

Correspondence:

Fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) con adición de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzima (PPO's) en la disminución de metales pesados.

Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) With addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and enzyme (PPO's) in the decrease of heavy metals.

Kerly Alvarado Vásquez

Ingeniera en Alimentos
Universidad Estatal de Quevedo
Quevedo-Ecuador
kerly.alvarado2015@uteq.edu.ec
Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0494-7085>

Jaime Vera Chang

Master en Procesamiento de Alimentos
Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Quevedo-Ecuador
jverac@uteq.edu.ec
Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6127-2307>

Diego Tuarez García

Master en Gestión de la Producción
Master universitario en Prevención de
Riesgos Laborales
Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Quevedo-Ecuador
dtuarez@uteq.edu.ec
Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5153-1889>

Frank Intriago Flor

Doctor en Ciencias Agrarias
Universidad Técnica de Manabí
Chone-Ecuador
frank.intriago@utm.edu.ec
Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0377-1930>

Resumen

El cacao es una de las materias primas de gran transcendencia económica y productiva dentro del territorio ecuatoriano y de países donde se desarrolla este tipo de cultivos. La investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y enzima Polifenoloxidasas durante la etapa fermentativa de almendras de cacao. Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo bifactorial. Se evaluó tres porcentajes de levadura los (0, 0.5 y 1%) y tres de enzimas (0, 2.0 y 2.5%). Previo al proceso fermentativo se adecuó las cajas micro-fermentadoras con capacidad de 2 kg. Se controló que la temperatura de fermentación fuese inferior a 50 °C; durante la fermentación se evaluó la temperatura, pH, °Brix; posterior a ello se efectuó un secado hasta lograr una humedad de 7% y se valoró el Índice de semilla, Porcentaje de testa y cotiledón, Prueba de corte, pH, °Brix, análisis sensorial y cadmio. Posterior a ello se obtuvo una pasta de chocolate con pureza al 100%. Los resultados muestran un aumento de la temperatura (43,03 °C) y pH (5,44) en el tratamiento 7 y una disminución en los °Brix (6,04). Las pruebas de corte mostraron efectos significativos sobre los granos fermentados al incluir la levadura y enzima. La evaluación sensorial dio como resultados diferencias estadísticas en el parámetro de sabor (especies). La presencia de cadmio cumplió con los requisitos establecidos en el reglamento 488/2014 (<0,8 mg/kg).

Palabras clave cacao, cadmio, fisicoquímicos, Polifenoloxidasas, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

Cocoa is one of the raw materials of great economic and productive importance within the ecuadorian territory and in countries where this type of cultivation is developed. The research was developed with the objective of evaluating the effect of the addition of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and Polyphenoloxidase enzyme during the fermentation stage of cocoa beans. A Completely Random Design (DCA) with a bifactorial arrangement was used. Three percentages of yeast (0, 0.5 and 1%) and three of enzymes (0, 2.0 and 2.5%) were evaluated. Prior to the fermentation process, the micro-fermentation boxes with a capacity of 2 kg were adapted. Fermentation temperature was controlled to be less than 50 °C; during fermentation, temperature, pH, °Brix were evaluated; After that, drying was carried out until a humidity of 7% was achieved and the seed index, percentage of testa and cotyledon, cutting test, pH, °Brix, sensory analysis and cadmium were evaluated. Subsequently, a chocolate paste with 100% purity was obtained. The results show an increase in temperature (43.03 °C) and pH (5.44) in treatment 7 and a decrease in °Brix (6.04). The cutting tests showed significant effects on the fermented grains when including the yeast and enzyme. The sensory evaluation resulted in statistical differences in the flavor parameter (spices). The presence of cadmium met the requirements established in regulation 488/2014 (<0.8 mg/kg).

Keywords cocoa, cadmium, physicochemicals, *Polyphenoloxidases*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) tiene su transcendencia en el continente americano, países originarios Mesoamérica entre México, Guatemala y Honduras alrededor de su existencia desde hace 2000 años a.C, el cacao es uno de los principales cultivos generadores de ingresos por su excelencia en sabor y aroma es reconocido al nivel mundial, la almendra que posee es utilizada para realizar un subproducto (pasta de cacao) (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao, [ANECACAO], 2015).

Unos de los productos más importantes del Ecuador y principales de exportación es el cacao ubicándose como unos de los mejores del mundo y primero en exportar, actualmente se mantiene posesionado en la categoría de tercer lugar a nivel internacional, representativo por ser unos de los principales rubros del sector agropecuario ecuatoriano y de chocolatería, su producción ayudado a generar recursos y plazas de trabajos a jornaleros y familias campesinas, en las últimas décadas se ha visto que un mal manejo de la post cosecha por lo cual afecta la características organolépticas (Acebo, 2016).

Esto afectando a la cadena agroindustrial por pérdidas de empleos y caída de ingresos, pérdida de fama de nuestro producto de calidad, lo definen al cacao ecuatoriano como el gourmet ya que registra demandas significativas en el mercado mundial, y con la almendra se elabora unos de las mejores exquisiteces de chocolates más finos conocidos de todo el mundo (Burbano, 2011).

Preexisten trazas emitidas por el cadmio y se encuentran en porcentajes en productos alimenticios y en el cacao se asume múltiples forma de su contaminación, puede darse en la parte del proceso de cultivo, en producción y transformación referente en la cadena agroalimentaria, y de forma relevante se va afectando tanto en la pasta, masa y la molienda resultado un chocolate a base de cacao contaminado por concentraciones de este metal pesado

que afectaría directamente a la cadena productiva (industria alimentaria, exportación y consumidor) resultado de manifestación de efectos tóxicos ya que es bioacumulable, cabe recalcar que en la actualidad, la presencia de estos metales tanto cadmio y plomo que abarca el cacao y subproductos su mayor almacenamiento es en la almendra (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, [INVIMA], 2016).

En caso de no existir una fermentación adecuada de la almendra de cacao se debe tomar en cuenta las temperaturas y tiempo el factor desfavorable va ser un subproducto sin ningún valor significativo sensorial de aroma característico del mismo, en este magnífico escenario de proceso fermentativo aparecen sabores, incremento de tonalidad en la almendra por la acción de *polifenol oxidasa*, la utilización de levaduras ayudará al producto final potenciando su calidad organoléptica y más apetecible al consumidor y mejorando conjuntamente la almendra de cacao (Andrade *et al*, 2019).

Con la investigación se propone el mejoramiento de los procesos de fermentación de cacao mediante la adicción de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y enzimas PPOs para el mejoramiento de la calidad sensorial y ver si existe un efecto positivo en disminución de metales pesados en el cacao, se procura adicionar diferentes porcentajes de enzima y levadura en la fermentación, para lo cual se utilizó una variedad de cacao.

La expuesta investigación se realizó en la finca experimental “La Represa”, situado en el Recinto Faita ubicada en San Carlos kilómetro 7.5 Provincia de Los Ríos pertenecientes a los previos universitarios de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, su ubicación Geográfica es de 1° 03' 18" de longitud sur y 79° 25' 24" de longitud oeste, a una altura de 73 metros sobre la superficie del mar, donde fue la adquisición de la materia prima de la mazorca del cacao (Mite *et al.*, 2010).

El objetivo fue validar la fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) con adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y enzimas PPOs en la disminución de metales pesados, analizar el efecto físico – químico que ocurre durante la fase de fermentación aeróbica del cacao, determinar la calidad sensorial en la pasta de cacao (*Theobroma cacao* L.) con la adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y enzima PPOs.

Es de suma importancia mencionar que este proyecto busca minimizar los porcentajes de cadmio presentes en la pasta de cacao, en conjunto la levadura y polifenol oxidasa *con* el fin de regular este problema que es perjudicial tanto para el consumidor y el fabricante evitando pérdidas económicas o sanciones e intoxicaciones.

Materiales y métodos

Diseño de la Investigación

En la presente investigación se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo bifactorial 9 tratamientos por 3 repeticiones, se empleó la prueba de rangos múltiples de Tukey al ($p < 0.05$) para la comparación de medias, se trabajó con un software Estadístico de licencia libre InfoStat, para el estudio se evaluó tres porcentajes de levadura los cuales corresponden a los siguientes porcentajes (0%, 0.5% y 1%) que tendrán 3 repeticiones, y tres de enzimas (0%, 2.0%, 2.5%).

Tabla 1. Arreglo de tratamientos.

Nº	Código	Descripción
1	l ₀ e ₀	Sin Levadura (0.0%), sin enzima (0.0%) (testigo)
2	l ₀ e ₁	Sin Levadura con inducción de enzima (PPO's) (2.0%)
3	l ₀ e ₂	Sin Levadura con inducción de enzima (PPO's) (2.5%)
4	l ₁ e ₀	Levadura 0.5%p/p sin enzimas (0.0%) (testigo)
5	l ₁ e ₁	Levadura 0.5%p/p con inducción de enzima (PPO's) (2.0%)
6	l ₁ e ₂	Levadura 0.5%p/p con inducción de enzima (PPO's) (2.5%)
7	l ₂ e ₀	Levadura al 1 % p/p sin enzima (0.0%) (testigo)
8	l ₂ e ₁	Levadura al 1 % p/p con inducción de enzima (PPO's) (2.0%)
9	l ₂ e ₂	Levadura al 1 % p/p con inducción de enzima (PPO's) (2.5%)

Elaborado por: Autores

Proceso de post-cosecha.

Se recolecto alrededor de 30 mazorcas para alcanzar la cantidad requerida para cada tratamiento, se procedió a la recolección de la materia prima variedad Nacional de los frutos de cacao teniendo en cuenta que deben ser de óptima calidad sin ningún problema de enfermedad y frutos no sobre madurados o verdes ya que pueden tener un efecto negativo en el procesamiento de la pasta de cacao.

Fermentación.

se procedió al desgranaje o despulpado de las habas de cacao en cada cuadro de la caja micro-fermentadoras puede contener 2kg, dando lugar al proceso fermentativo cubriendo con ayuda de hojas de verde con la finalidad de ayudar a mejorar el proceso fermentativo, realizando la primera remoción a las 24 horas de fermentación y posterior a los 4 días restantes del estudio, tomando datos de las variables como: Temperatura, pH, °Brix, teniendo en cuenta que no debe superar los 50°C; las cajas micro - fermentadoras cuya capacidad es de 24 espacios, de los cuales 27 celdas corresponden a la presente investigación. Cada separación puede contener 2kg de almendras de cacao, teniendo un total de 54 kg de masa fresca total.

Proceso para la adición de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Se adicionó *Saccharomyces cerevisiae* para determinar si hay mejora en los atributos sensoriales, a su vez conocer si existe una disminución de metales pesados cadmio. La fermentación se llevó a cabo en cajas micro fermentadoras cuya capacidad de abarque es de 2000g por cada cuadrado, las dosis estandarizadas fueron 0.5% (10g) y 1% (20g) Para la activación de la levadura se adiciono 100ml de agua destilada a 40°C. Una vez diluido se adiciono en la masa fresca de cacao en diferentes proporciones dependiendo de la variación del croquis experimental planteado para 9 tratamientos y 3 repeticiones (Unión Europea, 2014).

Proceso para la adición de enzimas Polifenol Oxidasa.

Se utilizó la enzima *polifenol oxidasa* al 2%(40ml) y 2.5%(50ml), para determinar si existe un efecto favorable en el mejoramiento de la calidad sensorial y si a su vez existiría una disminución del contenido de cadmio en el proceso fermentativo, para lo cual su adición fue elaborando una mezcla (Pulpa de fruta banano) el requerimiento de esta fruta es de 8 bananos cuyo promedio es de 150gramos, su utilización requerida es debido al alto contenido en *polifenol oxidasa* se mezcló en 400ml de agua destilada a una temperatura de 37°C, junto a la levadura para la aceleración del proceso, una vez diluido se procedió a adicionar a las almendras frescas de cacao, esta se encarga de degradar una serie de compuestos orgánicos en el interior de los cotiledones actuando como un posible drenador de cadmio (Bernes, (2001); Ramírez, (2001); Vera *et al.*, (2015)).

Secado.

Posteriormente terminada la fermentación se realiza el secado al sol de los granos de cacao, las remociones son de mucha importancia en el momento del secado donde se procedió de una forma homogénea sin confundir las almendras de los otros tratamientos por un tiempo estimado de 6 -7 días con el fin de eliminar contenido de humedad interna del grano, teniendo en cuenta que la humedad para ser almacenada debe estar por debajo de los 7% de humedad recomendable.

Almacenamiento.

Los granos se tomaron por separados en diferentes bolsas de papel, con su identificación para evitar confundir los tratamientos, hay que recalcar que el almacenamiento mejorará la calidad de los granos.

Variables físicos-químicos

Índice de semilla:

Para la realización de esta variable del índice de semilla se tomaron 100 granos de cacao fermentados y secos al azar estas fueron pesadas en una balanza analítica y promediada sus datos, previos a la prueba de corte para determinarlo utilizamos la siguiente ecuación:

$$IS = \frac{\text{Peso en gramos de 100 almendras de cacao fermentada y secas}}{100}$$

Porcentaje de testa y cotiledón:

Para determinar el porcentaje de testa y cotiledón se tomó como referencia el peso de 30 gramos de cacao fermentado y seco, determinando el valor mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Testa} = \frac{(\text{Peso de la testa})}{\text{Peso de 30 gramos de cacao}} * 100$$

Prueba de corte:

Se procedió a la selección de 100 habas de cacao al azar, se pesó y con ayuda de estilete se realiza un corte transversal en las habas secas de cacao para evaluar por medio de un test visual si existió una fermentación óptima o algún defecto de la misma, según la normativa INEN 176:2008.

Determinación del pH:

Se determinó la medición del pH en las muestras de cacao obtenidas, de cada tratamiento y sus repeticiones diariamente con la utilización del pH-metro. Para lo cual se pesó por medio de una balanza 10g de almendras, se trituraba y se adicionaba 100ml de agua destilada tibia y se procedía a medir con el instrumento,

Grados Brix:

Se tomó 10g de muestra de cacao previamente triturados y disueltos en 100ml de agua destilada tibia, se aplicó en el prisma principal de 2 a 3 gotas en el lente se bajó la tapa del lector o prisma y se dejó por 1 minuto para posteriormente proceder a la toma de lectura exponiendo a contra luz para su mejor observación a través del lente. Mismo procedimiento para los días de fermentación.

Análisis sensorial.

Se realizó la respectiva prueba captando las principales características con diez catadores semientrenados a cada panelista se le entregó 9 muestras las cuales cada una tiene un peso de 20 gr por cada muestra y se procedió a valorizar los siguientes atributos sensoriales:

Principales sabores: acidez, amargor, astringencia, cacao.

Generalidades: aroma, sabor, intensidad.

Defecto: quemado, mohosos, sustancias químicas.

Específicos: floral, frutal, dulzor, nuez.

Respectivamente los valores se lo realizaron de una escala ordinal de prueba que fue 1=Ausente, 2=Bajo, 3=Medio, 4=Alto, 5=Muy alto o fuerte.

Prueba de Cadmio.

Se analizó los porcentajes de metales pesados presentes en la almendra de cacao y se verificó si están dentro del rango permitido por la Unión Europea y corroborar si existió una disminución de cadmio después del proceso de fermentación, para determinar dichos porcentajes de cadmio se tomó 1 gramo pasta de cacao diluida previamente con ácido nítrico seguidamente se ingresa en un microondas y se eleva a temperaturas superior a 150°C, se filtra la muestra y se rotula en el equipo de absorción atómica por horno de grafito (Teneda, 2016).

Pasos previos para la obtención de la pasta de cacao con pureza del 100%.

Selección y limpieza de los granos: Se realizó la limpieza de los granos secos extrayendo alguna impureza, materia extraña que contengan los granos.

Tueste de los granos: Se procedió a realizar el tueste de las almendras de cacao a fuego lento 125°C para evitar que se quemen o ahúmen además de quitar la humedad de los granos ya que afectaría a la elaboración de pasta de cacao y por último al análisis sensorial.

Descascarillado de los granos: Para el descascarillado se extrajo la testa del cotiledón y se almacenaron en empaques de papel de despacho.

Triturado de los granos: Con un molino manual se procedió a ingresar la muestra de cacao descascarillada poco a poco durante 4 pasadas para conseguir el diámetro requerido que corresponde a 30-40µm.

Refinamiento de los granos: Para este paso se tomó 1 muestra por cada tratamiento con el fin de realizar la pasta de cacao la cantidad que se determinó fue de 1 kg, se ingresó la muestra en una conchadora cuya cavidad del equipo es de cinco kilogramos.

Conchado: El proceso fue ingresar la muestra constantemente y distribuir la masa hacia las paredes de la conchadora con ayuda de una paleta plástica, para así evitar aglomeramiento y facilitándole el proceso que de la elaboración de la pasta de cacao que llevo 6 horas en alcanzar la textura adecuada.

Moldeado: Una vez terminado el proceso del conchado se esperó que la pasta tome la temperatura ambiente (atemperado de la pasta) y se colocó en los recipientes los cuales por tratamiento se obtuvieron alrededor de 40-46 cubitos con un peso de 20g cada uno. Continuamente se ingresó a refrigeración hasta tomar la consistencia adecuada.

Envoltura: Cuando la pasta está rígida se envolvió con papel aluminio con su respectiva etiquetación dependiendo su tratamiento.

Almacenado: Se almacenó las muestras en fundas plásticas en refrigeración 4°C.

Pasos para la evaluación organoléptica

Posterior a la pasta de cacao envuelta y almacenada se procede a colocar en recipientes hirviendo la muestra en baño maría para derretir a una temperatura de aproximadamente a 45 grados Celsius para la degustación a los panelistas.

Continuamente se colocó la pasta líquida en vasos pequeños para los 9 tratamientos acompañado de servilletas y paletas. A los panelistas se les indica que deben degustar la muestra para captar sabores y aroma es recomendable que este entre un tiempo promedio de 15 a 20 segundos en ese rango de tiempo se puede captar los sabores. Además, el catador debe estar 1 hora antes o después de haber comido otro tipo de alimentos, para que estos sabores no afecten a la catación. Además de que el catador debe enjuagar su boca para quitar el amargor entre tratamientos.

Este proceso se debe continuar por cada muestra de manera individual es aconsejable repetirse la degustación de 2 a 3 veces por muestra o dependiendo de gustador; es recomendable para la siguiente antes de catar debe enjuagar la boca con agua.

Debe existir un tiempo de descanso para proseguir considerar entre 1 a 2 entre muestras. La muestra que haya quedado debe desecharse no debe ser nuevamente almacenada. Se debe desechar las muestras utilizadas y las paletas ya con muestra anterior de pasta de cacao.

Resultados

Efecto de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre las variables físico químicas, sensoriales y concentración de cadmio en el cacao. Variables físico - químicas.

Temperatura.

En la tabla 2, se muestran los promedios que reportan el efecto que tuvo la levadura sobre la temperatura de fermentación, estos demuestran que existió diferencias estadísticas ($P < 0.05$); se puede evidenciar que la acción microbiana provocó cambios con un comportamiento lineal positivo (incremento) en el valor de la temperatura en todos los tiempos (días) de muestreo.

Tabla 2. Efecto de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre la temperatura del cacao en su proceso fermentativo.

Levadura	Temperatura (día 1)	Temperatura (día 2)	Temperatura (día 3)	Temperatura (día 4)
0%	32.04c	39.66b	40.08b	41.48b
0.5%	33.17b	40.01ab	40.47a	42.17ab
1%	33.94a	40.54a	40.78a	43.01a
EEM	1.6542	0.7745	0.6082	1.3304
P<0.05	<0.0001	0.0027	0.0002	0.011

Elaborado por: Autores

pH.

En el mismo sentido, se observó que la variable pH en el proceso de fermentación, también se vio afectado ($P < 0.05$) por efecto de la variable levadura, pudiéndose evidenciar que el valor del pH en todos los tiempos (días) de muestreo incrementó linealmente en función del nivel de adición del compuesto microbiano, demostrando una acción positiva de este factor en estudio (levadura: *Saccharomyces cerevisiae*) en los procesos de fermentación de cacao (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre la pH del cacao en su proceso fermentativo.

Levadura	pH (día 1)	pH (día 2)	pH (día 3)	pH (día 4)
0%	3.49c	4.43c	4.95c	5.20c
0.50%	3.59b	4.48b	5.09b	5.32b
1%	3.67a	4.56a	5.18a	5.44 ^a
EEM	0.1527	0.1154	0.2000	0.2081
P<0.05	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Elaborado por: Autores.

Grados Brix.

En lo que se refiere a los resultados de concentración de los °Brix, no se observó datos concluyentes que determinen un efecto claro del factor en estudio levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), toda vez que, en los días 1 y 4 no se reportaron diferencias estadísticas ($P>0.05$), mientras que en los días 2 y 3, los datos presentaron un comportamiento lineal decreciente ($P<0.05$), condición que demuestra una acción positiva por efecto de la acción microbiana (*Saccharomyces cerevisiae*) en los procesos de fermentación de cacao (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre los °Brix del cacao en su proceso fermentativo

Levadura	°Brix (día 1)	°Brix (día 2)	°Brix (día 3)	°Brix (día 4)
0%	13.47a	11.62a	9.90a	6.18a
0.5%	12.80a	9.96b	9.27a	6.42a
1%	13.31a	9.96b	8.17b	6.04a
EEM	0.6027	1.6663	1.5187	0.3310
P<0.05	0.0821	0.0005	0.0006	0.8679

Elaborado por: Autores.

Variables de prueba de corte.

Los resultados de la mayoría de las variables de prueba de corte estudiadas en la presente investigación no presentaron diferencias estadísticas ($P>0.05$), por lo tanto, podemos indicar que los variables porcentaje de testa, cotiledón, índice de semilla y pizarras, no son influenciados por la acción microbiana (*Saccharomyces cerevisiae*) durante el proceso de fermentación del cacao; sin embargo, la variable elementos fermentados y presentación de almendras violetas, tuvieron un comportamiento distinto ($P<0.05$), demostrando un efecto lineal creciente y decreciente, respectivamente con la aplicación de la levadura (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre las variables de prueba de corte del cacao en su proceso fermentativo.

Levadura	%Testa	%Cotiledón	IS	Fermentados	Vio	Piz
0	15.70	84.30	1.57	62.22b	36.67a	1.44
0.5	14.67	83.33	1.53	74.78a	27.22ab	1.44
1	12.00	88.00	1.50	74.44a	21.78b	1.11
EEM	3.31	3.30	0.057	12.39	13.48	0.33
P<0.05	0.1558	0.1558	0.5192	<0.0001	0.0029	0.6579

Elaborado por: Autores

Variables sensoriales.

Similarmenete a los resultados anteriormente descritos, la mayoría de las variables sensoriales estudiadas no presentaron diferencias estadísticas ($P<0.05$), donde, tan solo variables acidez y otros, fueron influenciadas por la acción microbiana (*Saccharomyces cerevisiae*) durante el proceso de fermentación del cacao; sin embargo, las demás variables estudiadas tuvieron un comportamiento distinto ($P>0.05$) (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre las variables sensoriales del cacao en su proceso fermentativo.

Levadura	Aroma	Acidez	Amargor	Cacao	Nuez	Frutos.	Floral	Especias	Otros	Intensidad	Color
0%	4.17 a	0.73 ab	3.50a	3.80a	2.80a	2.60a	3.17a	0.07a	0.70a	3.77a	4.90a
0.50 %	4.03 a	0.8a	3.50a	3.80a	2.70a	2.87a	3.17a	0.13a	0.37a b	3.77a	5.00a
1.00 %	4.27 a	0.43 b	3.73a	3.77a	3.30a	2.90a	4.40a	0.03a	0.30b	3.63a	4.93a
EEM	0.36 9	0.61 64	0.424 2	0.057 7	1.016 5	0.519 6	0.424 2	0.16	0.678 0	0.244 9	0.163 2
P<0. 05	0.60 47	0.01 07	0.613 8	0.988 8	0.177 1	0.583 9	0.753 1	0.282 00	0.015 7	0.864 5	0.221 3

Elaborado por: Autores

Efecto de una enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre las variables físico químicas, sensoriales y concentración de cadmio en el cacao.

Variables físico - químicas.

Temperatura.

En la Tabla 7, se observa el efecto de una enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre la temperatura del cacao en su proceso de fermentación. Se evidenció que en los días estudio (día 1 al 4 de fermentación) no existió diferencias estadísticas ($P>0.05$) en los valores de la temperatura. Pudiendo recalcar que, de igual manera los comportamientos de los valores fueron erráticos y no lineales.

Tabla 7. Efecto de una enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre la variable temperatura del cacao en su proceso fermentativo.

Enzima	Temperatura (día 1)	Temperatura (día 2)	Temperatura (día 3)	Temperatura (día 4)
0%	32.92a	40.06a	40.51a	42.21a
2%	33.13a	40.04a	40.43a	42.29a
2.5%	33.10a	40.11a	40.38a	42.16a
EEM	0.2000	0.0577	0.1154	0.1150
P<0.05	0.646	0.9482	0.5906	0.9566

Elaborado por: Autores

pH.

En lo referente al efecto de la enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre el pH del cacao en su proceso de fermentación, podemos indicar que hay una respuesta lineal de los valores (excepto en el día 1); presentándose diferencias estadísticas ($P<0.05$) en todos los días de evaluación de la variable (1 al 4). Lo anterior, nos indica que para esta investigación la acción de la enzima (*Polifenol oxidasas*) es consistente y se correlaciona con el incremento del pH.

Tabla 8. Efecto de una enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre la variable pH del cacao en su proceso fermentativo.

Enzima	pH (día 1)	pH (día 2)	pH (día 3)	pH (día 4)
0%	3.55b	4.34c	4.76c	4.92c
2%	3.46c	4.50b	5.08b	5.34b
2.5%	3.74a	4.63a	5.38a	5.70a
EEM	0.2449	0.2449	0.5354	0.6782
P<0.05	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Elaborado por: Autores.

Grados Brix.

En lo referente a la presenta variable, que determina porcentaje de sólidos solubles en base a la solución total (cuantificación de °Brix), podemos indicar que la enzima (*Polifenol oxidasas*) permitió obtener datos que presentaron un comportamiento de linealidad de los valores en respuesta de la adición incremental de la enzima (0, 2 y 2.5%); sin embargo, la adición del producto microbiano solo permitió la expresión estadística significativa ($P < 0.05$) de la variable en el día 3 de muestreo. Es importante manifestar, que el perfil de los valores es congruente con la adición de la enzima en torno a la disminución de los valores de °Brix como evidencia del efecto positivo de la adición de la enzima (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de una enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre la variable °Brix del cacao en su proceso fermentativo.

Enzima	°Brix (día 1)	°Brix (día 2)	°Brix (día 3)	°Brix (día 4)
0%	13.42a	10.78a	9.61a	6.38a
2%	13.16a	10.36a	9.37a	6.93a
2.5%	13.00a	10.40a	8.36b	6.23a
EEM	0.6000	0.4000	1.1532	0.300
P<0.05	0.3606	0.5184	0.0069	0.8908

Elaborado por: Autores.

Variables de prueba de corte.

Con base en los resultados encontrados, indicar que el producto enzimático enzima (*Polifenol oxidasas*) utilizado, provocó solo efectos de criterio estadístico en la variable fermentados (almendras fermentadas) ($P > 0.05$), lo que permite inferir el efecto positivo sobre los procesos fermentativos del cacao, sin embargo, las variables como porcentaje de testa, cotiledón, índice de semilla, presentación de almendras violetas y pizarra, presentaron resultados estadísticos similares ($P > 0.05$) (Tabla 10). Es importante mencionar, que el comportamiento de la variable fermentados en lineal positiva al empleo y efecto del producto enzimático utilizado.

Tabla 10. Efecto de una enzima (Polifenol oxidasas) sobre las variables de prueba de corte del cacao en su proceso fermentativo.

Enzima	%Testa	%Cotiledón	IS	Fermentados	Vio	Piz
0	15.26a	84.74a	1.51a	61.89c	28.22a	1.33a
2	15.41a	84.59a	1.57a	71.33b	28.56a	1.56a
2.5	11.70a	88.30a	1.51a	78.22a	28.89a	1.11a
EEM	3.63	3.63	0.057	5.71	0.57	0.38
P<0.05	0.1112	0.1112	0.5459	<0.0001	0.9841	0.5746

Elaborado por: Autores.

Variables Sensoriales

En relación a las variables sensoriales, en lo general se puede manifestar que los resultados no demostraron diferencias estadísticas ($P>0.05$), excepto para las variables especias y otros (sabores y olores indeterminados), que reportaron la existencia de diferencias estadísticas ($P<0.05$) (Tabla 11) sin un criterio de crecimiento de decrecimiento lineal.

Tabla 11. Efecto de una enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre las variables sensoriales del cacao en su proceso fermentativo.

Enzima	Aroma	Acidez	Amargor	Cacao	Nuez	Frutos secos	Floral	Especias	Otros	Intensidad	Color
0.0	4.20	0.70	3.53	3.93	2.80	2.87	3.23	0.00	0.83	3.93	4.87
%	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a
2.0	4.00	0.60	3.47	3.70	3.10	2.43	2.90	0.30	0.40	3.23	4.97
%	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a
2.5	4.27	0.67	3.73	3.73	2.90	3.07	3.60	0.20	0.13	4.00	5.00
%	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a
EE	0.43	0.16	0.43	0.4	0.48	1.02	1.10	0.33	1.99	1.34	0.21
M	9	32	96		3	3	75	66	08	28	6
P<0	0.49	0.72	0.59	0.61	0.67	0.12	0.15	0.00	<0.0	0.01	0.06
.05	41	24	58	86	21	91	29	49	001	48	34

Elaborado por: Autores

Efecto de la interacción de una enzima (*Polifenol oxidasas*) y una levadura sobre las variables físico químico, sensorial y concentración de cadmio en el cacao.

Variables físico - químicas.

Temperatura.

En la Tabla 12, se presentan los valores de la variable temperatura como respuesta a la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (*Polifenol oxidasas*), observándose que en los días (1 y 3) del proceso fermentativo, existió diferencias estadísticas ($P < 0.05$), sin embargo, en los días 2 y 4, no se evidenció interacción entre los factores estudiados, es importante comentar que fue claro el incremento del valor de esta variable para los tratamientos constituido por la interacción de una levadura por una enzima en sus máximos niveles, que aunque, como se indicara que no en todos los casos existió diferencias estadísticas, la tendencia numérica se mantuvo en favor de uso de los factores en su nivel máximo.

Según Pallares *et al* (2016), menciona que una temperatura máxima de fermentación debe ser entre 45 a 48 grados centígrados para que exista una pérdida significativa de humedad y por ende una fermentación de calidad en el grano, impedimento que exista una germinación de las almendras de cacao. El proceso fermentativo termina con la muerte del embrión además la disminución total de bacterias y microorganismos (Peng *et al.*, 2019).

Seguido del contexto anterior Salous *et al.*, (2019), indican que los microorganismos ayudan a mejorar la fermentación además de brindar mayores características sensoriales cumple un papel importante en el proceso fermentativo reduciendo significativamente el tiempo de fermentación cumpliendo su características como un reductor, acelerador de tiempo fermentativo el cual es óptimo para la productividad en las industrias chocolateras y alimentarias con el objetivo de no reducir su calidad es más fomentar la rentabilidad, producción cacaotera de este modo mejorando sus cualidades sensoriales y aumentando su aroma, sabores y olores.

Continuamente Pallares *et al.*, (2016), califican que la enzima *polifenol oxidada* es una fuente natural de azúcares que permite activar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y esto tiene un efecto positivo en la fermentación de las almendras de cacao reduciendo tiempo del proceso fermentativo, además da un aporte a los granos de cacao muy significativos (Otsuki *et al.*, 2013).

Tabla 12. Efecto de la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (Polifenol oxidasas) sobre la temperatura del cacao en su proceso fermentativo.

Factor levadura	%Adición PPO	Temperatura (día 1)	Temperatura (día 2)	Temperatura (día 3)	Temperatura (día 4)
0	0	31.97b	39.99a	40.17ab	41.40a
	2	32.07b	39.53a	40.00b	41.57a
	2.5	32.97b	39.67a	40.07ab	41.47a
0.5	0	33.00ab	39.90a	40.57ab	42.20a
	2	33.27ab	40.00a	40.47ab	42.17a
	2.5	33.00ab	40.13a	40.37a	42.13a
1	0	33.80a	40.50a	40.80a	43.03a
	2	34.07a	40.60a	40.83a	43.13a
	2.5	33.97a	40.53a	40.70ab	42.87a
EEM		0.0333	0.0666	0.0333	0.04714
P<0.05		0.9979	0.2581	0.9513	0.9999

Elaborado por: Autores

pH.

En el mismo sentido, al estudiar la variable pH como respuesta a la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (*Polifenol oxidasas*), se observó que en los días (1 y 2) del proceso fermentativo, existió diferencias estadísticas ($P < 0.05$), sin embargo, en los días 3 y 4 no se identificó el mismo comportamiento estadístico ($P > 0.05$) para la interacción entre los factores estudiados. Se debe indicar también, que con excepción del día uno de registro de esta variable, en los demás días (2, 3 y 4), se observó una tendencia lineal creciente de los valores del pH como efecto de la infección de factores (Tabla 13)

Amorim *et al.*, (2017), argumentan que el pH influye directamente en el proceso fermentativo y es necesario encontrarse en rangos como mínimo (4.5) y máximos de (5.5) para alcanzar una fermentación formidable y atributos sensoriales de calidad, Mismos valores que tienen total concordancia con la presente investigación debido a que se alcanzaron esos rangos de pH en la fermentación anaerobia.

Conforme Castillo *et al.*, (2018), redactan que en la fermentación se debe controlar el pH ya que va a determinar la calidad final de un alimento por los severos daños que ocasionan en la salud por lo que es necesario que su pH de 6 que es el más óptimo.

Tabla 13. Efecto de la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre pH del cacao en su proceso fermentativo.

Factor levadura	%Adición PPO	pH (día 1)	pH (día 2)	pH (día 3)	pH (día 4)
0	0	3.44e	4.33a	4.63f	4.76g
	2	3.34f	4.30a	4.96d	5.23d
	2.5	3.69bc	4.57bc	5.26b	5.61b
0.5	0	3.56d	4.35e	4.76e	4.92f
	2	3.46e	4.49cd	5.12c	5.34cd
	2.5	3.74ab	4.61b	5.39a	5.70ab
1	0	3.64cd	4.45d	4.89d	5.07e
	2	3.58d	4.53bcd	5.17bc	5.45c
	2.5	3.78a	4.70a	5.49a	5.79a
EEM		0.0223	0.023	0.0124	0.0179
P<0.05		0.0027	<0.0109	0.468	0.3238

Elaborado por: Autores.

Grados Brix.

Por otra parte, investigando la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre la respuesta de la variable °Brix, se observó que en los días (1 y 4) de fermentación del cacao, los resultados no presentaron diferencias estadísticas ($P>0.05$), sin embargo, en los días 2 y 3 se pudo observar interacción entre los factores ($P<0.05$), aunque las respuestas no mostraron un efecto lineal creciente por efectos de la relación incremental de los niveles de la levadura por la enzima (Tabla 14).

Según Gálvez (2019), indica que los grados brix van en función con la fermentación los datos obtenidos muestran un comportamiento lineal decreciente similar a los que se representan en la presente investigación. Razón por la durante la fermentación su concentración de azúcares disminuye, y garantiza que el producto semi - elaborado o final contenga propiedades o cualidades enriquecidas.

Tabla 14. Efecto de la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre los °Brix del cacao en su proceso fermentativo.

Factor levadura	%Adición PPO	°Brix (día 1)	°Brix (día 2)	°Brix (día 3)	°Brix (día 4)
0	0	13.73a	11.83a	11.10a	6.33a
	2	13.50a	11.33ab	7.90c	5.50a
	2.5	13.17a	11.70a	10.70a	6.70a
0.5	0	13.37a	10.50abc	10.13ab	7.07a
	2	12.70a	10.53abc	9.27abc	6.50a
	2.5	12.33a	8.83c	8.40bc	5.70a
1	0	13.17a	10.00abc	7.60c	5.73a
	2	13.27a	9.20bc	7.90c	6.10a
	2.5	13.50a	10.67abc	9.00abc	6.30a
EEM		0.2027	0.48070	0.7070	0.3741
P<0.05		0.4435	0.0497	0.0001	0.7042

Elaborado por: Autores.

Variables de prueba de corte.

Con base en los resultados de las variables de prueba de corte, se observa que, para el porcentaje de testa, cotiledón, índice de semilla, presentación de almendras violetas y pizarras, no existen diferencias estadísticas ($P>0.05$) por efecto de la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (*Polifenol oxidasas*), sin embargo, en lo referente a la variable fermentados, los resultados demuestran un perfil de datos que tienen tendencia lineal creciente, además de, diferencias estadísticas ($P<0.05$) como respuesta a la interacción de los factores (Tabla 15).

Referente al investigador Álvarez *et al.*, (2010), señalan que esta prueba es determinante en la fermentación ya que se evalúa la cantidad de granos que alcanzaron una buena fermentación, mediana, violetas y pizarras entre más características que se evalúan en este principio, a su vez es clave principal para las industrias alimentarias dedicadas a la transformación del grano, sugiere que la se remocione en rangos homogéneos es decir cada 24 horas constantemente durante los días de fermentación.

Por consiguiente, Quintana *et al.*, (2015), mencionan que es necesario realizar pruebas a las almendras de cacao (índice de semilla, porcentaje de testa y cotiledón, índice de grano), ya que estos porcentajes serán determinantes en el manejo de poscosecha del cacao, dichos valores resultantes se asemejan a los encontrados en esta investigación y con referencia a la norma INEN176.

Tabla 15. Efecto de la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (Polifenol oxidasas) sobre las variables de prueba de corte del cacao en su proceso fermentativo.

Factor levadura	%Adición PPO	%Testa	%Cotiledón	IS	Fermentados	Vio	Piz
0	0	15.56	84.44	1.56	56.67d	37.33	4.33
	2	18.11	81.89	1.58	63.67cd	36.67	2.00
	2.5	13.44	86.56	1.56	66.33c	36.00	1.67
0.5	0	16.44	83.56	1.53	61.67cd	27.67	3.00
	2	17.78	82.22	1.56	75.00b	25.00	2.67
	2.5	9.78	90.22	1.52	87.67a	29.00	1.33
1	0	13.78	86.22	1.45	67.33c	19.67	2.33
	2	10.33	89.67	1.58	75.33b	24.00	2.00
	2.5	11.89	88.11	1.45	80.67ab	21.67	1.00
EEM		1.51	1.51	0.020	2.49	1.22	0.12
P<0.0		0.313		0.918		0.926	0.963
5		2	0.3132	6	0.0003	0	9

Elaborado por: Autores.

Variables sensoriales.

Para este grupo de variables, se puede indicar que, los resultados no demuestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$), excepto para las variables acidez, especias, otros e intensidad, que presentaron cambios en su comportamiento estadístico ($P < 0.05$), por efecto de la interacción entre los factores estudiados (Tabla 16), cabe mencionar que no se evidenció un criterio de crecimiento lineal creciente o decreciente de los valores de respuesta por efecto de la de los niveles de levadura y enzima, excepto para acidez, cuya tendencia fue evidentemente decreciente.

Según Quevedo *et al.*, (2018), el método fermentativo empleado determinara la calidad sensorial desarrollando aroma, sabor, color resultante del licor de cacao. Empezando por una fermentación microbiana donde actúa las levaduras ayudando a integrarse y activándose reduciendo más rápido la concentración de mucilago, además de producir esteres de aromas. La aplicación productores de aroma, sabor durante la fermentación es ideal para potenciar las cualidades presentes en el grano, también argumenta que gracias al drenaje el grano alcanza o logra tener menor contenido de humedad interna lo cual favorece y disminuye el tiempo de secado al sol sin perder propiedades. Los resultados que se obtuvieron son significativos positivos por la adición de levaduras al proceso fermentativo.

Tabla 16. Efecto de la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre las variables sensoriales del cacao en su proceso fermentativo.

Factor levadura	%Adición PPO	Aroma	Acidez	Amargor	Cacao	Nuez	Frutos secos	Floral	Espicias	Otros	Intensidad	Color
0	0	4.30a	0.80ab	3.20a	3.80a	2.50a	2.20a	3.30a	0.00b	1.00a	3.80ab	4.80a
	2	3.90a	0.90ab	3.50a	4.10a	2.60a	3.60a	3.70a	0.00b	0.70abc	4.20ab	5.00a
	2.5	4.30a	0.50bc	3.90a	3.90a	3.30a	2.80a	2.70a	0.00b	0.80ab	3.80ab	4.80a
0.5	0	4.10a	0.50bc	3.60a	3.80a	3.10a	2.70a	2.80a	0.00b	0.40abc	3.70ab	4.90a
	2	4.10a	0.50bc	3.30a	3.80a	3.00a	2.10a	2.70a	0.00b	0.00c	3.30ab	5.00a
	2.5	3.90a	1.40a	3.50a	3.50a	3.20a	2.50a	3.20a	0.10ab	0.00c	2.70b	5.00a
1	0	4.20a	0.80ab	3.70a	3.80a	2.80a	2.90a	3.40a	0.20ab	0.70abc	3.80ab	5.00a
	2	4.00a	0.40bc	3.70a	3.50a	2.50a	2.90a	3.10a	0.40a	0.40abc	3.80ab	5.00a
	2.5	4.60a	0.10c	3.80a	3.90a	3.40a	3.40a	4.30a	0.00b	0.10bc	4.40a	5.00a
EEM		0.238	0.488	0.231	0.2309	0.2357	0.4678	0.6046	0.1414	0.1247	0.476	0.0666
P<0.05		0.6431	0.4946	0.7859	0.7480	0.8868	0.1075	0.1532	0.0254	0.7657	0.1631	0.4809

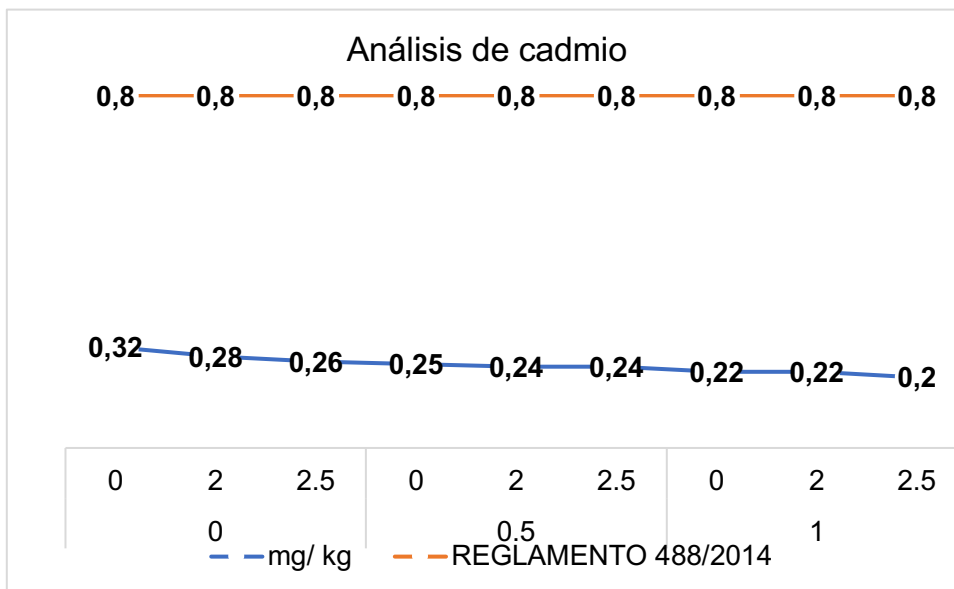
Elaborado por: Autores.

Concentración de cadmio.

Con base en los resultados experimentales descriptivos de la concentración de Cadmio, se puede indicar que se observa una interacción entre el factor levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (*Polifenol oxidasas*), siendo este un efecto positivo sobre los productos fermentados del cacao, por cuanto para la industria se ve favorable la reducción de la concentración de este elemento químico contaminante (gráfico 1).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación, ([FAO], 2019), menciona que con la utilización de levadura ayuda a la minimización de cadmio en las almendras de cacao y eficientemente en el producto semielaborado o final (chocolate) de este modo mejorando la exportación y productividad interna, externa y se evidencio y reducción del tiempo fermentativo.

Gráfico 1 Efecto de la interacción levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por enzima (*Polifenol oxidasas*) sobre las concentraciones de Cadmio del cacao en su proceso fermentativo.



Elaborado por: Autores

La realización del análisis económicos que se llevó a cabo para los diferentes tratamientos que se efectuaron en la investigación nos muestra los siguientes resultados, el tratamiento T0 – T4 son los que generaron los menores costos de la investigación, mientras que los tratamientos T5 y T9 son los que presenta mayor costo esto se debe a la mayor cantidad de Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y Enzima (*Polifenol oxidasas*) que adiciono a las almendras de cacao para la presente investigación y para los diferentes tratamientos.

El costo que se determinó para la elaboración de pasta de cacao no tiene variaciones entre los tratamientos ya que se obtuvo por cada kilogramo de muestra de cacao molida un costo de \$5.85 la producción de 45 barras que quedan después del proceso de la elaboración de pasta de cacao con un peso de 20 gramos generando un costo unitario de \$0.13 centavos, esto nos genera un costo por tratamiento de \$17.55 todos los tratamientos tuvieron el mismo valor ya que se procesó la misma cantidad de cacao es decir un kilogramo del cual se obtuvo 900 gramos de pasta de cacao.

Conclusiones

Los resultados experimentales del estudio de la interacción de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y una enzima (*Polifenol oxidasas*), presentaron resultados favorables para la disminución del Cadmio en la pasta de cacao según el reglamento establecido por la Unión Europea N° 488/2014.

Si bien es cierto que, en algunas variables físico-químicas, de prueba de corte y sensoriales de la almendra de cacao fermentada se presentan diferencias estadísticas significativas por el empleo de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), los efectos no son concluyente y determinantemente beneficios para todas las variables estudiadas en el proceso de fermentación del cacao. Es importante mencionar, que no existe normativa específica para los valores de estas variables en función de la aplicación de moduladores biológicos (levadura, *Saccharomyces cerevisiae*), sin embargo, se puede indicar que, al compararse con los encontrados por otros autores, los presentes resultados guardan mucha relación (temperatura 32.04 hasta 43.01, pH 3.49 hasta 5.44, °Brix 12.80 hasta 6.18) con los de la literatura.

En el mismo sentido, aunque en algunas variables físico-químicas, de prueba de corte y sensoriales de la almendra de cacao fermentada, se presentan diferencias estadísticas significativas por el empleo de una enzima (*Polifenol oxidasas*), los efectos no son concluyente y determinantemente beneficios para todas las variables estudiadas en el proceso de fermentación del cacao. Similarmente, se puede indicar que no se encuentra en la literatura valores referencia para las variables físico-químicas en función del empleo de enzimas (*Polifenol oxidasas*), sin embargo, al compararse con los encontrados por otros autores, los presentes resultados guardan mucha relación (temperatura 33.10 hasta 42.29, pH 3.46 hasta 5.70, °Brix 13.00 hasta 6.93) con los de la literatura.

Referencias

- Acebo, M. (2016). *Estudios industriales y orientación estratégica para la toma de decisiones para la industria de cacao*. [Tesis de pregrado, Escuela Politécnica del Litoral].
Obtenido de https://www.academia.edu/37635940/Industria_de_Cacao_ESTUDIOS_INDUSTRIALES_ORIENTACION_ESTRATEGICA_PARA_LA_TOMA_DE_DECISIONES
- Álvarez, C., Tovar, L., García, H., Morillo, F., Sánchez, P., Girón, C., y De Farias, A. (2010). Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) usando dos tipos de fermentadores. *Revista científica UDO agrícola*, 10(1), 76-87. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3909942>
- Amorim, A., Reis, Q., René, R., Andrade, G., y Moreira, S. (2017). Influencia de factores agroambientales sobre la calidad del clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) PH-16 en la región cacaotera de Bahia, Brasil. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 4(12), 579.
- Andrade, J., Rivera, J., Chire, G., y Ureña, M. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao *Theobroma cacao* L. de Ecuador y Perú. *Revista Enfoque UTE*, 10(4), 1-12. Obtenido de http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-65422019000400001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Asociación Nacional de Exportadores de Cacao. ([ANECACAO], 2015). *Historia del cacao*. Obtenido de <https://centrosuragraria.com/index.php/revista/article/view/149/342>
- Bernes, E. (2001). The Fungi as a major group of organisms. *Atlas Man Plant Pathol*.
- Burbano, M. (2011). *Ecuador de exportador del mejor cacao del mundo a exportador del mejor chocolate del mundo*. [Tesis de pregrado, FLACSOANDES]. Obtenido de <https://repositorio.flacsoandes.edu.ec/handle/10469/6407>
- Castillo, E., Álvarez, C., y Contreras, Y. (2018). Caracterización fisicoquímica de la cáscara del fruto de un clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) cosechados en Caucagua, estado Miranda. Venezuela. *Revista De Investigación*, 42(95), 154-175. Obtenido de <http://revistas.upel.edu.ve/index.php/revinvest/article/view/7539/4323>

Galvez. (2019). *Efectos del secado en la fermentación y características del cacao (Theobroma cacao L) de almendra blanca var. Carmelo*. [Tesis de pregrado, Escuela Agrícola Panamericana]. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6519>

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. ([INVIMA], 2016). *Programa nacional de vigilancia y control de cadmio en productos derivados del cacao (licor de cacao, chocolate de mesa, cocoa en polvo y chocolatina de leche)*. Obtenido de <https://www.invima.gov.co/documents/20143/441038/Documento-tecnico-Cadmio-en-cacao.pdf/36200805-c21d-c444-ee08-47a0f6c8c230>

Mite, F., Carrillo, M., y Durango, W. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas en Ecuador. *In XII congreso Ecuatoriano de la Ciencia del suelo*. Obtenido de <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/6.-Francisco-Mite.-Cadmio.-INIAP.pdf>

Norma Técnica Ecuatoriana INEN 176. ([NTE INEN 176], 2018). *Granos de cacao. Requisitos*. Obtenido de https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_176-5.pdf

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación. ([FAO], 2019). Documento de debate sobre el desarrollo de un código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por cadmio en el cacao. *J Chem Inf*, 53(9), 1689-1699.

Otsuki, Y., Kumagai, T., Nakamura, H., Taguchi, K., y Mori, N. (2013). Emissions measurement system for hybrid and plug-in hybrid electric vehicles using intermittent sampling strategy (No. 2013-01-1047). *SAE Technical Paper*. doi:<https://doi.org/10.4271/2013-01-1047>

Pallares, A., Estupiñan, M., Parea, J., y 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. doi:<https://doi.org/10.18273/revion.v29n2-2016001>

Peng, X., Du, C., Yu, H., Zhao, X., Zhang, X., y Wang, X. (2019). Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from water yam (*Dioscorea alata*). *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 676-684. doi:<https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1634645>

Quevedo, J., Romero, J., y Tuz, G. (2018). Calidad físico química y sensorial de granos y licor de cacao (*Theobroma Cacao*.) Usando cinco métodos de fermentación. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(1), 115-127. Obtenido de <https://ceema.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/172>

- Quintana, L., Gómez, S., García, A., y Matínez, N. (2015). Caracterización de tres índices de cosecha de cacao de los clones CCN51, ICS60 e ICS 95, en la montaña santandereana, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 252-265. Obtenido de <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1284/1620>
- Ramírez, A. (2001). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Revista Anales de la Facultad de Medicina*, 63(1), 51-64. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/379/37963107.pdf>
- Salous, A., Angulo, A., y Solís, L. (2019). Acceleration of cocoa fermentation through the action of bacteria (*Acetobacter aceti*) and yeast (*Saccharomyces cerevisia*). *Espirales Revista Multidisciplinaria de Investigación*, 3(28), 1-20. Obtenido de <http://revistaespirales.com/index.php/es/article/download/572/464>
- Teneda, W. (2016). *Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao (Theobroma cacao L) Variedad Nacional y CCN-51* (1ra ed.). Universidad Internacional de Andalucía. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=664426>
- Unión Europea. (2014). *Reglamento (UE) No 488/2014 de la comisión de 12 de mayo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios*. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0488&from=SL>
- Vera, J., Vallejo, C., Párraga, D., Macías, J., y Ramo, R. M. (2015). Atributos físico-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao L.*) en el Ecuador. *Revista Ciencia Y Tecnología*, 7(2), 21–34. Obtenido de <https://doi.org/10.18779/cyt.v7i2.139>
- Vié, M. (2006). Las escrituras que privilegian la imagen: cuatro casos. *Revista Desacatos*, 22, 37-63. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/desacatos/n22/n22a2.pdf>