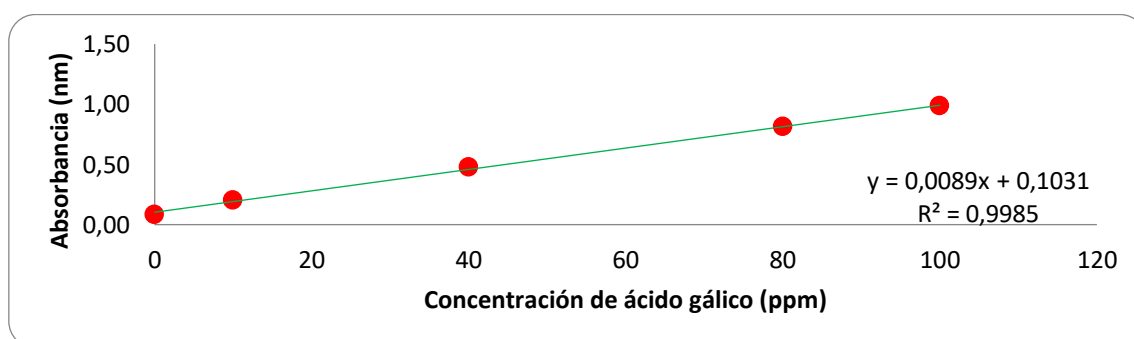
### 4.3. Contenido de polifenoles totales

El cacao es característico por su alto contenido de polifenoles, estos compuestos son los responsables de la astringencia en los granos de cacao y también de contribuir al sabor amargo, los polifenoles se encuentran almacenados en las células pigmentarias de los cotiledones y son los que le otorgan a las semillas de cacao un color que va desde blanco a morado oscuro en función del contenido de antocianinas que varía según el genotipo de cacao (Afoakwa et al., 2013; Afoakwa et al., 2008).

Los polifenoles se subdividen en tres grupos: las catequinas o flavan-3-oles que representan el 37 % del total del contenido de polifenoles; las antocianinas que representan el 4 % y las proantocianidinas que representan el 48 % del total de polifenoles presentes en los granos de cacao (Afoakwa et al., 2008).

**Figura 14.**

*Curva de calibración promedio para la determinación de polifenoles totales*



*Nota:* Representación promedio de la curva de calibración medida en 5 días diferentes, concentración de ácido gálico expresado en mg AGE·g<sup>-1</sup> en relación con la absorbancia en seis diluciones de extracto de ácido gálico-agua.

**ELABORADO:** AUTORA

La validación de los datos se reportó por medio del estudio de linealidad de las curvas de calibración de ácido gálico, a través de la curva de absorbancia promedio de las

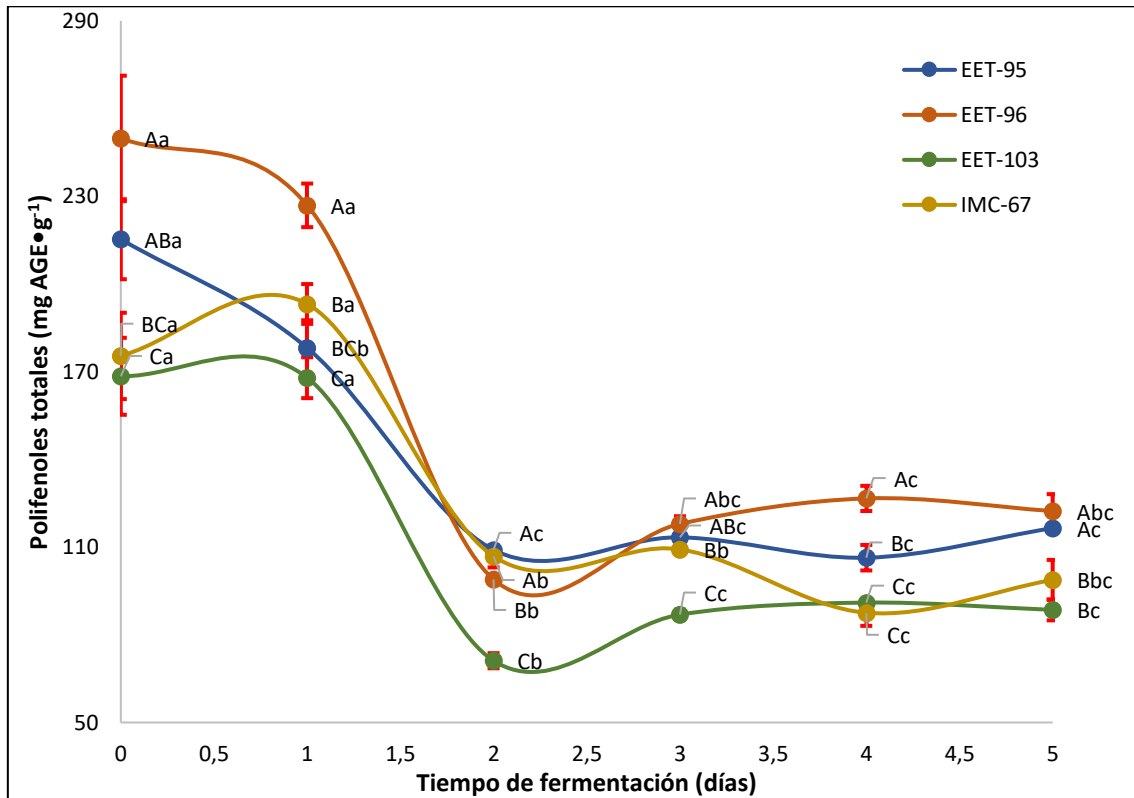
cinco curvas medidas en diferentes días, dando un ajuste lineal  $R^2 = 0,9985$  mostrando que los datos obtenidos del equipo son confiables para la cuantificación de polifenoles totales en los cuatro materiales de cacao ecuatoriano.

La determinación del contenido de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano se realizó tomando muestras en duplicado de los cinco días de fermentación (Figura 15), los resultados mostraron que el TPC inicial del material EET-95 tuvo similitudes con el material EET-96 e IMC-67 aunque estos no mostraron similitudes entre sí, mientras que el cacao EET-103 tuvo un contenido de polifenoles inicial similar al del cacao IMC-67. En el primer día de fermentación solo el cacao EET-96 tuvo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los otros tres materiales, en el segundo día de fermentación la disminución de TPC fue similar en los materiales EET-95 e IMC-67 mientras que los materiales EET-96 y EET-103 reportaron valores más bajos, para el cuarto día de fermentación los materiales EET-95 y EET-96 tuvieron un contenido de polifenoles más alto que los materiales EET-103 e IMC-67 cuyos valores muestran similitudes entre sí.

Al evaluar el efecto del tiempo de fermentación en cada uno de los materiales, se puede observar que a pesar de que el contenido de polifenoles totales desciende de manera significativa a partir de segundo día de fermentación en los cuatro materiales de cacao, el cacao EET-95 y el cacao EET-103 mantienen un contenido polifenólico constante desde el segundo hasta el quinto día de fermentación, mientras que en el cacao EET-96 el contenido de polifenoles en el segundo día de fermentación es más bajo respecto a los siguientes tres días de fermentación y en el cacao IMC-67 el contenido deciente en el segundo día de fermentación y es contante en los días dos, tres y cinco pero desciende en al cuarto día de fermentación.

**Figura 15.**

*Efecto del tiempo de fermentación y el tipo de material en el contenido de polifenoles totales de cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



**Nota:** A, B, C: representan la diferencia significativa que existe en el contenido de polifenoles totales según el genotipo.

a, b, c, d, e: representan la diferencia significativa que existe en el contenido de polifenoles totales con respecto al tiempo de fermentación.

n: los resultados se reportaron como el promedio de 2 muestras (réplicas) medidas en duplicado.

Los resultados de la Figura 15 indican que las muestras EET-95, B EET-96, EET-103 e IMC-67 poseen un contenido de polifenoles totales inicial mayor (215.32 mg AGE·g<sup>-1</sup>, 249.81 mg AGE·g<sup>-1</sup>, 168.43 mg AGE·g<sup>-1</sup> y 175.41 mg AGE·g<sup>-1</sup> respectivamente) a comparación del segundo día de fermentación en el cual el contenido de Polifenoles totales disminuye exponencialmente en los cuatro materiales de cacao ecuatoriano con 109.07 mg AGE·g<sup>-1</sup>, 98.95 mg AGE·g<sup>-1</sup>, 71.14 mg AGE·g<sup>-1</sup> y 106.87 mg AGE·g<sup>-1</sup> respectivamente sin embargo se mantienen constantes a partir del segundo día sin tener una disminución o aumento de polifenoles totales significativo hasta el quinto día de fermentación, en el que cada material reporto 116.49 mg AGE·g<sup>-1</sup>, 122.33 mg AGE·g<sup>-1</sup>, 88.53 mg AGE·g<sup>-1</sup> y 98.79 mg AGE·g<sup>-1</sup> respectivamente.

Los datos reportados por Afoakwa et al (2013), muestran que el contenido inicial de polifenoles en cacao forastero es de 120 a 180 mg AGE•g<sup>-1</sup>, mientras que en los granos de cacao seco el contenido de polifenoles disminuye entre 20 a 62 mg AGE•g<sup>-1</sup>, esto se debe a que ocurren modificaciones bioquímicas por acción de la polimeración y la formación de complejos con proteínas, que reducirán la astringencia y solubilidad en los grano de cacao fermentados y secos, el valor inicial de contenido de polifenoles de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano es más alto en contraste a los reportados por el investigador, que menciono al tiempo de almacenamiento de mazorca antes de la fermentación como un factor que influye en el contenido de polifenoles, en su ensayo estos compuestos disminuían a medida que aumentaban los días de almacenamiento de las mazorca ya que el volumen de mucílago se reduce debido a la evaporación de agua y a la inversión de la sacarosa que provoca el aumento de la micro aireación dentro del mucílago de las mazorcas, la cuales pasaron de 172.54 a 123.24 mg AGE•g<sup>-1</sup> en diez días de almacenamiento, mientras que los materiales de cacao tomados como muestra para esta investigación fueron fermentados al momento de ser cosechados.

**Tabla 8.**

*Análisis de Varianza para el contenido de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Comp. Var.</b>	<b>Porcentaje</b>
Total (corregido)	115043,	47			
<b>A:</b> Genotipo	12795,4	3	4265,14	0,0	0,00
<b>B:</b> Tiempos de fermentación	100769,	20	5038,46	2488,43	97,58
Error	1478,34	24	61,5976	61,5976	2,42

*Nota:* **GL:** representa los grados de libertad y **Comp. Var.:** Representa los componentes de varianza.

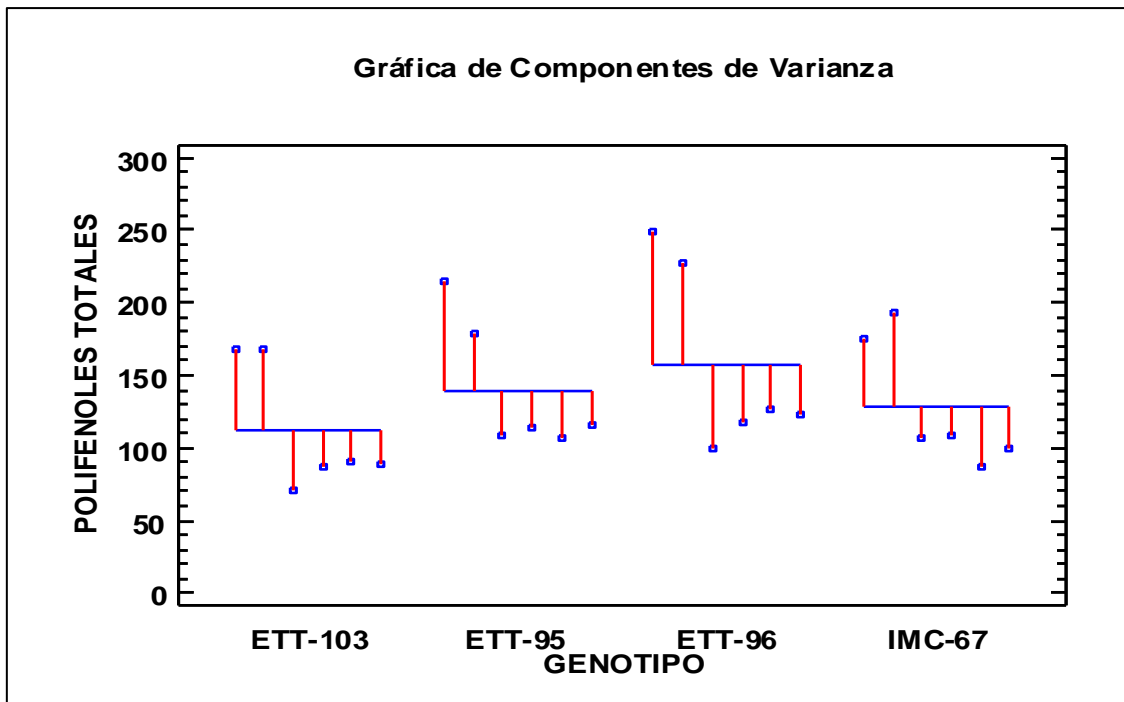
**ELABORADO:** AUTORA

El análisis de varianza del contenido de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano ubicados en la Tabla 8, mostró la variabilidad con la que contribuyen los factores A y B (genotipo y tiempo de fermentación) en el perfil del contenido fenólico de cada material a lo largo del proceso de fermentación. En este caso, el factor que más contribuye a la varianza es el tiempo de fermentación representando el 97.58 % de la variación total de los datos en TPC. Existe una inconsistencia encontrada en la literatura con respecto al contenido de polifenoles totales ya que los datos varían en un rango de 40 a 150 mg AGE•g<sup>-1</sup>, sin embargo es seguro que el contenido de polifenoles

disminuye en función del tiempo de fermentación, cuya disminución varía de 150 a menos de 50 mg AGE•g<sup>-1</sup>, a medida que los días de fermentación aumentan el contenido de polifenoles totales en los granos de cacao disminuye siendo esta una relación inversamente proporcional (Caporaso et al., 2018).

**Figura 16.**

*Componentes de varianza del contenido de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



*Nota:* Representación promedio de 2 muestras medidas en duplicado (n) en el contenido de polifenoles totales (TPC) del cacao durante la fermentación (desde los días 0 al 5) en los cuatro genotipos de cacao: Nacional (EET-95, EET-96 y EET-103) y Amazónico (IMC-67).

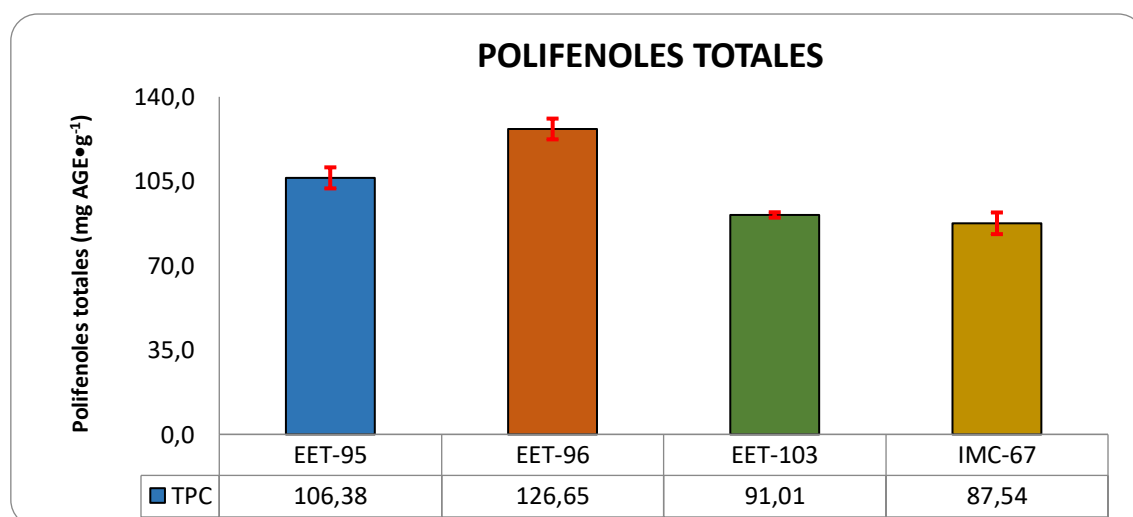
**ELABORADO:** AUTORA

El grafico de componentes de varianza (Figura 8), muestra que, en función del contenido de polifenoles totales, se diferencian dos grupos entre los genotipos de cacao; el primer grupo está compuesto por el cacao EET-103, y el segundo grupo por los materiales EET-95, EET-96 e IMC-67. Sin embargo, cada material presenta un comportamiento propio durante el proceso de fermentación, el cacao EET-103 no se encuentra en el mismo grupo que el cacao EET-95 y EET-96 a pesar de que los tres son variedades de tipo Nacional.

Borja et al. (2022), en su investigación evaluó el contenido de polifenoles totales de cinco materiales de cacao; uno de tipo Criollo, dos materiales Trinitario y dos Forasteros, su investigación mostro una variación del contenido fenólico de 44.51 a 106.77 mg AGE•g<sup>-1</sup>, el invetigador menciona que el contenido fenólico está más relacionado al tiempo de fermentación que a la variedad, esto se ve reflejado en sus resultado ya que de los dos materiales de cacao Trinitario estudiados, el primer material (UTLM02) reporto 77.96 mg AGE•g<sup>-1</sup> mientras que el segundo material (UTGC01) reporto 106.77 mg AGE•g<sup>-1</sup> mostrando la diferencia significativa en el contenido de fenoles de los dos materiales a pesar de que ambos pertenecen al mismo grupo de cacao Trinitario.

**Figura 17.**

*Contenido de polifenoles totales a las 96 h de fermentación de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



*Nota:* TPC (■) representa el promedio de 2 muestras medidas en duplicado (n) en el contenido de polifenoles totales (expresado en mg AGE•g<sup>-1</sup>) del cacao durante la fermentación (**Día 4**), en los cuatro materiales de cacao: Nacional (**EET-95**, **EET-96** y **EET-103**) y Amazónico (**IMC-67**).

**ELABORADO:** AUTORA

La Figura 17 compara el contenido de polifenoles totales en el cuarto día de fermentación de los cuatro materiales, siendo el material con mayor contenido de polifenoles totales en cacao EET-96 con 126.65 mg AGE•g<sup>-1</sup> mientras que el material con menor concentración de polifenoles totales en el material IMC-67 con 87.54 mg AGE•g<sup>-1</sup>.

1.

El contenido fenólico del cacao se ve afectado por la variedad, grado de madurez, temporada de cosecha, origen geográfico y las condiciones postcosecha como la fermentación y el secado, siendo las dos últimas las que determinan la mayor diferenciación en el contenido de polifenoles totales de cada material, mostrando que las plantas que crecen a menor altitud producen mayor contenido de polifenoles y flavan-3-ol (Carrillo et al., 2014).

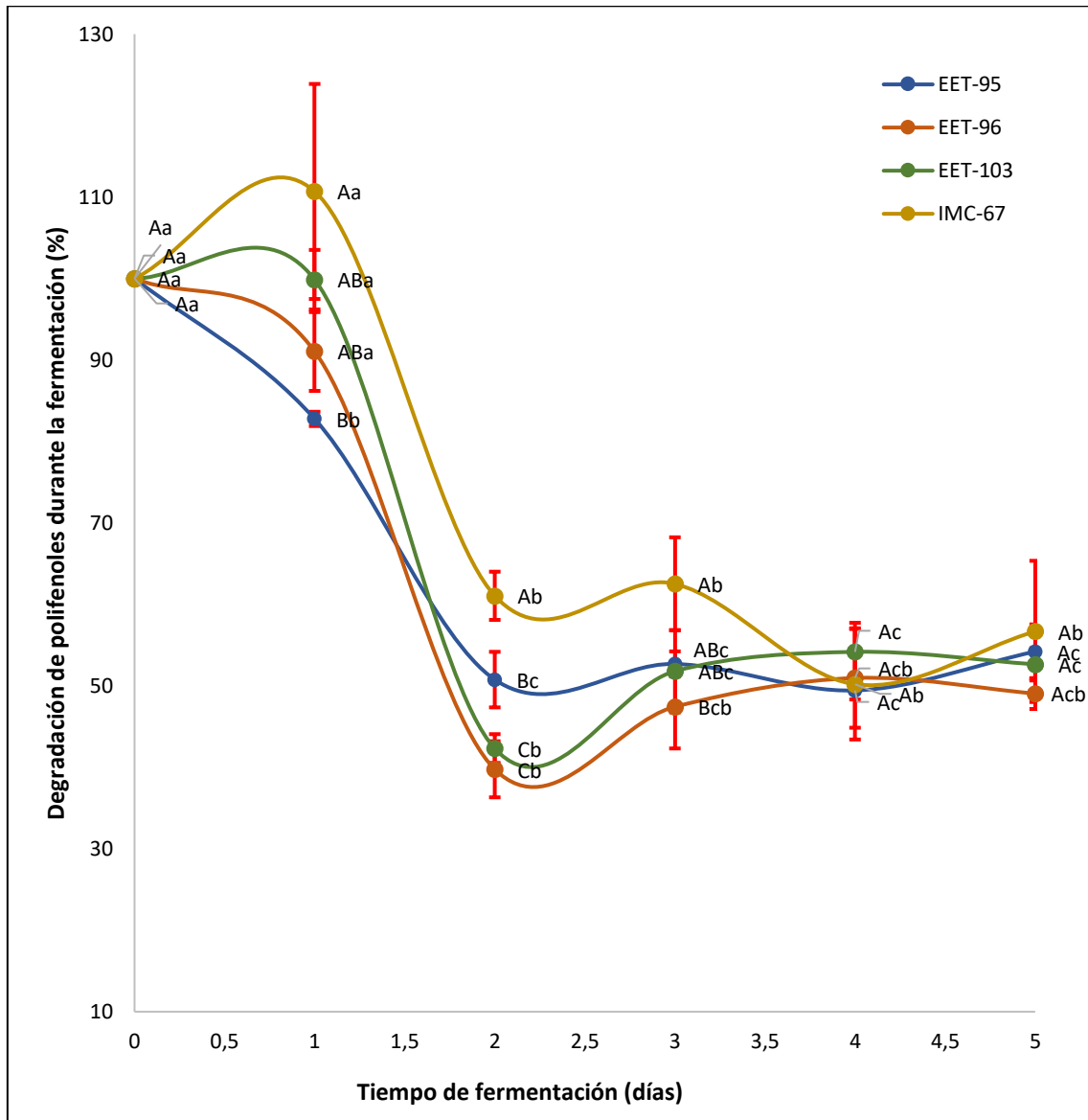
#### **4.4. Índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales**

La pérdida del contenido de polifenoles en función del genotipo (Figura 18), muestra que en el primer día de fermentación el cacao EET-95 tuvo un descenso mayor en comparación a los otros tres materiales, es en el segundo día de fermentación que se reporta la mayor pérdida de TPC en los cuatro materiales y a partir de ese día los valores se mantendrán constantes hasta el quinto día donde los datos de los cuatro materiales mostraron similitud.

Con respecto al tiempo de fermentación, la pérdida de polifenoles totales se mantuvo constante desde el segundo al quinto día de fermentación en los materiales EET-95, EET-96 e IMC-67, mientras que en el cacao EET-103 el día con mayor disminución porcentual de polifenoles es el día dos y a partir de ahí aumentó de manera significativa en el día tres y se mantuvo constante hasta en final de proceso de fermentación.

**Figura 18.**

*Determinación del Índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



**Nota:** A, B, C: representan la diferencia significativa que existe en la disminución de polifenoles totales según el genotipo.

a, b, c, d, e: representan la diferencia significativa que existe en la disminución de polifenoles totales con respecto al tiempo de fermentación.

n: los resultados se reportaron como el promedio de 2 muestras (réplicas) medidas en duplicado.

En los materiales de cacao EET-95 e IMC-67 se tuvo mayor pérdida de TPC en el cuarto día de fermentación con un contenido de 49.44 y 50.19 % respectivamente, mientras que en los materiales EET-96 y EET-103 el día de mayor disminución de TPC fue el segundo día de fermentación reportando valores de 39.76 y 42.30 % respectivamente, estos datos muestran que el material que tuvo una mayor pérdida de polifenoles es el cacao EET-96

en su segundo día de fermentación mientras que el que reporto menor pérdida de polifenoles totales es el material IMC-67 en su cuarto día de fermentación.

Afoakwa et al (2008), reporto que el cacao forastero puede llegar a tener una reducción de entre el 15 al 20 % de contenido de polifenoles al momento de ser fermentado. Otros estudios realizados en cacao muestran que durante el proceso de fermentación ocurre una disminución de polifenoles totales de entre el 20 al 30 %, esto se debe a que estos compuestos son oxidados por la acción de las polifenol oxidasas que transforman los compuestos polifenólicos como la epicatequina en quinonas que al condensarse con grupos amina forman polímeros marrones dando esa tonalidad marrón característica del cacao fermentado (Menéndez & Burgos, 2021). Las reacciones bioquímicas que ocurren durante la fermentación se ven reflejados en los resultados mostrados en la Figura 18 ya que a partir del primer día de fermentación ocurre un descenso significativo de TPC en los cuatro materiales de cacao, en el caso del cacao EET-95 que ocurrió un descenso del 17.23 % de polifenoles totales en su segundo día de fermentación.

**Tabla 9.**

*Análisis de Varianza para el índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Comp. Var.</b>	<b>Porcentaje</b>
Total (corregido)	25467,5	47			
<b>A:</b> Genotipo	747,723	3	249,241	0,0	0,00
<b>B:</b> Tiempo de fermentación	24194,9	20	1209,75	593,938	96,45
Error	524,877	24	21,8699	21,8699	3,55

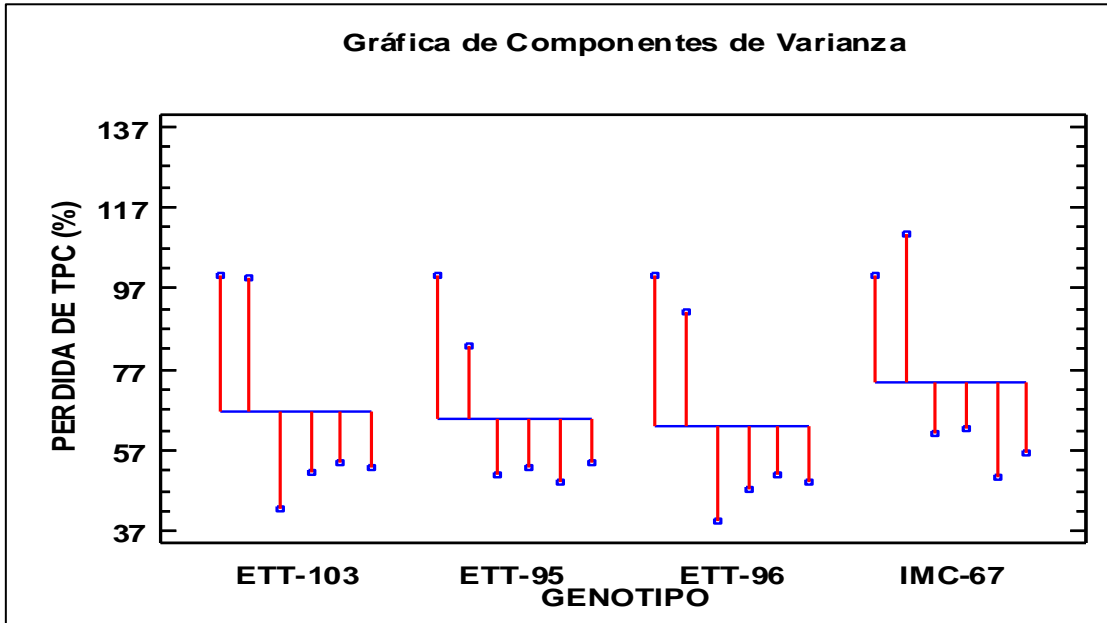
*Nota:* **GL:** representa los grados de libertad y **Comp. Var:** Representa los componentes de varianza.

**ELABORADO:** AUTORA

La tabla de análisis de varianza (Tabla 9) aquí mostrada divide la varianza del índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales en 2 componentes, uno para cada factor. Al comparar la cantidad de variabilidad con la que contribuye cada uno de los componentes de varianza (factores A y B). se concluye que el factor que más contribuye a la varianza es el tiempo de fermentación que representa 96.45% de la variación total en los resultados.

**Figura 19.**

*Componentes de varianza del índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



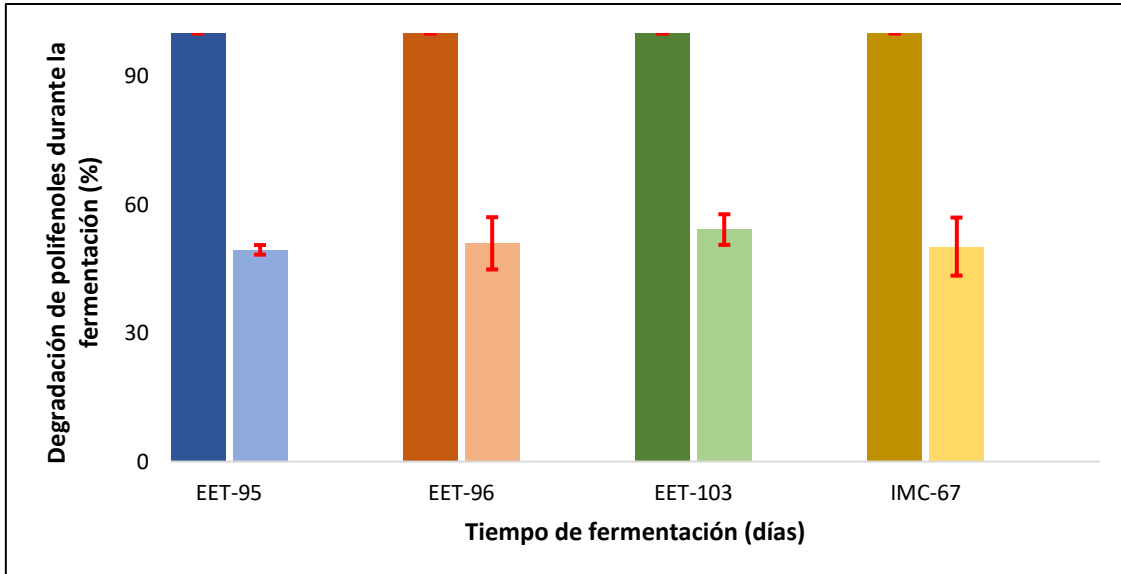
*Nota:* Representación promedio de 2 muestras medidas en duplicado (n) durante la pérdida porcentual del contenido de polifenoles totales (TPC) en el proceso de fermentación (desde los días 0 al 5) en los cuatro genotipos de cacao: Nacional (EET-95, EET-96 y EET-103) y Amazónico (IMC-67).

**ELABORADO:** AUTORA

A través del gráfico de componentes de varianza (Figura 8), se pudo determinar que en función del contenido de grasa existen dos grupos diferenciados entre los genotipos de cacao; el primer grupo está compuesto por los materiales de cacao EET-95, EET-96 y EET-103, y el segundo grupo por el cacao IMC-67. Sin embargo, cada material presenta un comportamiento propio durante el proceso de fermentación

**Figura 20.**

*Perdida de polifenoles totales en el cuarto día de fermentación de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano.*



*Nota:* comparación porcentual de la pérdida de polifenoles totales (TPC) durante la fermentación en los cuatro materiales de cacao; Nacional **EET-95** (día 0 ■ y día 4 ■), **EET-96** (día 0 ■ y día 4 ■) y **EET-103** (día 0 ■ y día 4 ■) y Amazónico **IMC-67** (día 0 ■ y día 4 ■).

**ELABORADO: AUTORA**

De acuerdo con los resultados de la Figura 20, en el cuarto día de fermentación los valores de pérdida de polifenoles totales de los cuatro genotipos son los siguientes; EET-95 con el 49.44 %, EET-96 con el 50.96, EET-103 con el 54.17 e IMC-67 con el 50.19 % del contenido de polifenoles totales con respecto al 100 % del TPC inicial.

Menéndez & Burgos (2021), menciona que existe una reducción de polifenoles del 35 al 59 % en el tercer y séptimo día de fermentación del cacao, mientras que en un estado de fermentación óptimo la pérdida de polifenoles será de aproximadamente 50,1 %, por ello el proceso de fermentación es considerado un factor importante a la hora de determinar la calidad de los granos de cacao ya que en esta etapa ocurre la mayor pérdida de sustancias antioxidantes (Pallares et al., 2016).

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1 Conclusiones

Tomando en cuenta los objetivos planteados en el presente proyecto de investigación se pudo concluir que:

- Considerando el cuarto día de fermentación (96 h) como el día óptimo de fermentación, los parámetros medidos en la investigación reportaron los siguientes datos para cada material (EET-95, EET-96, EET-103); contenido de grasa 47.35, 45.91, 44.73 y 44.36 % respectivamente; contenido de flavonoides totales 44.51, 42.17, 35.28 y 44.53 mg CE•g<sup>-1</sup> respectivamente; contenido de polifenoles totales 106.38, 126.65, 91.03 y 87.54 mg AGE•g<sup>-1</sup> respectivamente y finalmente en el índice de fermentación en función de la pérdida de polifenoles totales reportaron valores de 49.44, 50.96, 54.17 y 50.19 % respectivamente.
- El factor anidado B (tiempo de fermentación) influye en la variación de datos en un 98.06 % para contenido de flavonoides totales y en un 97.58 % en el contenido de polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano. Con respecto al efecto del proceso de fermentación en el contenido de grasa, a medida que aumentaron los días de fermentación el porcentaje de grasa fue disminuyendo.
- El efecto del tiempo de fermentación influyó en un 98.06 % en la variación de los datos de los cuatro genotipos concluyendo que a partir del segundo día de fermentación el contenido fenólico de los materiales tiene una disminución significativa tanto en polifenoles totales como en flavonoides totales y es mantuvieron constantes hasta en quinto día de fermentación.
- Mediante la determinación de la pérdida de polifenoles totales durante el proceso de fermentación se pudo determinar que a las 96 h de fermentación los cuatro materiales de cacao ecuatoriano tuvieron una pérdida de polifenoles totales cercanas al 50 % lo cual indica un índice de fermentación óptimo en los granos de cacao.

## 5.2. Recomendaciones

Tomando en cuenta los resultados obtenidos del proyecto de investigación se sugiere tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Asegurarse de que los materiales utilizados para la caracterización de compuesto bioactivos no estén mezclados con otros materiales ya que pueden afectar en los resultados obtenidos.
- Comparar los resultados obtenidos de los análisis con datos realizados mediante otras técnicas de medición, como es el caso del índice de fermentación.
- Asegurarse que los equipos estén correctamente calibrados para que no afecten en los resultados.
- Comprobar que los parámetros de calidad medidos coincidan con los datos reportados por otros investigadores en cacao Nacional.

## **CAPÍTULO VI**

### **BIBLIOGRAFÍA**

## 6.1. Bibliografía

- Afoakwa, E., Kongor, J., Takrama, J., Simpson, A., & Brown, M. (2013). Effects of Pulp Preconditioning on Total Polyphenols, O-diphenols and Anthocyanin Concentrations during Fermentation and Drying of Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *Journal of Food Science and Engineering*, 3(December 2014), 235–245.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840–857. <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Allgrove, J., & Davison, G. (2013). Dark Chocolate/Cocoa Polyphenols and Oxidative Stress. In *Polyphenols in Human Health and Disease* (Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00019-0>
- Arango, G. (2008). *Alcaloides y Compuestos Nitrogenados*. Universidad De Antioquia-Facultad de Química Farmacéutica.
- Ascrizzi, R., Flamini, G., Tessieri, C., & Pistelli, L. (2017). From the raw seed to chocolate: Volatile profile of Blanco de Criollo in different phases of the processing chain. *Microchemical Journal*, 133, 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.024>
- Benítez, A., Villanueva, J., González, G., Alcántar, V., Puga, R., & Quinter, A. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1–9. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>
- Borja, J., Horta, H., Peñaloza, G., Sandoval, A., & Mendez, J. (2022). Antioxidant activity, total polyphenol content and methylxantine ratio in four materials of *Theobroma cacao* L. from Tolima, Colombia. *Heliyon*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09402>

- 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>
- Carrillo, L., Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- 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(January), 100494. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100494>
- de Souza, P. A., Moreira, L. F., Sarmiento, D. H. A., & da Costa, F. B. (2018). Cacao—*Theobroma cacao*. *Exotic Fruits*, 3, 69–76. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00010-1>
- Díaz, D. (2020). *Evaluación de los parámetros de calidad mediante la identificación de las características organolépticas del cacao de exportación en el Ecuador*. Universidad Técnica de Machala.
- Engeseth, N., & Ac Pangan, M. (2018). Current context on chocolate flavor development — a review. *Current Opinion in Food Science*, 21, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.07.002>
- Espín, S., & Samaniego, I. (2016). *Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao-Manual Nro 105* (Instituto). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina.
- Fanning, E., Eyres, G., Frew, R., & Kebede, B. (2023). Linking cocoa quality attributes to its origin using geographical indications. *Food Control*, 151(February), 109825. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109825>

- García, E. (2019). Estudio de la fermentación espontánea de cacao (*Theobroma cacao* L.) y evaluación de la calidad de los granos en una unidad productiva a pequeña escala. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 6, 41–51. <https://revistas.sena.edu.co/index.php/recia/article/view/1635/2914%0Ahttps://revistas.sena.edu.co/index.php/recia/article/view/1635>
- Hernández, R., & Coello, S. (2011). *El proceso de investigación científica*. Editorial Universitaria Cubana.
- INEN. (2018). *NTE INEN 176-5. Granos de cacao. Requisitos* (p. 8). [http://181.112.149.204/buzon/normas/nte\\_inen\\_176-5.pdf](http://181.112.149.204/buzon/normas/nte_inen_176-5.pdf)
- Llerena, W., Samaniego, I., Navarro, M., Ortíz, J., Angós, I., & Carrillo, W. (2020). Effect of modified atmosphere packaging (MAP) in the antioxidant capacity of arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.), and tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) fruits from Ecuador. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, 26. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14757>
- Lloor, G., Amores, M., Vasco, S., Eskes, A., Quiroz, J., Suárez, C., Motamayor, J., Schnell, R., Zambrano, J., Calderón, D., Jiménez, J., Tarqui, E., Rosenquist, E., Lanaud, C., Fouet, O., Argout, X., Valdez, F., Lachenaud, P., Costet, P., ... Subia, C. (2017). *Desarrollo de nichos específicos de cacao con alta productividad y calidad sensorial: experiencia ecuatoriana R.G.*
- López, A. (2017). *Producción y Comercialización de Cacao Fino de Aroma en el Ecuador - Año 2012-2014*.
- Menéndez, L., & Burgos, G. (2021). Efectos de la fermentación y secado en el contenido de polifenoles y alcaloides del cacao. *Dominio de Las Ciencias*, 7, 1280–1304. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.23857/dc.v7i5.2310>
- Montgomery, D. (2004). *Diseño y análisis de experimentos* (Limusa Wil).
- Orozco, F. (2011). *Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo*. Centro de

Investigación Científica de Yucatán, A.C.

- Pallares, A., Estupiñán, M., Perea, J., & López, L. (2016). 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>
- Paredes, N. (2009). Manual de cultivo de cacao para la Amazonía ecuatoriana—Manual No. 76—. In *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-INIAP* (Vol. 76, p. 25). <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4786>
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31, 68–81.
- Perea, J. (2019). *El cacao desde la ciencia: de la semilla al chocolates* (Universida).
- Predan, G. M., Lazăr, D. A., & Lungu, I. I. (2019). Cocoa industry—from plant cultivation to cocoa drinks production. *Caffeinated and Cocoa Based Beverages. The Science of Beverages*, 8, 489–507. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00015-5>
- PROCOMER. (2022a). *Manual técnico-Cosecha de cacao fino y de aroma*.
- PROCOMER. (2022b). *Manual técnico-Poscosecha de cacao fino y de aroma*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10918.pdf>
- Quiroz, J., Mestanza, S., Parada, N., Morillo, E., Samaniego, I., & Garzón, I. (2021). *Catálogo de cultivadores de cacao en Ecuador* (1era. Ed.).
- RAE. (2022). *Alcaloide*. Real Academia Española. <https://dle.rae.es/alcaloide>
- Saltos, H. (2012). *Sensometría: Análisis en el desarrollo de los alimentos procesados* (1ra. ed). Editorial Pedagógica Freire.
- Samaniego, I., Espín, S., Quiroz, J., Ortiz, B., Carrillo, W., García-Viguera, C., & Mena, P. (2020). 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(January). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103448>

Samaniego, I., Espín, S., Quiroz, J., Rosales, C., Carrillo, W., Mena, P., & García-Viguera, C. (2021). Effect of the growing area on the fat content and the fatty acid composition of Ecuadorian cocoa beans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(7), 901–911. <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1884204>

SIPA. (2022). *Reportes Dinámicos del Sistema de Información Pública Agropecuaria*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php>

Stagnati, L., Soffritti, G., Martino, M., Bortolini, C., Lanubile, A., Busconi, M., & Marocco, A. (2020). Cocoa beans and liquor fingerprinting: A real case involving SSR profiling of CCN51 and “Nacional” varieties. *Food Control*, 118, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107392>

Téllez, J., & Cote, M. (2006). Alcohol Etílico: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. *Revista de La Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*, 54, 18. <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>

Velasco, A. (2014). Farmacología y toxicología del alcohol etílico, o etanol. *Anales de La Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, 51, 241–248.

Vera, J., Vallejo, C., Párraga, D., Morales, W., Macías, J., & Ramos, R. (2014). Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*, 7(2), 21–34.

Zerón, A. (2010). Biotipos, fenotipos y genotipos. ¿De qué tipo somos? (Primera parte). *Revista Mexicana de Periodontología*, 1, 36–43.

## 7.1. Anexos

### Anexo 1.

#### *Muestreo de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



Recuento de mazorcas de cacao cosechadas.

Cosecha de cacao.

Pesado de granos de cacao en baba.



Recolección de cinco materiales de cacao para la fase experimental.

Separación de los granos de cacao de la placenta.

Preparación de las muestras de cacao a fermentar.

**ELABORADO: AUTORA**

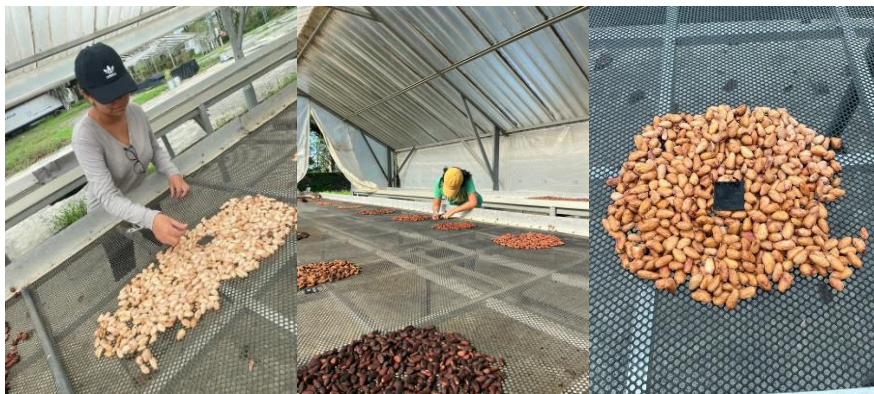
## Anexo 2.

### *Manejo postcosecha de las muestras de cacao ecuatoriano*



Pesado de muestras.

Remoción de las muestras fermentadas.



Secado del cacao.

Remoción del cacao seco.

Muestras de cacao seco.



Determinación de humedad de las muestras de cacao seco.

**ELABORADO: AUTORA**

**Anexo 3.**

*Preparación de muestras previo a los análisis de compuestos bioactivos en cacao*



Descascarillado de cacao.

Molido de muestras de cacao.



Desengrasado de las muestras de cacao.

**ELABORADO: AUTORA**

#### Anexo 4.

*Determinación del porcentaje de grasa, flavonoides, polifenoles e índice de fermentación de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano*



Pesado de muestras desengrasadas.



Extracto de las muestras desengrasadas.



Cuantificación de flavonoides y polifenoles totales de los cuatro materiales de cacao ecuatoriano.



Incubación de las muestras.



Lectura de las muestras de cacao en el espectrofotómetro UV-VIS.

**ELABORADO: AUTORA**