

## Efectos de dos métodos fermentativos en cacao (*Theobroma cacao* L.) trinitario, inducido con *Rhizobium japonicum* para disminuir cadmio

### Effects of two fermentative methods on cacao (*Theobroma cacao* L.) Trinitario, induced with *Rhizobium japonicum* to reduce cadmium

Jaime Fabián Vera–Chang<sup>a</sup>  [jverac@uteq.edu.ec](mailto:jverac@uteq.edu.ec)

Juan José Reyes–Pérez<sup>b</sup>  [jreyes@uteq.edu.ec](mailto:jreyes@uteq.edu.ec)

Jorge Ismael Benavides–Vera<sup>a</sup>  [jbenavidesv@uteq.edu.ec](mailto:jbenavidesv@uteq.edu.ec)

Frank Guillermo Intriago–Flor<sup>b</sup>  [frank.intriago@utm.edu.ec](mailto:frank.intriago@utm.edu.ec)

Luis Humberto Vásquez–Cortez<sup>b</sup>  [lvasquez7265@utm.edu.ec](mailto:lvasquez7265@utm.edu.ec)

Maddela Naga–Raju<sup>b</sup>  [raju.maddela@utm.edu.ec](mailto:raju.maddela@utm.edu.ec)

Kerly Estefanía Alvarado–Vásquez<sup>b</sup>  [kalvarado6940@utm.edu.ec](mailto:kalvarado6940@utm.edu.ec)

Victor Lovani Castro–Triana<sup>c</sup>  [victorcastror2019@gmail.com](mailto:victorcastror2019@gmail.com)

<sup>a</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo

<sup>b</sup>Universidad Técnica de Manabí

<sup>c</sup>Universidad de Guayaquil

Recibido: 05/01/2023 Aceptado: 22/06/2023

**Citar, APA:** Vera–Chang, J. F., Benavides–Vera, J. I., Vásquez–Cortez, L. H., Alvarado–Vásquez, K. E., Reyes–Pérez, J. J., Intriago–Flor, F. G., Naga–Raju, M. y Castro–Triana, V. L. (2023). Efectos de dos métodos fermentativos en cacao (*Theobroma cacao* L.) trinitario, inducido con *Rhizobium japonicum* para disminuir cadmio. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 10 (1), 95–106. <https://doi.org/10.23850/24220582.5460>

**Resumen** En el mundo se producen 7,5 millones de toneladas de chocolate, y el 64 % se consume como chocolate relleno. En el año 2012, la Unión Europea indicó los niveles de cadmio no debían superar los 0,8 mg kg<sup>-1</sup> en productos con una base de pasta de cacao del 70 %. El propósito de esta investigación fue evaluar la efectividad de *Rhizobium japonicum* en la disminución de cadmio presente en semillas de cacao. Por lo cual, se aplicó tres concentraciones de *Rhizobium japonicum* 0 ml, 300 ml y 600 ml por cada dos kilos de masa fresca de cacao variedad Trinitario, para la fermentación se aplicó dos métodos por Rohan y hieleras en dos fincas (Los Ríos y Guayas). Se utilizó un diseño completamente al Azar Trifactorial (12 tratamientos y 2 repeticiones), evaluándose 24 semillas en total, las variables de calidad en la semilla evaluadas fueron: pH, temperatura, porcentaje de fermentación, índice de semilla, prueba de testa y cotiledón. El análisis sensorial se determinó mediante un panel de catadores semientrenados, para el análisis de cadmio se realizó con digestión ácido nítrico perclórica por espectrometría de ICP OES. Durante la fermentación existió un aumento creciente del pH (3,6 – 4,2), temperatura (27 – 40,2 °C), el índice de semilla presentó el mayor promedio en el T5 (1,65 g), el contenido de cadmio disminuyó en un 79 %, por el método de fermentación en hieleras en la provincia de Los Ríos y un 78 %, por el método de fermentación en cajas Rohan en la provincia del Guayas. *Rhizobium japonicum* puede considerarse una especie potencial para disminuir cadmio en la almendra de cacao cultivado por encima de los niveles permisibles.

**Palabras clave:** Normativa, microorganismo, perfil sensorial, análisis, metales pesados, concentraciones.

**Abstract** 7.5 million tons of chocolate are produced worldwide, and 64 % is consumed as filled chocolate. In 2012, the European Union indicated cadmium levels should not exceed 0,8 mg kg<sup>-1</sup> in products with a cocoa paste base of 70 %. The goal in this research was to evaluate the effectiveness of *Rhizobium japonicum* in decreasing cadmium present in cocoa beans. Therefore, three concentrations of *Rhizobium japonicum* 0 ml, 300 ml and 600 ml were applied for every two kilos of fresh mass of Trinitario cocoa, for fermentation two methods were applied by Rohan and coolers in two farms (Los Ríos and Guayas). She used a completely random Trifactorial design (12 treatments and 2 repetitions), evaluating 24 seeds in total, the quality variables in the seed evaluated were: pH, temperature, percentage of fermentation, seed index, test of testa and cotyledon. The sensory analysis was determined by a panel of semi-trained tasters, for the analysis of cadmium was performed with perchloric nitro acid digestion by spectrometry of ICP OES. During fermentation there was an increasing increase in pH (3,6 – 4,2), temperature (27 – 40,2 °C), the seed index showed the highest average in T5 (1,65 g), cadmium content decreased by 79 %, by the method of fermentation in rows in the province of Los Ríos and 78 %, by the method of fermentation in Rohan boxes in the province of Guayas. *Rhizobium japonicum* can be considered a potential species to decrease cadmium in cocoa almond grown above permissible levels.

**Keywords:** Regulations, microorganism, sensory profile, analysis, heavy metals, concentrations.

## Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es considerado una especie arbórea de gran importancia, ya que su fruto suele emplearse como materia prima en el sector industria. La pepa de oro, como también se le conoce es un fruto tropical que se cultiva principalmente en el litoral y en la amazonia, siendo esta actividad el sustento de familias que se dedican principalmente a su cultivo (Cruz y Pereira, 2019).

A nivel de producción en Ecuador, su cultivo está ligado principalmente a las provincias de Los Ríos, Guayas, Esmeraldas, Manabí, El Oro y Sucumbíos. Ecuador, es considerado el tercer exportador de cacao a nivel mundial (Abad *et al.*, 2020). Siendo la calidad de su cacao apetecible por sus notas sensoriales que lo hace diferente a otros tipos de cacao del mundo (Alvarado *et al.*, 2022).

Actualmente, existe una problemática que afecta sobre todo a los pequeños y medianos agricultores, la cual está relacionada con el contenido de metales pesados en la semilla, hecho que puede darse de forma Natural o Antropogénica, En este sentido, el agricultor suele realizar prácticas que ayudan a disminuir estos metales pesados pero en largo plazo, la aplicación de *Rhizobium Japonicum* en la poscosecha de cacao en la masa fermentativa mejorará el proceso fermentativo además de potenciar la calidad del grano y disminuir la presencia de metales pesados según lo permitido de la Unión Europea 0,80 mg/kg de cadmio (Vásquez *et al.*, 2022), este efecto rápido disminuyendo el tiempo de fermentación un método viable a diferencia de la utilización de enmiendas.

Según Abad *et al.* 2019 en Ecuador es posible evidenciar concentraciones altas de cadmio asociadas a las provincias de Manabí, Esmeraldas, Guayas y El Oro, ya que sus localidades presentan trazas altas de este metal.

La importancia de este trabajo de investigación es potenciar la calidad de granos fermentados y el producto final como un chocolate destacando sus propiedades organolépticas no obstante en investigaciones previas el *Rhizobium Japonicum* se ha realizado la inducción en masa fermentativa en variedad de cacao Nacional y Trinitario. Además, de mejorar la calidad organoléptica y fermentativa en híbridos de cacao, su actividad no afecta el producto final al contrario mejora sus cualidades sensoriales.

El árbol de cacao por su naturaleza tiene la facilidad de absorber metales pesados como el cadmio, plomo y arsénico, finalmente estos elementos se dirigen al fruto penetrando en la testa y llegando al cotiledón. Este hecho biológico, puede considerarse una desventaja a nivel productivo ya que el fruto es la base para la elaboración del chocolate. Por lo cual, en la presente investigación se propone inducir *Rhizobium japonicum* en la masa fermentativa de los granos de cacao, con lo cual se espera disminuir la presencia de este metal pesado en la semilla mejorando la calidad de los granos y minimizar esta problemática a corto plazo, finalmente se espera impulsar en los agricultores la implementación de esta metodología de remediación y así lograr que se acojan a los estándares del Reglamento 2021/1323 que menciona los límites permisibles de 0,80 mg/kg de cadmio (Comisión Europea, 2021).

## Materiales y métodos

### Área de estudio

La investigación se realizó en dos puntos de muestreo: la Finca “2 Hermanos” localizada en el recinto Fruta de Pan en el km 14 vía San Carlos, Provincia de Los Ríos, situada geográficamente en  $-1,124961^{\circ}$  de latitud Sur y  $-79,345739^{\circ}$  de longitud Oeste. La segunda zona donde se extrajeron las almendras de cacao fresco fue en la Hacienda Campo de Valores localizada en Cerecita, Bajada de progreso, Provincia del Guayas, situación geográfica S  $02.34601^{\circ}$  de latitud Sur y  $080,22193^{\circ}$  de longitud Oeste.

### Proceso de post cosecha

Al momento de cosechar las mazorcas de cacao se consideró aquellas que se encontraron en su grado fisiológico de maduración, evitando las mazorcas enfermas.

### Despulpado

Una vez colectadas, a cada mazorca se le realizó un corte transversal para extraer el grano “despulpado”, posteriormente las almendras frescas de cacao se depositaron en recipientes separados. Se empleó 2 kg por cada tratamiento, en la caja micro - fermentadora.

### Fermentadores

El proceso de fermentación se realizó con ayuda de dos métodos, el primero utilizando caja Rohan (micro - fermentación) con capacidad de 16 cavidades, de los cuales 12 pertenecen a la presente investigación utilizando 24 kg de almendras de cacao, mientras que para el segundo se utilizó 3 hieleras plásticas con capacidad 100 kg de cacao fresco, pero se colocarán 6 sub-muestras en cada hielera plástica dependiendo de la inducción. Cada separación puede contener 2 kg de granos de cacao fresco, el tiempo que se utilizó fue de 5 días, durante los días de fermentación, donde se observó las diferentes variaciones y reacciones que sufren las almendras durante el proceso antes mencionado, para este proceso se determinó evaluar las diferentes variables de estudio.

### Inducción de *Rhizobium japonicum*

Se realizó la inducción de *Rhizobium japonicum* a la masa fresca de cacao dependiendo de los arreglos del experimento, con las dosis para cada objeto de estudio fue al 15 % y 30 % estas aplicaciones permiten acelerar el drenaje del mucílago y a su vez determinar el nivel de reducción de cadmio.

### Remociones

Se realizó la remoción pasada las primeras 24 horas y a las 48 horas después de la inducción para que exista la activación del microorganismo y se efectuó en la masa fermentativa. remociones durante el periodo de fermentación, utilizando cajas micro - fermentadoras con las siguientes dimensiones 120\*80\*10 cm con capacidad de 48 kg de cacao fresco, para la fermentación en hielera plásticas con las siguientes dimensiones 120\*60\*20 cm con capacidad de 100 kg de cacao fresco aproximadamente, se controló la temperatura durante este periodo.

### Temperaturas de fermentación

Se procedió a realizar la toma de temperaturas diariamente durante 5 días, lo ideal es que se eleve la temperatura progresivamente no superior a los 50 °C afectando propiedades de las almendras tanto físicas como biológicas.

### Determinación de pH

Para la determinación del pH se utilizó 10 gramos de almendras de las cuales son triturados y luego se diluyen en 90 ml de agua destilada. Este proceso se repite para los objetos estudiados, durante 5 días, de esta manera se obtuvo los datos con ayuda de un pH-metro de la marca pH-meter de rango 0,00 - 14,00.

### Secado

Se procedió a realizar un secado directo al sol con remociones constantes para un secado uniforme, hasta conseguir 7 % de humedad (Dubón, 2016).

### Variables a evaluar

#### Índice de semilla

Se procedió a escoger al azar 100 almendras de cacao fermentadas y secas las cuales fueron pesadas en gramos en una balanza analítica y promediadas. Se utilizó la siguiente Ecuación:

**Ecuación 1.** Índice de semilla.

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

## Prueba de testa y cotiledón

Se realizó por medio de peso de una cantidad considerada de almendras de cacao que son 30 granos de cacao fermentado y seco y de esta manera poder obtener el porcentaje mediante la aplicación de la siguiente Ecuación:

**Ecuación 2.** Prueba de testa y cotiledón.

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

## Análisis Sensorial

Se procedió a tomar 20 gramos de cada muestra, cada evaluador se encarga de verificar si existe un efecto de mejoramiento en las propiedades organolépticas de precursores de sabor y aroma y los análisis se presentarán en gráfico de componentes principales (Silva *et al.*, 2012).

## Determinación de contenido de cadmio

Los análisis de cadmio se realizaron en el laboratorio de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) ubicado en la ciudad de Guayaquil. Las muestras fueron colocadas en una estufa, por 48 h, con el fin de eliminar cualquier vestigio de humedad. Posteriormente, las muestras secas fueron puestas en una licuadora industrial para pulverizar los granos. Una fracción de los granos pulverizados (~500 mg), fue mezclada con una proporción de 6:1 de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, respectivamente.

**Tabla 1**

Estructura ANDEVA

Fuente de Variación		Grados de Libertad
Fuente de Variación	(i*f*z)-1	11
Tratamientos	(i-1)	2
Factor de Inducción	(f-1)	1
Factor Fermentadores	(z-1)	1
Factor Zonas	(i-1)(f-1)	2
Int. Inducción Fermentadores	(f-1)(z-1)	1
Int. Fermentadores*Zonas	(i-1)(z-1)	2
Int. Inducción*Zonas	(i-1)(f-1)(z-1)	2
Int. Inducción*Fermentadores*Zonas	(i*f*z)(r-1)	12
Error Experimental	(i*f*z*r)-1	23
Total	(i*f*z*r)-1	23

Las muestras fueron colocadas en un digestor abierto a una temperatura de 70 °C por 24 H para obtener el digesto se analizado mediante Espectroscopía de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés).

## Diseño estadístico

En la presente investigación se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) Trifactorial con doce tratamientos y dos repeticiones. Como primer factor de inducción se consideró la especie *R. japonicum* (0, 300 y 600 ml) utilizando una muestra de dos kilos de masa fermentativa, el segundo factor se atribuyó a los fermentadores de cacao (Cajas de Maderas, Cooler box), y como tercer factor se consideró las dos zonas de estudio (Los Ríos y Guayas), **Tabla 2 y 3** (Melo *et al.*, 2020).

## Diseño experimental

El diseño experimental o el arreglo de los tratamientos empleados correspondió a un Diseño completamente al azar D.C.A (**Tabla 1**), mientras que para el análisis de los datos se utilizó el ANOVA y en caso de significancia estadística para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey con  $p \leq 0,05$ .

**Tabla 2**

*Factores y niveles en estudio*

	Grados de Libertad	Factores fermentadores	Factor zona
	i0,0 %	f1	z1
Niveles	i15 %	Niveles	Niveles
	i30 %	f2	z2

Nota. La tabla 2 muestra los factores y niveles que se emplearon en la presente investigación.

**Tabla 3**

*Arreglos de tratamientos*

Nº	Código	Descripción
1	i0,f1.z1	Inducción al 0 % fermentación en madera en La zona de Los Ríos. (Testigo)
2	i0,f1.z2	Inducción al 0 % fermentación en madera en La zona de Guayas. (Testigo)
3	i0,f2.z1	Inducción al 0 % fermentación en hielera en La zona de Los Ríos. (Testigo)
4	i0,f2.z2	Inducción al 0 % fermentación en hielera en La zona de Guayas. (Testigo)
5	i1,f1.z1	Inducción al 15 % fermentación en madera en La zona de Los Ríos.
6	i1,f1.z2	Inducción al 15 % fermentación en madera en La zona de Guayas.
7	i1,f2.z1	Inducción al 15 % fermentación en hielera en La zona de Los Ríos.
8	i1,f2.z2	Inducción al 15 % de fermentación en hielera en La zona de Guayas.
9	i2,f1.z1	Inducción al 30 % fermentación en madera en La zona de Los Ríos.
10	i2,f1.z2	Inducción al 30 % de fermentación en madera en La zona de Guayas.
11	i2,f2.z1	Inducción al 30 % de fermentación en hielera en La zona de Los Ríos.
12	i2,f2.z2	Inducción al 30 % de fermentación en hielera en La zona de Guayas.

Nota. En la tabla 3, se presentan los arreglos de los tratamientos el número, código y descripción.

## Resultados y discusión

### Temperatura (°C)

Se pudo observar el efecto ascendente de la temperatura partiendo de 24,9 °C al inicio del experimento, alcanzando un promedio de 43,5 °C, a las 120 horas de culminando el proceso fermentativo. (Tabla 4)

### Potencial de hidrógeno (pH)

En la variable pH, se obtuvo un valor inicial de 3,9, una vez culminado el periodo de fermentación alcanzo un pH de 4,51 (Tabla 5).

### Índice de semilla y porcentaje de testa

En la Tabla 6, se presenta el análisis de varianza para el índice de semilla. Según el ANOVA se

observan diferencias significativas siendo el mayor promedio el T5 (Inducción al 15 % empelando el método fermentación en madera en la zona Los Ríos). Estadísticamente el T5 difiere con el T4 (Inducción al 0 % empelando el método fermentación en hielera plásticas en la zona Guayas (Testigo) con una media de 1,51 y un CV (%) de 5,04.

### Cadmio

En la tabla 7 se presenta el análisis factorial que refleja significancia estadística ( $p \leq 0,05$ ) valor en cadmio para la prueba de Tukey. En la zona Los Ríos la fermentación en cajas de Rohan disminuyo de (1,39 - 0,80 mg/kg) cumpliendose con los estandares de la “Unión Europea”, para este método. La fermentación en hielera plástica fue de (3,29 - 0,69 mg/kg), cumpliendo con la

normativa. Para la provincia de Guayas los valores obtenidos en las cajas Rohan fue de (4,06 - 0,86 mg/kg) y en hielera correspondio a (4,02 - 1,02

mg/kg), con promedio de 2,05 y coeficiente de variación 15,35 y Error estándar 0,27.

**Tabla 4**

*Valores de temperatura (°C) registrados durante el proceso fermentativo con aplicación del Rhizobium japonicum.*

Tratamiento	Temperatura				
	Día1	Día2	Día3	Día4	Día5
1	24,60	28,30	30,50	33,50	39,00
2	22,40	27,10	30,50	33,50	38,50
3	28,30	27,90	31,50	34,00	38,00
4	25,40	28,40	32,50	34,00	38,00
5	24,40	29,50	34,50	36,50	44,50
6	25,70	31,50	35,00	37,00	46,00
7	24,10	33,20	35,00	37,00	46,60
8	22,90	33,00	36,00	37,50	46,50
9	26,60	34,50	36,50	37,50	46,50
10	25,60	34,00	37,00	38,50	47,50
11	24,90	34,50	37,00	39,00	44,60
12	24,70	34,00	37,50	39,50	46,60
Promedio	24,97	31,33	34,46	36,46	43,53
CV(%)	3,21	3,11	3,90	3,19	2,17
E.E	0,75	0,88	1,10	1,19	1,20

Nota. Elaboracion propia

**Tabla 5**

*Valores de potencial de hidrogeno pH registrados durante el proceso fermentativo con aplicación del Rhizobium japonicum*

Tratamiento	pH				
	Día1	Día2	Día3	Día4	Día5
1	3,90	4,00	4,10	4,10	4,22
2	3,90	4,00	4,15	4,20	4,30
3	3,90	4,00	4,15	4,10	4,10
4	3,95	4,00	4,10	4,20	4,25
5	3,90	4,10	4,25	4,35	4,44
6	3,90	4,11	4,23	4,44	4,54
7	3,90	4,10	4,23	4,43	4,62
8	3,90	4,20	4,25	4,45	4,54
9	3,95	4,20	4,30	4,34	4,55
10	3,90	4,10	4,30	4,43	4,66
11	3,90	4,25	4,30	4,42	4,60
12	3,90	4,25	4,30	4,35	4,75
Promedio	3,91	4,11	4,22	4,32	4,51
CV(%)	3,01	3,44	3,10	4,10	3,17
E.E	0,99	0,54	0,88	0,79	1,33

Nota. Elaboracion propia

**Tabla 6**

Valores promedio registrado para índice de semilla (IS) y porcentaje de testa (Testa %) en el estudio de Efectos de dos métodos fermentativos en cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad de origen Trinitario, inducido con microorganismos

Tratamiento	Índice de Semilla (g)			Testa (%)		
1	1,54	a	b	c	14,13	a
2	1,47	a	b	c	14,85	a
3	1,64	a	b		14,00	a
4	1,30			c	13,94	a
5	1,65	a			14,07	a
6	1,40	a	b	c	13,39	a
7	1,63	a	b		12,10	a
8	1,41	a	b	c	9,88	a
9	1,61	a	b		15,57	a
10	1,34		b	c	15,39	a
11	1,64	a	b		12,08	a
12	1,44	a	b	c	11,92	a
<b>Promedio</b>	<b>1,51</b>				<b>13,44</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>5,04</b>				<b>17,88</b>	
<b>E.E</b>	<b>0,05</b>				<b>1,70</b>	

Nota. Elaboracion propia

**Tabla 7**

Valores promedios registrado para Cadmio (Cd) en el estudio de efectos de dos métodos fermentativos en cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad Trinitario, inducido con microorganismos eficientes en la disminución de cadmio

Tratamiento	Detalles	Cd			
1	Inducción al 0 % fermentación en cajas Rohan, en Los Ríos. (Testigo)	1,36		c	a
2	Inducción al 0 % fermentación en cajas Rohan en Guayas. (Testigo)	4,06	a	b	a
3	Inducción al 0 % fermentación en hielera en Los Ríos. (Testigo)	3,29		c	a
4	Inducción al 0 % fermentación en hielera en Guayas. (Testigo)	4,02	a	b	a
5	Inducción al 15 % fermentación en cajas Rohan en Los Ríos.	0,83		c	a
6	Inducción al 15 % fermentación en cajas Rohan en Guayas.	2,64	a	b	a
7	Inducción al 15 % fermentación en hielera en Los Ríos.	2,39		c	a
8	Inducción al 15 % de fermentación en hielera en Guayas.	2,65	a		a
9	Inducción al 30 % fermentación en madera en Los Ríos.	0,80		c	a
10	Inducción al 30 % de fermentación en madera en Guayas.	0,86		b	a
11	Inducción al 30 % de fermentación en hielera en Los Ríos.	0,69		c	a
12	Inducción al 30 % de fermentación en hielera en Guayas.	1,02	a		a
<b>Promedio</b>		<b>2,05</b>			
<b>CV (%)</b>		<b>15,35</b>			
<b>E.E</b>		<b>0,27</b>			

Nota. Elaboracion propia

### Porcentaje de fermentación

En la **Tabla 8**, se indica el análisis físico de prueba de corte donde se observó que existe incremento de almendras bien fermentadas en cuanto a la adición de *Rhizobium japonicum* durante el proceso de fermentación, no existió significancia estadística, según Tukey ( $p \leq 0,05$ ), obteniendo un promedio general 49,17 mientras el Coeficiente de variación 11,64 y Error estándar 4,05.

Según el ANOVA el valor de medianamente fermentadas no se evidencio diferencia significativa entre tratamientos según Tukey ( $p \leq 0,05$ ), con promedio general 31,74; Coeficiente de variación 20,73 y Error estándar 4,65.

De acuerdo con el análisis de varianza, la variable fermentación total, el análisis estadístico no presentó significancia estadística entre tratamientos según Tukey ( $p \leq 0,05$ ), con promedio general de 80,92, coeficiente de variación igual a 7,89, error estándar de 4,51. Considerando las normas INEN 076 2018, es un grano cacao Superior Selecto (C.S.S)

### Análisis de componentes principales

Es posible observar en la **Tabla 9** el estudio de prueba sensorial. Según al análisis de componentes de varianza evaluando el atributo

“aroma cacao” los tratamientos T2 (Inducción al 0 % fermentación en madera en Guayas. (Testigo)), obtuvieron el mayor perfil a sabor floral. Dado por un porcentaje igual al 53,3 %.

El atributo sensorial floral agrupa los tratamientos: T1 (Inducción al 0 % fermentación en madera en Los Ríos. (Testigo)), el T7 (Inducción al 15 % fermentación en hielera en Los Ríos), T8 (Inducción al 15 % de fermentación en hielera en Guayas), T5 (Inducción al 15 % fermentación en madera en Los Ríos), T9 (Inducción al 30 % fermentación en madera en Los Ríos), respectivamente en los atributos frutales/sabor cacao/ sabor nuez dentro del grupo de los denominado arriba, con acentos a sabor a cacao T10 (Inducción al 30 % de fermentación en madera en Guayas).

Los tratamientos que presentaron atributos frutales fueron T11 (Inducción al 30% de fermentación en hielera en Los Ríos) con sabor a cacao moderado, el vigor fuerte de Astringencia lo presenta T3 (Inducción al 0 % fermentación en hielera en Los Ríos. (Testigo) el amargor moderado presentó el T12 (Inducción al 30 % de fermentación en hielera en Guayas), T4 (Inducción al 0 % fermentación en hielera en Guayas. (Testigo) con tonalidades y roma nuez/aroma fruta/aroma cacao, como podemos observar en la **Figura 1**.

**Tabla 8**

Valores promedios registrados para bien fermentadas, medianamente fermentadas, fermentación total en el estudio de efectos de dos métodos fermentativos en cacao Trinitario, inducido con microorganismos

Tratamientos	Bien fermentadas		Medianamente fermentadas		Fermentación Total		NTE INEN 0176 2018
1	51,50	a	35,50	a	87,0	a	C.S.S
2	51,50	a	31,00	a	82,5	a	C.S.S
3	50,50	a	32,50	a	83,0	a	C.S.S
4	52,00	a	31,50	a	83,5	a	C.S.S
5	48,50	a	32,50	a	81,0	a	C.S.S
6	48,00	a	27,50	a	75,5	a	C.S.S
7	45,00	a	30,00	a	75,0	a	C.S.S
8	47,00	a	32,50	a	79,5	a	C.S.S
9	52,00	a	34,00	a	86,0	a	C.S.S
10	56,50	a	22,50	a	79,0	a	C.S.S

Tratamientos	Bien fermentadas		Medianamente fermentadas		Fermentación Total		NTE INEN 0176 2018
11	42,00	a	38,50	a	80,5	a	C.S.S
12	45,50	a	33,00	a	78,5	a	C.S.S
Promedio	49,17		31,75		80,92		
CV(%)	11,64		20,73		7,89		
E.E	4,05		4,65		4,51		

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ). Cacao Superior Selecto (C.S.S).

**Tabla 9**

*Análisis de componentes principales correspondiente a la prueba sensorial de propiedades organolépticas*

Có-digo	Re-peti-ción	Trata-mien-to	Aro-ma cacao	Aro-ma floral	Aro-ma frutas	Aroma nuez	Dul-zor	Tex-tura	Astrin-gencia	Sabor cacao	Sabor nuez	Sabor Acido	Sabor frutal	Sabor floral
R1.i0.f1.z1	I	1	0,75	0,35	0,35	1,50	1,00	2,50	2,50	1,25	2,00	0,90	0,35	0,20
R1.i0.f1.z2	I	2	1,80	3,00	1,00	0,20	0,00	0,30	1,80	0,00	1,00	0,10	1,00	3,00
R1.i0.f2.z1	I	3	4,00	1,00	2,00	1,75	1,50	2,50	1,25	3,00	2,10	0,90	0,75	0,35
R1.i0.f2.z2	I	4	2,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	2,00	1,00	0,00	1,00	0,30
R1.i1.f1.z1	I	5	2,00	1,00	0,50	0,40	0,00	0,70	2,40	0,80	1,00	2,00	0,50	1,00
R1.i1.f1.z2	I	6	3,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	3,00	1,00	2,00	1,00	1,00
R1.i1.f2.z1	I	7	1,00	1,25	0,35	2,50	0,90	2,25	1,90	1,75	2,50	1,85	0,20	0,20
R1.i1.f2.z2	I	8	1,00	0,00	0,00	1,00	2,00	0,10	2,00	2,00	0,00	0,10	1,00	2,00
R1.i2.f1.z1	I	9	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	4,00	0,00	0,30	0,00	1,00
R1.i2.f1.z2	I	10	1,00	0,00	1,00	3,00	0,00	0,10	0,00	3,00	3,00	0,30	0,00	1,50
R1.i2.f2.z1	I	11	1,50	0,50	0,00	1,00	0,20	0,40	0,80	3,00	4,00	0,10	0,00	0,50
R1.i2.f2.z2	I	12	1,00	0,00	0,00	1,00	2,00	0,10	3,00	3,00	2,00	0,80	0,00	0,20
R2.i0.f1.z1	II	13	2,00	1,00	0,00	1,10	0,20	0,10	1,00	2,00	2,00	0,80	0,00	3,00
R2.i0.f1.z2	II	14	2,00	2,00	0,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	0,00	3,00
R2.i0.f2.z1	II	15	4,00	2,00	3,00	2,00	0,00	2,00	4,00	3,00	1,00	1,00	1,00	0,20
R2.i0.f2.z2	II	16	2,50	0,60	1,25	2,25	1,00	1,00	2,25	3,00	2,75	1,00	0,35	0,20
R2.i1.f1.z1	II	17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	3,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
R2.i1.f1.z2	II	18	2,25	1,00	0,25	3,50	0,75	1,75	1,00	1,25	2,75	1,00	0,90	1,50
R1.i1.f2.z1	II	19	0,60	0,00	0,00	0,30	0,00	0,01	2,54	2,00	4,00	0,30	0,00	0,00
R2.i1.f2.z2	II	20	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,20	0,00	1,50	2,00	0,10	0,00	0,00
R2.i2.f1.z1	II	21	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	4,00	0,00	0,30	0,00	1,00

Código	Repetición	Tratamiento	Aroma cacao	Aroma floral	Aroma frutas	Aroma nuez	Dulzor	Textura	Astringencia	Sabor cacao	Sabor nuez	Sabor Acido	Sabor frutal	Sabor floral
R2.i2.f1.z2	II	22	1,00	0,00	1,00	3,00	0,00	0,10	0,00	3,00	3,00	0,30	0,00	1,50
R2.i2.f2.z1	II	23	2,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,10	1,00	1,00	2,00	0,20	0,40	2,00
R2.i2.f2.z2	II	24	2,50	0,65	0,95	3,00	1,75	1,00	0,50	1,25	2,75	0,50	0,50	0,20

Nota. Elaboración propia.

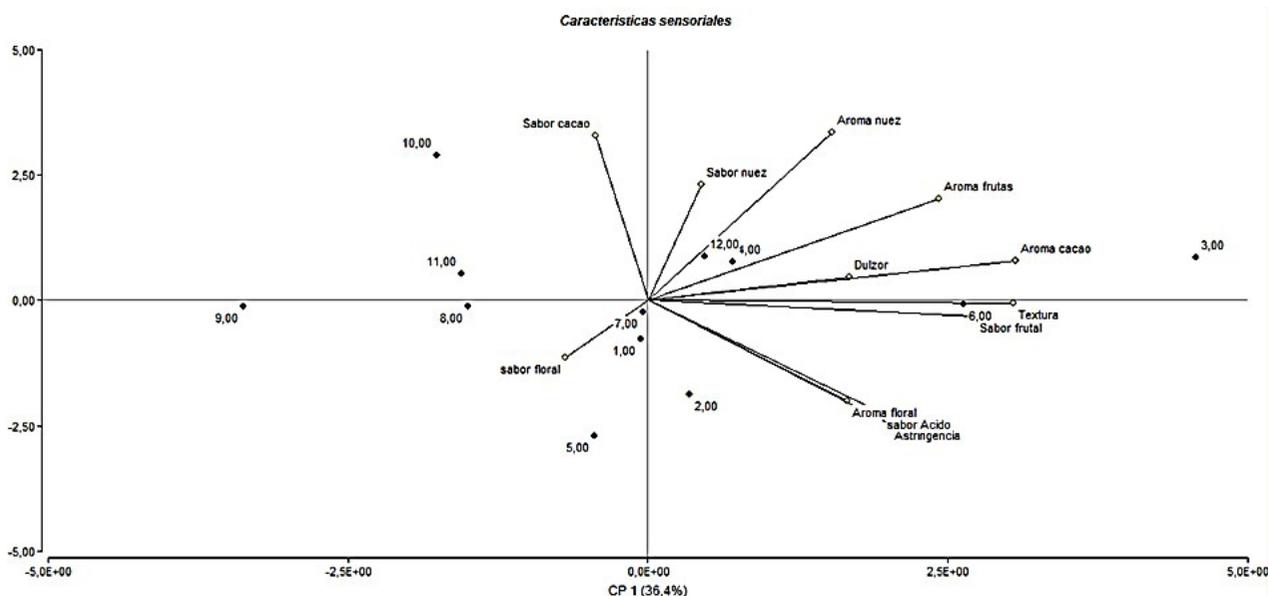


Figura 1

*Análisis de componentes principales del proceso de fermentación inducidas con Rhizobium japonicum.*

Nota. Elaboración propia.

En cuanto a lo encontrado en la evaluación de los efectos de dos métodos fermentativos en cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad de origen trinitario, inducido con *Rhizobium Japonicum* en la disminución de cadmio, en donde el proceso de fermentación se alcanzó a los 42 °C siendo esta la temperatura más alta registrada, guarda relación con lo reportado por (Dubón, 2016), en su investigación realizada en Brasil quienes concluyeron que la temperatura no debe ser superior 51°C lo cual afectaría a la calidad del grano por una sobre fermentación, según (Vásquez et al., 2022) indica que realizando la aplicación de *Rhizobium Japonicum* en la masa fresca de las almendras de cacao mejora la calidad y cualidades del grano ayudando a elevar de manera paulatinamente la temperatura, La diferencia marcada entre las temperaturas de fermentación

alcanzadas en las dos investigaciones se debe principalmente a que corresponden a zonas geográficas distintas (Galvis y Rodríguez, 2022). Palma et al. 2021 afirman que, las diferencias de temperaturas durante la fermentación de las almendras de cacao a partir de las 48 horas tienen relación directa con los valores de pH de la testa y el cotiledón.

Alvarado et al. 2022, mencionan en su estudio que la utilización de microorganismos como la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) ayuda a incrementar la temperatura de una manera no tan acelerada para que pueda existir un proceso químico y se cumplan las tres fases de la fermentación la fermentativa, la acética y oxidativa.

Según Vargas *et al.* (2008) en la investigación realizada en la parroquia San Carlos, el proceso de fermentación culminó a las 120 horas se obtuvo un pH de 4,51 se observa el efecto estable del pH cuyo promedio general es de 3,9, mientras que, en su investigación la calidad del clon de cacao pH - 16 en la región cacaotera de Bahía, Brasil concluyeron que el pH promedio de granos de cacao fermentados obtuvo valores superiores de 5,0. Cabe mencionar que un pH muy bajo en las almendras de cacao puede tener un efecto negativo en el sabor del producto. Así lo indican estos autores:

Llerena y Uriña (2017), afirman que si el pH es menor a 5.0 indica la presencia de ácidos no volátiles indeseables para el desarrollo del aroma y sabor del cacao (Erazo y Mendoza, 2015). En este sentido, Loureiro *et al.* (2016) ratifican que el pH es un atributo importante en la calidad del cacao y debe encontrarse entre 5,0 y 5,4. Finalmente, el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (1993) considera como un cacao seco de calidad aquellos relacionados con pH más altos de 5,2.

Alvarado *et al.* 2022, manifiesta que los microorganismos como la levadura tiene una gran actividad en pro de la fermentación. Es decir que ha mayor aplicación de la levadura mayor será el grado de fermentación alcanzando valores de 80,67 % concuerda con la investigación de (Vasquez *et al.*, 2022) en la aplicación de la inoculación en fase anaeróbica de *Bradyrhizobium japonicum* para mejorar la postcosecha y actividad fermentativa lo cual indica que la aplicación de 5 % obtuvo 77,75 % de granos bien fermentados.

De igual manera, Morejon *et al.* (2022) en su estudio de investigación usando el proceso fermentativo con las almendras de cacao y aplicando levadura madre para poder disminuir cadmio, lo cual dio resultados favorables, alcanzando los límites estipulado por el

reglamento de la Unión Europea. De la misma manera (Alvarado *et al.*, 2022) indica que al utilizar levadura al 1% disminuyó de (0,32 mg/kg a 0,20 mg/kg de cadmio), corrobora Vasquez *et al.* (2022) que la inducción de *Rhizobium japonicum* en la etapa fermentativa a mayor aplicación del 5 % alcanzó disminuir de (0,36 mg/kg a 0,29 mg/kg de cadmio), lo cual estos resultados y metodología ayudarán a los agricultores.

## Conclusiones

En función de los resultados encontrados se concluye que los contenidos de cadmio en el presente estudio cumplen con la norma establecida por la Unión Europea lo N° 2021/1323 para los diferentes tratamientos obtenidos los cuales son resultados favorables para la disminución del cadmio en almendras de cacao por la aplicación de *Rhizobium japonicum*.

Se observaron efectos concluyentes con respecto a la prueba de corte y análisis sensorial, lo cual demuestra que la aplicación de *Rhizobium japonicum* es favorable en la actividad fermentativa de los granos de cacao. Respecto al análisis de las variables fisicoquímicas se observó una reacción positiva en la inducción de este microorganismo, lo cual se ve reflejada en la calidad de las almendras de cacao.

## Referencias

Abad, A., Acuña, C., y Naranjo, E. (2020). El cacao en la Costa Ecuatoriana: estudio de su dimensión cultural y económica. Estudios de La Gestión. *Revista Internacional de Administración*, 7(7), 59–83. <https://doi.org/10.32719/25506641.2020.7.3>

Alvarado, K., Vera, J., Tuarez, D., y Intriago, F. (2022). Fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) con adición de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzima (PPO's) en la disminución de metales Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) With addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and enzyme. *Centrosur*, 2014(1), 24. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/361380137\\_Fermentacion\\_de\\_cacao\\_Theobroma\\_cacao\\_L\\_con\\_adicion\\_de\\_levadura\\_Saccharomyces\\_cerevisiae\\_y\\_enzima\\_PPO\\_s\\_en\\_la\\_disminucion\\_de\\_metales\\_pesados](https://www.researchgate.net/publication/361380137_Fermentacion_de_cacao_Theobroma_cacao_L_con_adicion_de_levadura_Saccharomyces_cerevisiae_y_enzima_PPO_s_en_la_disminucion_de_metales_pesados)

Comisión Europea. (2021). REGLAMENTO (UE) 2021/1323. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 10(1), 13–18. <https://boe.es/doue/2021/288/L00013-00018.pdf>

- Cruz, E., y Pereira, I. (2019). Historias, Saberes y Sabores en torno al cacao (*Theobroma cacao* L.) en la subregión de Barlovento, Estado Miranda. *Sapiens*, 10(2), 97–120. <https://www.redalyc.org/pdf/410/41021266005.pdf>
- Dubón, A. (2016). Protocolo para el Beneficiado y Calidad del Cacao Protocolo para el Beneficiado y Calidad del Cacao. Honduras: Fhia, Recuperado de [http://www.fhia.org.hn/descargas/Proyecto\\_de\\_Cacao\\_SECO/Protocolo\\_para\\_el\\_Beneficiado\\_y\\_Calidad\\_del\\_Cacao\\_2016.pdf](http://www.fhia.org.hn/descargas/Proyecto_de_Cacao_SECO/Protocolo_para_el_Beneficiado_y_Calidad_del_Cacao_2016.pdf)
- Erazo, R., y Mendoza, C. (2015). Evaluación de la aplicación de *Lactobacillus fermentum* y *Acetobacter acetii*, en la fermentación del cacao CCN-51 y su efecto en la calidad de las almendras. [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. Repositorio Institucional de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10232/3/T-ESPE-002777.pdf>
- Galvis, A., y Rodríguez, S. (2022). Desarrollo de un prototipo de fermentador cilíndrico con control de temperatura, humedad y agitación durante el proceso de fermentación del cacao. [Tesis de pregrado, Universidad El Bosque]. Repositorio Universidad El Bosque [https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/8358/2021-1\\_P\\_Rodriguez\\_Galvis\\_Documento\\_final.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/8358/2021-1_P_Rodriguez_Galvis_Documento_final.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, I. (1993). *Manual para análisis de cacao en laboratorio*. IICA-CIDIA. <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/8995/BVE20038007e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Llerena, K. E., y Uriña, Z. B. (2017). *Uso de cultivos iniciadores (Starter) en la fermentación de cacao tipo Nacional clon 103 y CCN51 en la Estación Experimental Pichilingue ubicada en Quevedo- Provincia de Los Ríos*. [Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil]. Repositorio Universidad de Guayaquil. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/28030>
- Loureiro, G., Araujo, Q., Sodré, G., Valle, R., Souza, J., Ramos, E., Comerford, N., y Grierson, P. (2016). Cacao Quality: Highlighting Selected Attributes. *Food Reviews International*, 9129(April). <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175011>
- Melo, O., López, L., y Melo, S. (2020). *Diseño de experimentos métodos y aplicaciones* (U. N. de Colombia (ed.); 2nd ed.). [http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad\\_de\\_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas\\_Libros/Estadistica/Diseno\\_de\\_Experimentos/DisenoDeExperimentos.pdf](http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Estadistica/Diseno_de_Experimentos/DisenoDeExperimentos.pdf)
- Morejon, R., Vera, J., Salgada, I., Flores, C., y Morejón, M. (2022). Use of enzymes and leavening agents as a strategy to reduce the presence of cadmium in the fermentation process of *Theobroma cacao* L. almonds. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 13(3), 604–614. <https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.03.089>
- Palma, H. J., Intriago Flor, F. G., Andrade Andrade, V. V., Gorozabel Muñoz, W. A., y Zambrano Sanchez, M. J. (2021). Determinación de los niveles de cadmio en el beneficio de la almendra de cacao con diferentes concentraciones de salmuera. *Revista Pertinencia Académica*, 5(1). <https://doi.org/10.5281/zenodo.4796595>
- Silva, C. G., Medina, N. G., Pajilla, B. L., y Universitaria, C. (2012). Efecto de la proporción de naranja (*Citrus sinensis*), papaya (*Carica papaya*) y piña (*Ananas comosus*) en la aceptabilidad sensorial de un néctar mixto. *Agroindustrial Science*, 2(2), 132–138. <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2012.02.02>
- Vargas, S., Pilar, A., Domínguez, C., y Domínguez, M., K. P. (2008). Mejoramiento de la poscosecha del cacao a partir del roadmapping. *Ingenieria e Investigación*. 2008;28(3):150–158. ISSN: 0120–5609. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=64328323>
- Vásquez, L., Vera, J., Erazo, C., y Intriago, F. (2022). Induction of *rhizobium japonicum* in the fermentative mass of two varieties of cacao (*Theobroma Cacao* L.) as a strategy for the decrease of cadmium. *International Journal Of Health Sciences*, 6(3), 11354–11371. <https://doi.org/https://doi.org/10.53730/ijhs.v6n3.8672> Induction
- Vasquez, L., Vera, J., Intriago, F., y Alvarado, K. (2022). Inducción anaerobica de *bradyrhizobium japonicum* en la poscosecha de híbridos experimentales de cacao y su mejoramiento en la calidad fermentativa. *Journal of Science and Research*, 7(2), 50–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.7723254>