

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

MENCIÓN: CULTIVOS TROPICALES



**CADMIO Y POLIFENOLES TOTALES EN LA FERMENTACIÓN
DE LOS GRANOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CLON**

CCN-51

TESIS

**Para optar al Grado Académico de
MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
MENCIÓN: CULTIVOS TROPICALES**

GEIDER FALCÓN PAREDES

Tingo María – Perú

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
ESCUELA DE POSGRADO
DIRECCIÓN



"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Nro. 025-2019-EPG-UNAS

En la ciudad universitaria, siendo las 6:00pm, del día jueves 18 de julio del 2019, reunidos en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, se instaló el Jurado Calificador a fin de proceder a la sustentación de la tesis titulada:

“CADMIO Y POLIFENOLES TOTALES EN LA FERMENTACIÓN DE LOS GRANOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CLON CCN-51”

A cargo del candidato al Grado de Maestro en Ciencias Agrícolas, mención Cultivos Tropicales nombre Geider FALCON PAREDES.

Luego de la exposición y absueltas las preguntas de rigor, el Jurado Calificador procedió a emitir su fallo declarando **APROBADO** con el calificativo de **MUY BUENO**.

Acto seguido, a horas 8:30 pm. el presidente dio por culminada la sustentación; procediéndose a la suscripción de la presente acta por parte de los miembros del jurado, quienes dejan constancia de su firma en señal de conformidad.

.....
Dr. JOSÉ W. ZAVALA SOLORZANO
Presidente del Jurado

.....
Dr. HUGO A. HUAMANÍ YUPANQUI
Miembro del Jurado

.....
M.Sc. JOSÉ LUIS GIL BACILIO
Miembro del Jurado

.....
M.Sc. JORGE L. ADRIAZOLA DEL AGUILA
Asesor



DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por brindarme la vida y la fortaleza diaria y por haberme puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante el día a día.

A mis queridos padres, Geremias Falcón Mishama y Diomar Paredes Arce, porque siempre han estado en cada uno de los pasos que doy, los logros y las caídas, los aciertos y los desaciertos, con su inmenso amor, comprensión y esfuerzo.

En reconocimiento al gran gesto de cariño, amor y apoyo, mi amada esposa, Diana Jara Hualcas y queridas hijas; Heidy Nayelee y Emily Geydi, por su constante motivación y ayuda emocional.

A mis hermanos Ruth Guirleni, John Lewis y Jessenia Violeta, por el apoyo moral que me brindaron durante mi formación profesional.

A toda mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona.

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, mi Alma Mater y a todo el personal que la conforma, por su apoyo y confianza, en especial a los docentes de la Escuela de Posgrado por impartirme sus sabios conocimientos y contribuir en mi formación profesional.
- Al M. Sc. Jorge Adriazola del Águila, en calidad de asesor de la presente tesis; por su apoyo técnico y científico en la ejecución y redacción del presente trabajo.
- Al Dr. José Wilfredo Zavala Solórzano, en calidad de presidente de jurado de tesis, Dr. Hugo Alfredo Huamaní Yupanqui y M. Sc. José Luis Gil Bacilio en calidad de miembros de jurado de tesis, por su oportuna orientación, revisión y corrección en la realización del trabajo de tesis.
- A la Cooperativa Agroindustrial Cacao Alto Huallaga por el financiamiento del presente trabajo de investigación, en especial a su gerente general CPC Jorge Simon Ccollana.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA	12
2.1. Cacao CCN-51.....	12
2.1.1. Composición química del cacao	12
2.1.2. Fermentación del grano de cacao.....	14
2.1.3. Secado	17
2.1.4. Prueba de corte para el análisis de fermentación	17
2.2. Polifenoles	19
2.2.1. Polifenoles de la semilla de cacao	19
2.2.2. Compuestos fenólicos: influencia del procesado desde el grano hasta el polvo de cacao y chocolate.....	20
2.2.3. Clasificación de los polifenoles	23
2.2.4. Fuentes naturales principales de polifenoles	24
2.2.5. Medición de polifenoles totales.....	24
2.2.6. Factores que intervienen en la extracción de polifenoles	25
2.3. Metales pesados	25
2.3.1. El cadmio.....	25
2.3.2. Origen del cadmio.....	26
2.3.3. Dinámica de los metales pesados en el suelo	26
2.3.4. Comportamiento del cadmio en el suelo	27
2.3.5. Ingreso, transporte y acumulación de cadmio en las plantas.....	27
2.3.6. Contaminación del cacao con cadmio y plomo	28
2.3.7. Determinación de metales pesados en alimentos.....	30
2.3.8. Estrategias para disminuir el contenido de cadmio en cacao.....	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Materiales	34
3.1.1. CAMPO experimental	34

3.1.2.	Análisis físico-químico del suelo	35
3.2.	Métodos	37
3.2.1.	Componentes en estudio	37
3.2.2.	Tratamientos en estudio	37
3.2.3.	Diseño experimental	37
3.2.4.	Ejecución el experimento	38
3.2.5.	Variables a evaluar	40
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1.	Contenido de macro y microelementos de los granos de cacao clon CCN-51	42
4.1.1.	Contenido de macro y microelementos totales en el cotiledón de los granos de cacao clon CCN-51	42
4.1.2.	Contenido de macro y microelementos totales en la cascarilla de los granos de cacao	51
4.2.	Contenido de polifenoles totales de los granos de cacao clon CCN-51	60
4.3.	Características físicas de los granos de cacao CLON CCN-51 ...	64
4.4.	Correlación de Pearson y análisis de regresión en el cotiledón y cascarilla de los granos de cacao CLON CCN-51	66
4.4.1.	Correlación de Pearson en el cotiledón y cascarilla de los granos de cacao.....	66
4.4.2.	Análisis de regresión en el cotiledón de los grano de cacao.....	67
4.4.3.	Análisis de regresión en la cascarilla de los granos de cacao.....	72
V.	CONCLUSIONES	77
VI.	RECOMENDACIONES.....	78
VII.	RESUMEN	79
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	81
IX.	ANEXO.....	91

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Composición química de la pulpa de cacao (100 g de pulpa fresca)...	13
2. Composición química de la almendra y cáscara de cacao (%).	13
3. Composición química de 100 g de polvo de cacao	14
4. Niveles máximos admisibles de cadmio y plomo en alimentos, manteca y polvo de cacao.....	29
5. Niveles máximos de cadmio en el chocolate y productos derivados de cacao.....	29
6. Niveles máximos admisibles de cadmio en derivados de cacao según la Unión Europea, vigente a partir del 1 de enero del 2019.....	29
7. Contenido máximo admisible de Pb y Cd en almendras de cacao.....	30
8. Datos meteorológicos registrados durante la ejecución del experimento – año 2018	35
9. Análisis físico – químico del suelo (parcela).....	36
10. Descripción de los tratamientos en estudio	37
11. Esquema del análisis de variancia (ANVA).....	38
12. Cuadrados medios del análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) totales analizados en el cotiledón de los granos de cacao.	43
13. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) totales analizados en el cotiledón de los granos de cacao	44
14. Cuadrados medios del análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de microelementos (cobre, zinc, hierro y cadmio) totales analizados en el cotiledón de los granos de cacao.....	47
15. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para microelementos (cobre, zinc, hierro y cadmio) totales analizados en el cotiledón de los granos de cacao..	48
16. Cuadrados medios del análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de macroelementos (nitrógeno, fosforo, potasio, calcio y	

magnesio) totales analizados en la cascarilla de los granos de cacao.	52
17. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) totales analizados en la cascarilla de los granos de cacao.....	53
18. Cuadrados medios del análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de microelementos (cobre, zinc, hierro y cadmio) totales analizados en la cascarilla de los granos de cacao.....	56
19. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para microelementos (cobre, zinc, hierro y cadmio) analizado a la cascarilla de granos de cacao.	57
20. Análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de polifenoles en cotiledón y cascarilla de granos de cacao.....	60
21. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para polifenoles totales analizados a en el cotiledón y la cascarilla de los granos de cacao.....	61
22. Análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para las características físicas de los granos de cacao.....	64
23. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para las características físicas de los granos de cacao.....	65
24. Correlación de Pearson entre el contenido de cadmio (cotiledón, cascarilla) con respecto a los macro y micronutrientes y las características físicas de los granos de cacao.....	67
25. Macro y microelementos totales en el cotiledón de los granos de cacao.....	92
26. Cadmio total (ppm) del cotiledón de los granos de cacao.....	92
27. Macro y microelementos en la cascarilla de los granos de cacao.....	93
28. Cadmio total (ppm) de la cascarilla de los granos de cacao.....	93
29. Contenido de polifenoles totales en el cotiledón y cascarilla de los granos de cacao.....	94
30. Porcentaje de fermentación de los granos de cacao.....	95
31. Porcentaje de granos violetas.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Porcentaje de compuestos polifenólicos en los cotiledones de la semilla fresca de cacao	20
2. Absorción de metales pesados por levaduras (CHÁVEZ <i>et al.</i> , 1993).	32
3. Contenido de macroelementos en función a los tratamientos en estudio.....	45
4. Contenido de microelementos en cotiledón de granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio	49
5. Contenido de macroelementos en cascarilla de granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio	54
6. Contenido de microelementos en cascarilla de los granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.	58
7. Contenido de cadmio en cotiledón y cascarilla de granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.....	59
8. Contenido de polifenoles en granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.	63
9. Contenido de polifenoles totales en el grano de cacao fermentado. ...	63
10. Características físicas de los granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.	66
11. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el fósforo del cotiledón de los granos de cacao.	68
12. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el potasio del cotiledón de los granos de cacao.	68
13. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el magnesio del cotiledón de los granos de cacao.	69
14. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio del cotiledón y el porcentaje de fermentación de los granos de cacao.	70
15. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio del cotiledón y el porcentaje de granos violetas.	71
16. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio del cotiledón y el cadmio de la cascarilla de los granos de cacao.	72

17.	Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el nitrógeno de la cascarilla de los granos de cacao.	73
18.	Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el fósforo de la cascarilla de los granos de cacao.	73
19.	Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el potasio de la cascarilla de los granos de cacao.	74
20.	Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el magnesio de la cascarilla de los granos de cacao.	74
21.	Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el zinc de la cascarilla de los granos de cacao.	75
22.	Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio de la cascarilla y el porcentaje de fermentación de los granos de cacao.	76
23.	Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio de la cascarilla y el porcentaje de granos violetas.	76
24.	Contenido de cadmio inicial en la parcela de cacao clon CCN-51.	96
25.	Análisis de macro y microelementos de la cascarilla del cacao (Muestra 1: T ₀ R ₁ – tratamiento 0, repetición 1).	97
26.	Transporte de los granos de frescos de cacao.	98
27.	Escurrido de los granos frescos de cacao, tratamiento T ₁	99
28.	Adición de los granos de cacao a los cajones fermentadores.	100
29.	Control de temperatura de los tratamientos.	100
30.	Adición de las levaduras al tratamiento T ₂	101
31.	Secado de las muestras de cacao de cada tratamiento.	102
32.	Obtención del jugo de cacao.	102
33.	Verificación de la tesis a cargo del Dr. Hugo Huamaní, miembro del jurado.	103
34.	Rotulación de las muestras de cacao de cada tratamiento, para su envío al laboratorio.	104
35.	Control de temperatura de los tratamientos en fermentación.	105
36.	Prueba de corte del tratamiento T ₁	106
37.	Prueba de corte del tratamiento T ₀	106
38.	Análisis físico-químico de la parcela de cacao.	107

I. INTRODUCCIÓN

“El cacao es un producto de exportación importante para muchas economías en desarrollo en África, Asia y América Latina. Según la Organización Internacional del Cacao (ICCO) en el 2010 su producción representó un valor en el mercado de US\$ 12 mil millones y es un medio de sustento para un estimado de 50 millones de personas en todo el mundo. (MORALES *et al.*, 2015).

El Perú es reconocido a nivel mundial como un productor de cacao fino de aroma; sin embargo, los granos de cacao producidos en la zona del Alto Huallaga, provincia de Leoncio Prado; poseen un alto contenido de metales pesados, alcanzando 1.53 y 13.69 ppm de cadmio y plomo, respectivamente (HUAMANÍ *et al.*, 2016); los cuales están muy por encima de los límites máximos permitidos de 0.50 ppm (Más y Azcue, 1993; citado por GARCÍA y DORRONSORO, 2002). Este problema afecta principalmente a las diversas organizaciones de pequeños productores existentes en la zona como son: asociaciones y cooperativas agrícolas dedicadas a la producción y comercialización de cacao en grano orgánico.

La fermentación del cacao es un proceso bioquímico el cual implica la transformación y eliminación de sustancias orgánicas desde los cotiledones hacia el exterior del grano (transporte de macro y microelementos); en la presente investigación se realizó la fermentación de los granos bajo ciertas condicionantes, como el escurrido del jugo y uso de levaduras; dado que el jugo y la pulpa del cacao contienen en promedio 6.80 ppm de cadmio (IPNI, 2015) y los microorganismos como las levaduras, tienen la propiedad de secuestrar cadmio en sus paredes celulares y por ende se disminuir la concentración de cadmio de los granos de cacao.

“Los polifenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal; desde el punto de vista químico, los polifenoles se caracterizan por contener un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilo (grupo fenol). Los polifenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia y dureza), las características nutritivas y las propiedades

antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La actividad antioxidante se debe principalmente a sus propiedades redox, el cual les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y secuestradores de oxígeno singlete; además de tener potencial para quelatar metales” (PALADINO, 2008).

La presente tesis se llevó a cabo en el centro de beneficio de cacao de la Cooperativa Agroindustrial Cacao Alto Huallaga (CAICAH); planteándose los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- ✓ Evaluar cadmio y polifenoles totales en la fermentación de los granos de cacao clon CCN-51

Objetivos específicos:

1. Determinar el efecto de la fermentación de granos de cacao en el contenido de macro y microelementos, cadmio.
2. Determinar el efecto de la fermentación de granos de cacao en el contenido de polifenoles totales.
3. Evaluar el efecto de la fermentación en las características físicas del grano de cacao.
4. Realizar la correlación de Pearson y análisis de regresión en el cotiledón y cascarilla de los granos de cacao.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Cacao CCN-51

“El cacao CCN-51 es el resultado de la combinación de tres clones, de los cuales dos son amazónicos (ICM-67 y Canelo), y del ICS-95 (Trinitario) y en donde el ICS-95, proviene de un amazónico criollo. Esto nos muestra que el CCN-51 no es un trinitario ya que las cualidades intrínsecas del ICS no fueron heredadas por el CCN-51” (Bustamante, 2010; citado por BURGA, 2016).

“El clon CCN-51 es una planta de 5 a 6 m de altura, de arquitectura buena. El sistema radicular es fasciculado con 3 a 4 raíces principales, posee un tallo, de donde emergen las ramas (de tres a cinco), a la altura de un metro, con crecimiento lateral que forma la horqueta; tienen tantos gametos masculinos como femeninos. El fruto es una baya, que se conoce como mazorca. Las mazorcas se encuentran distribuidas desde la parte basal hasta la parte superior del árbol, la mazorca es de color rojo con contenido medio alto de mucilago. Generalmente contiene en su interior de 35 a 45 granos de forma aplanada, de 2.4 cm de longitud, recubiertos por pulpa dulce y ligeramente ácida” (Agama, 2015; citado por CAMPOVERDE, 2010).

2.1.1. Composición química del cacao

“La pulpa está compuesta por 80 a 90% de agua y 10 a 13% de azúcares, además de pequeñas cantidades de ácido cítrico, proteínas y otros componentes con porcentajes menores” (MINIFIE, 1989; citado por PAZMIÑO, 2012). “La composición de la pulpa es importante porque es a partir de los azúcares contenidos en ella, se inicia el proceso fermentativo. La composición de la pulpa de cacao es variable depende la variedad de cacao y de la época de cosecha” (PAZMIÑO, 2012).

En el Cuadro 1, se muestra la composición química y la concentración de carbohidratos, proteínas y compuestos nitrogenados de la pulpa mucilaginoso.

Cuadro 1. Composición química de la pulpa de cacao (100 g de pulpa fresca).

Componente	Cantidad (%)
Sacarosa	4.35
Glucosa	3.00
Fructosa	3.80
Nitrógeno total	0.11
Aminoácidos libres	0.15
Proteínas/péptidos	0.57
Amonio	0.02

Fuente: PAZMIÑO (2012).

“La composición química de la almendra de cacao depende de varios factores: tipo de cacao, origen geográfico, grado de madurez, calidad de la fermentación y el secado. El beneficio postcosecha también influye sobre su composición química” (WAKAO, 2002). En el Cuadro 2, se presenta la composición química de la almendra y cáscara de cacao fermentadas y secas.

Cuadro 2. Composición química de la almendra y cáscara de cacao (%).

Componente	Almendra (%)	Cáscara (%)
Agua	5.00	4.50
Grasa	54.00	1.50
Cafeína	0.20	-
Teobromina	1.20	1.40
Polihidroxifenoles	6.00	-
Proteínas brutas	11.50	1.90
Mono-oligosacáridos	1.00	0.10
Almidón	6.00	-
Pentosanos	1.50	7.00
Celulosa	9.00	26.50
Ácidos carboxílicos	1.50	-
Cenizas	2.60	8.00

Fuente: CALDERÓN (2002).

La composición química del polvo de cacao se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición química de 100 g de polvo de cacao.

Componente	Concentración g/100 g
Proteínas	21.5 g
Carbohidratos	35.0 g
Grasa	25.6 g
Nitrógeno	2.5 g
Calcio	0.169 g
Magnesio	0.544 mg
Hierro	0.013 mg
Cobre	0.004 mg
Fósforo	0.795 mg
Potasio	2.057 mg
Sodio	0.009 g
Zinc	0.007 g
Teobromina	2.5 g
Flavonoides	7.0 g

Fuente: MORALES *et al.* (2012).

2.1.2. Fermentación del grano de cacao

“La fermentación consiste en una serie de cambios físico-químicos que generan el desarrollo de sabor y aroma a chocolate, con: cambios en la pigmentación interna, color violeta a marrón claro; transformación del sabor astringente de los cotiledones; transformación de los azúcares en alcoholes por las levaduras, los cuales son a su vez convertidos en ácido acético por las bacterias acéticas. Durante este proceso, existe una relación ordenada entre microorganismos y las variaciones de temperatura, pH y humedad, con la formación de alcoholes, ácidos y compuestos polifenólicos, que matan el embrión, disminuyen el sabor amargo y se producen las reacciones bioquímicas que forman el chocolate. Dichas alteraciones químicas en el interior del haba de cacao, dependen de la muerte de las células del cotiledón, con la cual sus membranas celulares se degradan y aumentan su permeabilidad, permitiendo el contacto entre los diversos componentes celulares. Así los polifenoles, que producen el sabor astringente, pueden difundirse entonces hacia las células adyacentes, donde se encuentran con diversas enzimas que provocan

reacciones hidrolíticas gracias a las condiciones anaerobias del haba. Si no se degradan, pasan al grano seco, provocando el color violeta de la almendra, que indica errores en el proceso de fermentación” (TENEDA, 2016).

“La fermentación incluye dos fenómenos distintos pero dependientes. La fermentación microbiana de los azúcares de la pulpa va a ir degradando el mucílago que recubre a la semilla, por otro lado, las reacciones bioquímicas darán lugar a la formación de precursores del sabor y aroma a chocolate que se produce durante el tostado” (Cros, 2004; citado por ZAMBRANO, 2018). La fermentación se da en dos etapas:

a. Fermentación anaeróbica

“La fermentación anaeróbica inicial toma de 24 a 48 horas. Una vez iniciado el proceso, varios géneros de levaduras, entre ellos: *Candida*, *Hanseniospora*, *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y otras salvajes presentes en el ambiente y en el mismo cacao como la microflora predominante, degradan los azúcares y otros carbohidratos más complejos del mucílago, produciendo principalmente alcohol y anhídrido carbónico como metabolitos. La microflora crece exponencialmente, ya que la masa en un inicio está aireada lo suficiente para que las levaduras se reproduzcan” (ZAMBRANO, 2018).

“La pulpa del cacao tiene 10% de azúcares y 2% de ácido cítrico, estas son las condiciones para que las levaduras metabolicen estas sustancias, siendo esta reacción exotérmica, elevando la temperatura. El metabolismo del ácido cítrico disminuye la acidez. El aumento de temperatura y la disminución de la acidez provoca un efecto sinérgico que favorecerá la proliferación de bacterias ácido-lácticas, de tal forma que mientras avanza la fermentación la masa se vuelve anaeróbica y con ello la fase reproductiva de las levaduras declina. Posteriormente, las bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus* predominan, mientras que, las levaduras van disminuyendo” (RAMOS, 2004).

b. Fermentación aeróbica

“La fermentación aeróbica se da cuando se realizan las remociones que permiten circular el aire. La fermentación por parte de bacterias ácido-lácticas hetero-fermentadoras genera, además del ácido láctico, ácido acético y 3-hidroxi-butanona. Esto genera una acción antagonista para las levaduras que se inhiben por el ácido acético. Estas reacciones bioquímicas generan una pérdida de líquido y por ende de peso en las almendras” (Ramos, 2004; citado por ZAMBRANO, 2018).

“La fase acética es eminentemente aeróbica. El aumento de etanol y las remociones que permiten la circulación del aire provocan la transformación de etanol en ácido acético, produciendo además monóxido de carbono y agua. Durante este proceso altamente exotérmico, se puede alcanzar temperaturas que van desde 48 °C a 50 °C. Mientras avanza esta etapa de fermentación, la concentración de lactato y acetato mata a las bacterias. Con las remociones se inserta más aire al sistema y permite una mejor distribución de la concentración de metabolitos, lo cual ayuda a que las bacterias se reactiven y sigan con su proceso de fermentación para que el embrión muera (RAMOS, 2004). El embrión muere aproximadamente al tercer día de fermentación cuando el proceso alcanza 40 °C a 50 °C” (MAISINCHO, 2006).

“La duración de la fase de fermentación dependerá de cada tipo de cacao, además de las condiciones ambientales y de presión, del método de fermentación, frecuencia de remoción, volumen de cacao a fermentar, estado de madurez de las mazorcas, condiciones sanitarias del grano y condiciones post cosecha. Si la fermentación dura más tiempo del debido, la masa fermentable se contamina con bacterias proteolíticas que generarán amoníaco, neutralizando los ácidos y generando olores y sabores extraños” (AMORES *et al.*, 2006).

“Durante la fermentación ocurre la eliminación más significativa de polifenoles solubles, que son reducidos aproximadamente al 10 – 20%. Dicha pérdida ocurre a través de la eliminación de líquidos drenados producto de la fermentación o por la acción de la enzima polifenol oxidasa que se encarga de oxidar los polifenoles a polifenoles condensados insolubles de alto peso

molecular, conocidos como taninos” (Weisburguer, 2001; citado por CADENA, 2008). “La frecuencia de las reacciones de condensación de los polifenoles se evidencia en la reducción del contenido de (-) epicatequina entre el primero y segundo día de fermentación” (Hansen *et al.*, 1998; citado por CADENA, 2008).

2.1.3. Secado

“Los métodos de secado al sol o secado natural y secado artificial se realizan para asegurar la conservación del cacao reduciendo el contenido de humedad del grano hasta un 6 – 7%. En esta etapa el pH del cotiledón aumenta como consecuencia de la eliminación del ácido acético y otros ácidos volátiles presentes en la superficie de la testa y de la aceleración de las reacciones de oxidación por el incremento del contenido de oxígeno en el tejido expuesto de los granos. Aquí, son de gran importancia las oxidaciones no enzimáticas de los polifenoles, se produce una disminución del 50% del contenido de (-) Epicatequina” (Hansen *et al.*, 1998 citado por CADENA, 2008). “La pérdida de estos polifenoles se evidencia en la disminución de la astringencia y el sabor amargo de los chocolates” (Nazaruddin, 2006; citado por CADENA, 2008).

2.1.4. Prueba de corte para el análisis de fermentación

“Es una prueba subjetiva de evaluación, que requiere de la observación visual y se utiliza para determinar el grado de fermentación de las almendras, por su influencia directa sobre el sabor y aroma a chocolate. Es recomendable su aplicación como máximo a los 30 días después del secado, para aislar en lo posible el efecto de oxidación que continúa en alguna medida durante el almacenamiento. La oxidación de los tejidos en los cotiledones, hace que los colores internos cambien naturalmente, pudiendo estos adquirir un color marrón típico de la fermentación, pero el sabor y aroma de las almendras no mejora” (BRAVO, 2011).

“La prueba de corte es el procedimiento que se realiza para determinar el porcentaje de fermentación del grano de la siguiente manera: hacer un corte longitudinal por la parte central de cada uno de los 300 granos, a fin de exponer la máxima superficie de corte de los cotiledones. Examinar visualmente las dos mitades de cada grano a la luz diurna o bajo una iluminación artificial

(lámpara fluorescente). Contar separadamente los granos defectuosos, es decir aquellos mohosos, pizarrosos, partido, violeta, vanos, múltiple, germinados, dañados por insectos según lo definido y graficado a continuación: **Grano mohoso**. Grano que ha sufrido deterioro parcial o total en su estructura interna debido a la acción de hongos, determinado mediante prueba de corte. **Grano dañado por insectos**. Grano que ha sufrido deterioro en su estructura (perforaciones, picados, etc.) debido a la acción de insectos. **Grano germinado**. Grano que ha sufrido deterioro evidente en su estructura por el proceso de germinación, o por la acción mecánica durante el beneficiado. **Grano múltiple**. Es la unión de dos o más granos. **Grano plano vano o granza**. Es un grano cuyos cotiledones se han atrofiado hasta tal punto que cortando la semilla no es posible obtener una superficie de cotiledón. **Grano partido (quebrado)**. Fragmento de grano entero. **Grano pizarroso (pastoso)**. Es un grano sin fermentar, que; al ser cortado longitudinalmente, presenta en su interior un color gris negruzco o verdoso y de aspecto compacto. **Grano violeta**. Grano cuyos cotiledones presentan un color violeta intenso, debido al mal manejo durante la fase de beneficio del grano. **Grano de buena fermentación**. Grano fermentado cuyos cotiledones presentan en su totalidad una coloración marrón o marrón rojiza y estrías de fermentación profunda. Para el tipo de cacao marfil vira a color marrón interno o cubierta externa al retirar cascarilla. El grano una vez fermentado se caracteriza por lo que hincha y se llena de aire en su interior lo cual le permite flotar al suspenderse en agua” (GUTIÉRREZ, 2009).

Cálculo:

$$\% F = (Nf/300 \text{ granos}) \times 100$$

Donde:

% F = Grado de fermentación en %

Nf = Número de granos fermentados

El porcentaje (%) de los demás defectos del grano se determinarán, teniendo como base 100 granos de la muestra, tal como lo estipula la NTP-ISO-1114:2006, granos de cacao: prueba de corte (GUTIÉRREZ, 2009).

2.2. Polifenoles

PALADINO (2008) “menciona que los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo, estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia y dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal y la característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol. La actividad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, el cual les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y secuestradores de oxígeno singlete; además de tener potencial para quelatar metales”. UGARTONDO (2009) “manifiesta que, desde el punto de vista químico, los polifenoles se caracterizan por contener un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilo (grupo fenol); la estructura de los polifenoles varía de moléculas simples, como los ácidos fenólicos, a estructuras complejas, como los taninos condensados. Se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos”.

2.2.1. Polifenoles de la semilla de cacao

“El creciente interés sobre los polifenoles ha incentivado el estudio de su concentración natural en plantas y frutos y los factores que le impactan, debido en parte a sus propiedades funcionales como antioxidantes. En la semilla de cacao los polifenoles se encuentran en la cascara y en el cotiledón, el cual se caracteriza por el color violeta intenso, color relacionado con polifenoles específicos como las catequinas y antocianinas. Los polifenoles en la semilla de cacao constituyen aproximadamente entre el 8% y el 10% del peso seco de la semilla” (Padilla *et al.*, 2008; citado por SUAZO, 2012).

“Aunque en la semilla de cacao se encuentran diversos compuestos como se ilustra en la Figura 1, los de interés son aquellos que

pertencen a los flavonoides (p.ej., catequinas) compuestos que han adquirido notoriedad pública a raíz de su actividad biológica en el hombre, que al consumirlos a través de vegetales o derivados como el chocolate, ejercen funciones anti inflamatorio, antioxidantes y por tanto preventivas ante diversas enfermedades como las del tipo cancerígenas” (Tuckmantel *et al.*, 1999; citado por SUAZO, 2012).

<u>Compuesto</u>	(%) de compuestos polifenólicos en la célula almacenadora	(%) de compuestos polifenólicos en los cotiledones
Catequina	25,0	3,0
Proantocianidina	21,0	2,5
Polímeros de Proantocianidina	17,5	2,1
Antocianinas	3,0	0,4
Fenoles totales	66,5	<u>8,0</u>
Teobromina	14,0	1,7
Cafeína	0,5	0,1
Azúcares libres	1,6	-
Polisacáridos	3,0	-
Otros	14,4	-




Figura 1. Porcentaje de compuestos polifenólicos en los cotiledones de la semilla fresca de cacao (RUSCONI y CONTI, 2010).

2.2.2. Compuestos fenólicos: influencia del procesado desde el grano hasta el polvo de cacao y chocolate

“Las semillas o granos frescos de cacao obtenidos de la mazorca son excepcionalmente ricos en compuestos (poli)fenólicos, su fracción (poli)fenólica está compuesta por: 37% de catequinas o flavan-3-oles, siendo la (-)-epicatequina la catequina más importante dentro de su grupo; además se han identificado en cantidades más bajas (+)-catequina y trazas de (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina. 58% de proantocianidinas oligoméricas, principalmente los dímeros B1, B2, B3, B4, trímero (C1) y tetrámero (D). 4% de antocianos, siendo estos últimos los responsables de la coloración púrpura de las semillas. La fracción de antocianidinas está formada preferentemente por el

cianidin-3- α -L-arabinósido y cianidin-3- β -D-galactósido. Aunque en menores cantidades, también están presentes en cacao los flavonoles quercetina y quercetin-3-O-glucósido (isoquercitrina), quercetin-3-O-galactósido (hiperósido), quercetin-3-O-arabinósido y las flavonas apigenina, apigenina-8-C-glucósido (vitexina), luteolina y luteolina-7-O-glucósido, naringenina, clovamida y ácidos fenólicos como el ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico y ácido *p*-coumárico” (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003; citado por JOVELLANOS, 2016).

“El cacao es de todos los alimentos el que posee el contenido más alto de flavanoles por peso y, por tanto, un contribuyente significativo a la ingesta dietética total de flavonoides. Así, el contenido de (poli)fenoles de semillas de cacao es de un 6% (semillas con un contenido graso del 54% y un 6% de humedad)” (WOLLGAST y ANKLAM, 2000).

“Sin embargo, hay que tener en cuenta que, aunque la materia prima de cacao tenga una gran cantidad de (poli)fenoles, no implica necesariamente un elevado contenido en el producto final elaborado debido a las pérdidas que se producen durante las etapas de procesado. Así, este contenido de (poli)fenoles en semillas depende de varios factores como son la variedad del grano (genotipo) y origen” (ZAPATA *et al.*, 2015); “condiciones de tratamiento del grano posterior a su recolección (tratamientos post-cosecha), como por ejemplo el tiempo de almacenamiento de las mazorcas durante la prefermentación y, del nivel de fermentación del grano” (Nazaruddin *et al.*, 2006; citado por JOVELLANOS, 2016).

“La fermentación del grano de cacao, es uno de los factores que más afecta al contenido de (poli)fenoles en las semillas, ya que se producen cambios químicos que conducen a un descenso notable de los mismos. Las intensas modificaciones que sufren, se inician después de la muerte de las semillas, cuando las sustancias fenólicas y enzimas son liberadas de sus respectivas zonas de almacenamiento en la célula. Los (poli)fenoles se propagan desde sus células almacenadoras al líquido de drenaje. Desde el primer día de la fermentación, la pulpa adherida a las semillas, empieza a convertirse en un líquido que comienza ser drenado. Bajo condiciones anaeróbicas, los

microorganismos comienzan a producir ácido acético y etanol. La muerte ocurre durante el segundo día, siendo los principales factores que contribuyen el ácido acético producido por la pulpa y las altas temperaturas que se llegan a alcanzar (entre 45-50 °C). Como resultado de esta fase anaeróbica se producen reacciones de hidrólisis enzimáticas; las antocianinas son hidrolizadas debido a la acción de enzimas glucosidasas a antocianidinas libres, que son oxidadas a quinonas y polimerizan con catequinas para formar taninos complejos; resultando en la pérdida de la coloración violeta de los cotiledones. Las antocianinas desaparecen rápidamente durante el proceso de fermentación, estimándose un 93% de pérdidas después de 4 días de fermentación” (WOLLGAST y ANKLAM, 2000).

“Después del segundo día, comienza a tener lugar la segunda fase de la fermentación, la fermentación aeróbica. El cambio de las condiciones anaeróbicas a las aeróbicas, se producía una reducción en el nivel de (poli)fenoles que era mostrado por la disminución del valor de TEAC (capacidad antioxidante equivalente). Durante esta fase aeróbica, la enzima polifenol oxidasa (PPO) actúa primero oxidando a o-quinonas a la mayor parte de los (poli)fenoles (epicatequinas, catequinas y antocianidinas), que pueden reaccionar con aminoácidos y proteínas o polimerizar con otros flavonoides teniendo lugar la formación de taninos complejos de elevado peso molecular. Taninos que forman complejos con proteínas a través de puentes de hidrogeno siendo el resultado de esta reacción la formación de pigmentos, insolubles en agua, de color marrón. De esta forma, el contenido de epicatequinas y (poli)fenoles solubles es reducido aproximadamente a un 10 y 20% respectivamente de su valor inicial” (WOLLGAST y ANKLAM, 2000).

“Existe correlación entre el contenido (poli)fenoles con el grado de fermentación en semillas de Ecuador; y publicaron que el contenido de (poli)fenoles y (-)-epicatequina era más bajo en semillas más fermentadas (color marrón más oscuro). Existe una disminución del contenido de (poli)fenoles totales y (-)-epicatequina en semillas al aumentar los días de fermentación; mostrando un descenso en la concentración de (poli)fenoles desde el 16 al 6% después de 6 días de fermentación. AFOAKWA *et al.* (2015) publicaron una

reducción del 30% de (poli)fenoles totales, 32% *o*-difenoles y 35% de antocianinas, después de 10 días de almacenamiento de mazorcas de cacao, en semillas fermentadas y secadas” (Caligiani *et al.*, 2007; citado por JOVELLANOS, 2016).

“Durante la etapa de secado del grano se producen también pérdidas de (poli)fenoles debidas a reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimático a partir de la polimerización de la quinona. En esta etapa, la enzima PPO aunque con una actividad mucho más reducida, continúa actuando ya que, con el incremento de pH y la elevada captación de oxígeno, se producen las condiciones apropiadas para la oxidación de los fenoles” (BRITO, 2000).

2.2.3. Clasificación de los polifenoles

Desde un punto de vista estructural, los compuestos fenólicos pueden clasificarse en fenoles simples: benzoquinonas, acetofenonas, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas, benzoicos, fenilacéticos, cinámicos, cromonas, naftoquinonas y polifenoles. Estos últimos se caracterizan por tener uno o más grupos fenoles, y se dividen a su vez en xantonas, estilbenos, antraquinonas, ligninos, taninos hidrolizables y favonoides. “La biosíntesis de los flavonoides como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: **la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos**. Los flavonoides son los compuestos polifenólicos más abundantes de las plantas y casi todos son considerados pigmentos, abarcan todo el espectro de la luz visible y ultravioleta. Se caracterizan por una estructura benzo- γ -pirona (C6-C3-C6) que permite la sustitución en diversas posiciones de diferentes grupos funcionales como hidroxilos, metoxilos u O-glucósidos, lo que explica las más de 8000 estructuras caracterizadas hasta la fecha, y que se pueden clasificar como: chalconas, dihidrochalconas, auronas, flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, flavanoles (catequinas), flavandioles, antocianidinas, isoflavonas, bioflavonoides y proantocianidinas” (TRILLO, 2015).

“Los flavanoles poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C-3. Pueden aparecer como monómeros o como polímeros con distintos grados de polimerización. Los flavanoles más representativos en los

alimentos son de tipo flavan-3-ol, y estos pueden aparecer como monómeros (catequinas), como dímeros condensados entre sí, y como oligómeros (procianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). La catequina ha mostrado ser un antioxidante más potente aún que el ácido ascórbico (vitamina C), la Vitamina E o los carotenoides” (Garrido y Borges, 2013; citado por TRILLO, 2015).

2.2.4. Fuentes naturales principales de polifenoles

“El contenido cualitativo y cuantitativo de polifenoles es diferente en cada especie vegetal. Entre las plantas con alto contenido en polifenoles se encuentran el cacao (*Theobroma cacao*), la uva (*Vitis vinifera*), el té (*Camelia sinensis*), la manzana (*Malus domestica*) y diversas bayas. Así pues, las fuentes mayoritarias de polifenoles en la dieta humana son principalmente las frutas, el té, el vino y el chocolate. En el cacao, los flavanoles están principalmente en forma de epicatequinas, catequinas y procianidinas. El vino es rico en catequinas y procianidinas, y en el té los flavanoles se encuentran fundamentalmente como derivados de galatos (galocatequina, epigalocatequina y galato de epigalocatequina, principalmente)” (SHI *et al.*, 2003).

2.2.5. Medición de polifenoles totales

La determinación cuantitativa de los polifenoles totales en cacao y sus productos incluyen su medición por el método de Folin-Ciocalteu o la cuantificación por HPLC de (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y en algunos casos del contenido de procianidinas tipo β . El método de Folin-Ciocalteu, es simple, sensible y preciso sin embargo la reacción es lenta a pH ácido y específica a pH básico. SINGLETON y ROSSI (1965) “desarrollaron los parámetros necesarios para la obtención de datos reales, como la relación de volumen entre el reactivo de F-C y la base, el tiempo y la temperatura de reacción la longitud de onda y el uso de ácido gálico como patrón estándar. Investigaciones recientes han utilizado el método de F-C variando el uso de ácido gálico por equivalentes de (\pm)-Catequina, ácido tanínico, ácido clorogénico, vainilínico y equivalente de ácido felúrico como patrones” (Prior *et al.*, 2005; citado por CADENA, 2008).

“Los polifenoles presentes reaccionan con reactivos redox específicos (reactivo de Folin-Ciocalteu) formando un complejo azul, el cual puede ser cuantificado mediante la luz visible de la espectrofotometría. Durante la reacción se forma un cromóforo azul, constituido por un complejo de fosfotungstato-fosfomolibdato, donde la máxima absorción de los cromóforos depende de la concentración de compuestos fenólicos” (Blainski *et al.*, 2013; citado por HERNÁNDEZ, 2015).

2.2.6. Factores que intervienen en la extracción de polifenoles

“De acuerdo a investigaciones realizadas previamente, en la extracción de polifenoles pueden influir ciertos factores tales como: relación líquido-sólido, concentración del solvente, pH, temperatura, tiempo de calentamiento y extracción, por lo cual, dependiendo de la combinación adecuada de estos factores se puede optimizar la extracción” (WU *et al.*, 2011; citado por HERNÁNDEZ, 2015).

2.3. Metales pesados

“El término de metal pesado refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas. Los ejemplos de metales pesados o algunos metaloides, incluyen el mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), y plomo (Pb), entre otros” (LUCHO *et al.*, 2005). “Algunos autores consideran esta definición un tanto ambigua y prefieren utilizar la denominación de metales traza. Bajo esta denominación se engloban todos los elementos presentes a concentraciones no detectables mediante técnicas de análisis clásicas, de forma que se considera elemento traza a los elementos detectables en un rango de concentración de 100 a 0,01 mg/kg y se reserva el término ultratrazas a niveles comprendidos entre 0,01 mg/kg y 10 µg /kg” (WARD, 1995).

2.3.1. El cadmio

El cadmio es un elemento químico de número atómico 48; peso atómico de 112.40 y una densidad relativa de 8.65 a 20 °C (68 °F), valencia química 2. Su punto de fusión de 320.9 °C (610 °F) y de ebullición de 765 °C

(1410 °F). Es un metal dúctil, de color blanco con un ligero matiz azulado (YALCINKAYA, 2001).

2.3.2. Origen del cadmio

“El cadmio proviene de las emanaciones volcánicas representan casi la mitad del total estimado movilizado a nivel global, actividad minera, siderúrgica, industrias químicas y fertilizantes; por lo tanto, en la corteza terrestre el cadmio se encuentra en cantidades muy bajas ($< 1 \text{ mg/kg}^{-1}$), con un promedio de 0.1 y 0.2 mg/kg^{-1} ” (SÁNCHEZ, 2016); sin embargo, (GONZÁLEZ, 2010) afirma que en los suelos fluctúa entre valores menores de 1 a 3 mg/kg^{-1} de cadmio.

“El cadmio es un metal pesado, se produce de forma natural en la corteza terrestre y en el agua del océano y se emite al medio ambiente como resultado de las dos actividades: naturales y antropogénicas. **Las fuentes naturales** de cadmio incluyen actividad volcánica, erosión de las rocas que contienen cadmio, espuma del mar, y la movilización de cadmio depositadas en suelos, sedimentos, vertederos, etc”. (BROWN *et al.*, 1984). “**Las fuentes antropogénicas** de cadmio incluyen la extracción y fundición de minerales que contienen zinc, quema de combustibles fósiles, incineración de residuos y emisiones procedentes de pilas desechadas o vertederos municipales” (FAO, 2012).

2.3.3. Dinámica de los metales pesados en el suelo

“Los metales pesados presentes en los suelos no se comportan como elementos estáticamente inalterables, sino que siguen unas pautas de movilidad generales. La dinámica de los metales pesados en el suelo puede clasificarse resumidamente en cuatro vías: movilización a las aguas superficiales o subterráneas; transferencia a la atmósfera por volatilización; absorción por las plantas e incorporación a las cadenas tróficas, retención de metales pesados en el suelo de distintas maneras: disueltos o fijados, retenidos por adsorción, complejación (compuestos orgánicos) y precipitación (carbonatos y fosfatos)” (GARCÍA y DORRONSORO, 2005).

2.3.4. Comportamiento del cadmio en el suelo

“El comportamiento del cadmio es parecido al del zinc, sólo que es mucho más afín al azufre y más móvil en ambientes ácidos. En ambientes naturales el cadmio se encuentra con valencia 2+ por lo que en solución forma CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO_3^+ , CdCl_3^- , CdCl_4^{2-} , $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$ y $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$ y quelatos orgánicos. Bajo condiciones extremas de oxidación tiende a formar minerales como CdO y CdCO_3 y a acumularse en fosfatos y en depósitos biolíticos” (KABATA-PENDIAS, 2000). “En suelos ácidos, la concentración de Cd^{2+} puede ser importante, ya que este ión se adsorbe débilmente en las arcillas y otras partículas materiales. Sin embargo, por encima de un pH de 7 el Cd^{+2} precipita como sulfuro, carbonato o fosfato” (BAIRD, 2001).

“La concentración de cadmio promedio en los suelos es de 0.07 a 1.1 mg/kg. A valores altos de pH el cadmio no es móvil, posiblemente por la baja solubilidad de los carbonatos y fosfatos, en la movilidad del cadmio también es importante la alta afinidad del cadmio con la materia orgánica, oxihidróxidos de hierro, alófano e imogolita, no así con las arcillas. En general podemos decir que a pH ácido los oxihidróxidos de hierro y la materia orgánica controlan la solubilidad del cadmio y que a pH alcalinos el Cd precipita, por lo que es inmóvil. La concentración de Cd en la solución del suelo es de 0.2 a 6 ug/L; en suelos contaminados se ha llegado a reportar concentraciones hasta de 400 ug/L. Para recuperar los suelos contaminados por cadmio se puede recomendar entre otras cosas: lavados en suelos ácidos, encalar (para elevar el pH) y aumentar la capacidad de intercambio de cationes” (CHANMUGATHAS y BOLLAG, 1987).

2.3.5. Ingreso, transporte y acumulación de cadmio en las plantas

Es bien conocido que un exceso de cationes esenciales como el Zn^{2+} y el Ca^{2+} , producen un efecto protector frente a la toxicidad del cadmio (ARAVIND y PRASSAD, 2005), lo que sugiere la existencia de una competencia de estos cationes por la entrada a la planta. “Como el cadmio no es un metal esencial, se asume que no existen mecanismos de entrada específicos para el mismo; pero entre las proteínas responsables de la entrada de cadmio a la célula cabe destacar el transportador específico de calcio LCT1” (CLEMENS *et al.*,

1998), y la proteína IRT1, perteneciente a la familia de transportadores de Zn y Fe (ZIP) (GUERINOT, 2000).

2.3.6. Contaminación del cacao con cadmio y plomo

“Los metales pesados en alimentos tienen múltiples orígenes, es posible que la contaminación del producto se dé en la etapa de cultivo, producción y transformación. Las concentraciones de metales pesados en los suelos están asociadas a los ciclos biológicos y geoquímicos y pueden alterarse por actividades antropogénicas como la practicas agrícolas, el transporte, las actividades industriales y la eliminación de residuos, entre otras” (PRIETO, 2009).

“Los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes sistemas vivos. Además, se ha establecido que los principales factores que influyen en la movilización de metales pesados en el suelo son el pH, potencial redox, presencia de iones, capacidad de intercambio (catiónico y/o aniónico), contenido de materia orgánica y textura, entre otras; además la contaminación por metales pesados puede producir acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad en los suelos” (SAHUQUILLO, 2003).

En un estudio realizado en la provincia de Leoncio Prado, región Huánuco, determinó que las semillas de cacao de parcelas de esta zona, revelaron contenidos de cadmio en niveles superiores al permitido (0.5 ppm), lo cual puede limitar la exportación de este producto agrícola. HUAMANÍ *et al.* (2016) en la zona del Alto Huallaga (Perú), determinó la presencia de metales pesados en almendras de cacao de los socios de Cooperativa Agroindustrial Naranjillo, reportando valores de 1.53 y 13.69 ppm de Cd y Pb, respectivamente, valores superiores a los límites permisibles de la Unión Europea.

Actualmente los contenidos de cadmio en los derivados del cacao, está regulado por diversas organizaciones y estados del mundo, por ejemplo:

Cuadro 4. Niveles máximos admisibles de cadmio y plomo en alimentos, manteca y polvo de cacao.

Instituciones reguladoras	Concentraciones de Pb (mg/kg)	Concentraciones de Cd (mg/kg)
Comisión de Códex alimentario (CAC)	0,20	0,10
Organización Mundial de la Salud (OMS)	0,18 - 1,20	0,10
American Environmental Safety Institute (AESI)	0,0002 - 0,105	0,002 – 0,136

Fuente: Lead contamination in cocoa and cocoa products: isotopic evidence of global contamination (CHARLEY, 2005).

Cuadro 5. Niveles máximos de cadmio en el chocolate y productos derivados de cacao.

Productos	Nivel máximo de cadmio (mg/kg)
1. Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao <30%.	0,20
2. Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao <50%; chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao ≥30%.	0,06
3. Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao ≥50%.	2,00
4. Cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (chocolate para beber)	1,50

Fuente: (FAO, 2012).

Cuadro 6. Niveles máximos admisible de cadmio en derivados de cacao según la Unión Europea, vigente a partir del 1 de enero del 2019.

Productos	Nivel máximo de cadmio (mg/kg)
Chocolate con leche con un contenido en materia seca total de cacao < 30%.	0,10
Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao < 50%; y ≥ al 30%.	0,30
Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 50%	0,80
Cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (chocolate para beber).	0,60

Fuente. (Unión Europea, 2014; citado por DÍAZ, 2014).

Cuadro 7. Contenido máximo admisible de Pb y Cd en almendras de cacao.

Metal pesado	UE	Codex alimentarius
	Almendra de cacao (ppm)	Almendra de cacao (ppm)
Plomo	2.00	2.00
Cadmio	0.50	-

Fuente: Mas y Ascue (1993); citado por GARCÍA y DORRONSORO (2002).

2.3.7. Determinación de metales pesados en alimentos

“Para determinar la presencia de cadmio en cualquier tipo de muestra, la etapa más importante es la preparación de la muestra, para ello se utilizan diversas técnicas con el fin de extraer el elemento de interés, para ello se deben seguir algunas técnicas que se encuentran normalizadas por organizaciones internacionales como la EPA, ISO, AOAC, u otra técnica que se encuentre validada. Luego del tratamiento de las muestras, se realiza la detección según las técnicas analíticas recomendadas por las mismas organizaciones internacionales” (BARRUETA, 2013).

“Existen diversas metodologías para la determinación de metales pesados, en su mayoría basadas en técnicas electroquímicas, y espectrométricas. Dentro de las técnicas espectrométricas las más conocidas y utilizadas son: espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS), espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS), espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG - AAS), espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS), Espectrometría de emisión atómica con llama (F- AES), espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES), espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)” (BARRUETA, 2013).

2.3.8. Estrategias para disminuir el contenido de cadmio en cacao

a. Escurrido del mucílago

“El mucílago es una sustancia viscosa, generalmente hialina, que contiene el cacao. Es un producto orgánico de origen vegetal, de peso molecular elevado, superior a 200.000 g/gmol, cuya estructura molecular completa es desconocida. Están conformados por polisacáridos celulósicos que

contienen el mismo número de azúcares que las gomas y pectinas. Los mucílagos se suelen confundir con las gomas y pectinas, diferenciándose de estas sólo en las propiedades físicas. Mientras que las gomas y pectinas se hinchan en el agua para dar dispersiones coloidales gruesas y las pectinas se gelifican; los mucílagos producen coloides muy poco viscosos, que presentan actividad óptica y pueden ser hidrolizados y fermentados. Se forma en el interior de las plantas durante su crecimiento. Las semillas de cacao están rodeadas por una pulpa aromática la cual procede de sus tegumentos. La pulpa mucilaginoso está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%), y sales (8-10%). Durante el proceso de cosecha de las semillas de cacao (el producto de exportación), la pulpa es removida por fermentación e hidrolizada por microorganismos” (MÁRQUEZ y SALAZAR, 2015).

Estudios realizados en Ecuador demuestran que estrategias sencillas tales como lavar la pulpa de los granos antes del proceso de fermentación, pueden eliminar cantidades importantes de contaminantes sin afectar la calidad del grano fermentado; también se ha podido identificar que el contenido de cadmio en los diversos órganos de la planta del cacao es variable (IPNI, 2015).

b. Uso de microorganismos

“Los hongos filamentosos y levaduras, han sido reportados como materiales biosorbentes eficientes de diversos elementos metálicos. La acumulación de metales en estos microorganismos se da como resultado, tanto del transporte activo, para propósitos metabólicos, así como del transporte pasivo y retención de especies químicas por los constituyentes de la pared celular. Un numeroso grupo de trabajos se han enfocado en encontrar la interacción entre los hongos y los metales. La atención se ha enfocado, principalmente, al uso de *Saccharomyces cerevisiae* como material biosorbente” (CHÁVEZ *et al.*, 1993).

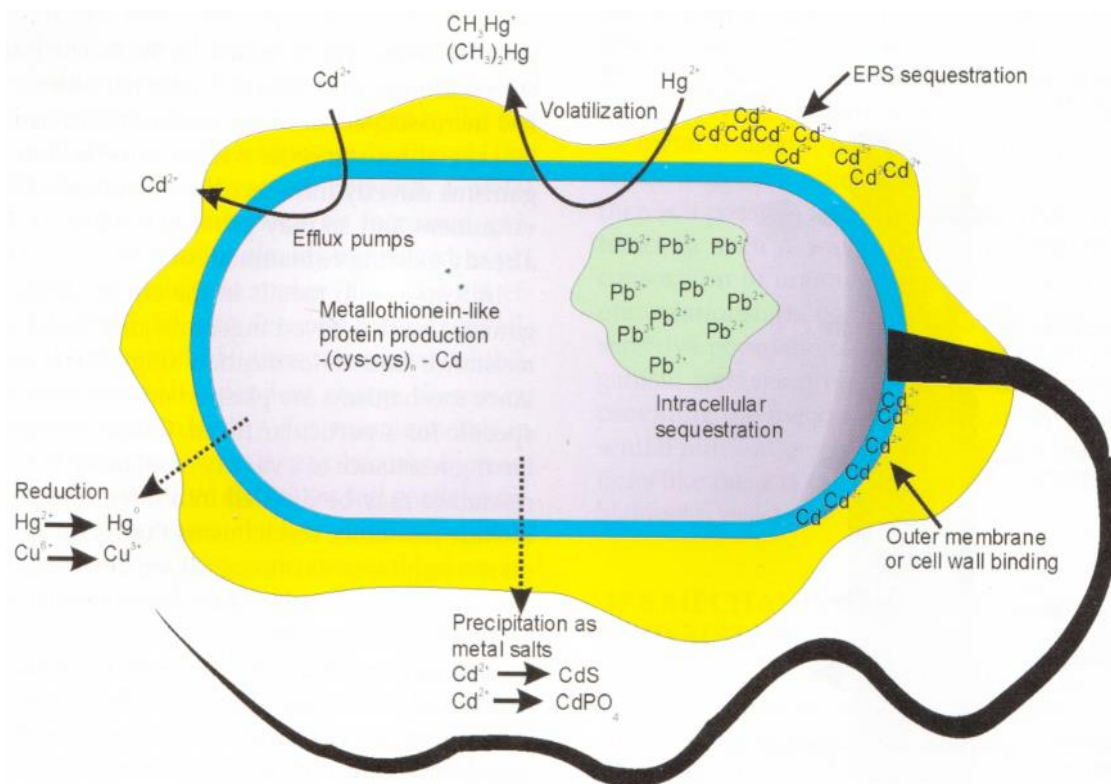


Figura 2. Absorción de metales pesados por levaduras (CHÁVEZ *et al.*, 1993)

“Los microorganismos tienen la propiedad de absorber metales pesados (Cd, Pb y Zn) en sus paredes celulares gracias a compuestos orgánicos llamados péptidoglucanos específicos para *Saccharomyces cerevisiae*. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es una de las cepas nativas que intervine en la fermentación del cacao, al aumentar su población en dicho proceso se podría mejorar la absorción de cadmio y mejorar la calidad del cacao (inocuidad). La capacidad de biosorción de estos microorganismos se debe a la potencial cantidad de compuestos orgánicos capaces de secuestrar y/o intercambiar iones metálicos, entre los cuales destacan, polialginatos, péptidoglucanos, polisacáridos, glicoproteínas, flavonoides, etc., en los cuales los centros atrayentes de cationes son los grupos funcionales amino, hidroxilo, carboxilato, fosfato y sulfhidrilos, conocidos por su potencial nucleófilo” (CHÁVEZ *et al.*, 1993). “Los metales se adsorben a las levaduras principalmente por interacciones electrostáticas, aunque pueden llegar a presentarse ´ interacciones hidrofóbicas como las fuerzas de van del Waals. Sin embargo, y de manera general, los valores de hidrofobicidad altos, se relacionan con una menor

eficiencia de remoción de cationes como el Cd” (Holle., 2012). “En algunos ocasiones, la adsorción sobre la superficie celular externa es un sistema de defensa de la biomasa contra los metales pesados tóxicos, donde los microorganismos producen una capa polimérica externa que permite la penetración del metal a través de la pared celular, también es conocido como mecanismo de bio – absorción en el cual los iones son removidos de la solución a través del proceso de precipitación, causado por los compuestos producidos por el sistema de defensa de las células” (DIMAS, 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. CAMPO experimental

a. Ubicación

La presente investigación se desarrolló en los meses de octubre, noviembre y diciembre del año 2018, en el centro de beneficio de la Cooperativa Agroindustrial Cacao Alto Huallaga (CAICAH), ubicado en el distrito de Castillo Grande, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco; según la clasificación del científico norteamericano Holdridge, esta zona corresponde a un clima de Bosque Muy Húmedo Tropical (bmh - T), temperatura media 26 °C, humedad relativa 84%, coordenadas geográficas: mE 0389535 y mN 8974399 con una altitud de 654 msnm.

b. Características de la parcela

La parcela de donde se extrajeron los granos de cacao se llama “El Mirador”, perteneciente a la señora Cecilia Huancho Hualinga, ubicada en el caserío de Venenillo, distrito de José Crespo y Castillo, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco; es una parcela de 8 ha, posee el cultivar CCN-51 de 12 años de edad, libre de sombra, actualmente dicha parcela cuenta con certificación orgánica, con una producción estimada de 1000 kg/ha/año de grano seco. La unidad fisiográfica donde está instalada la plantación de cacao corresponde a una terraza media, cuyo contenido inicial de cadmio disponible en el suelo y cadmio total del grano de cacao fue de 0.18 y 1.80 ppm (Anexo, Figuras 38 y 24); el contenido de cadmio en el grano está muy por encima de los niveles máximos permitidos que es de 0.50 ppm (Más y Azcue, 1993; citado por GARCÍA y DORRONSORO, 2002).

c. Datos meteorológicos

En el Cuadro 8, se presentan los datos meteorológicos, obtenidos de la Estación Experimental Meteorológica “José Abelardo Quiñones” de Tingo María, correspondiente al año 2018; cuyos valores promedios son: temperatura media 25.41 °C, la precipitación promedio fue 297.94 mm/mes, la

humedad relativa promedio fue de 84.08% y finalmente las horas sol promedio fue de 145.59, en el mes de agosto fue mayor.

Cuadro 8. Datos meteorológicos registrados durante la ejecución del experimento – año 2018.

Meses	Temperatura (°C)			Precipitación (mm)	H R (%)	Insolación (Horas sol)
	Max.	Med.	Min.			
Enero	30.10	25.40	20.60	404.40	86.00	131.30
Febrero	29.80	25.60	21.30	305.90	85.00	101.00
Marzo	29.90	25.30	20.80	485.00	85.00	116.90
Abril	29.90	25.40	20.60	224.80	86.00	140.20
Mayo	30.60	25.60	20.70	181.20	84.00	177.20
Junio	29.40	24.60	19.70	182.60	85.00	160.00
Julio	30.40	24.90	19.50	62.40	83.00	175.40
Agosto	30.70	25.10	19.00	214.60	82.00	196.30
Setiembre	32.30	26.10	20.00	80.40	79.00	195.40
Octubre	30.50	25.70	21.00	485.50	83.00	124.20
Noviembre	29.60	25.40	21.30	494.10	86.00	107.00
Diciembre	30.30	25.80	21.40	454.40	85.00	122.20
Total	363.50	304.90	245.90	3575.30	1009.00	1747.10
Promedio	30.29	25.41	20.49	297.94	84.08	145.59

Fuente: Universidad Nacional Agraria de la Selva, Estación Meteorológica: José Abelardo Quiñonez – 2018.

3.1.2. Análisis físico-químico del suelo

Antes de iniciar el presente estudio de investigación, se sacó una muestra representativa de suelo de la parcela de cacao de donde se obtuvo los granos de cacao; la misma que se llevó al laboratorio de análisis de suelos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS, Tingo María) para su análisis de caracterización completa (clase textural, pH, materia orgánica, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, hidrógeno, aluminio, capacidad de intercambio catiónico, bases cambiables, acidez cambiante y saturación de aluminio) y contenido de cadmio disponible.

En el Cuadro 9, se presenta los resultados del análisis físico-químico del suelo. Se observa una clase textural franco limoso, considerados como suelos ideales ya que contienen una mezcla equilibrada de arena, limo y

arcilla, lo que favorece la permeabilidad del agua y retención de nutrientes (RUCKS *et al.*, 2005). Además, se observa un pH de 7.15 se denomina suelo neutro (PIEDRAHÍTA, 2009; SADEGHIAN, 2016). El contenido de M.O fue 1.48 % ANDRADE y MARTÍNEZ (2014), manifiestan, un suelo de textura franco el porcentaje de M.O. debe ser mayor a 2.5% para ser considerado alto. Tomando en cuenta la referencia el contenido de suelo usado en el experimento es bajo en porcentaje de M.O.

Cuadro 9. Análisis físico – químico del suelo (parcela).

Parámetro	Valor	Método empleado
Análisis físico:		
Arena (%)	16.00	Hidrómetro
Arcilla (%)	19.00	Hidrómetro
Limo (%)	65.00	Hidrómetro
Clase textural	Franco limoso	Triángulo textural
Análisis químico:		
pH (1:1) en agua	7.15	Potenciómetro
M. O. (%)	1.48	Walkey y Black
N - Total (%)	0.07	% M.O. x 0.05
Fósforo disponible (ppm)	10.00	Olsen Modificado
Potasio disponible (ppm)	71.00	Acetato de amonio
Pb disponible (ppm)	-	-
Cd disponible (ppm)	0.18	EDTA - EAA
Ca cambiante (cmol(+)/kg)	9.66	EAA
Mg cambiante (cmol(+)/kg)	1.41	EAA
K cambiante (cmol(+)/kg)	0.06	EAA
Na cambiante (cmol(+)/kg)	0.94	EAA
Al cambiante (cmol(+)/kg)	Yuan
H cambiante (cmol(+)/kg)	Yuan
CIC	12.07	EAA
Bas. Camb. (%)	100.00	Ca + Mg +K+ Na/CIC x 100
Ac. Cam. (%)	0.00	CIC - Bas. Camb.
Sat. Al (%)	0.00	

Fuente: Laboratorio de suelos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva – UNAS.

Respecto al contenido de fósforo y potasio disponible el contenido es de 10 y 71 ppm, contenido denominados bajos según GUERRERO (2012) y PELLEGRINI (2017), ya que hacen referencia que el contenido de fósforo adecuado es mayor a 15 y potasio mayor a 120 ppm. El contenido de Ca y Mg se de 9.66 y 1.41 cmol (+)/kg, valor alto para Ca y bajo para Mg, Según SADEGHIAN (2012) refiere que el contenido de Ca es mayor a 6 cmol (+)/kg, se

considera alto y para Mg mayor a 2.5 cmol (+)/kg. El contenido de Cd disponible es de 0.18 ppm, nivel bajo. “Según la Guía de Protección Ambiental de la Comunidad Europea, Cd disponible es 0.80 ppm” (SUBERO, 2013).

3.2. Métodos

3.2.1. Componentes en estudio

a. Cacao CCN-51

Se usó granos frescos de cacao, escurridos y sin escurrir que hayan alcanzado la madurez fisiológica óptima, de una plantación adulta de 12 años de edad.

b. Levadura

La levadura a utilizada en el presente trabajo de investigación corresponde a la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, la cual tiene alta afinidad por los metales pesados la misma que fue obtenida en el mercado de Tingo María.

3.2.2. Tratamientos en estudio

En el Cuadro 10, se presenta la descripción de los tratamientos en estudio.

Cuadro 10. Descripción de los tratamientos en estudio.

Tratamientos	Descripción
T ₀	Grano fermentado sin escurrir
T ₁	Grano fermentado escurrido por 36 horas
T ₂	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p
T ₃	Grano sin fermentar (testigo)

3.2.3. Diseño experimental

En el presente trabajo de investigación se empleó el diseño completamente al azar (DCA) con 4 tratamientos, incluido el testigo y 3 repeticiones, asimismo; las características evaluadas fueron sometidas al análisis de variancia y para la comparación de promedios se utilizó la prueba de

Tukey con un nivel de significación de $\alpha=0.05$, utilizando el programa estadístico Minitab 17.

a. Modelo estadístico

El modelo estadístico utilizado en la presente investigación es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Es el j-ésimo elemento perteneciente al i-ésimo tratamiento

μ = Efecto de la media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

E_{ij} = Error experimental asociado al j-ésimo elemento del i-ésimo tratamiento

Para:

$i = 0, 1, 2, 3$, tratamientos

$j = 1, 2, 3$, repeticiones

b. Análisis de variancia (ANVA)

En el Cuadro 11, se presenta el esquema del análisis de variancia.

Cuadro 11. Esquema del análisis de variancia (ANVA).

Fuente de variabilidad	Fórmula	Grados de libertad
Tratamientos	$t-1$	3
Error experimental	$(t) (r-1)$	8
Total	$tr-1$	11

3.2.4. Ejecución el experimento

a. Selección de la parcela de cacao clon CCN-51

Antes de iniciar el estudio, se realizó el muestreo y cuantificación de cadmio total de varias parcelas de cacao; con la finalidad de identificar aquella parcela que tenga un contenido de cadmio mayor a 1.50 ppm.

La parcela de cacao seleccionada tuvo un contenido de cadmio total de 1.80 ppm, excluyendo la cascarilla.

b. Recolección de los granos de cacao

Se cosecharon las mazorcas fisiológicamente maduras de la parcela de cacao seleccionada (1.80 ppm de Cd). El quiebre de las mazorcas se realizó utilizando un machete sin filo; depositando los granos de cacao en baldes plásticos, evitando en todo momento el escurrido del mucílago; en horas de la tarde al promediar las 4:00 pm los granos fueron trasladados en timbos de 200 L; al centro de acopio de la Cooperativa Agroindustrial Cacao Alto Huallaga. El transporte de los granos se realizó el mismo día de la cosecha, utilizando para ello unidades motorizadas.

c. Implementación de los tratamientos - fermentación

La implementación de los tratamientos, se realizó siguiendo la siguiente metodología:

- Tratamiento T₀ (grano fermentado sin escurrir). El grano fresco de cacao, llegado de campo se puso a fermentar en los cajones de madera; la masa de cacao fue cubierta con costales de yute, al igual que todos los tratamientos. La primera remoción de los granos se hizo a las 48 horas y el volteo cada 24 horas. Se fermentó 6 días en total. Se utilizó 60 kg de grano fresco por cada repetición. Este método de fermento es el que utiliza la CAICAH, para fermentar sus volúmenes de cacao.

- Tratamiento T₁ (grano fermentado escurrido por 36 horas). Para esta labor se utilizó una malla simple de 0.50 cm de diámetro; suspendiendo la malla con los granos frescos de un larguero de madera por 36 horas, para garantizar el escurrido del grano. Después de ello recién se colocó la masa de cacao a fermentar en los cajones de madera, la primera remoción se realizó a las 48 horas y luego cada 24 horas. Se fermentó por un espacio de 6 días. Se utilizó 60 kg de grano fresco por cada repetición.

- Tratamiento T₂ (grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p). Al grano fresco llegado de campo, se aplicó las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; para ello se pesó 60 g de levadura, activándolas por un periodo de 20 minutos en 120 g de azúcar diluida

en 420 ml de agua a una temperatura de 37 °C; una vez aplicadas las cepas de levaduras; se cubrió la masa fresca con sacos de yute, iniciando su proceso de fermento. El primer volteo de la masa se realizó a las 48 horas y luego cada 24 horas. El tiempo de fermentación de los granos de cacao, fue por un tiempo de 5 días. Se utilizó 60 kg de grano fresco por cada repetición.

- Tratamiento T₃ (grano sin fermentar – testigo). Los granos frescos de cacao llegados de campo, fueron puestos a secar mediante radiación solar directa. Se usó tres (3) kg de grano fresco por cada repetición (3).

Durante el experimento se realizó el registro de la temperatura de cada tratamiento en forma diaria.

d. Secado de los granos de cacao

Utilizando costales de polipropileno de primer uso, las muestras de cacao fueron secadas a través de la radiación solar directa, hasta una humedad aproximada del 7%. Las muestras de grano al momento del secado fueron correctamente identificadas por tratamiento, utilizando plumón indeleble y cinta masking. Una vez secas las muestras de cacao de cada tratamiento, fueron codificadas y enviadas al laboratorio para sus respectivos análisis de cadmio y polifenoles.

3.2.5. Variables a evaluar

a. Contenido de macro y microelementos del grano de cacao

El nitrógeno total fue determinado por el método de Dumas y el fósforo total por el método colorimétrico. Los contenidos totales de potasio, calcio, magnesio, cobre, zinc y hierro fueron analizados mediante espectrometría de absorción atómica por llama (FAAS). El contenido de cadmio total de los granos de cacao, se cuantificó por espectrofotometría de absorción atómica (FAAS), mediante el método oficial de la AOAC 999.11. Los análisis se realizaron en el laboratorio de Química Agrícola “Valle Grande”, Cañete, Lima. El método utilizado para la cuantificación del cadmio total del grano excluye la testa o cascarilla.

b. Determinación de polifenoles totales

Se realizó mediante el método colorímetro de Folin-Ciocalteu reportado por SULTANA *et al.* (2009), con algunas modificaciones: 100 µL de muestra seca de cacao (7% de humedad) fueron mezclados con 500 µL de solución Folin-Ciocalteu 2N (Merck) (1:10 v/v) con H₂O, luego de 8 minutos de reacción se mezcló con 400 µL de Na₂CO₃ (Sigma Aldrich) al 7.5% y se almacenó por 2 horas a temperatura ambiente bajo oscuridad. La Absorbancia se registró a 740 nm (Espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10, USA). La medida se comparó con una curva de calibración de ácido gálico $R^2 = 0.9998$ en concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL. Los resultados fueron expresados en gramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra (g EAG/100 g).

c. Determinación de las características físicas del grano

Las características físicas del grano fueron determinadas mediante la prueba de corte, utilizando para ello una guillotina metálica; se evaluó el porcentaje de granos pizarrosos, violetas, mohosos y fermentados a nivel de grano seco.

Las características físicas del grano fueron determinadas por las siguientes normas técnicas: NTP – ISO 1114/2006 – Granos de cacao – Prueba de corte y la NTP – ISO 2291/2006 – Granos de cacao – Determinación del contenido de humedad.

d. Correlación de Pearson

La correlación de Pearson se realizó utilizando el programa estadístico Minitab 17.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Contenido de macro y microelementos de los granos de cacao clon CCN-51

4.1.1. Contenido de macro y microelementos totales en el cotiledón de los granos de cacao clon CCN-51

Los análisis de variancia (Cuadro 12), para nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg) total en el cotiledón de los granos de cacao. Se observa que existen diferencias estadísticas significativas para nitrógeno (N) y altamente significativas para fósforo, potasio y magnesio (P, K y Mg) entre los tratamientos en estudio; lo cual indica que al menos uno o más tratamientos presentan un comportamiento estadístico diferente; sin embargo, para el elemento calcio (Ca) no se observan diferencias estadísticas significativas, es decir todos los tratamientos tienen el mismo efecto estadístico. Los coeficientes de variación (C.V.) para el contenido de los macroelementos es 3.91% (nitrógeno), 6.79% (fósforo), 4.59% (potasio), 11.56% (calcio) y 4.71% (magnesio) respectivamente; según (Pimentel, 1985; citado por GORDÓN y CAMARGO, 2015) manifiestan que para ensayos de naturales a agrícola los coeficientes de variación (C.V.) se consideran bajos cuando son inferiores a 10%, medios de 10 a 20%, altos cuando van de 20 a 30% y muy altos cuando son mayores al 30%. Tomando la referencia podemos manifestar que el coeficiente de variación (C.V.) para N, P, K y Mg muestran menor variación que para Ca.

Al existir diferencias estadísticas significativas en el análisis de variancia (ANVA), hace necesario realizar la prueba de comparación medias de Tukey, la cual confirma la existencia de diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) para el contenido de macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y calcio) en el cotiledón del grano de cacao clon CCN-51, tal como se muestra en el Cuadro 13.

Cuadro 12. Cuadrados medios del análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) totales analizados en el cotiledón de los granos de cacao.

Fuente de variación	GL	N-Total		P-Total		K-Total		Ca-Total		Mg-Total	
		CM		CM		CM		CM		CM	
Tratamientos	3	0.050000	S	0.015000	AS	0.022000	AS	0.000080	NS	0.007500	AS
Error experimental	8	0.005000		0.001000		0.001000		0.000108		0.000100	
Total	11										
C.V. (%)		3.91		6.79		4.59		11.56		4.71	

Leyenda:

- S = Significativo
- AS = Altamente significativo
- NS = No significativo

Cuadro 13. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) totales analizados en el cotiledón de los granos de cacao.

Clave	N-Total		Clave	P-Total		Clave	K-Total		Clave	Ca-Total		Clave	Mg-Total	
	%	Sig.		%	Sig.		%	Sig.		%	Sig.		%	Sig.
T ₃	2.09	a	T ₃	0.48	a	T ₃	0.85	a	T ₂	0.09	a	T ₃	0.34	a
T ₂	2.01	a b	T ₁	0.36	b	T ₁	0.73	b	T ₀	0.09	a	T ₂	0.24	b
T ₁	1.83	b	T ₂	0.34	b	T ₀	0.67	b	T ₃	0.09	a	T ₁	0.24	b
T ₀	1.83	b	T ₀	0.33	b	T ₂	0.67	b	T ₁	0.08	a	T ₀	0.23	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe significación estadística.

Leyenda:

T₀ = Grano fermentado sin escurrir

T₂ = Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p

T₁ = Grano fermentado escurrido por 36 horas

T₃ = Grano sin fermentar

En el Cuadro 13, se observa que el tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) presenta los mayores contenidos medios de macroelementos tanto en N, P, K y Mg, con valores de 2.09%, 0.48%, 0.85% y 0.34% respectivamente; además se muestra estadísticamente diferente a los demás tratamientos. Al no existir fermentación en el grano no se liberan exudados del cotiledón y por lo tanto no existe arrastre de minerales al medio exterior. El tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) presenta el mayor contenido de Ca, sin ser estadísticamente diferente a los demás tratamientos. Asimismo se muestra que el tratamiento T₀ (Grano fermentado sin escurrir) muestra los menores contenidos de N, P y Mg con valores de 1.83%, 0.33% y 0.23%; el tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) registra 0.67% de K y finalmente el tratamiento T₁ (Grano fermentado escurrido por 36 horas) alcanza 0.08% de Ca, estos dos últimos valores son los más bajos.

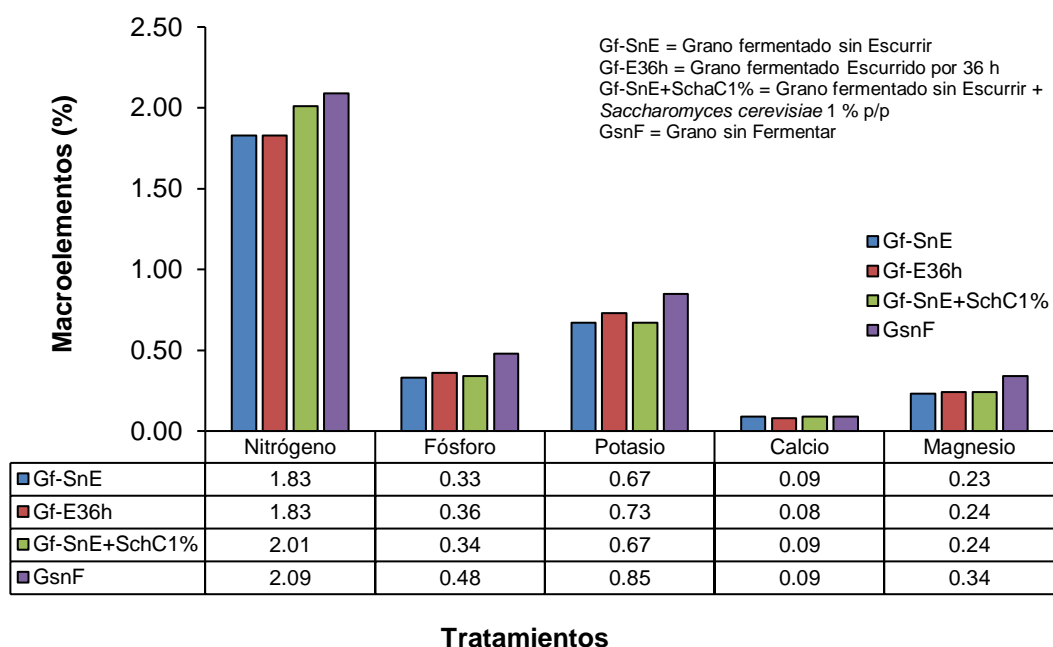


Figura 3. Contenido de macroelementos en función a los tratamientos en estudio.

En la Figura 3, mostramos el contenido de macroelementos de cada tratamiento, observándose que en el grano de cacao existe mayor

contenido de N seguido de K y P, los menores contenidos están representados por Mg y Ca respectivamente. “El nitrógeno está determinando en incremento de peso de almendras porque es componente de las proteínas y aminoácidos que tiene el fruto así mismo el contenido de potasio se explica estos resultados porque la función del potasio en la planta es transportar otros iones de elementos minerales a las células y absorción de iones de la solución suelo que son acumulados en la semilla del cacao, además ayuda la formación de hidratos de carbono y proteínas según” (AZCÓN-BIETO y TALAN, 2008; HUACHOS, 2015).

Los análisis de variancia (Cuadro 14), para cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe) y cadmio (Cd) en el cotiledón de los granos de cacao. Para el caso del Cu, Zn y Fe no se observan diferencias estadísticas significativas, todos los tratamientos en estudio son iguales. Sin embargo, se observa alta significación estadística para el contenido de Cd es decir que al menos uno o más de los tratamientos presentan un comportamiento estadístico diferente. Los valores de los coeficientes de variación (C.V.) para el contenido de cada micronutriente son los siguientes: 12.66% (Cu), 6.71% (Zn), 4.31% (Fe) y 17.97 % (Cd); para el caso del Cu y Cd los coeficientes de variación están en el intervalo del 10% al 20%, considerados como medios; con respecto al Cu y Zn los coeficientes de variación son inferiores al 10% considerados como bajos (Pimentel, 1985; citado por GORDÓN y CAMARGO, 2015).

En el Cuadro 15, se percibe que el tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) presenta los mayores contenidos medios de Cu, Zn, Fe y Cd con valores de 21.76 ppm, 48.75 ppm, 16.95 ppm y 1.21 ppm, se observa que para el caso del Cu, Zn y Fe confirman los resultados del ANVA ya que todos los tratamientos son estadísticamente iguales; a diferencia del Cd el tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) tiene un comportamiento estadístico diferente a los demás tratamientos. El menor valor está representado por el tratamiento T₀ (Grano fermentado sin escurrir), para Cu, Zn, Fe y para Cd el menor valor se muestra en el tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) con 0.54 ppm.

Cuadro 14. Cuadrados medios del análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de microelementos (cobre, zinc, hierro y cadmio) totales analizados en el cotiledón de los granos de cacao.

Fuente de variación	GL	Cu-Total		Zn-Total		Fe-Total		Cd-Total	
		CM		CM		CM		CM	
Tratamientos	3	8.45	NS	20.83	NS	0.83	NS	0.26	AS
Error experimental	8	6.25		9.50		0.49		0.02	
Total	11								
C.V. (%)		12.66		6.71		4.31		17.97	

Leyenda:

- S = Significativo
- AS = Altamente significativo
- NS = No significativo

Cuadro 15. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para microelementos (cobre, zinc, hierro y cadmio) totales analizados en el cotiledón de los granos de cacao.

Clave	Cu-Total		Clave	Zn-Total		Clave	Fe-Total		Clave	Cd-Total	
	ppm	Sig.		ppm	Sig.		ppm	Sig.		ppm	Sig.
T ₃	21.76	a	T ₃	48.75	a	T ₃	16.95	a	T ₃	1.21	a
T ₁	20.43	a	T ₂	47.58	a	T ₂	16.21	a	T ₁	0.74	b
T ₂	19.00	a	T ₁	43.87	a	T ₁	15.89	a	T ₀	0.66	b
T ₀	17.91	a	T ₀	43.50	a	T ₀	15.79	a	T ₂	0.54	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe significación estadística.

Leyenda:

T₀ = Grano fermentado sin escurrir

T₂ = Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p

T₁ = Grano fermentado escurrido por 36 horas

T₃ = Grano sin fermentar

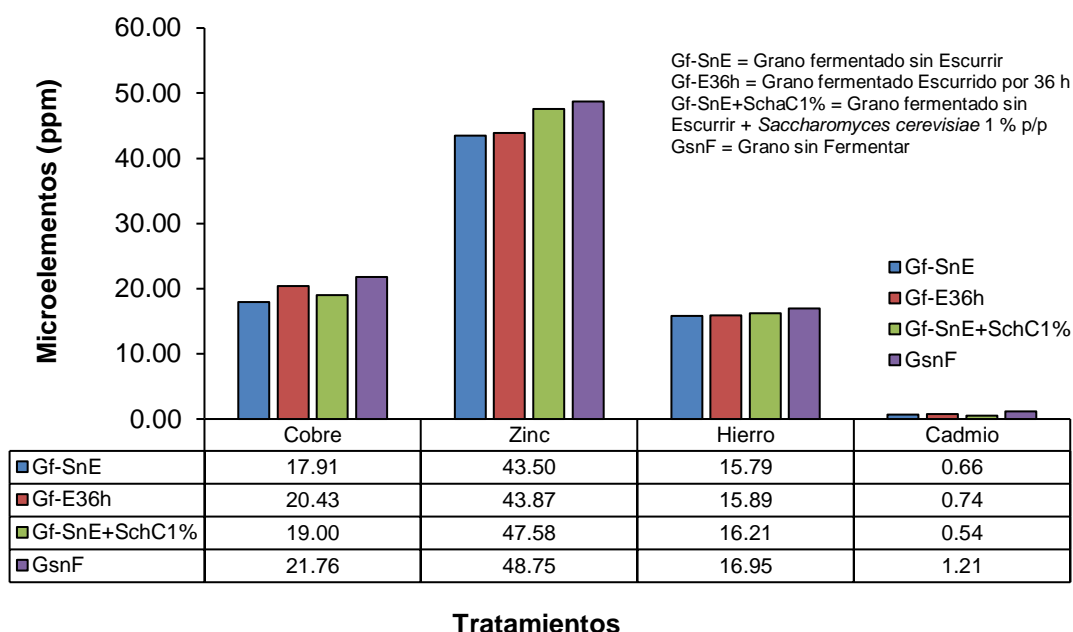


Figura 4. Contenido de microelementos en cotiledón de granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.

En la Figura 4, se observa que el cotiledón de granos de cacao, presentan mayor contenido de zinc, seguido de cobre y hierro, y el menor contenido pertenece al cadmio.

Los contenidos de macro y microelementos del cotiledón de los granos de cacao lo analizaremos en forma conjunta; los resultados obtenidos en la presente investigación son similares a los reportados por varios autores; por ejemplo: TANTALEAN (2017) realizó la caracterización nutricional de almendras de cacao procedentes de un suelo aluvial en el Valle del Alto Huallaga, cuyos contenidos promedios fueron: N (2.26%), P (0.36%), K (0.76%), Ca (1.19%), Mg (0.66%), Cu (8.05 ppm), Zn (40.79 ppm), Fe (13.27 ppm) y Cd (0.84 ppm). ROJAS (2014) analizó almendras de cacao fermentadas y secas; procedentes de la región Junín (Perú), obteniendo los siguientes valores: fósforo (384 mg/100 g), potasio (689 mg/100 g), calcio (68 mg/100 g), magnesio (242 mg/100 g) y hierro (2.90 mg/ 100 g). (FAO, 2011; citado por ARVELO *et al.*, 2017) determinó la composición química de granos de cacao fermentados y secos a nivel del cotiledón, cuyo contenido de nitrógeno total fue de 2.50%. En general, el

tratamiento T₃ (grano sin fermentar – testigo), contiene los más altos contenidos de macro y microelementos con respecto a los demás tratamientos, este tratamiento alcanzó el más bajo porcentaje de fermentación (68%); lo cual estaría influenciando en el contenido de los nutrientes; es decir a menor porcentaje de fermentación mayor contenido de nutrientes en el cotiledón del grano de cacao; al parecer cuando existen bajos porcentajes de fermentación no se estarían degradando los compuestos orgánicos presentes en el cotiledón del grano de cacao por lo tanto no habría liberación de sustancias al medio externo del grano. El tratamiento T₀ (Grano fermentado sin escurrir), alcanzó los más bajos contenidos de macro y microelementos (Cu, Zn y Fe) debido a que obtuvo uno de los más altos valores de fermentación (83.33%), este proceso implica la degradación de compuestos orgánicos y el transporte de los mismos desde el cotiledón del grano hacia la cascarilla o al medio externo. “Durante la fermentación ocurre la eliminación significativa de compuestos solubles, que son reducidos aproximadamente al 10 – 20%. Dicha pérdida ocurre a través de la evacuación de líquidos drenados producto de la fermentación o por la acción de la enzima polifenol oxidasa” (Weisburger, 2001; citado por CADENA, 2008). “Recordemos que durante la etapa de fermentación la humedad del grano permanece por encima del 35%, permitiendo la actividad enzimática” (Thompson *et al.*, 2001; citado por PANCARDO, 2016). El tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) obtuvo el más bajo contenido de cadmio (0.54 ppm), esto quizás está ligado a la actividad biológica de las levaduras las cuales tienen la propiedad de absorber metales pesados (Cd, Pb y Zn) en sus paredes celulares gracias a compuestos orgánicos llamados péptidoglucanos específicos para *Saccharomyces cerevisiae*. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es una de las cepas nativas que intervine en la fermentación del cacao, al aumentar su población en dicho proceso se podría mejorar la absorción de cadmio y mejorar la calidad del cacao (inocuidad). “La capacidad de biosorción de estos microorganismos se debe a la potencial cantidad de compuestos orgánicos capaces de secuestrar y/o intercambiar iones metálicos, entre los cuales destacan polisacáridos, glicoproteínas, flavonoides, etc., en los cuales los centros atrayentes de cationes son los grupos funcionales

amino, hidroxilo, carboxilato, fosfato y sulfhidrilos” (CHÁVEZ *et al.*, 1993). LANZA *et al.* (2016) al analizar el contenido de cadmio de los cotiledones de un cacao híbrido de Venezuela; fermentado y sin fermento encontraron diferencias, cuyos valores fueron: cacao fermentado (1.74 ppm) y cacao sin fermento (2.09 ppm). Durante el fermento podría estar trasladándose metales desde el cotiledón a la cascarilla del grano por flujo de masas. La composición química (contenido de macro y micronutrientes) del grano de cacao puede variar dependiendo del tipo de grano, la fermentación, el secado y el posterior procesamiento (ARVELO *et al.*, 2017).

4.1.2. Contenido de macro y microelementos totales en la cascarilla de los granos de cacao

Los análisis de variancia (Cuadro 16), para nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg) en la cascarilla. Se observa que existen diferencias estadísticas significativas (Ca) y altamente significativas (N, P, K y Mg) entre los tratamientos en estudio; lo cual indica que al menos uno o más tratamientos presentan un comportamiento estadístico diferente. Los coeficientes de variación (C.V.) para el contenido de cada macronutriente son los siguientes: 6.07% (N), 9.34% (P), 12.32% (K), 9.76% (Ca) y 5.37% (Mg) respectivamente; para el caso del N, P, Ca y Mg los coeficientes de variación son inferiores al 10% considerados como bajos; para el caso del K el coeficiente de variación se encuentra en el intervalo del 10% al 20% considerado como medio; en general los coeficientes de variación indican una buena precisión en toma de datos (Pimentel, 1985; citado por GORDÓN y CAMARGO, 2015).

En el Cuadro 17, se muestra la prueba de Tukey para el contenido de macroelementos de la cascarilla de los granos de cacao; notándose que el tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) ostenta los mayores contenidos medios de N y K, el tratamiento T₀ (Grano fermentado sin escurrir) presenta el mayor contenido de P, el tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) exhibe el mayor contenido de Ca.

Cuadro 16. Cuadrados medios del análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de macroelementos (nitrógeno, fosforo, potasio, calcio y magnesio) totales analizados en la cascarilla de los granos de cacao.

Fuente de Variación	GL	N-Total		P-Total		K-Total		Ca-Total		Mg-Total	
		CM		CM		CM		CM		CM	
Tratamientos	3	2.412	AS	0.495	AS	0.876	AS	0.004	S	0.247	AS
Error experimental	8	0.037		0.005		0.073		0.001		0.001	
Total	11										
C.V. (%)		6.07		9.34		12.32		9.76		5.37	

Leyenda:

S = Significativo

AS = Altamente significativo

Cuadro 17. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) totales analizados en la cascarilla de los granos de cacao.

Clave	N-Total		Clave	P-Total		Clave	K-Total		Clave	Ca-Total		Clave	Mg-Total	
	%	Sig.		%	Sig.		%	Sig.		%	Sig.		%	Sig.
T ₂	3.72	a	T ₀	1.01	a	T ₂	2.59	a	T ₃	0.30	a	T ₁	0.89	a
T ₀	3.62	a	T ₂	0.95	a	T ₁	2.44	a	T ₁	0.24	a b	T ₂	0.87	a
T ₁	3.55	a	T ₁	0.93	a	T ₀	2.38	a	T ₂	0.23	b	T ₀	0.86	a
T ₃	1.84	b	T ₃	0.15	b	T ₃	1.40	b	T ₀	0.23	b	T ₃	0.30	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe significación estadística.

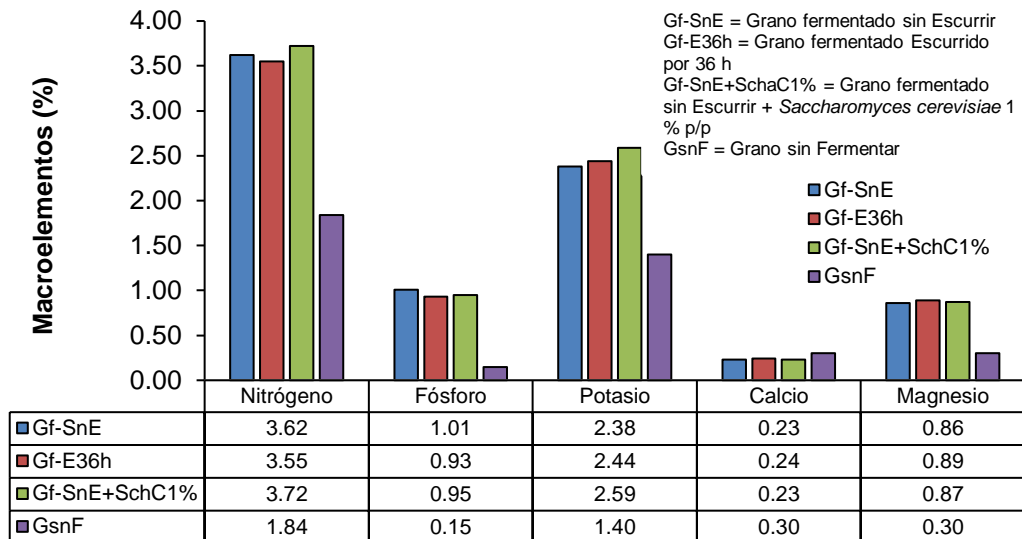
Leyenda:

T₀ = Grano fermentado sin escurrir

T₂ = Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p

T₁ = Grano fermentado escurrido por 36 horas

T₃ = Grano sin fermentar



Tratamientos

Figura 5. Contenido de macronutrientes en cascarilla de granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.

El tratamiento T₁ (Grano fermentado escurrido por 36 horas) alcanzó el mayor contenido de Mg con valores de 3.72, 1.01, 2.56, 0.30 y 0.89% respectivamente. Además, se observa que el menor contenido de N, P, K y Mg se observa en el tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) con valores de 1.84, 0.15, 1.40 y 0.30 ppm; para Ca el menor contenido se muestra en el tratamiento T₀ (Grano fermentado sin escurrir). En la Figura 5, se observa que los tratamientos T₀ (Grano fermentado sin escurrir), T₁ (Grano fermentado escurrido por 36 horas) y T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p), presentan los más altos contenidos de nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio, esto probablemente puede obedecer al mayor porcentaje de fermentación alcanzado por estos tratamientos; aquí sucede lo inverso a lo reportado en el cotiledón. El grano de cacao durante el proceso de fermentación libera exudados orgánicos desde su interior al medio exterior, lo cual podría estar acarreado y almacenando nutrientes en la cascarilla del grano. “Durante la fermentación los líquidos celulares se mueven y atraviesan las paredes celulares y se distribuyen sobre todo el grano de cacao. Para el tercer día, la masa de granos se habrá calentado uniformemente a 45 °C y se mantendrá entre esta temperatura y 50

°C hasta que la fermentación se haya completado” (PALLARES *et al.*, 2016). El tratamiento T3 (Grano sin fermentar - testigo), presenta el mayor contenido de calcio, podría estar relacionado al bajo porcentaje de fermentación del grano. El contenido de nitrógeno es mayor respecto a los demás elementos, seguido de potasio, fósforo, magnesio y finalmente calcio.

Los análisis de variancia (Cuadro 18), para cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe) y cadmio (Cd) en la cascarilla de granos de cacao. Se observa alta significancia estadística para cada microelemento, es decir que al menos uno o más de los tratamientos son estadísticamente diferentes; para el caso del hierro (Fe) no existe significación estadísticamente, es decir los tratamientos tienen un igual comportamiento. Los coeficientes de variación (C.V.) para cada microelemento son los siguientes: 19.88% (Cu), 9.51% (Zn), 25.45% (Fe) y 17.73% (Cd). En general los coeficientes de variación son menores al 30%, lo cual indica buena precisión en la toma de datos (Pimentel, 1985; citado por GORDÓN y CAMARGO, 2015).

En el Cuadro 19, se presenta la prueba de Tukey para el contenido de microelementos de la cascarilla de los granos de cacao; observándose que el tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) presenta el mayor contenido de Cu (60.46 ppm), el tratamiento T₀ (Grano fermentado sin escurrir) presenta los mayores contenidos de Zn (96.86 ppm), el tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) presenta los mayores contenidos de Fe (127.97 ppm), y el tratamiento T₁ (Grano fermentado escurrido por 36 horas) presenta el mayor contenido de Cd (3.65 ppm). El menor contenido de Cu, Zn y Cd se observa en el tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) alcanzando valores de 23.61 ppm, 51.73 ppm y 1.28 ppm respectivamente; el menor contenido de Fe se observa en el tratamiento T₁ (Grano fermentado escurrido por 36 horas) con 113.5 ppm. Para dilucidar el comportamiento de los tratamientos en estudio con respecto al contenido de micronutrientes en la cascarilla de los granos de cacao, presentamos la Figura 6.

Cuadro 18. Cuadrados medios del análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de microelementos (cobre, zinc, fierro y cadmio) totales analizados en la cascarilla de los granos de cacao.

Fuente de Variación	GL	Cu-Total		Zn-Total		Fe-Total		Cd-Total	
		CM		CM		CM		CM	
Tratamiento	3	726.9	AS	1355	AS	110.1	NS	3.639	AS
Error experimental	8	80.53		62.77		926.5		0.228	
Total	11								
C.V. (%)		19.88		9.51		25.45		17.73	

Leyenda:

AS = Altamente significativo

NS = No significativo.

Cuadro 19. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para microelementos (cobre, zinc, hierro y cadmio) analizado a la cascarilla de granos de cacao.

Clave	Cu-Total		Clave	Zn-Total		Clave	Fe-Total		Clave	Cd-Total	
	ppm	Sig.		ppm	Sig.		ppm	Sig.		ppm	Sig.
T ₂	60.46	a	T ₀	96.86	a	T ₃	127.97	a	T ₁	3.65	a
T ₁	50.41	a	T ₁	94.53	a	T ₀	118.5	a	T ₀	3.47	a b
T ₀	46.06	a b	T ₂	90.25	a	T ₂	118.3	a	T ₂	2.36	b c
T ₃	23.61	b	T ₃	51.73	b	T ₁	113.5	a	T ₃	1.28	c

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe significación estadística.

Leyenda:

T₀ = Grano fermentado sin escurrir

T₂ = Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p

T₁ = Grano fermentado escurrido por 36 horas

T₃ = Grano sin fermentar

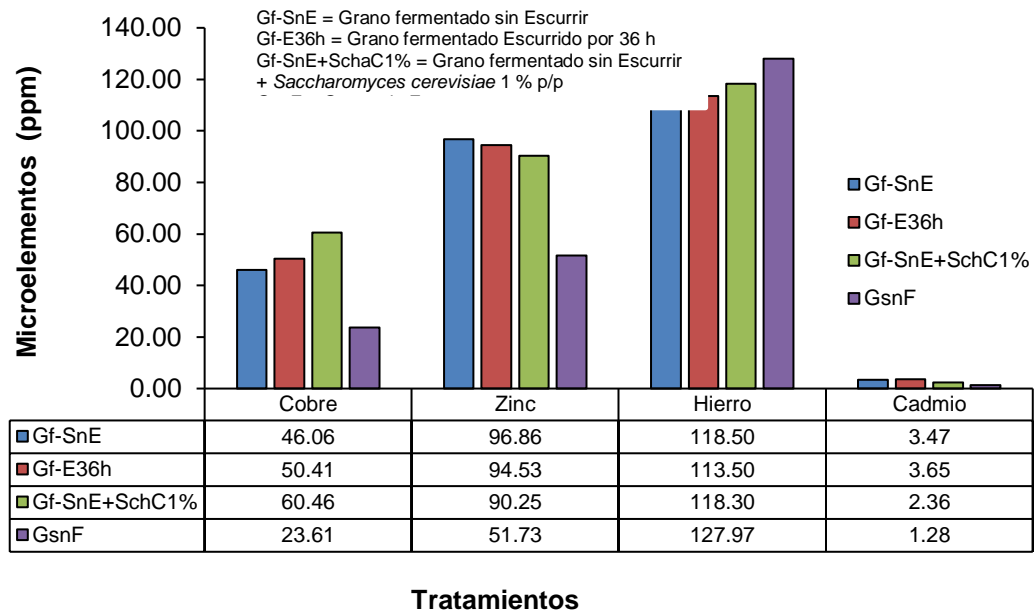


Figura 6. Contenido de microelementos en cascarilla de los granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.

En la Figura 6, los tratamientos T₀ (Grano fermentado sin escurrir), T₁ (Grano fermentado escurrido por 36 horas) y T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p), presentan los mayores valores de Cu, Zn y Cd en la cascarilla, estos elementos posiblemente aumenten su concentración producto de su migración de los cotiledones del grano de cacao, como consecuencia del proceso bioquímico de la fermentación; este comportamiento es muy similar al de los macroelementos de la cascarilla. El tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) ostenta los mayores contenidos de Fe, probablemente a que dichos granos no sufrieron grandes cambios químicos por efecto de la fermentación sin tener pérdidas de sustancias orgánicas en la cascarilla. “Diversas investigaciones han demostrado que, durante el proceso del beneficio del cacao, existen variaciones en las características fisicoquímicas del grano, en función del tipo de fermentador utilizado y del tiempo de secado, que pueden afectar las concentraciones de los metales, así como la calidad e inocuidad del producto final” (Portillo *et al.*, 2007 citado por LANZA *et al.*, 2016). Finalmente, en esta figura se evidencia que la cascarilla contiene en mayor proporción hierro, seguido de zinc, cobre y cadmio.

En los últimos años uno de los microelementos del cacao que ha tomado una gran relevancia a nivel mundial por su peligrosidad para la salud humana es el cadmio, el cual lo analizaremos independientemente tanto en el cotiledón y en la cascarilla del grano de cacao. En la Figura 7, se exhibe que el contenido de cadmio es mayor en la cascarilla que en el cotiledón del grano de cacao, en promedio se obtuvo 0.79 ppm en el cotiledón y 2.69 ppm de cadmio, en la cascarilla arrojando una relación cascarilla/cotiledón igual a 3.40. Cuando los granos de cacao alcanzan un porcentaje de fermentación mayor al 80% como en caso del presente estudio, se logra disminuir el contenido de cadmio de los cotiledones como producto de su migración a la testa y el medio externo. Los granos no fermentados presentan contenidos de cadmio muy similares tanto en el cotiledón (1.21 ppm) como en la cascarilla (1.28 ppm).

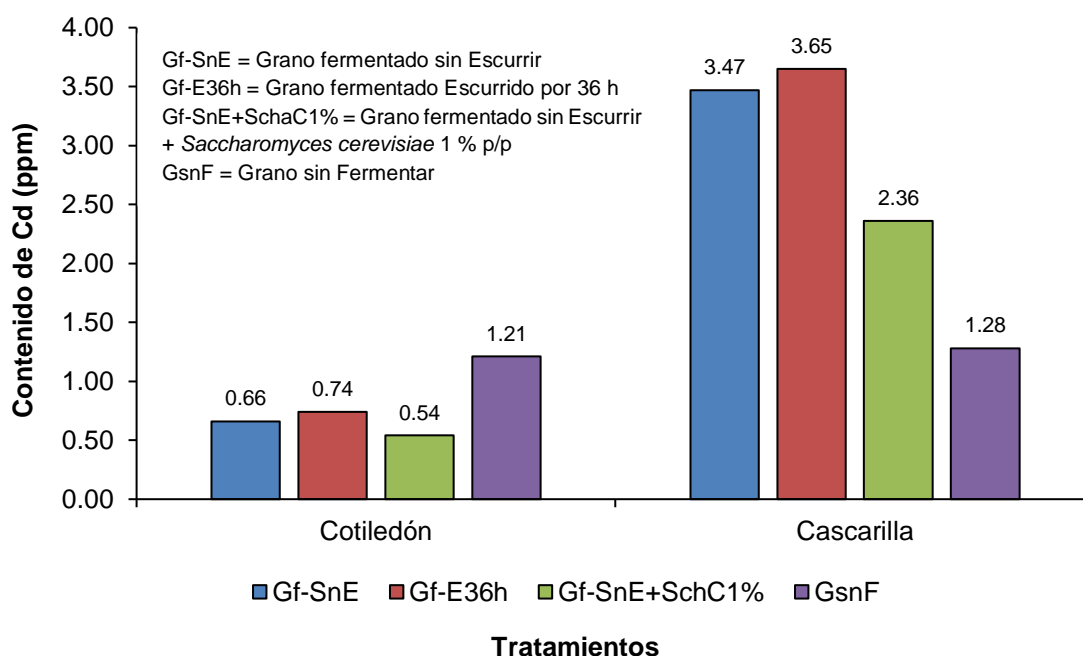


Figura 7. Contenido de cadmio en cotiledón y cascarilla de granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.

La Figura 7, evidencia en forma clara que la fermentación del grano bajo cualquier modalidad o tratamiento disminuye el contenido de cadmio de los cotiledones del grano de cacao.

4.2. Contenido de polifenoles totales de los granos de cacao clon CCN-51

En el Cuadro 20, se exhibe el análisis de variancia ($\alpha = 0.05$), para el contenido de polifenoles totales del cotiledón y la cascarilla de los granos de cacao; observándose que no existe significación estadísticamente, es decir todos los tratamientos son iguales, con respecto a los valores de estas dos variables. Los coeficientes de variación (C.V.) determinados son: 12.28% (cotiledón), considerado como medio por encontrarse en el intervalo del 10 – 20% y 7.80% (cascarilla) valor estimado como bajo por ser inferior al 10%; los coeficientes de variación son menores al 30%, lo cual indica una buena precisión en la toma de datos (Pimentel, 1985; citado por GORDÓN y CAMARGO, 2015).

Cuadro 20. Análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para el contenido de polifenoles en cotiledón y cascarilla de granos de cacao.

Fuente de variación	GL	Cotiledón		Cascarilla	
		CM		CM	
Tratamiento	3	0.57	NS	0.13	NS
Error experimental	8	0.50		0.08	
Total	11				
C.V. (%)		12.28		7.80	

Leyenda:

NS: No significativo

En el Cuadro 21, se muestra la prueba de Tukey para el contenido de polifenoles totales en el cotiledón y cascarilla de los granos de cacao; en el cual se evidencia que no existe diferencia estadística entre los tratamientos en ningún caso, corroborando los resultados del ANVA; sin embargo el tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) logró el mayor contenido de polifenoles totales (6.08 g EAG/100 g); con respecto a la cascarilla el tratamiento T₁ (Grano fermentado escurrido por 36 horas) obtuvo la más alta concentración de polifenoles totales, igual a 3.72 g EAG/100 g.

Cuadro 21. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para polifenoles totales analizados a en el cotiledón y la cascarilla de los granos de cacao.

Clave	Cotiledón		Clave	Cascarilla	
	(g EAG/100 g)	Sig.		(g EAG/100 g)	Sig.
T ₂	6.08	a	T ₁	3.72	a
T ₀	6.08	a	T ₃	3.70	a
T ₃	5.59	a	T ₀	3.51	a
T ₁	5.18	a	T ₂	3.27	a

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe significación estadística.

Leyenda:

T₀ = Grano fermentado sin escurrir

T₁ = Grano fermentado escurrido por 36 horas

T₂ = Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p

T₃ = Grano sin fermentar

En la Figura 8, se evidencia que los tratamientos sometidos a fermentación bajo cualquier tratamiento, registran los mayores contenidos de polifenoles totales, tanto en el cotiledón como la cascarilla, reportando 6.08 y 3.72 g EAG/100 g de muestra para cada caso respectivamente; esto puede deberse al incremento de ácidos producidos durante la fermentación. “Los polifenoles pueden estar asociados a ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos (ácido acético y ácido láctico), aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos” (Bravo, 1998 citado por VÁZQUEZ, 2016). Estos resultados concuerdan a los obtenidos por (PANCARDO, 2016) quien evaluó el contenido de polifenoles totales en granos de cacao fermentados al 53%, 75% y 100%; cuantificando 1.18 g EAG/100 g, 1.80 g EAG/100 g y 4.35 g EAG/100 g de muestra, concluyendo que la fermentación incrementa el contenido de polifenoles de los granos de cacao. (Portillo *et al.*, 2009; citado por PANCARDO, 2016) “encontraron que al inicio de la fermentación se desarrollan principalmente alcoholes y ácidos, mientras que aldehídos, pirazinas, furanos y fenoles se desarrollan en menor cantidad. Sin embargo, estas últimas familias de compuestos aumentaron en cantidad y concentración al final del proceso”. SUAZO (2012) reporta el contenido de polifenoles totales al inicio de la fermentación y al secado del grano de cacao, determinando 10.87 y 5.28 g/100 g de muestra; concluyendo que la fermentación

y el secado fueron responsables del 51.87% de disminución de los polifenoles totales; de igual modo (VÁZQUEZ *et al.*, 2016) “afirman que principalmente por difusión de las células de almacenamiento promovida durante el tiempo de fermentación se reduce hasta el 30% del total de alcaloides y hasta 20% de polifenoles totales (taninos como las proantocianidinas y flavonoides como la flavan3-ol); los polifenoles son degradados debido a la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO), con gran actividad en los granos de cacao en estado fresco”. (Tomas *et al.*, 2007; citado por PALLARES *et al.*, 2016) manifiestan el hallazgo de un contenido polifenólico total de 8.10 g EAG/100 g en un clon de cacao amazónico colombiano seco y sin fermentar. (RINCÓN *et al.*, 2011) determinaron contenidos de polifenoles totales equivalentes a 6.66 g EAG/100 g de semillas secas y fermentadas de cacao; estos valores reportados están por encima a los obtenidos en el presente estudio. (VÁZQUEZ *et al.*, 2016) “afirman que las almendras de cacao son ricas en polifenoles (aproximadamente 15% de peso seco) y alcaloides (hasta 4%) y éstos contribuyen con el sabor y aroma del cacao. Sin embargo, se ha demostrado que la cantidad y composición de compuestos polifenólicos (también de metilxantinas) varía con la altitud a la que se encuentran las plantaciones de cacao, debido posiblemente al diferencial de radiación UV-B que influye de manera directa en la biosíntesis de polifenoles. Los demás factores, atribuibles al manejo pre y postcosecha son las prácticas culturales de manejo de la plantación, que en las plantaciones de América reviste de importancia por las plagas y enfermedades que aquejan a este cultivo (moniliasis, mancha negra, hormigas, ardillas), fertilización (sintética u orgánica), momento de cosecha, tiempo transcurrido entre la cosecha y el procesamiento de la mazorca, así como las atribuibles (igualmente importantes) al procesamiento de las mismas”.

La mayor concentración de polifenoles totales se encuentra en el cotiledón que en la cascarilla.

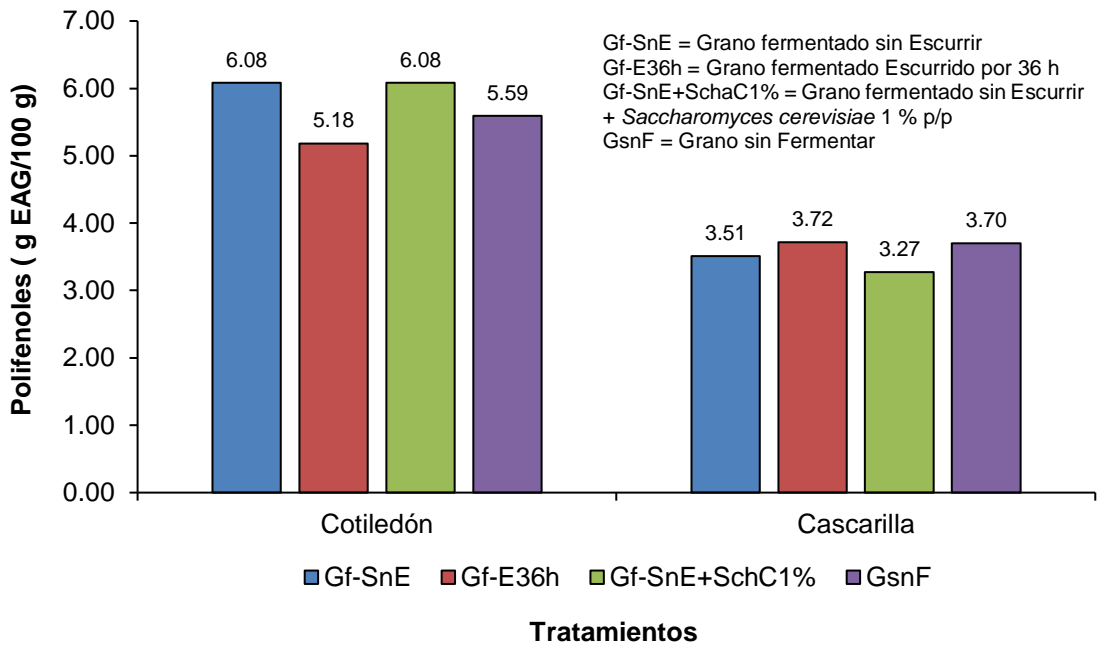


Figura 8. Contenido de polifenoles en granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.

En la Figura 9, se muestra el contenido de polifenoles totales en el grano de cacao fermentado, tanto en el cotiledón y la cascarilla; el contenido de polifenoles del cotiledón es 1.63 veces mayor al contenido de la cascarilla; el cotiledón del cacao es rico en alcaloides los cuales representan del 10 al 15% del peso del grano.

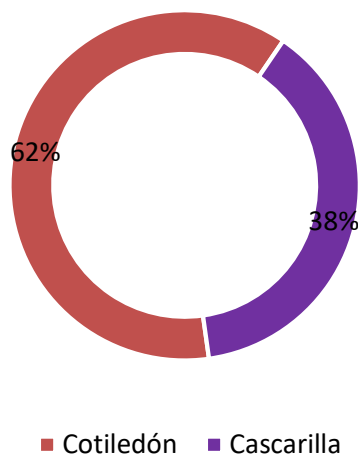


Figura 9. Contenido de polifenoles totales en el grano de cacao fermentado.

4.3. Características físicas de los granos de cacao CLON CCN-51

En el Cuadro 22, se muestra el análisis de variancia ($\alpha = 0.05$), para las características físicas de los granos de cacao (fermentados y violetas); observándose alta significancia estadísticamente, es decir que al menos uno o más de los tratamientos son diferentes estadísticamente. Los coeficientes de variación (C.V.) determinados son: 4.16% (grano fermentado), considerado como bajo por ser inferior al 10% y 16.31% (grano violeta) valor estimado como medio por encontrarse en el intervalo del 10 – 20%; ambos coeficientes de variación son menores al 30%, lo cual indica una buena precisión en la toma de datos (Pimentel, 1985; citado por GORDÓN y CAMARGO, 2015).

Cuadro 22. Análisis de variancia ($\alpha = 0.05$) para las características físicas de los granos de cacao.

F. Variación	GL	G. Fermentados		G. Violetas	
		CM		CM	
Tratamiento	3	183.56	AS	183.56	AS
Error experimental	8	11.00		11.00	
Total	11				
C.V. (%)		4.16		16.31	

Leyenda:

AS: Altamente significativo

Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para las características físicas de los granos de cacao (Cuadro 23). Para los granos fermentados se observa que el tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) estadísticamente es diferente a los demás tratamientos y además alcanza el mayor contenido de granos fermentados igual a 84.67%; el tratamiento con menor porcentaje de fermentación es el tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) con 68.00 %. Para el caso de granos violetas, se nota que el tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) presenta un comportamiento estadístico diferente a los demás tratamientos y además ostenta el mayor contenido de granos violetas igual a 32.00%, el menor porcentaje de granos violetas se muestra en el tratamiento T₂

(Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) con un porcentaje de 15.33%.

Cuadro 23. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para las características físicas de los granos de cacao.

Clave	G. Fermentados		Clave	G. Violetas	
	%	Sig.		%	Sig.
T ₂	84.67	a	T ₃	32.00	a
T ₀	83.33	a	T ₁	17.33	b
T ₁	82.67	a	T ₀	16.67	b
T ₃	68.00	b	T ₂	15.33	b

Tratamientos unidos por la misma letra en columna no existe significación estadística.

Leyenda:

T₀ = Grano fermentado sin escurrir

T₁ = Grano fermentado escurrido por 36 horas

T₂ = Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p

T₃ = Grano sin fermentar

En la Figura 10, se exterioriza que el tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) alcanza el más alto porcentaje de granos fermentados (84.67%), superando el estándar de fermentación del cacao Grado I igual a 80% (LOLI y CAVERO, 2011); esto posiblemente esté relacionado al mayor grado de temperatura (40.84 °C) alcanzado durante la fermentación, producto de la actividad microbiológica. “Es importante señalar que el porcentaje de fermentación depende de factores externos como la temperatura, tiempo y variedad de cacao” (Braudeau, 1970; citado por MORALES *et al.*, 2016). Por su parte TENEDA (2016), “manifiesta que existe una relación ordenada entre microorganismos y las variaciones de temperatura, pH y humedad, con la formación de alcoholes, ácidos y compuestos polifenólicos para un buen porcentaje de fermentación de cacao”. Por lo tanto, podemos decir que a mayor tiempo de escurrido no hay una relación ordenada de condiciones que ayuden al porcentaje de fermentación. En el caso del tratamiento T₃ (Grano sin fermentar), logra el más bajo porcentaje de granos fermentados, como también el más alto contenido de granos violetas debido a que este tratamiento no ha sido sometido de un proceso de fermentación propiamente dicho en los cajones

de madera. “Los granos violetas tienen un comportamiento indirectamente proporcional a los granos fermentados, es decir a mayor porcentaje de fermentación disminuye la cantidad de granos violetas, debido a que son producto de una fermentación incompleta lo que origina un sabor ácido y astringente” (MORALES *et al.*, 2016). Por otra parte, TENEDA (2016) “manifiesta que el color violeta de granos de cacao está en función a la fermentación”.

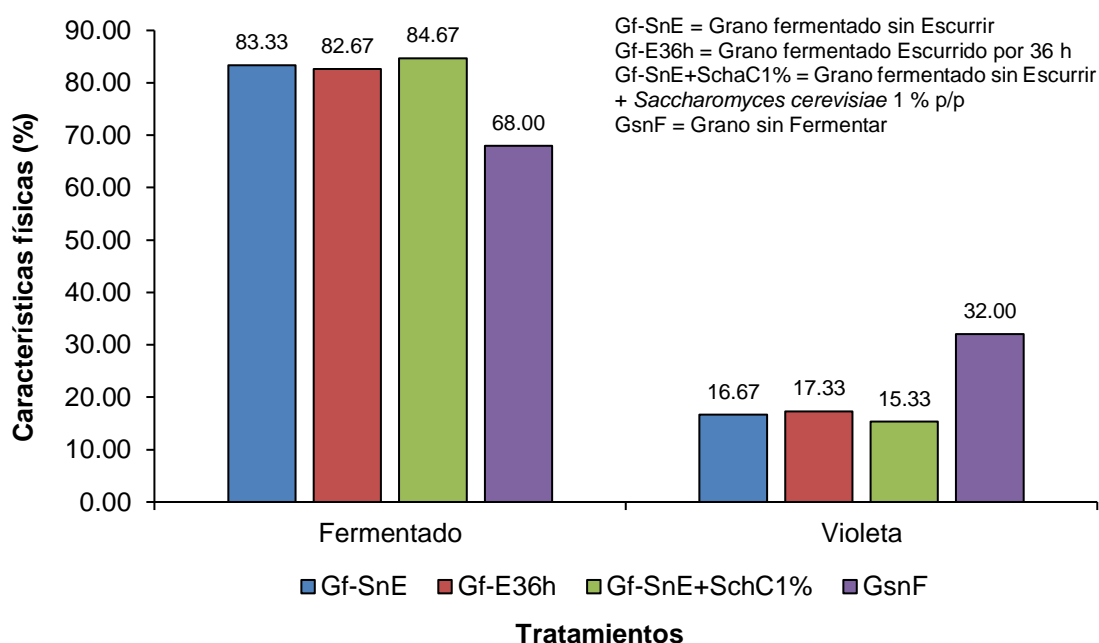


Figura 10. Características físicas de los granos de cacao respecto a los tratamientos en estudio.

4.4. Correlación de Pearson y análisis de regresión en el cotiledón y cascarilla de los granos de cacao CLON CCN-51

4.4.1. Correlación de Pearson en el cotiledón y cascarilla de los granos de cacao.

En el Cuadro 24, se muestra la correlación de Pearson entre el Cd con respecto a los macro y micronutrientes y las características físicas (granos fermentados y violetas). Con respecto al cadmio en el cotiledón, se percibe una correlación positiva altamente significativa con el contenido fósforo, potasio,

magnesio y granos violetas, y una correlación negativa altamente significativa con porcentaje de fermentación. Con relación al cadmio en la cascarilla, se observa una correlación positiva altamente significativa con nitrógeno, fósforo magnesio, zinc y granos fermentados (fermentación) y correlación significativa con potasio; además se observa una correlación negativa altamente significativa con los granos violetas. Pernía *et al.* (2008) citado por HUAUYA y TANTALEAN (2017), “refieren que una vez que los metales se han movilizado, son capturados por las células de las raíces, donde se unen inicialmente a la pared celular de las células epidérmicas para ser luego translocados por intercambio iónico al resto de la planta”.

Cuadro 24. Correlación de Pearson entre el contenido de cadmio (cotiledón, cascarilla) con respecto a los macro y micronutrientes y las características físicas de los granos de cacao.

correlación binomial de Pearson	Cadmio en cotiledón	Cadmio en cascarilla
Nitrógeno (N)	0.556	0.786**
Fosforo (P)	0.820**	0.797**
Potasio (K)	0.792**	0.591*
Calcio (Ca)	0.257	-0.506
Magnesio (Mg)	0.844**	0.811**
Cobre (Cu)	0.217	0.474
Zinc (Zn)	0.439	0.871**
Hierro (Fe)	0.526	-0.222
Polifenol	0.002	-0.052
Fermentación (%)	-0.793**	0.759**
Granos violetas (%)	0.793**	-0.759**
Cadmio cascarilla	-0.604*	

*Correlación significativa ($p = 0.05$) ** Correlación altamente significativa ($P = 0.01$)

4.4.2. Análisis de regresión en el cotiledón de los granos de cacao.

A continuación, se presenta el análisis de regresión de las variables que tuvieron significancia al ser sometidas a la correlación de Pearson.

En la Figura 11, se presenta la regresión entre el Cd y el P del cotiledón de los granos de cacao, observándose una correlación positiva, es decir a medida que el contenido de P aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,6729, indicando una dependencia entre variables del 67.29%.

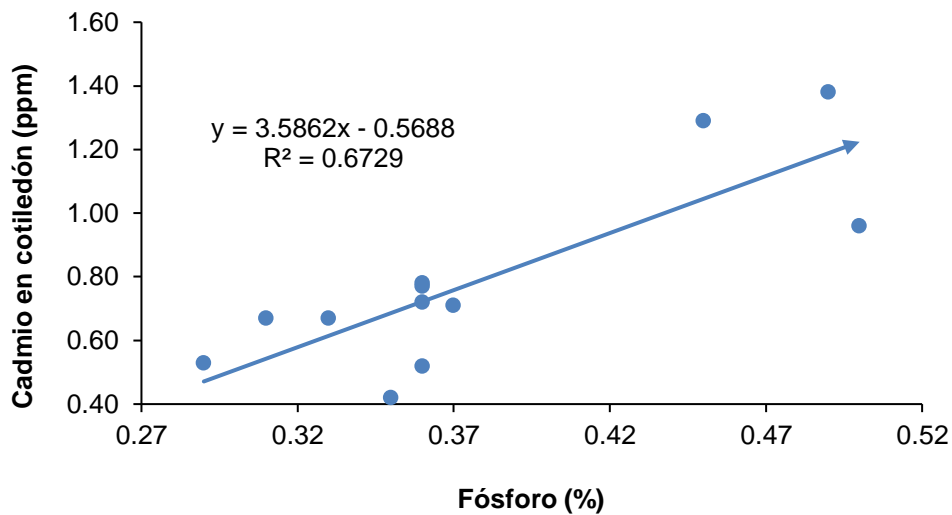


Figura 11. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el fósforo del cotiledón de los granos de cacao.

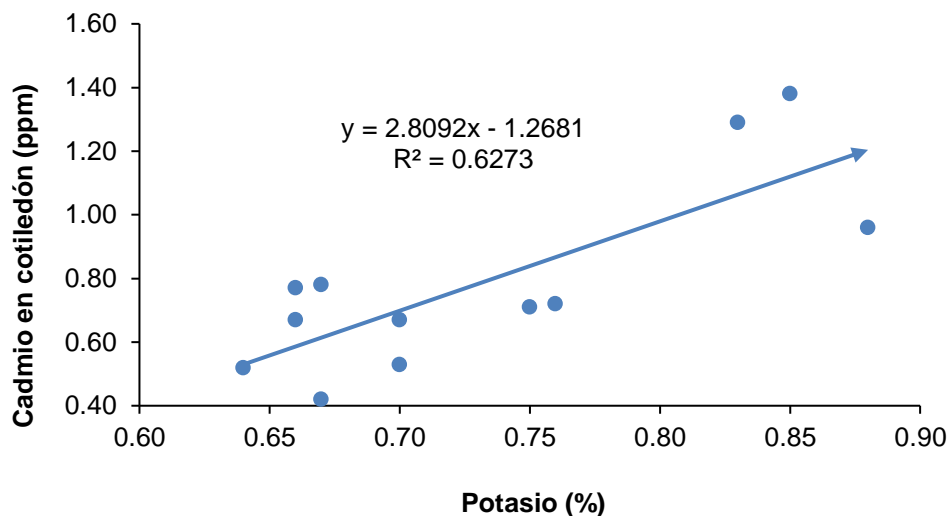


Figura 12. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el potasio del cotiledón de los granos de cacao.

En la Figura 12, se presenta la regresión entre el Cd y el K del cotiledón de los granos de cacao, observándose una correlación positiva, es decir a medida que el contenido de K aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,6273, indicando una dependencia entre variables del 62.73%.

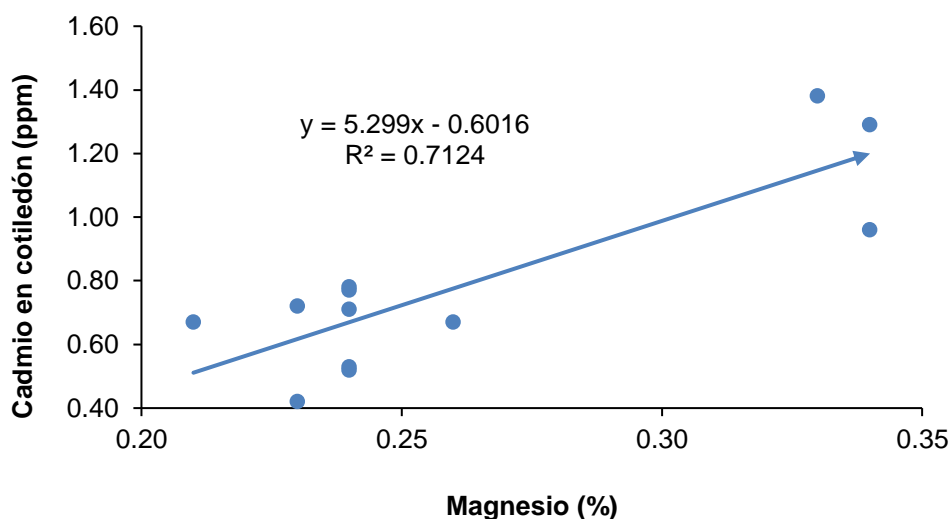


Figura 13. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el magnesio del cotiledón de los granos de cacao.

En la Figura 13, se presenta la regresión entre el Cd y el Mg del cotiledón de los granos de cacao, observándose una correlación positiva, es decir a medida que el contenido de Mg aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,7124, indicando una dependencia entre variables del 71.24%.

Según las Figuras 11,12 y 13, se aprecia que existe correlación positiva entre el Cd y los macroelementos como P, K y Mg; esto probablemente esté relacionado a la presencia de cadmio en las estructuras orgánicas vegetales, en la cual los macroelementos son constituyentes importantes o forman parte de sus estructuras elementales (aminoácidos, proteínas, enzimas, etc.). Así por ejemplo el fósforo forma parte de diversos ácidos y proteínas vegetales, las cuales tienen una alta afinidad por el cadmio (metal pesado). “El

cadmio puede sustituir al magnesio en la molécula de clorofila, lo que imposibilita la captación de fotones, generando como consecuencia una disminución de la actividad fotosintética y también reduce la absorción de nitratos” (Pernía *et al.*, 2008; citado por HUAUYA y TANTALEAN, 2017). “La relación del Cd con los elementos en las plantas depende de numerosos factores físicos, químicos y biológicos que modifican su solubilidad y el estado del metal en el suelo” (RODRÍGUEZ *et al.*, 2008),

En la Figura 14, se presenta la regresión entre el Cd del cotiledón y el porcentaje de fermentación de los granos de cacao, observándose una correlación negativa, es decir a medida que el porcentaje de fermentación aumenta, disminuye el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,6289, indicando una dependencia entre variables del 62.89%. “Durante la fermentación de los granos de cacao, la **enzima polifenol oxidasa** degrada una serie de compuestos orgánicos en el interior de los cotiledones, produciendo un drenaje de líquidos al medio externo, los cuales posiblemente estén acarreado una serie de nutrientes entre macro y microelementos dentro de estos el cadmio” (Weisburguer, 2001; citado por CADENA, 2008).

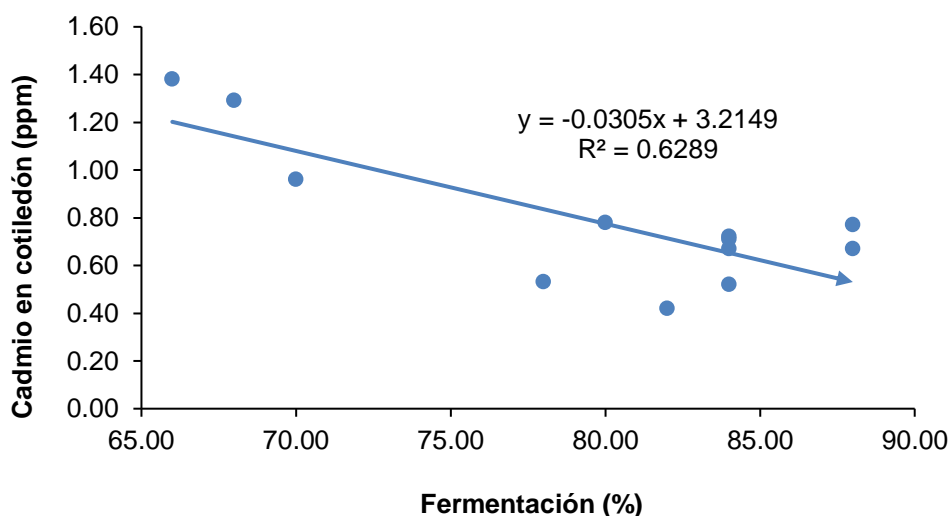


Figura 14. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio del cotiledón y el porcentaje de fermentación de los granos de cacao.

En la Figura 15, se presenta la regresión entre el Cd del cotiledón y el porcentaje de granos violetas, observándose una correlación positiva, es decir a medida que el porcentaje de granos violetas aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,6289, indicando una dependencia entre variables del 62.89%. Al existir mayor cantidad de granos violetas, significa que el porcentaje de fermentación es menor, por lo tanto, no se estaría dando la degradación de los compuestos orgánicos del cotiledón y por lo tanto también se estaría reteniendo las concentraciones de cadmio.

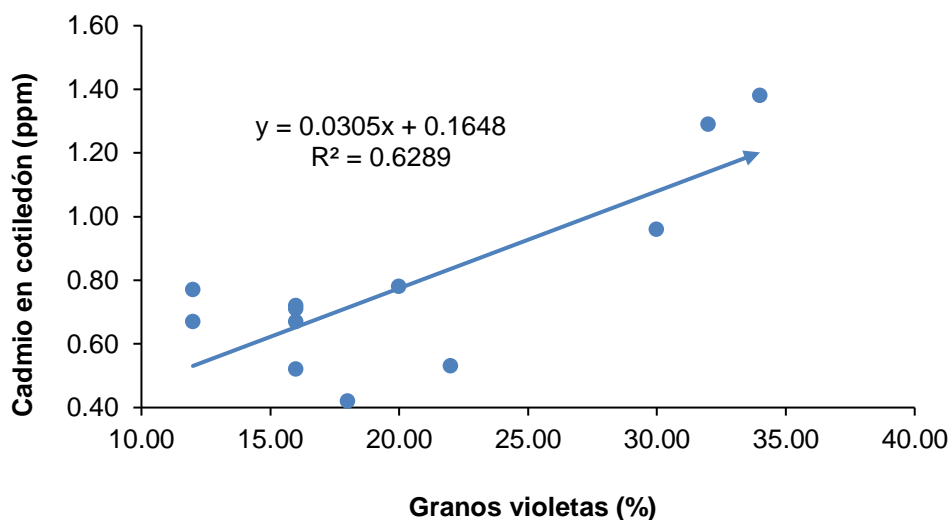


Figura 15. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio del cotiledón y el porcentaje de granos violetas.

En la Figura 16, se presenta la regresión entre el Cd del cotiledón y el cadmio de la cascarilla de los granos de cacao, observándose una correlación negativa, es decir a medida que el Cd de la cascarilla aumenta, disminuye el contenido de Cd del cotiledón. El valor de R^2 es igual a 0,3645, indicando una dependencia entre variables del 36.45%. “El grano de cacao durante el proceso de fermentación libera exudados orgánicos desde su interior al medio exterior, lo cual podría estar acarreado y almacenando nutrientes en la cascarilla del grano. Durante la fermentación los líquidos celulares se mueven y atraviesan las paredes celulares y se distribuyen sobre todo el grano de cacao” (PALLARES *et al.*, 2016).

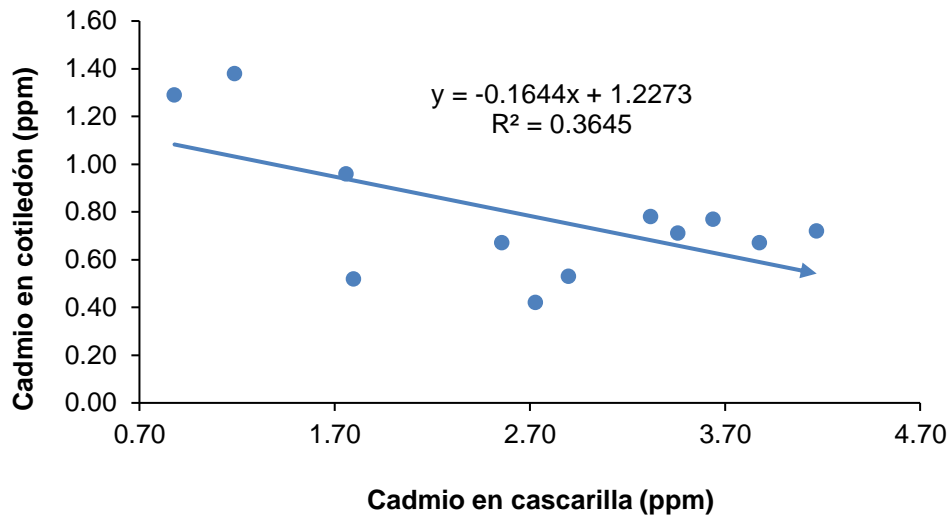


Figura 16. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio del cotiledón y el cadmio de la cascarilla de los granos de cacao.

4.4.3. Análisis de regresión en la cascarilla de los granos de cacao

A continuación, se presenta el análisis de regresión de las variables que tuvieron significancia al ser sometidas a la correlación de Pearson.

En la Figura 17, se muestra la regresión entre el Cd y el N de la cascarilla de los granos de cacao, notándose una correlación positiva, es decir a medida que el contenido de N aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,6170, indicando una dependencia entre variables del 61.70%.

En la Figura 18, se muestra la regresión entre el Cd y el P de la cascarilla de los granos de cacao, notándose una correlación positiva, es decir a medida que el contenido de P aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,6344, indicando una dependencia entre variables del 63.44%.

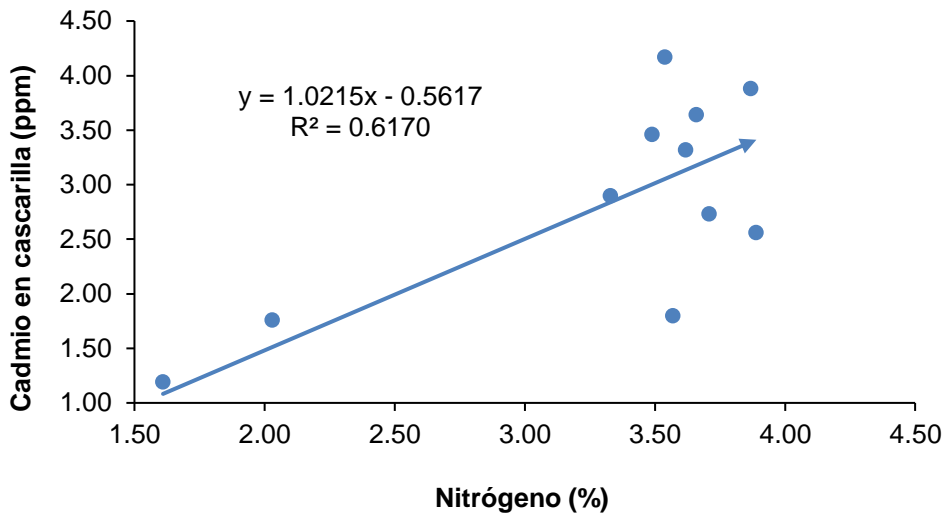


Figura 17. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el nitrógeno de la cascarilla de los granos de cacao.

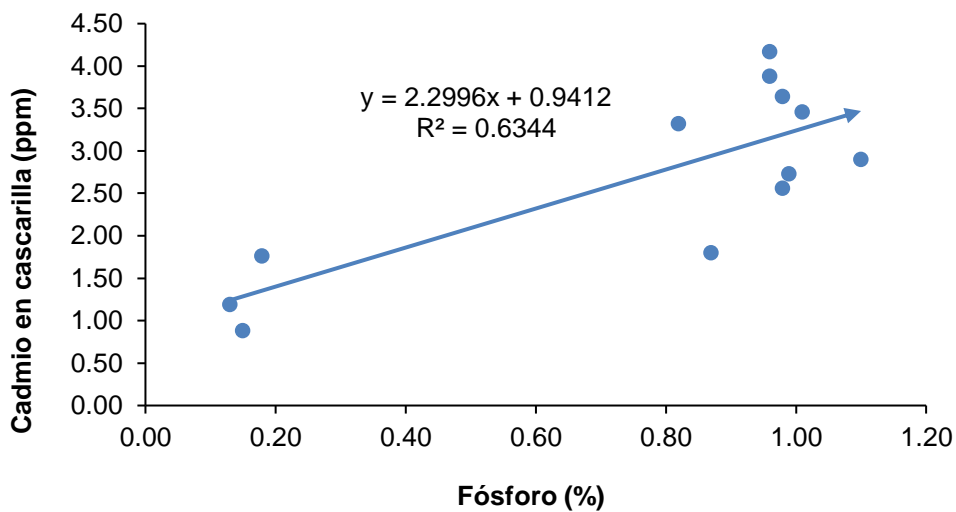


Figura 18. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el fósforo de la cascarilla de los granos de cacao.

En la Figura 19, se muestra la regresión entre el Cd y el K de la cascarilla de los granos de cacao, notándose una correlación positiva, es decir a medida que el contenido de K aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,3488, indicando una dependencia entre variables del 34.88%.

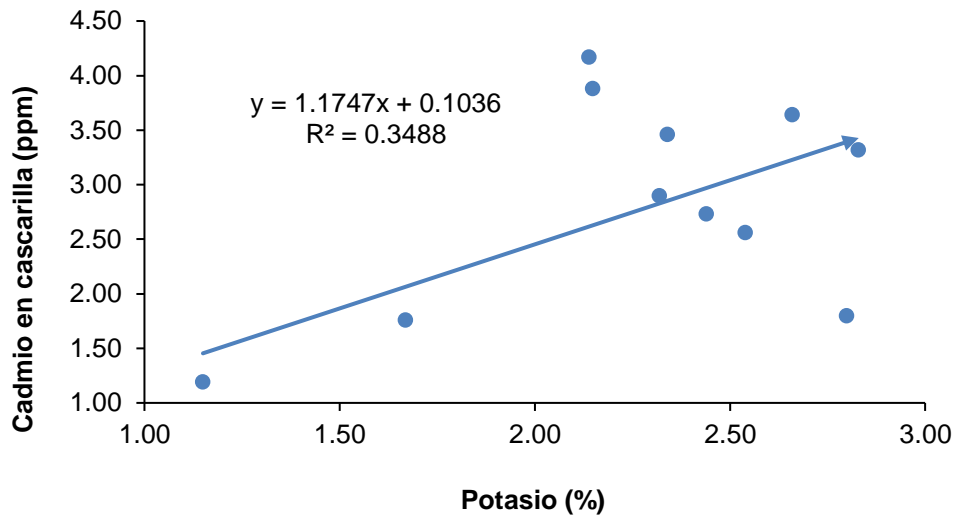


Figura 19. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el potasio de la cascarilla de los granos de cacao.

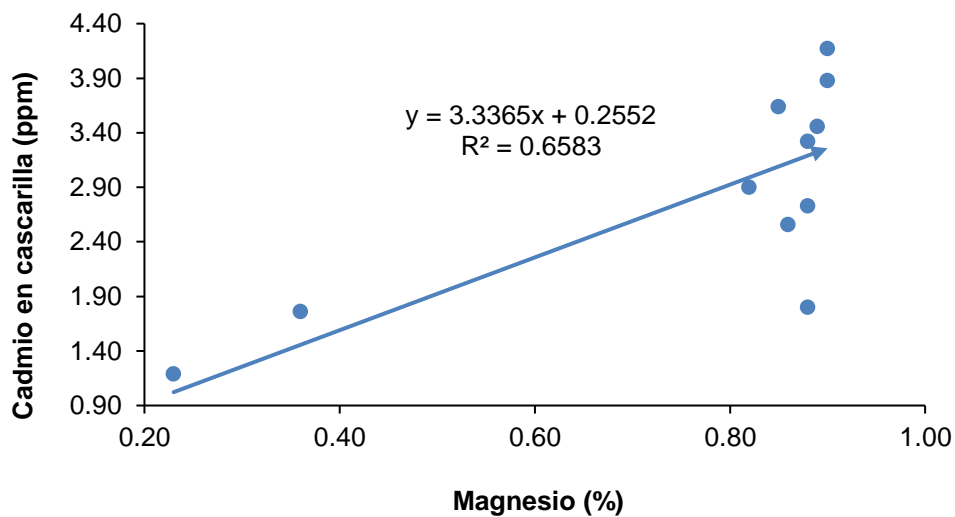


Figura 20. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el magnesio de la cascarilla de los granos de cacao.

En la Figura 20, se muestra la regresión entre el Cd y el Mg de la cascarilla de los granos de cacao, notándose una correlación positiva, es decir a medida que el contenido de Mg aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,6583, indicando una dependencia entre variables del 65.83%.

En la Figura 21, se muestra la regresión entre el Cd y el Zn de la cascarilla de los granos de cacao, notándose una correlación positiva, es decir a medida que el contenido de Zn aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,7586, indicando una dependencia entre variables del 75.86%.

En la Figura 22, se muestra la regresión entre el Cd de la cascarilla y el porcentaje de fermentación de los granos de cacao, notándose una correlación positiva, es decir a medida que la fermentación aumenta, también se incrementa el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,7586, indicando una dependencia entre variables del 75.86%.

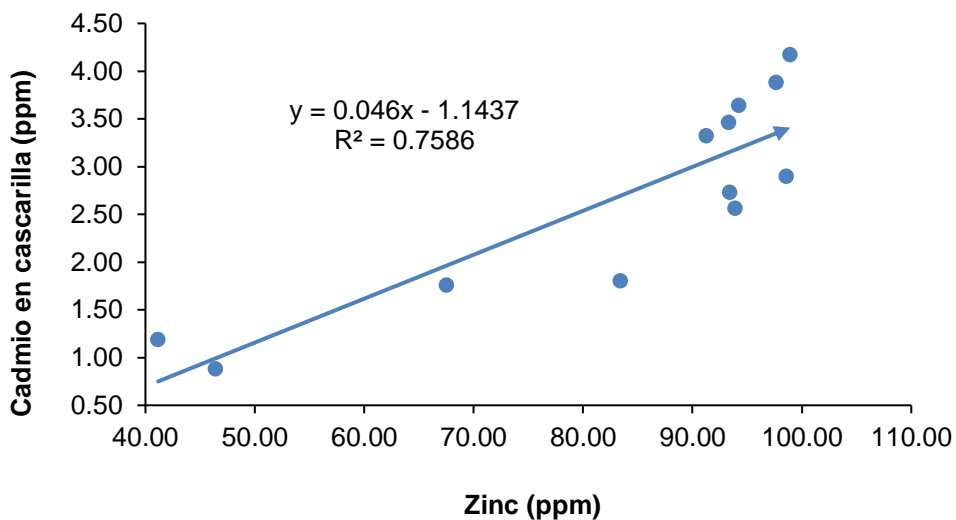


Figura 21. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio y el zinc de la cascarilla de los granos de cacao.

Las figuras 17, 18, 19, 20, 21 y 22; muestran una correlación positiva, este comportamiento posiblemente esté relacionada a la fermentación del cacao, ya que esta degrada una serie de compuestos orgánicos en el cotiledón del grano, causando la eliminación de exudados al medio externo (cascarilla), los cuales probablemente contengan macroelementos y metales pesados como el cadmio.

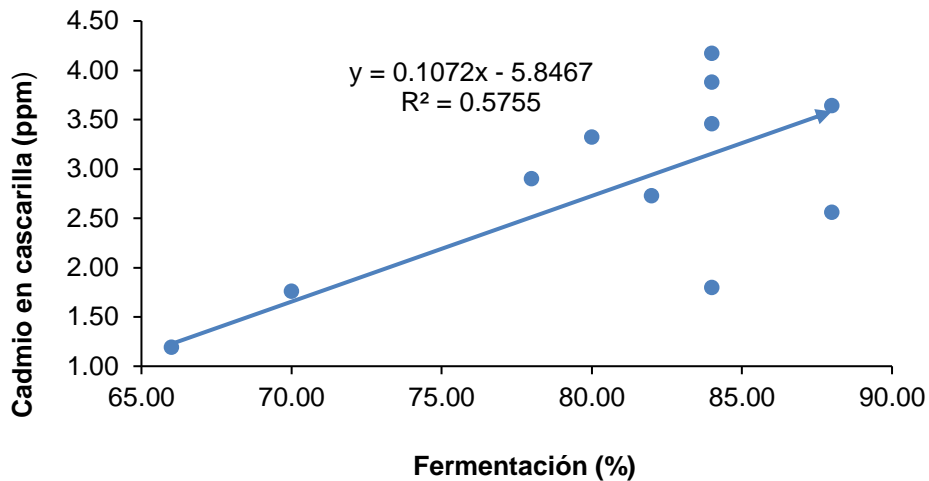


Figura 22. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio de la cascarilla y el porcentaje de fermentación de los granos de cacao.

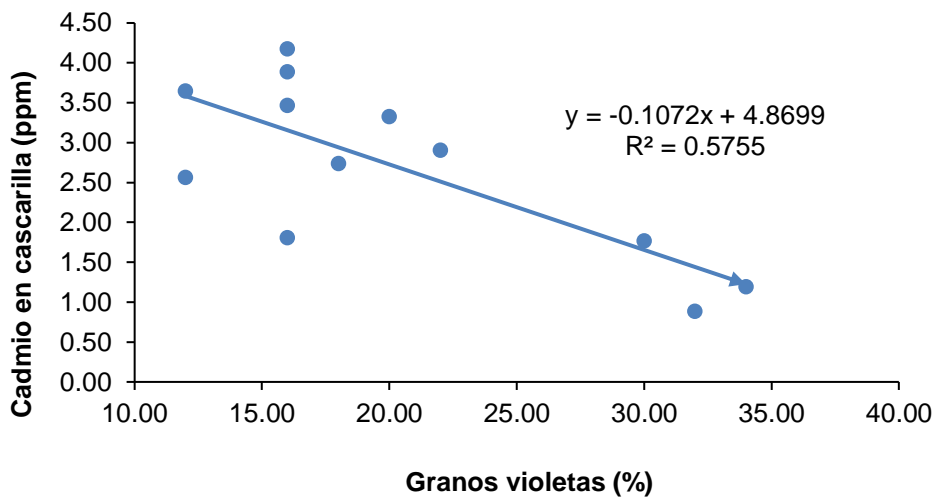


Figura 23. Diagrama de dispersión y recta de regresión entre el cadmio de la cascarilla y el porcentaje de granos violetas.

En la Figura 23, se muestra la regresión entre el Cd de la cascarilla y el porcentaje de granos violetas, notándose una correlación negativa, es decir a medida que los granos violetas aumentan, disminuye el contenido de Cd. El valor de R^2 es igual a 0,5755, indicando una dependencia entre variables del 57.55%. Los granos violetas presentan en su interior compuestos orgánicos (ácidos, polifenoles, etc.) no degradados por las enzimas del grano, producto de una fermentación deficiente, producto de ello el cadmio no es movilizado al exterior del grano (cascarilla).

V. CONCLUSIONES

1. El tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) alcanzó los más altos contenidos de macro y microelementos a nivel del cotiledón del grano de cacao. Los mayores contenidos de macro y microelementos se obtuvieron en la cascarilla con respecto al cotiledón del grano de cacao.
2. El mayor contenido de polifenoles totales en el cotiledón y la cascarilla de los granos de cacao lo obtuvieron los tratamientos T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) y T₁ (Grano fermentado escurrido por 36 horas) respectivamente. El mayor contenido de polifenoles totales se encontró en el cotiledón (62%), cascarilla (38%) del grano de cacao.
3. El mayor porcentaje de granos fermentados lo obtuvo el tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) con un valor de 84.67% y porcentaje de granos violetas igual a 32%.
4. El cadmio presenta correlación de Pearson positiva para N, P, K, Mg y Zn y negativa para granos violetas y el porcentaje de fermentación de los granos de cacao

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar más trabajos de investigación para disminuir los contenidos de cadmio de los granos de cacao, considerando nuevos clones de cacao.
2. Para trabajos similares utilizar mayores volúmenes de cacao para favorecer el proceso bioquímico de la fermentación, dado que a mayor fermentación menos cadmio en el cotiledón de los granos de cacao.
3. El proceso de fermentación de los granos de cacao debe ser una actividad primordial que toda organización exportadora de este producto debe realizar para disminuir los niveles de cadmio de los cotiledones del cacao.
4. Evaluar el efecto de los microorganismos (levaduras), no solamente a nivel de las características físicas del grano, sino también a nivel de las características organolépticas o sensoriales,

VII. RESUMEN

La presente tesis se llevó a cabo en el centro de beneficio de la Cooperativa Agroindustrial Cacao Alto Huallaga (CAICAH), ubicado en el distrito de Castillo Grande, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco; cuyos objetivos fueron los siguientes: 1) Determinar el efecto de la fermentación de granos de cacao en el contenido de macro e microelementos y cadmio. 2) Determinar el efecto de la fermentación de granos de cacao en el contenido de polifenoles totales. 3) Evaluar el efecto de la fermentación en las características físicas del grano de cacao. 4) Realizar la correlación de Pearson y análisis de regresión en el cotiledón y cascarilla de los granos de cacao. El diseño estadístico empleado en el presente trabajo de tesis fue un diseño completamente al azar (DCA); para la comparación de medias, se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significación ($\alpha = 0.05$). Los resultados fueron: (1) El tratamiento T₃ (Grano sin fermentar) alcanzó los más altos contenidos de macro y microelementos a nivel del cotiledón de los granos de cacao; con respecto a la cascarilla los tratamientos tuvieron un comportamiento variable. Los mayores contenidos de macro y microelementos se obtuvieron en la cascarilla que en el cotiledón de los granos de cacao clon CCN-51. (2) El mayor contenido de polifenoles totales en el cotiledón y la cascarilla de los granos de cacao lo obtuvieron los tratamientos T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) y T₁ (Grano fermentado escurrido por 36 horas) respectivamente. El mayor contenido de polifenoles totales se encontró en el cotiledón (62%) que en la cascarilla (38%) de los granos de cacao. (3) El mayor porcentaje de granos fermentados lo obtuvo el tratamiento T₂ (Grano fermentado sin escurrir + *Saccharomyces cerevisiae* al 1% p/p) con un valor de 84.67% y porcentaje de granos violetas igual a 32%. Es importante señalar que este tratamiento también aceleró el proceso de fermentación del grano unos 2 días menos. (4) El cadmio presenta correlación de Pearson positiva para N, P, K, Mg y Zn y negativa para granos violetas y el porcentaje de fermentación de los granos de cacao.

ABSTRACT

The present thesis took place in the profits center at the Cooperativa Agroindustrial Cacao Alto Huallaga (CAICAH – acronym in Spanish), located in the Castillo Grande district, Leoncio Prado province, Huánuco region; the objectives of which were the following: 1) to determine the effect of the fermentation on the content of macro and microelements (Cd) in the clon CCN-51 cacao beans, 2) to determine the effect of the fermentation on the total polyphenol content in the clon CCN-51 cacao beans, 3) to evaluate the effect of the fermentation on the physical characteristics of the clon CCN-51 cacao bean, 4) to realize the Pearson correlation and the regression analysis of the cotyledon y hulls of the clon CCN-51 cacao beans. The statistical design employed in the present thesis work was the completely randomized design (CRD; DCA in Spanish); for the means comparison the Tukey test was used at a ($\alpha = 0.05$) significance level. The results were: (1) treatment T₃ (unfermented beans) reached the highest contents of macro and microelements at the cotyledon level of the cacao beans; with respect to the hulls, the treatments had a variable behavior. The greatest contents of macro and microelements were obtained in the hulls rather than the cotyledon of the clon CCN-51 cacao beans. (2) The greatest total polyphenol content in the cotyledon and the hulls of the cacao beans was obtained with treatments T₂ (undrained fermented bean + *Saccharomyces cerevisiae* at 1% p/p) and T₁ (fermented bean drained for thirty six hours), respectively. The greatest content of total polyphenols was found in the cotyledon (62%) rather than in the hulls (38%) of the cacao beans. (3) The greatest percentage of fermented beans was obtained with treatment T₂ (undrained fermented beans + *Saccharomyces cerevisiae* at 1% p/p) with a value of 84.67% and percentage of violet beans was equal to 32%. It is important to note that this treatment also accelerated the fermentation process of the beans by two days less. (4) The cadmium presents a positive Pearson correlation for the N, P, K, Mg and Zn and negative for the violet beans and the fermentation percentage of the cacao beans.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. AFOAKWA, E., QUAO, J., BUDU, A., TAKRAMA, J., SAALIA, F. 2012. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 19: 1071–1077.
2. AMORES, F., JIMÉNEZ, J., PEÑA, G. 2006. Influencia del tiempo de fermentación y el tostado sobre el desarrollo de compuestos aromáticos asociados al sabor a chocolate en almendras de cacao de la variedad nacional. Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP. Quevedo, Ecuador. 7 p.
3. ANDRADE, M.; MARTÍNEZ, L. 2014. Fertilidad del suelo y parámetros que la definen. 3ª edición. 29 p volumen digital.
4. ARAVIND, P., PRASSAD, M. 2005. Cadmium-Zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. 20 p.
5. ARVELO, M., GONZÁLEZ, D., MAROTO, S., DELGADO, T., MONTOYA, P. 2017. Manual técnico del cultivo de cacao prácticas latinoamericanas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 143 p.
6. AZCON -BIETO, J; TALAN, M. 2013. Fundamentos de la fisiología vegetal. Segunda Editorial Me Graw-Hill interamericana de España S.A. Madrid, España. 669 p. [En línea]: (<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetal2008Azcon.pdf>. 5 de jul. 2019)
7. BAIRD, C. 2001. Química Ambiental. ISBN: 84-291-7902-X. Editorial Reverté S.A. 625 p.
8. BARRUETA, S. 2013. Guía metodológica para el muestreo y detección de cadmio en suelos, agua, fertilizantes, almendras de cacao y productos derivados. Presidencia del consejo de ministros. Lima. Perú. 76 p.

9. BRAVO, N. 2011. Valoración de tres métodos de fermentación y secado para mejorar la calidad y rentabilidad del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.) en la parroquia Panguintza del Cantón Centinela del Cóndor, provincia de Zamora Chinchipe. Tesis. Ing. Agrícola. Loja, Ecuador. Universidad Nacional de Loja. 224 p.
10. BRITO, E. 2000. Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Campinas, Brasil. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 134 p.
11. BROWN, K.W., THOMAS J.C., SLOWEY J.F. 1984. Extractability of metals applied to soils in sewage effluent. *Soil Science*, 138, 423-431. 8 p.
12. BURGA, E. 2016. Influencia del índice de cosecha sobre la calidad sensorial del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) del clon CCN-51 en la provincia de Mariscal Cáceres, San Martín. Tesis Ing. Agroindustrial. Juanjuí, Perú. Universidad Nacional de San Martín. 135 p.
13. CADENA, T. 2008. Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. Trabajo de grado para optar el título de Química. Bucaramanga, Colombia. Universidad Industrial de Santander. 91 p.
14. CALDERÓN, L. 2002. Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad. Tesis de licenciatura en Química. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 114 p.
15. CAMPOVERDE, M. 2010. Días de fermentación y frecuencia de remoción de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el genotipo nacional y clon CCN-51. Tesis Ing. Agrónomo. Ambato, Ecuador. Universidad Técnica de Ambato. 104 p.

16. CHANMUGATHAS., BOLLAG. 1987. Anaerobic microbial transformations in subsurface environments Upton, N.Y.: Brookhaven National Laboratory and the Pennsylvania State University Collaborative Research Program, 1985. 27 p.
17. CHARLEY, W., JEROME, O., JUPDEED, K. 2005. Lead contamination in cocoa and cocoa products: isotopic evidence of global contamination. *Environ. Health perspect.* 113 (10), 1344 - 1348. 14 p.
18. CHÁVEZ, M., CANO, R., MENDOZA, O., AMÉZQUITA, L., CARACHEO, A., OBREGÓN, H., RAMÍREZ, S., SOSA, L., MARTÍNEZ, C., GUTIÉRREZ, C. 1993. Proteínas inducibles por cobre en cepas de *Mucor rouxii* tolerantes y sensibles al metal. In: Memorias del V Congreso Nacional de Biotecnología. México. No. 3 y 4. AM189-AM192. 28 p.
19. JOVELLANOS, E. 2016. Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en (poli)fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido. Memoria presentada para optar el grado de Doctor. Murcia, España. Universidad de Murcia. 213 p.
20. CLEMENS, S., ANTOSIEWICZ, D.M., WARD, J.M., SCHACHTMAN, D.P., SCHROEDER, J.I. 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:12043-12048. 45 p.
21. DÍAZ, A. 2014. Unión Europea. Contenidos máximos en metales pesados en productos alimenticios. Valencia, España. 24 p. [En línea]: Metales pesados (<http://www.plaguicidas.comercio.es/MetalPesa.pdf>., 28 feb.2019).
22. DIMAS, G. L. 2011. Estudio de la interacción de metales pesados (Pb, Cd, Zn Y Cr) en solución, en el proceso de biosorción por tres tipos de biomasa. Tesis requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS con Orientación en Procesos Sustentables. México

- 103 p. [En línea]: (<http://eprints.uanl.mx/5682/1/1080221572.PDF>., 7 de jul. 2019)
23. GARCÍA, I Y DORRONSORO, C. 2002. Contaminación por metales pesados. [En línea]: IDIAF, (<http://www.idiaf.gov.do/publicaciones/Publications/cacao/HTML/files/assets/basic-html/page76.html>], Documentos, 23 ago. 2017).
 24. GARCÍA, I., DORRONSORO, C. 2005. Contaminación por metales pesados. En Tecnología de Suelos. Universidad de Granada. España. 267 p.
 25. GUERRERO, J. 2012. Guía técnica de análisis de suelo y fertilización de cacao. San Martín Perú. [En línea]: https://www.agrobanco.com.pe/wp-content/uploads/2017/07/010-a-cacao_SUELOS_FERTILIZACION_C3_93N.pdf. 8 de jul. del 2019).
 26. GONZÁLEZ, A. I. 2010. Determinación y validación de cadmio total e intercambiable en algunos suelos cacaoteros del departamento de Santander. Grado en Químico. Santander, Colombia. Universidad Industrial de Santander. 172 p.
 27. GORDÓN, R., CAMARGO, I. 2015. Selección de estadísticos para la estimación de la precisión experimental en ensayos de maíz. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 10 p.
 28. GUERINOT, M. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:190-198. 8 p.
 29. GUTIÉRREZ, M. 2009. Guía de gestión de calidad en centro de acopio, secado y fermentación de cacao. Lima, Perú. 22 p.
 30. HERNÁNDEZ, J. 2015. Obtención a escala laboratorio de polifenoles a partir de la cáscara de cacao y su utilidad como aditivo conservante de aceites vegetales comestibles. Tesis Ing. Química. Guayaquil, Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral. 112 p.
 31. HOLLE, A; MACHADO, M; SOARES, E. 2012. Flocculation in ale brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Re-evaluation of the role of cell surface charge and hydrophobicity. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology 93, 1221-1229. [En línea]:
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21814806>., 7 de jul. 2019)
32. HUACHOS, H. 2015. Fertilización con nitrógeno y potasio en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) clon ICS 95 en Cubantia- Pangoa. Tesis para optar el título profesional de ingeniero agrónomo. Perú 78 p. [En línea]: (<http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/553/THAH-877.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. 6 de jul. 2019)
33. HUAMANÍ, H., HUAYA, M., TANTALEAN, E. 2016. Difusión de resultados preliminares del proyecto “Desarrollo de un plan de manejo de la fertilidad orgánica de los suelos para reducir la acumulación de cadmio en las almendras de cacao en el ámbito de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo Ltda.” En: TALLER: Contenido de metales pesados en cacaotales de Tingo María. Tingo María. Perú.
34. HUAUYA, M., TANTALEAN, E. 2017. Distribución del contenido de cadmio en los diferentes órganos del cacao CCN-51 en suelo aluvial y residual en las localidades de Jacintillo y Ramal de Aspuzana. Revista de investigación agroproducción sustentable. 10 p.
35. INSTITUTO INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN VEGETAL – IPNI. 2015. Metales pesados en cacao perspectivas y posible manejo. Ecuador. 2 p. [En línea]: PDF ([http://www.nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/049b3f076c63e02705257e0e005767b1/\\$FILE/AA%20-%207%20Julio-2015.pdf](http://www.nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/049b3f076c63e02705257e0e005767b1/$FILE/AA%20-%207%20Julio-2015.pdf), PDF, 25 feb. 2019).
36. KABATA-PENDIAS, A. 2000. Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press, Boca Raton, USA. 413 p. [En línea]: Agriculture, (<https://www.e-agriculture.biz/.../Soil/Trace%20Elements%20in%20Soils%20and%20Plants.pdf>, PDF, 03 set. 2017).
37. LANZA, J., CHURIÓN, P., LIENDO, N., LÓPEZ, V. 2016. Evaluación del contenido de metales pesados en cacao (*Theobroma cacao* L.) de Santa Bárbara del Zulia. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 11 p.

38. LOLI, O., CAVERO, J. 2011. Curso – taller: fertilización y postcosecha de cacao. Universidad Nacional Agraria la Molina. Juanjuí, Perú. 33 p.
39. LUCHO, C., ALVAREZ, M., BELTRAN, R., PRIETO, F., POGGI, H. 2005. A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with waste water. *Environmental International*. 23 p.
40. MAISINCHO, M. 2006. Fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51 inoculando *Acetobacter*. Trabajo de investigación para la obtención del título de Ingeniero en Alimentos. Ambato, Ecuador. Universidad Técnica de Ambato. 34 p.
41. MÁRQUEZ, A., SALAZAR E. 2015. Análisis de los niveles de desperdicio del mucílago de cacao y su aprovechamiento como alternativa de biocombustible. Tesis Ing. Industrial. Milagro, Ecuador. 93 p.
42. MORALES, J., JESUS, J., GARCÍA, A., MÉNDEZ, E. 2012. ¿Qué sabe usted acerca de cacao?. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, ISSN: 1870-0195. Distrito Federal, México. 18 p.
43. MORALES, O., BORDA, A., ARGANDOÑA, A., FARACH, R., GARCIA, N., LAZO, K. 2015. La Alianza Cacao Perú y la cadena productiva del cacao fino de aroma. Universidad ESAN. Lima, Perú. 182 p.
44. MORALES, W., VALLEJO, C., SINCHÉ, P., TORRES, Y., VERA, J., ANZULES, E. 2016. Mejoramiento de las características físico-químicas y sensoriales del cacao CCN-51 a través de la adición de una enzima y levadura durante el proceso de fermentación. Universidad Tecnológica Equinoccial. Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. 14 p.
45. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 2012. Guía de fertilizantes y nutrición. Servicio de fertilizantes y nutrición de las plantas. Dirección de fomento de tierras y agua. FAO. Roma, Italia. 198 p.
46. PALADINO, S. 2008. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L). Tesis de

- Magister en Alimentos. Mendoza, Argentina. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. 100 p.
47. 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 CNN-51. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia. 15 p.
 48. PANCARDO, A. 2016. Efecto del procesamiento del cacao (*Theobroma cacao* L.) en la capacidad antioxidante durante la obtención de licor y cocoa. Tesis Maestro en Ciencias Alimentarias. Veracruz, México. Universidad Veracruzana. 123 p.
 49. PAZMIÑO, N. 2012. Mejoramiento de las características sensoriales del cacao CCN-51 a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación. Tesis Ing. Alimentos. Guayaquil, Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral. 135 p.
 50. PELLEGRINI, A. E. 2017. Fósforo en el suelo. [En línea]: (http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/35407/mod_resource/content/1/TEMA%2013%20-%20F%C3%93SFORO.pdf. 8 de jul. del 2019)
 51. PIEDRAHÍTA, O. 2009. Acidez del suelo. [En línea]: (http://www.nuprec.com/Nuprec_Sp_archivos/Literatura/Acidez%20del%20Suelo/Fuentes%20y%20efectos.pdf. 7 de jul. del 2019).
 52. PRIETO, J.; GONZÁLES, C.; GUTIÉRREZ, R. 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Tropical. Subtrop. Agroecosystems. p. 10, 29 - 44.
 53. RAMOS, J. 2004. La fermentación y secado del cacao, almacenamiento. Taller Internacional de calidad integral del cacao. Quevedo, Ecuador: INIAP-ETP. 20 p.
 54. RINCÓN, A., PÉREZ, M., BOU, L., ROMERO, A., BUCARITO, L., PADILLA, F. 2011. Métodos para la determinación de la actividad antioxidante de vegetales. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 5 p.

55. ROJAS, R. 2014. Estudio de proceso postcosecha de cacao nativos procedentes de Cusco, Junín y Piura para la optimización de su calidad organoléptica y del contenido de fitoquímicos de importancia en salud. Universidad Cayetano Heredia. Lima, Perú. 41 p.
56. RODRÍGUEZ, H. S. 2011. Dinámica del cadmio en suelos con niveles altos del elemento, en zonas productoras de cacao de Nilo y Yacopí, Cundinamarca. Tesis para optar el título de Magister en Ciencias Agrarias. Colombia. [En línea]: (<http://bdigital.unal.edu.co/62280/352/1019048469.2017.pdf>). 10 jul. del 2019).
57. RUCKS, L.; GARCÍA, F.; KAPLÁN, A.; PONCE DE LEÓN, J.; HILL, M. 2004. Propiedades físicas del suelo. Facultad de Agronomía. Uruguay. [En línea]: ([http://bibliofagro.pbworks.com/f/propiedades+fisicas+del+suelo .pdf](http://bibliofagro.pbworks.com/f/propiedades+fisicas+del+suelo.pdf)). 7 de jul. del 2019).
58. RUSCONI, M., CONTI, A. 2010. *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res*, 61 (1), p. 5-13.
59. SADEGHIAN, S. 2012. Efecto de los cambios en las relaciones de calcio, magnesio y potasio intercambiables en suelos de la zona cafetera colombiana sobre la nutrición de café (*Coffea arabica* L.) en la etapa de almácigo. Colombia. [En línea]: (<http://www.bdigital.unal.edu.co/5723/1/16077856.2012.pdf>). 7 de setiembre del 2019).
60. SADEGHIAN, S. 2016. La acidez del suelo una limitante común para la producción de café. [En línea]: (<https://www.cenicafe.org/es/publications/AVT0466.pdf>). 7 de jul. del 2019).
61. SAHUQUILLO, A., RIGOL, G. 2003. Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments, *Trends. Analyt, Chem.* 3 (22), 152-159.
62. SÁNCHEZ, G. 2016. Ecotoxicología del cadmio. Riesgo para la salud de la utilización de suelos ricos en cadmio. Trabajo de fin de grado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. España. 23 p.

63. SHI, J., YU, J., POHORLY, J., KAKUDA, Y. 2003. Polyphenolics in grape seeds – Biochemistry and Funcionality. *Journal of Medicinal Food*, 6, pp.291-299.
64. SINGLETON, V., ROSSI, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. En: *America Journal of Enology and Viniculture*. Vol. 16 (1965). p. 144-158.
65. SUAZO, Y. 2012. Efecto de la fermentación y el tostado Sobre la concentración polifenólica y Actividad antioxidante de cacao Nicaragüense. Memoria de investigación, título de máster en Tecnología y Calidad en las Industrias Alimentarias. Pamplona, España. Universidad Pública de Navarra. 64 p.
66. SUBERO, N. 2013. Evaluación de las fracciones de fósforo y del contenido de cadmio en suelos ácidos fertilizados con fosfatos por largos periodos y su absorción por el arroz [En línea]: http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/4550/1/T0268000079_04-0-Tesis_paraDefensa-000.pdf 6 de jul. del 2019).
67. TANTALEAN, E. 2017. Distribución del contenido de cadmio en los diferentes órganos del cacao CCN-51 en suelo aluvial y residual. Tesis Ing. Agrónomo. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 86 p.
68. TENEDA, W. 2016. Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad Nacional y variedad CCN-51. Universidad Internacional de Andalucía. Sevilla, España. 140 p.
69. TRILLO, J. 2015. Extracción y purificación de productos naturales de interés industrial. Trabajo para optar el título de Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. Almería, España. Universidad de Almería. 46 p.
70. UGARTONDO, V. 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Memoria para optar el título de doctor. Barcelona, España. Universidad de Barcelona. 217 p.

71. VÁZQUEZ, A., OVANDO, I., ADRIANO, L., BETANCUR, D., SALVADOR, M. 2016. Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicancias en el sabor y aroma. Universidad Autónoma de Chiapas. Chiapas, México. 16 p.
72. WAKAO, H. 2002. Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional durante el proceso de beneficio. Tesis de licenciatura en ciencias químicas, especialidad Química Analítica. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 91 p.
73. WARD, N.I. 1995. Trace elements. Environmental Analytical Chemistry. Ed. by FW Fifield and P.J. Haines. Capman and Hall.
74. WOLLGAST, J., ANKLAM, E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International, 33: 423-447. 25 p.
75. YALCINKAYA, Y. 2001. Biosorption of cadmium from aquatic systems by carboxymethylcellulose and immobilized *Trametes versicolor*. Hydrometallurgy 63: 31 – 40.
76. ZAMBRANO, G. 2018. Evaluación de la influencia del proceso de beneficio del cacao (*Theobroma cacao*) CCN-51 de altura en su calidad final, mediante el análisis físico, físico-químico y sensorial. Trabajo de investigación para la obtención del título de Químico de Alimentos. Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador. 107 p.
77. ZAPATA, S., TAMAYO, A., ROJANO, B. 2015. Efecto del tostado sobre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de clones de cacao colombiano. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 68: 7497-7507. 11 p.

IX. ANEXO

Cuadro 25. Macro y microelementos totales en el cotiledón de los granos de cacao.

Id.	Tratamientos		Repetición	Macro y microelementos totales							
	Clave	Descripción		N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)
1	T3	Grano sin fermentar (testigo)	1	2.07	0.49	0.85	0.08	0.33	20.98	49.66	16.29
2	T3	Grano sin fermentar (testigo)	2	2.12	0.45	0.83	0.10	0.34	19.48	47.50	17.29
3	T3	Grano sin fermentar (testigo)	3	2.08	0.50	0.88	0.08	0.34	24.81	49.09	17.27
4	T0	Grano fermentado sin escurrir	1	1.75	0.33	0.66	0.09	0.21	18.60	40.75	15.18
5	T0	Grano fermentado sin escurrir	2	1.97	0.36	0.66	0.09	0.24	14.00	46.71	17.08
6	T0	Grano fermentado sin escurrir	3	1.77	0.29	0.70	0.08	0.24	21.12	43.03	15.40
7	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	1	1.84	0.36	0.76	0.08	0.23	20.81	40.90	15.98
8	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	2	1.87	0.36	0.67	0.09	0.24	18.28	47.56	16.01
9	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	3	1.79	0.37	0.75	0.08	0.24	22.20	43.16	15.37
10	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	1	2.09	0.31	0.70	0.10	0.26	19.62	50.08	16.54
11	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	2	1.94	0.36	0.64	0.09	0.24	19.10	49.73	16.62
12	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	3	1.99	0.35	0.67	0.07	0.23	18.28	42.93	15.47

Cuadro 26. Cadmio total (ppm) del cotiledón de los granos de cacao.

Id.	Tratamientos		Repetición			Sumatoria	Promedio
	Clave	Descripción	I	II	III		
1	T3	Grano sin fermentar (testigo)	1.38	1.29	0.96	3.63	1.21
2	T0	Grano fermentado sin escurrir	0.67	0.77	0.53	1.97	0.66
3	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	0.72	0.78	0.71	2.21	0.74
4	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	0.67	0.52	0.42	1.61	0.54

Cuadro 27. Macro y microelementos en la cascarilla de los granos de cacao.

Id.	Tratamientos		Repetición	Macro y micronutrientes totales							
	Clave	Descripción		N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)
1	T3	Grano sin fermentar (testigo)	1	1.61	0.13	1.15	0.29	0.23	17.08	41.17	131.48
2	T3	Grano sin fermentar (testigo)	2	1.89	0.15	1.39	0.28	0.31	23.17	46.45	92.18
3	T3	Grano sin fermentar (testigo)	3	2.03	0.18	1.67	0.34	0.36	30.58	67.57	160.26
4	T0	Grano fermentado sin escurrir	1	3.87	0.96	2.15	0.23	0.90	41.90	97.68	100.30
5	T0	Grano fermentado sin escurrir	2	3.66	0.98	2.66	0.24	0.85	42.37	94.28	92.25
6	T0	Grano fermentado sin escurrir	3	3.33	1.10	2.32	0.21	0.82	53.91	98.62	163.06
7	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	1	3.54	0.96	2.14	0.26	0.90	49.13	98.95	99.84
8	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	2	3.62	0.82	2.83	0.23	0.88	38.17	91.29	107.93
9	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	3	3.49	1.01	2.34	0.24	0.89	63.94	93.34	132.72
10	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	1	3.89	0.98	2.54	0.26	0.86	51.36	93.91	89.35
11	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	2	3.57	0.87	2.80	0.23	0.88	64.13	83.43	122.22
12	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	3	3.71	0.99	2.44	0.20	0.88	65.89	93.42	143.39

Cuadro 28. Cadmio total (ppm) de la cascarilla de los granos de cacao

Id,	Tratamientos		Repetición			Sumatoria	Promedio
	Clave	Descripción	I	II	III		
1	T3	Grano sin fermentar (testigo)	1.19	0.88	1.76	3.83	1.28
2	T0	Grano fermentado sin escurrir	3.88	3.64	2.90	10.42	3.47
3	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	4.17	3.32	3.46	10.95	3.65
4	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	2.56	1.80	2.73	7.09	2.36

Cuadro 29. Polifenoles totales en el cotiledón y cascarilla de los granos de cacao.

Id.	Tratamientos		Repetición	Polifenoles totales (g EAG/100 g Muestra)	
	Clave	Descripción		Cotiledón	Testa (cascarilla)
1	T3	Grano sin fermentar (testigo)	1	6.565	3.818
2	T3	Grano sin fermentar (testigo)	2	5.194	3.714
3	T3	Grano sin fermentar (testigo)	3	5.012	3.561
4	T0	Grano fermentado sin escurrir	1	6.699	3.037
5	T0	Grano fermentado sin escurrir	2	6.497	3.685
6	T0	Grano fermentado sin escurrir	3	5.025	3.804
7	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	1	5.431	3.874
8	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	2	4.886	3.553
9	T1	Grano fermentado escurrido por 36 horas	3	5.215	3.731
10	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	1	6.548	3.618
11	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	2	5.418	3.147
12	T2	Grano fermentado sin escurrir + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al 1% p/p	3	6.283	3.037

Cuadro 30. Porcentaje de fermentación de los granos de cacao.

Id.	Tratamientos		Repetición			Sumatoria	Promedio
	Clave	Descripción	I	II	III		
1	T3	Grano sin fermentar	66.00	68.00	70.00	204.00	68.00
2	T0	Grano fermentado	84.00	88.00	78.00	250.00	83.33
3	T1	Grano fermentado, escurrido por 36 horas	84.00	80.00	84.00	248.00	82.67
4	T2	Grano fermentado con levadura	88.00	84.00	82.00	254.00	84.67

Cuadro 31. Porcentaje de granos violetas.

Id.	Tratamientos		Repetición			Sumatoria	Promedio
	Clave	Descripción	I	II	III		
1	T3	Grano sin fermentar	34.00	32.00	30.00	96.00	32.00
2	T0	Grano fermentado	16.00	12.00	22.00	50.00	16.67
3	T1	Grano fermentado, escurrido por 36 horas	16.00	20.00	16.00	52.00	17.33
4	T2	Grano fermentado con levadura	12.00	16.00	18.00	46.00	15.33

Nota: No se obtuvo granos pizarrosos ni mohosos



VALLE GRANDE
Laboratorio de Química Agrícola

50 AÑOS
1965 - 2015

SOLICITANTE : COOPERATIVA AGROINDUSTRIAL CACAO ALTO HUALLAGA

ANÁLISIS N° : 748-12FRUT -2018

PREDIO : C.A.C. ALTO HUALLAGA

LUGAR : HUÁNUCO

MATRIZ : ALMENDRA DE CACAO

FECHA DE RECEP. : 24/07/2018

INFORME DE ANÁLISIS DE FRUTOS - NUTRICIONAL

MUESTRA : MUESTRA: AM

PARAMETRO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO	TÉCNICA	L.C	UNIDAD
Nitrógeno Total (N _T)	2.39	%	MEF - 001	Dumas	2.80E-03	%
Fósforo Total (P)	0.48	%	MEF - 002	Colorimétrico	1.67E-04	%
Potasio Total (K)	0.98	%	MEF - 003	FAAS	3.33E-04	%
Calcio Total (Ca)	0.09	%	MEF - 004	FAAS	4.17E-04	%
Magnesio Total (Mg)	0.33	%	MEF - 005	FAAS	1.67E-04	%
Azufre Total (S)	0.03	%	MEF - 006	Turbidimétrico	5.00E-03	%
Sodio Total (Na)	0.01	%	MEF - 007	FAAS	1.67E-04	%
Cloro Total (Cl)	0.04	%	MEF - 008	Argentométrico	1.00E-02	%
Cobre Total (Cu)	27.30	ppm	MEF - 009	FAAS	1.67	ppm
Zinc Total (Zn)	49.11	ppm	MEF - 010	FAAS	1.67	ppm
Manganeso Total (Mn)	6.62	ppm	MEF - 011	FAAS	1.67	ppm
Hierro Total (Fe)	19.28	ppm	MEF - 012	FAAS	1.67	ppm
Boro Total (B)	10.45	ppm	MEF - 013	Colorimétrico	0.83	ppm
Cadmio Total (Cd)	1.80	ppm	AOAC - 999.11	FAAS	0.02	ppm

Los resultados están expresados en muestra seca a 65°C.

DONDE:

% : Masa / Masa
ppm : mg / Kg
FAAS : Espectrometría de Absorción Atómica por Llama
MEF : Método Propio del Laboratorio.
L.C : Límite de Cuantificación

AOAC official Method 999.11

NOTA:

- 1: Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.
- 2: Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente informe sin la autorización del Laboratorio de Química Agrícola.


MSc. Quím. Alexis Saucedo Chacón
JEFE DEL LABORATORIO




MSc. Agr. Julio Castro Lazo
DIRECTOR DEL LABORATORIO

Figura 24. Contenido de cadmio inicial en la parcela de cacao clon CCN-51.



VALLE GRANDE
Laboratorio de Química Agrícola

50 AÑOS
1965 - 2015

SOLICITANTE : COOPERATIVA AGROINDUSTRIAL CACAO ALTO HUALLAGA
 PREDIO : COOPERATIVA AGROINDUSTRIAL CACAO ALTO HUALLAGA
 MATRIZ : CÁSCARA DE CACAO

ANÁLISIS N° : 136-13FRUT -2019
 LUGAR : TINGO MARIA
 FECHA DE RECEP. : 23/01/19

INFORME DE ANÁLISIS DE FRUTOS - NUTRICIONAL
 MUESTRA : CAICAH - MUESTRA 1

PARAMETRO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO	TÉCNICA	L.C	UNIDAD
Nitrógeno Total (N _T)	3.87	%	MEF - 001	Dumas	2.80E-03	%
Fósforo Total (P)	0.96	%	MEF - 002	Colorimétrico	1.67E-04	%
Potasio Total (K)	2.15	%	MEF - 003	FAAS	3.33E-04	%
Calcio Total (Ca)	0.23	%	MEF - 004	FAAS	4.17E-04	%
Magnesio Total (Mg)	0.90	%	MEF - 005	FAAS	1.67E-04	%
Azufre Total (S)	0.11	%	MEF - 006	Turbidimétrico	5.00E-03	%
Sodio Total (Na)	0.02	%	MEF - 007	FAAS	1.67E-04	%
Cobre Total (Cu)	41.90	ppm	MEF - 009	FAAS	1.67	ppm
Zinc Total (Zn)	97.68	ppm	MEF - 010	FAAS	1.67	ppm
Manganeso Total (Mn)	18.00	ppm	MEF - 011	FAAS	1.67	ppm
Hierro Total (Fe)	100.30	ppm	MEF - 012	FAAS	1.67	ppm
Boro Total (B)	34.35	ppm	MEF - 013	Colorimétrico	0.83	ppm
Cadmio Total (Cd)	3.88	ppm	AOAC - 999.11	FAAS	0.02	ppm

Los resultados están expresados en muestra seca a 65°C.

DONDE:

% : Masa / Masa
 ppm : mg / Kg
 FAAS : Espectrometría de Absorción Atómica por Llama
 MEF : Método Propio del Laboratorio.
 LC : Límite de Cuantificación

AOAC official Method 999.11

NOTA:

- 1: Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.
- 2: Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente informe sin la autorización del Laboratorio de Química Agrícola.


 MSc. Quím. Alexis Saucedo Chacón
 JEFE DEL LABORATORIO




 MSc. Agr. Julio Castro Lazo
 DIRECTOR DEL LABORATORIO

Figura 25. Análisis de macro y microelementos de la cascarilla del cacao (Muestra 1: T₀R₁ – tratamiento 0, repetición 1).



Figura 26. Transporte de los granos de frescos de cacao.



Figura 27. Ecurrido de los granos frescos de cacao, tratamiento T₁.



Figura 28. Adición de los granos de cacao a los cajones fermentadores.



Figura 29. Control de temperatura de los tratamientos.



Figura 30. Adición de las levaduras al tratamiento T₂.



Figura 31. Secado de las muestras de cacao de cada tratamiento.



Figura 32. Obtención del jugo de cacao.



Figura 33. Verificación de la tesis a cargo del Dr. Hugo Huamaní, miembro del jurado.



Figura 34. Rotulación de las muestras de cacao de cada tratamiento, para su envío al laboratorio.



Figura 35. Control de temperatura de los tratamientos en fermentación.



Figura 36. Prueba de corte del tratamiento T₁.

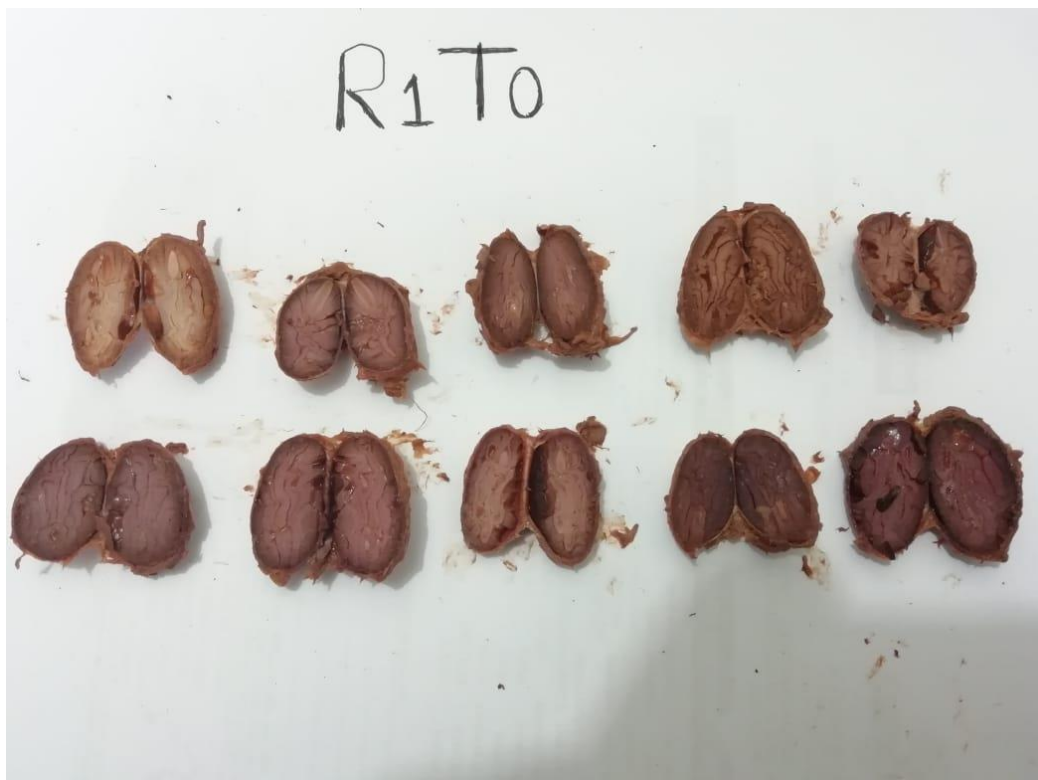


Figura 37. Prueba de corte del tratamiento T



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

AV. UNIVERSITARIA S/N - TINGO MARIA - CELULAR 941531359

Facultad de Agronomía - Laboratorio de Análisis de Suelos, Agua y Ecotoxicología

analisisdesuelosunas@hotmail.com



ANALISIS DE SUELOS

SOLICITANTE: FALCON PAREDES GEIDER										PROCEDENCIA: MIRADOR VENENILLO																													
N°	COD. LAB.	DATOS DE LA MUESTRA			ANALISIS MECANICO			pH	M.O.	N	P	K	Cd	Zn	Mn	Fe	Cu	CIC	CAMBIABLES Cmol(+)/kg						CICe	%	%	%											
		PROPIETARIO	CULTIVO	EDAD	Arena	Arcilla	Limo												Textura	TOTAL	DISPONIBLE								Ca	Mg	K	Na	Al	H	Bas. Camb.	Ac. Camb.	Sat. Al		
					%	%	%													%	ppm	ppm	ppm	ppm														ppm	ppm
1	S0287	CECILIA HUANCHO HUALINGA	CACAO	12 años	16	19	65	Franco Limoso	7.15	1.48	0.07	10	71	0.18	8	334	304	10	12.07	9.66	1.41	0.06	0.94	--	--	--	100.00	0.00	0.00										

MUESTREADO POR EL SOLICITANTE
TINGO MARIA, 05 DE ENERO 2019
RECIBO N° 0570756

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
LAB. ANALISIS DE SUELOS

Ing° Luis G. Mansilla Maza
JEFE



Figura 38. Análisis físico-químico del suelo de la parcela de cacao.