

Inducción de *Rhizobium japonicum* en la masa fermentativa de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) como estrategia para la disminución de cadmio

Inductio of *Rhizobium japonicum* in the fermentative maa of two varieties of cacao (*Theobroma cacao* L.) as a strategy for the decrease of cadmium

Luis Vásquez Cortez¹, Jaime Vera Chang², Frank Intriago Flor³, Cyntia Erazo Solórzano⁴, Diego Tuárez García⁵, Juan Avellaneda Cevallos⁶, Kerly Alvarado Vásquez⁷

¹ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. luis.vasquez2015@uteq.edu.ec

² Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. jverac@uteq.edu.ec

³ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. frank.intriago@utm.edu.ec

⁴ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. cerazo@uteq.edu.ec

⁵ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. dtuarez@uteq.edu.ec

⁶ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. javellaneda@uteq.edu.ec

⁷ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. kerly.alvarado2015@uteq.edu.ec



PARA CITAR ESTE ARTÍCULO

Vásquez, L., Vera, J., Intriago, F., Erazo, C., Tuárez D., Avellaneda, J., Alvarado, K. (2023) Inducción de *Rhizobium japonicum* en la masa fermentativa de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) como estrategia para la disminución de cadmio. *Alternativas*, 24(3).

DOI

<https://doi.org/10.23878/alternativas.v24i3.348>

CORRESPONDENCIA

luis.vasquez2015@uteq.edu.ec



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

Av. Carlos Julio Arosemena, Km 1,5. Guayaquil, Ecuador
Teléfono: +593 4 380 4600
Correo electrónico: revista.alternativas@cu.ucsg.edu.ec
Web: www.ucsg.edu.ec



© The Autor(s), 2023

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. To view a copy of this license visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Inducción de *Rhizobium japonicum* en la masa fermentativa de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) como estrategia para la disminución de cadmio

Induction of *Rhizobium japonicum* in the fermentative mass of two varieties of cacao (*Theobroma cacao* L.) as a strategy for the decrease of cadmium

Luis Vásquez Cortez¹, Jaime Vera Chang², Frank Intriago Flor³, Cyntia Erazo Solórzano⁴, Diego Tuárez García⁵, Juan Avellaneda Cevallos⁶, Kerly Alvarado Vásquez⁷

¹ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. luis.vasquez2015@uteq.edu.ec

² Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. jverac@uteq.edu.ec

³ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. frank.intriago@utm.edu.ec

⁴ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. cerazo@uteq.edu.ec

⁵ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. dtuarez@uteq.edu.ec

⁶ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. javellaneda@uteq.edu.ec

⁷ Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. kerly.alvarado2015@uteq.edu.ec

RESUMEN

El uso de pasta de cacao en la elaboración de chocolate en la Unión Europea debe cumplir con el reglamento 488/2014 para niveles permisibles de Cadmio. El objetivo principal de la investigación fue determinar si con la aplicación de *Rhizobium japonicum* en la fermentación existía una reducción de Cadmio en las almendras de cacao y a su vez si mejoraba sus condiciones o aspectos sensoriales con la inducción del microorganismo que se indujo una vez cosechado aplicado al cacao fresco, en diferentes concentraciones 3% (60 ml) y 5% (100 ml), durante el tiempo fermentativo se realizaron análisis físicos para conocer su pH, °Brix y temperatura. A las almendras secadas al sol durante 6 días, se les realizó la prueba de corte para conocer su estado de fermentación por cada 100 almendras al azar, se le realizó a la pasta de cacao un análisis sensorial donde se evaluó aroma, sabor, acidez, amargor, intensidad, con ayuda de un panel semi entrenado de cata, que constó de 10 personas, con el fin de conocer sensorialmente las variables antes mencionadas dando resultados significativos, además se hizo un análisis de costo por tratamiento para así determinar la rentabilidad en función a la inducción de este microorganismo, dando como resultado los testigos T1 y T4 (\$52,02) y demás inducciones T2,T3,T5,T6 con un promedio de (\$53,94), dando como diferencia promedio de 1.92 ctvs. Se fijó conocer cuanto disminuía el Cadmio con la aplicación de *Rhizobium japonicum* para lo cual se enviaron al laboratorio WSS los mismos datos, desde 36 hasta 29 mg/kg de contenido de Cadmio.

PALABRAS CLAVE

Rhizobium japonicum, cacao, cadmio, sensorial, concentraciones, inducción, tratamientos.

ABSTRACT

The use of cocoa paste in the production of chocolate in the European Union must comply with regulation 488/2014 for permissible levels of cadmium. The main goal of this research was to determine whether with *Rhizobium japonicum* application in fermentation there is a reduction of cadmium in cocoa almonds; and, if their sensory conditions or aspects would improve with the induction of the microorganism that was induced once harvested and applied to fresh cocoa, at different concentrations 3% (60 ml) and 5% (100 ml), during the fermentation time physical analyses were carried out to know its pH, Brix and temperature. Almonds were dried in the sun for 6 days, after this they were tested for fermentation status. For every hundred random almonds a sensory analysis was performed on cocoa paste where aroma, flavor, acidity, bitterness and intensity were evaluated; with the help of a semi-trained tasting panel of ten people, the above-mentioned variables were sensory-known with significant results; in addition, a cost-per-treatment analysis was performed to determine profitability based on the induction of this microorganism resulting in witnesses T1 and T4 (\$52.02) and other inductions T2,T3,T5,T6 with an average of (\$53.94) giving as an average difference of 1.92 ctvs. It was fixed to know how much cadmium decreased with the application of *Rhizobium japonicum* for which the same data was sent to the WSS laboratory same data that ranged from 36 to 29 mg / kg cadmium content.

KEYWORDS

Rhizobium japonicum, cocoa, cadmium, sensory, concentrations, induction, treatments.

Introducción

Theobroma cacao L. es una especie nativa de las regiones tropicales y subtropicales de América (América tropical) originario en el siglo XX antes de Cristo, existen estudios que su procedencia data hace alrededor de 5500 años, pero se han hallado restos y evidencias químicas y físicas en las cuencas amazónicas del Ecuador, hallados en Zamora Chinchipe, de la variedad “fino de aroma” muy apreciado y solicitados por las industrias chocolateras internacionales (ANECACAO, 2014).

Ecuador tiene aproximadamente 530 mil Ha que producen 275 mil toneladas, por motivo de lo cual el Ecuador es uno de los mayores productores de cacao fino de aroma del mundo, el cacao es uno de los principales productos desde la antigüedad de exportación ecuatoriana. Según el instituto Nacional de Estadística y censo (INEC), el sector cacaotero representa el 5% de la población económicamente activa nacional (PEA) y el 15% de la PEA rural, que conforma una base primordial de la subsistencia familiar costera del país, las estribaciones de las montañas de los Andes y la Amazonía ecuatoriana (Espinoza y Arteaga, 2015).

La evaluación sensorial la realizaron 10 catadores semi entrenados, proporcionándoles 20 gramos por cada tratamiento; el análisis de Cadmio se realizó en el laboratorio WORLD SURVEY SERVICES ECUADOR (WSS), ubicado en la ciudad de Guayaquil (Av. de las Américas 1608 y Av. Plaza Dañin, provincia del Guayas). Se compararon los porcentajes Cadmio, posterior al proceso de fermentación adicionando *Rhizobium japonicum* en la masa fresca, con los porcentajes permitidos por la Unión Europea.

En la actualidad las exportaciones de cacao fino de aroma, especialmente hacia los mercados Europeos, se pueden ver amenazados por los indicios de contaminación de metales pesados, creando incertidumbre a la población y al consumidor por las consecuencias de estos metales, tales como daños pulmonares críticos, acompañados del reblandecimiento óseo que origina la terrible enfermedad de itai-itai, misma que tuvo un rebrote en Japón. Se estima que el origen de contaminación se puede prevenir de formas naturales o inducidas por el hombre (Ramirez, 2002).

El proceso de investigar y mitigar los contenidos de Cadmio presentes en la almendra de cacao perjudica a la elaboración de chocolate. Se pretende inducir una bacteria gran negativa *Rhizobium japonicum*, perteneciente al género

bradyrhizobium de la familia *bradyrhizobiaceae*, es fijadora de nitrógeno atmosférico, a su vez proporcionando “N” fijo que es utilizable por las plantas, donde se aplican distintas dosis de concentraciones de *Rhizobium*. Han existido estudios donde su uso permite disminuir el contenido de metales pesados (Deltha, 1982).

La dirección de investigación de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo pretende mitigar este problema de altos contenidos de Cadmio en la producción cacaotera. A pesar de las limitaciones por la pandemia se han propuesto alternativas sostenibles para nuestros productores e industriales.

El objetivo de la investigación consistió en inducir *Rhizobium japonicum* en la masa fermentativa de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional y Trinitario como estrategia para la disminución de Cadmio.

Materiales y métodos

La investigación se generó en la Finca Experimental “La Represa”, localizada en el recinto Fanta en el km 7.5 vía Quevedo San Carlos, Provincia de Los Ríos, que forma parte de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Su situación geográfica es 1° 03'18" de latitud Sur y 79° 25' 24" de longitud Oeste, ubicada en una demarcación catalogada como bosque tropical húmedo, aproximadamente a la altura de 90msnm, este lugar fue de provisión de las mazorcas de cacao, pertenecientes a los predios de la misma Universidad (Álvarez, et al. 2020).

Se analizaron los valores de Cadmio presentes en la masa fermentativa fresca después de la inducción de *Rhizobium japonicum*, para determinar y valorizar si existe una disminución de dicho metal y si están dentro de los valores promedios permitidos por la Unión Europea. Utilizando el método de extracción USDA 3050 A, se determinó el contenido de Cadmio, se utilizó espectrometría de absorción atómica por horno de grafito (Zambrano, 2018), (Araujo, 2016).

Se realizó un análisis económico por tratamiento, que tendrá efecto en la almendra de cacao que se va a manejar con niveles de inducción de *Rhizobium japonicum*, niveles por tratamiento, se efectuó un análisis económico por tratamiento utilizando los de más significación, para determinar cuál de esos tratamientos es el que genere el costo más bajo, y en función de ello nos dará mejor resultado en cuanto a la calidad del producto.

Diseño de la Investigación

En la presente investigación se utilizó un Diseño Completamente al Azar Bifactorial (DCA) con un modelo bifactorial con 3 repeticiones, como primer factor de inducción *Rhizobium japonicum* de producto líquido (0, 3, 5% por cada dos kilos de masa fermentativa o 0.60 y 100 mL de producto líquido, respectivamente), como segundo factor se utilizaron variedades de cacao (Nacional y Trinitario), para determinar diferencia entre medias, y se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey al ($p \leq 0.05$), si existen diferencias o igualdad en los tratamientos.

Tabla 1. Arreglo de tratamientos

N°	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
1	v0j0	Cacao Nacional sin <i>Rhizobium japonicum</i> (testigo)
2	v0j1	Cacao Nacional con inducción de <i>Rhizobium japonicum</i> (3 %)
3	v0j2	Cacao Nacional con inducción de <i>Rhizobium japonicum</i> (5%)
4	v1j0	Cacao Trinitario sin de <i>Rhizobium japonicum</i> (testigo)
5	v1j1	Cacao Trinitario con inducción de <i>Rhizobium japonicum</i> (3%)
6	v1j2	Cacao Trinitario con inducción de <i>Rhizobium japonicum</i> (5%)

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Proceso de post cosecha

Se recolectaron alrededor de 30 mazorcas para alcanzar la cantidad requerida en cada tratamiento; en el momento de la recolección de las mazorcas se tuvo en cuenta que dichas mazorcas estén en buen estado evitando coleccionar frutos con monilla, teniendo en cuenta que fue de la variedad Nacional y Trinitario.

Fermentación

Se procedió a separar la placenta de la almendra de cacao para poder extraer la semilla sin mezclar las variedades en cada celda de la micro-fermentadora 2kg, dando lugar al proceso fermentativo, cubriendo con ayuda de hojas de plátano verde, con el fin de ayudar a mejorar el proceso, realizando la primera remoción a las 48 horas y por consiguiente cada 24 horas, por los días restantes que son en total 4 días de fermentación para ambas variedades, tomando datos de las variables como: Temperatura, pH, °Brix, teniendo en cuenta que no se debe superar los 50°C. Las cajas micro-fermentadoras tienen capacidad de 24 espacios, de los cuales 18 separaciones corresponden a la presente

investigación. Cada separación puede contener 2kg de almendras de cacao, teniendo un total de 36kg de masa fresca total

Inducción de *Rhizobium japonicum*

Se indujo *Rhizobium japonicum* a la masa fresca, dependiendo del croquis experimental, con las dosis requeridas para cada tratamiento y las repeticiones fueron 3%(60ml) y 5%(100ml); su aplicación permite acelerar el drenaje de mucilago y a su vez determinar su efecto en la disminución de Cadmio presente en la masa fermentativa fresca de cacao y así mejorar la calidad y productividad, previa a su industrialización y exportación, determinando si el concentrado del microorganismo podrá penetrar la pared de la almendra, en este caso la testa.

Secado

Se procedió a exponer al sol a las habas de cacao fermentadas y secas (fase aeróbica), con el objetivo que disminuya de 8% a 6% de humedad, evitando que se generen almendras mohosas y no alterar su conservación. Esto tuvo una duración de 6 días.

Almacenamiento

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

Variables físico-químicas

Índice de semilla

En esta variable se procedió a escoger al azar 100 almendras de cacao fermentadas y secas las cuales fueron pesadas en gramos en una balanza analítica de precisión. Se aplicó la siguiente formula:

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

Prueba de testa y cotiledón

La prueba de testa se pudo obtener por medio del peso de una cantidad considerada (30 gramos) de almendras de cacao fermentadas y secas y de esta manera poder obtener el porcentaje mediante la aplicación de la siguiente formula:

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

Prueba de corte

Se procedió a la selección de 100 habas de cacao al azar, se pesó y con ayuda de estilete se realizó un corte transversal en las habas secas de cacao

para evaluar por medio de un test visual si existió una fermentación óptima o algún defecto de la misma, según la normativa INEN 176:2008.

Determinación del pH

Para la determinación de pH se utilizaron 10 gramos de almendras, las cuales fueron trituradas y luego se diluyeron en 100 ml de agua destilada tibia (40°C) en vaso de precipitación. Este proceso se repitió para todos los tratamientos durante 4 días, de esta manera se obtuvieron los datos con ayuda de un pH-metro.

Grados Brix

Para la medición de los grados brix se tomaron 10 gramos de almendras de cacao al azar, las cuales se maceraron en 100 ml de agua destilada tibia, posteriormente, con la ayuda del instrumento Brixómetro, se colocaron en el prisma principal 3 gotas de la mezcla obtenida, posteriormente se bajó la cubierta del prisma y se procedió a dejarlo por 60 segundos para hacer la lectura y registrarla. Es recomendable buscar un lugar que tenga exposición a la luz exterior para su mejor observación, tomando la lectura por el lente ocular del refractómetro; este proceso fue determinado durante los días de fermentación.

Análisis sensorial

Se realizó una prueba captando las principales características. Se conformó un grupo de diez catadores semi entrenados. A cada juez se le asignó una muestra de 20 gr y se procedió a valorizar los siguientes atributos sensoriales:

- Principales sabores: acidez, amargor, astringencia, cacao.
- Generalidades: aroma, sabor, intensidad.
- Defecto: quemado, mohosos, sustancias químicas.
- Específicos: floral, frutal, dulzor, nuez.
- La escala ordinal de valores que se utilizó fue: 1=Ausente, 2=Bajo, 3=Medio, 4=Alto, 5=Muy alto o fuerte.

Prueba de Cadmio

Se analizaron los valores de Cadmio presentes en la masa fermentativa fresca después de la inducción de *Rhizobium japonicum* para determinar y valorizar si existe una disminución de dicho metal y si están dentro de los valores promedios permitidos por la Unión Europea. El análisis de Cadmio se realiza con el equipo de

adsorción atómica por horno de grafito, para lo cual se pesa 1 gramo de muestra. Se realizó la trituración de los granos de cacao secos por digestión húmeda utilizando ácido nítrico por medio de microondas, seguido de este paso se filtra la muestra saliente y se procede a leer en el equipo de horno de grafito.

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

Cada muestra para tostar corresponde 1kg de almendras de cacao secas por tratamiento, las cuales fueron tostadas en una vasija de barro por un tiempo prolongado de 15 a 20 minutos, a una temperatura de 130°C, con remociones constantes para evitar almendras quemadas u olores ahumados. Posteriormente al proceso de tueste, se procedió a la realización del descascarillado manual con la finalidad de retirar la testa del cotiledón y de esta manera descartar la humedad que contiene la almendra de cacao, con ayuda de un molino manual o tradicional se realizó la molienda con el objetivo de reducir el grosor del cotiledón a un tamaño que facilite el proceso del refinado, seguidamente al refinado se mejora la calidad final para que no existan gránulos y este no tenga inconvenientes a la hora de consumir o que afecte o sea percibido por las papilas gustativas. Se recomienda que los gránulos sean menores de 40 micras. En la elaboración de la pasta de cacao jugó un papel fundamental la conchadora, de una capacidad de 5 kg, en esta se introdujo la muestra de cacao poco a poco con el fin de que la conchadora fuera atrapando toda la materia prima que queda en la pared y a su vez que se fuera diluyendo. Este proceso se mantuvo durante 6 horas por cada tratamiento. A continuación, se esperó que la pasta de cacao se atemperara, es decir que se redujera la temperatura para pasar a los moldes donde reposaran hasta tener consistencia. Se procedió a envolver la pasta de cacao en papel aluminio para su almacenamiento en refrigeración a temperatura de 4°C, las envolturas se guardaron en funda, con su respectiva codificación, para evitar alguna contaminación cruzada.

Pasos para la evaluación organoléptica

Después de tener la pasta de cacao envuelta y almacenada se procede a colocar en recipientes, calentado la muestra en baño María para derretir a una temperatura aproximada de 45 grados Celsius para la degustación a los jueces.

Posteriormente se coloca la pasta derretida en vasos de muestra de material plástico colocando uniformemente la pasta para llevar a cabo la cata, a cada catador se le dan 6 muestras, acompañadas de paletas y servilletas, se les indica que debe colocarse en las papilas gustativas lo que cabe en la paleta durante 15 a 20 segundos, para la aparición de los sabores y aromas. Se le indica que los atributos percibidos debían anotarse en la hoja destinada para la catación.

Este proceso se debe continuar por cada muestra de manera individual, es aconsejable repetir la gustación de 2 a 3 veces por muestra o dependiendo del catador; es recomendable enjuagar la boca con agua para la siguiente degustación.

Debe existir un tiempo de descanso entre una cata y otra.

La muestra que haya quedado debe desecharse no debe ser nuevamente almacenada.

Resultado y discusión

Efecto de las variedades de cacao sobre las variables físico-químicas, sensoriales y contenido de Cadmio en almendras de cacao

Variables físico-químicas

Temperatura

En la Tabla 2, se muestran los promedios que reportan el efecto que tuvieron las variedades de cacao sobre la temperatura de fermentación, estos demuestran que no existió diferencias estadísticas ($P>0.05$), lo que nos indica que, tanto el cacao nacional como el trinitario, demuestran un mismo comportamiento en los cuatro eventos de registro de esta variable.

Tabla 2. Efecto de la variedad sobre la temperatura del cacao en su proceso fermentativo

VARIETADES	TEMPERATURA (DÍA 1)	TEMPERATURA (DÍA 2)	TEMPERATURA (DÍA 3)	TEMPERATURA (DÍA 4)
Nacional	28.22a	36.89a	39.10a	39.77a
Trinitario	28.00a	36.78a	39.12a	41.38a
EEM	0.3333	0.1665	0.0331	5.416
$P<0.05$	0.5893	0.4930	0.9136	0.3947

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

pH

En el mismo sentido, se observó que la variable pH en el proceso de fermentación, no se vio afectada ($P>0.05$) por efecto de la variable de cacao empleado en los últimos momentos de su evaluación, excepto en el primer momento del proceso de fermentación (día 1) donde el mayor valor ($P<0.05$) lo demostró la variedad denominada nacional (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la variedad sobre el pH del cacao en su proceso fermentativo

VARIETADES	PH (DÍA 1)	PH (DÍA 2)	PH (DÍA 3)	PH (DÍA 4)
Nacional	3.63a	4.79a	4.97a	4.92a
Trinitario	3.44b	4.79a	4.79a	4.80a
EEM	0.28	<0.00000	0.266	0.1833
$P<0.05$	0.0035	1.000	0.1008	0.2039

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Grados Brix

En lo que se refiere a la cuantificación de los °Brix, que indican el porcentaje de sólidos solubles en base a la solución total, se puede mencionar que, la variedad de cacao tuvo un efecto característico, observándose diferencias en el proceso de estudio y cuantificación, con un mayor valor ($P<0.05$) para la variedad de cacao nacional (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la variedad sobre los °Brix del cacao en su proceso fermentativo

VARIETADES	°BRIX (DÍA 1)	°BRIX (DÍA 2)	°BRIX (DÍA 3)	°BRIX (DÍA 4)
Nacional	13.14a	12.71a	11.34a	9.57a
Trinitario	12.84b	11.91b	11.01b	8.02b
EEM	0.458	1.196	0.518	2.326
$P<0.05$	<0.001	<0.001	0.0019	<0.0001

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Variables de prueba de corte.

Respecto a las variables de prueba de corte, entre las que se evaluaron el porcentaje de testa, cotiledón, índice de semilla, elementos fermentados, los de presentación de almendras violetas y pizarras; se puede indicar que no existieron diferencias estadísticas ($P>0.05$) por efecto de la variedad de cacao. En todos los casos, estas variables presentaron resultados similares, aunque, los comportamientos numéricos de las variables fueron ligeramente superiores en la variedad de cacao nacional, excepto para la variable fermentados, en la cual la variedad de cacao trinitario, presentó un mejor comportamiento numérico, aunque no estadístico (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la variedad sobre las variables de prueba de corte del cacao en su proceso fermentativo

VARIETADES	% TESTA	% COTILEDÓN	ÍNDICE DE SEMILLA	FERMENTADOS	VIOLETAS	PIZARRA
Nacional	14.06a	84.30a	1.54a	62.22a	30.88a	1.77a
Trinitario	14.04a	83.33a	1.46a	74.78a	32.55a	1.66a
EEM	0.031	0.031	12.33	2.33	2.50	0.16
$P<0.05$	0.9882	0.9882	0.0888	0.5369	0.4882	0.7121

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Variables sensoriales

De la misma manera, al evaluar las variables sensoriales, los resultados de la presente investigación demostraron que excepto sobre la variable cacao e intensidad, que presentaron diferencias ($P < 0.05$), las otras estudiadas (Tabla 6) no demostraron cambios en su comportamiento. En el caso de la variable sabor cacao, fue mucho más profundo y determinante para la variedad nacional, mientras que esta, presentó una menor intensidad.

Tabla 6. Efecto de la variedad sobre las variables sensoriales del cacao luego de su proceso fermentativo

VARIETADES	AROMA	ACIDEZ	AMARGOR	CACAO	NUZ	FRUTOS SECOS	FLORAL	ESPECIAS	OTROS	INTENSIDAD
Nacional	3.70	0.83	4.00	3.93a	2.53	2.50	2.63	0.23	0.83	3.20b
Trinitario	3.70	0.53	3.87	3.50b	2.16	2.43	2.37	0.23	0.47	4.33a
EEM	<0.0001	0.8215	0.3651	1.1867	1.004	0.1826	0.7303	<0.0000	1.0041	3.1037
P<0.05	1.0000	0.103	0.5286	0.044	0.2081	0.8334	0.4874	1.00000	0.1219	0.0005

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Efecto de inducción con *Rhizobium Japonicum* sobre las variables físico-químicas, sensoriales y contenido de Cadmio en almendras de cacao

Variables físico-químicas

Temperatura

En el Tabla 7, se observa el efecto de la inducción con *Rhizobium Japonicum* sobre la temperatura del cacao en su proceso de fermentación; evidenciándose que al inicio y al final del estudio (día 1 y 4 de fermentación, respectivamente) no existieron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) en los valores de la temperatura, sin embargo, en las estimaciones intermedias (día 2 y 3 de fermentación), la adición del mayor valor del inductor microbiológico de la fermentación (*Rhizobium Japonicum*), provocó que existieran valores mayores significativos ($P < 0.05$) de temperatura.

Tabla 7. Efecto de la inducción con *Rhizobium Japonicum* sobre la temperatura del cacao en su proceso fermentativo

RHIZOBIUM JAPONICUM	TEMPERATURA (DÍA 1)	TEMPERATURA (DÍA 2)	TEMPERATURA (DÍA 3)	TEMPERATURA (DÍA 4)
0%	28.17a	36.00b	38.78b	40.00a
3%	28.17a	36.50b	38.90b	41.67a
5%	28.00a	38.00a	39.65a	42.05a
EEM	0.1360	1.471	0.6651	5.606
P<0.05	0.9264	<0.0001	0.0083	0.3504

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

pH

En lo que toca, referente al efecto de la inducción con *Rhizobium japonicum* sobre el pH del cacao en su proceso de fermentación, podemos decir que no hay una consecuencia lineal generalizada de los valores (excepto en el día 1, lineal decreciente); sin embargo, sí se presentó diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en los días 1 y 3, pero no, en los días 2 y 4 ($P < 0.05$), respectivamente. Lo anterior, nos indica que para esta investigación la inducción con *Rhizobium japonicum* no es consistente y menos se correlaciona con la disminución o incremento del pH.

Tabla 8. Efecto de la inducción con *Rhizobium Japonicum* sobre la pH del cacao en su proceso fermentativo

RHIZOBIUM JAPONICUM	PH (DÍA 1)	PH (DÍA 2)	PH (DÍA 3)	PH (DÍA 4)
0%	3.67a	5.00a	5.02a	4.85a
3%	3.61a	4.62a	4.58b	4.83a
5%	3.33b	4.75a	5.03a	4.90a
EEM	0.254	0.275	0.360	0.0489
P<0.05	0.0004	0.0747	0.0047	0.8263

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Grados Brix

En cuanto al porcentaje de sólidos solubles en base a la solución total (cuantificación de °Brix), podemos decir que la inducción con *Rhizobium japonicum*, provocó datos variables en términos de la linealidad de los valores en respuesta de la adición incremental (0, 3 y 5%) de inductor; sin embargo, sí se presentaron cambios en las respuestas estadísticas ($P < 0.05$). Estos datos también demuestran que a mayor edad de evaluación (día 4), los valores de °Brix disminuyen como mecanismos de los procesos fermentativos, como se evidencia por efecto de la inducción con el microorganismo (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la inducción con *Rhizobium Japonicum* sobre la °Brix del cacao en su proceso fermentativo

RHIZOBIUM JAPONICUM	°BRIX1	°BRIX2	°BRIX3	°BRIX4
0%	12.94c	12.43a	11.22ab	9.09a
3%	12.99b	12.26b	11.38a	9.03a
5%	13.03a	12.26b	10.96b	8.27b
EEM	0.055	0.1367	0.297	0.6506
P<0.05	<0.001	<0.001	0.0071	0.0006

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Variables de prueba de corte

En el caso de, las variables porcentaje de testa, cotiledón, índice de semilla, se presentaron resultados estadísticos ($P>0.05$) similares, sin evidenciarse un patrón de comportamiento numérico lineal como respuesta a la inducción con *Rhizobium japonicum*, excepto para la variable fermentados (incrementa), presentación de almendras violetas (disminuye) y pizarras (disminuye), y que se demuestran en la Tabla 10; cabe recalcar que, se evidenció un valor positivo ($P<0.05$) del procedo de inducción para estas últimas variables.

Tabla 10. Efecto de la inducción con *Rhizobium japonicum* sobre las variables de prueba de corte del cacao en su proceso fermentativo

RHIZOBIUM JAPONICUM	% TESTA	% COTILEDÓN	ÍNDICE DE SEMILLA	FERMENTADOS	VIOLETAS	PIZARRA
0%	13.33a	86.66a	1.51a	58.83b	38.83a	2.33a
3%	14.46a	85.52a	1.57a	67.50a	30.33b	2.166a
5%	14.33a	85.66a	1.51a	73.33a	26.00b	0.66b
EEM	0.87	0.87	6.27	10.31	9.23	1.29
P<0.05	0.7731	0.7731	0.3000	0.0014	0.0023	0.0010

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Variables sensoriales

En lo que se refiere a las variables sensoriales, los resultados de la presente investigación no demostraron diferencias estadísticas ($P<0.05$), excepto la variable otros (sabores y olores indeterminados), que manifestó la presencia de diferencias ($P<0.05$) (Tabla 19) sin un criterio de crecimiento lineal.

Tabla 11. Efecto de la inducción con *Rhizobium Japonicum* sobre las variables sensoriales del cacao luego de su proceso fermentativo

RHIZOBIUM JAPONICUM	AROMA	ACIDEZ	AMARGOR	CACAO	NUZ	FRUTOS SECOS	FLORAL	ESPECIAS	OTROS	INTENSIDAD
0%	3.75a	0.80a	3.95a	3.65a	2.40a	2.40a	2.85a	0.15a	0.25b	4.00a
3%	3.55a	0.60a	3.65a	3.65a	2.35a	2.60a	2.25a	0.25a	1.00a	3.80a
5%	3.80a	0.65a	4.20a	3.85a	2.30a	2.40a	2.40a	0.30a	0.70ab	3.50a
EEM	0.3415	0.2687	0.7111	0.2981	0.129	0.2981	0.8062	0.1971	0.9747	0.6496
P<0.05	0.7045	0.6454	0.1113	0.6716	0.9606	0.8369	0.4150	0.6045	0.0376	0.4088

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Efecto de la interacción variedades de cacao por la inducción de *Rhizobium japonicum* sobre las variables físico-químicas, sensoriales y contenido de Cadmio en almendras de cacao

Variables físico químicas
Temperatura

En el Tabla 12, se presentan los valores de la variable temperatura como respuesta a la interacción variedades de cacao por la inducción

de *Rhizobium japonicum*, observándose que en los primeros días (1, 2 y 3) del proceso fermentativo, no existieron diferencias estadísticas ($P>0.05$), sin embargo, en el día 4, si se observó una interacción entre los factores estudiados, además de que fue claro el incremento del valor esta variable para el tratamiento constituido por la variable de cacao nacional con la inducción de 5% del producto que contenía al microorganismo (*Rhizobium japonicum*).

Independientemente del método que se haya aplicado en la fermentación del cacao según menciona Velásquez (2016), al tapar la caja fermentativa se ayuda a incrementar la temperatura con el fin de que tenga una interacción favorable por la aparición de la proliferación y actividad biológica de los microorganismos y mejorando las propiedades químicas y bioquímicas, y teniendo mejores catabolismos oxidativos de sustancias orgánicas, se recomienda que se deben cubrir las almendras frescas con hojas de plátano que tienen contenidos de glucosa y nutrientes y ayuda a mejorar la fermentación y la calidad de los granos de cacao. Asegurar el aumento de temperatura de manera homogénea ayuda a la purificación del aire al fermentador.

Afirman Arvelo et al. (2017) que la temperatura se debe a la actividad de la etapa fermentativa donde existen alteraciones en las propiedades; menciona que se lo llama como tercera fase, en ella participan microorganismos benéficos como bacterias acéticas que al modificar el etanol elaboran las levaduras (ayudando a tener una fermentación óptima) en ácido acético. Al tener una elevación adecuada de temperatura va existir la presencia de *Bacillus* (bacterias) que contribuyen al sabor por lo que produce ácidos orgánicos y saborizantes como el butanodiol. Al tener óptimas temperaturas se obtienen una excelente fermentación y actividad microbiana.

Tabla 12. Efecto de la interacción variedades de cacao por la inducción de *Rhizobium japonicum* sobre la temperatura del cacao en su proceso fermentativo

VARIEDADES	RHIZOBIUM JAPONICUM	TEMPERATURA (DÍA 1)	TEMPERATURA (DÍA 2)	TEMPERATURA (DÍA 3)	TEMPERATURA (DÍA 4)
Nacional	0%	28.00	36.00	38.90	41.16b
	3%	28.33	36.67	38.67	41.70b
	5%	27.67	38.00	39.73	42.76a
Tritinario	0%	28.33	36.00	38.67	41.16b
	3%	28.00	36.33	39.13	41.63b
	5%	28.33	38.00	39.57	41.33b
EEM		0.2545	0.0961	0.1931	0.4044
P<0.05		0.5171	0.6186	0.3250	0.0009

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

pH

En el Tabla 13, se presentan los valores de la variable pH como respuesta a la interacción variedades de cacao por la inducción de *Rhizobium japonicum*, observándose que en el segundo día del proceso fermentativo, no existió diferencias estadísticas ($P>0.05$), sin embargo, en los días 1, 3 y 4, si se observó una interacción entre los factores estudiados ($P<0.05$), aunque sin un patrón claro que permita deducir que la interacción respondió en función al nivel incremental del microorganismo estudiado.

Álvarez et al. (2010) ratifican que el pH es un parámetro a considerar y se expresa en la calidad del cacao y su producto final.

Un alto contenido de pH en los cotiledones es un indicativo de que existe una mala fermentación, y se cataloga como sobre fermentación de las almendras de cacao. Esto sucede por la aparición de ácidos carboxílicos y amina biogénicas que pertenecen a los aminoácidos.

Según Vega (2018), una fermentación noble debe tener un rango de pH entre 5.0-6.1 el pH optimo; según Armijos (2002) debe ser de 5.1 a 5.7 para que exista una fermentación adecuada. Si el pH es menor a 5.0 se manifiesta la aparición de ácidos no volátiles que trae consigo aromas no deseables para el chocolate, esto sucede cuando existe una fermentación incompleta.

Cuando los niveles de pH son inferiores de lo habitual, la calidad del cacao baja. Castañeda et al. (2016) hallaron que las almendras de cacao que poseen un pH inferior al 4.5 generan baja potencialidad de precursores aromáticos. Por su parte Zambrano et al. (2010) indican que el pH está en un rango de 5.5-5.8 se puede estimar que tiene la probabilidad de estar fermentado, pero si el rango está de 4.7 a 5.2 se puede valorar que ha habido una adecuada fermentación.

Tabla 13. Efecto de la interacción variedades de cacao por la inducción de *Rhizobium japonicum* sobre el pH del cacao en su proceso fermentativo

VARIEDADES	RHIZOBIUM JAPONICUM	PH (DÍA 1)	PH2 (DÍA 2)	PH3 (DÍA 3)	PH4 (DÍA 4)
Nacional	0%	3.83a	4.83	4.80ab	5.10ab
	3%	3.73ab	4.63	4.77ab	5.03ab
	5%	3.33c	4.90	4.80ab	5.63b
Trinitario	0%	3.50bc	5.17	5.23b	4.60b
	3%	3.50bc	4.60	5.40a	4.63b
	5%	3.33c	4.60	5.27a	5.17a
EEM		0.085	0.1589	0.235	0.2849
P<0.05		0.059	0.1573	0.0080	0.0010

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Grados Brix

En los días 1, 2 y 4 del proceso fermentativo, los valores experimentales de la variable °Brix demostraron una interacción entre los factores estudiados ($P<0.05$), aunque sin un patrón lineal claro que permita deducir que la interacción de los factores fue directamente proporcional al incremento del nivel de microorganismo empleado (Tabla 14), sin embargo, en el tercer día del proceso fermentativo, no hubo diferencias estadísticas ($P>0.05$).

Santana et al. (2020) mencionan que al transcurrir el tiempo la cantidad de mucilago va disminuyendo, este efecto ocurre por la actividad microbiana, que cumple la función de que exista el incremento de temperatura.

Para poder determinar los sólidos solubles, la fruta debe tener un dulzor aceptable para el producto final, ya sea para un licor o un néctar, y no alterar sus propiedades organolépticas (Quizhpi, 2016).

En este caso existe la evidencia que al inducir el microorganismo hay un descenso de los °Brix, y por ende existe un chocolate amargo de buena calidad. Es un factor principal es en el momento de la fermentación para que se cumpla con las propiedades requeridas.

Como es la pasta de cacao datos que no están representados o iguales a dicha investigación existe la tendencia de la disminución de los °Brix

Según García y Martínez (1967) la aparición y aumento de levaduras es por causa de los contenidos de azúcares totales en los cotiledones del grano del cacao. Los °Brix que sean considerablemente superiores favorecen la acción metabólica de las levaduras y la obtención de una excelente fermentación de las almendras de cacao, que, al tener unos valores adecuados tendrá disponibilidad de azúcares para la proliferación de levaduras, que pasarán a ser etanol.

Tabla 14. Efecto de la interacción variedades de cacao por la inducción de *Rhizobium japonicum* sobre los °Brix del cacao en su proceso fermentativo

VARIEDADES	RHIZOBIUM JAPONICUM	°BRIX (DÍA 1)	°BRIX2 (DÍA 2)	°BRIX3 (DÍA 3)	°BRIX4 (DÍA 4)
Nacional	0%	13.12b	12.84a	11.40	10.03a
	3%	13.14ab	12.79a	11.62	10.10a
	5%	13.17a	12.50b	11.05	8.58b
Trinitario	0%	12.78d	12.01c	11.04	8.16b
	3%	12.85c	11.72d	11.13	7.96b
	5%	12.88c	12.01c	10.87	7.95b
EEM		0.0135	0.1451	0.0803	0.4001
P<0.05		0.0154	<0.001	0.3573	0.0019

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Variables de prueba de corte

Con base en los resultados de las variables, porcentaje de testa, cotiledón, índice de semilla y pizarras, se puede indicar que no se presentaron resultados que difieran estadísticamente ($P>0.05$) por efecto de la interacción de los factores variedades de cacao por la inducción de *Rhizobium japonicum*, caso contrario a lo observado ($P<0.05$), con las variables fermentados y presentación de almendras violetas. De igual manera, se puede indicar que no existe un patrón de comportamiento numérico lineal como respuesta a la inducción con *Rhizobium japonicum* (Tabla 15).

La prueba de corte es de gran importancia ya que realizando el análisis de corte se logran evidenciar diferentes factores evaluativos, a saber: granos fermentados, violetas, pizarros, hongos entre otros presentes en las almendras de cacao, además este análisis demuestra la calidad de la fermentación que se generó en el tiempo transcurrido en dicho proceso. Los resultados que se obtuvieron son aceptables y comparables con la norma INEN 176.

Tabla 15. Efecto de la interacción variedades de cacao por la inducción de *Rhizobium japonicum* sobre las variables de prueba de corte cacao en su proceso fermentativo

VARIETADES	RHIZOBIUM JAPONICUM	% TESTA	% COTILEDÓN	ÍNDICE DE SEMILLA	FERMENTADOS	VIOLETAS	PIZARRAS
Nacional	0%	13.11	86.89	1.56	63.00bc	34.33ab	2.66
	3%	13.44	86.55	1.58	71.00ab	27.00ab	2.00
	5%	15.55	84.44	1.49	68.00abc	31.33abc	0.66
Trinitario	0%	13.55	86.44	1.52	54.66c	43.33a	2.00
	3%	15.50	84.49	1.44	64.00bc	33.66abc	2.33
	5%	13.11	86.89	1.42	78.66a	20.66c	0.66
EEM		1.14	1.14	2.58	5.30	5.37	0.25
P<0.05		0.4375	0.4375	0.6470	0.0137	0.0093	0.3966

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Variables sensoriales

Para este grupo de variables, se puede indicar que, los resultados no demuestran diferencias estadísticas ($P<0.05$), excepto para las variables otros e intensidad, que demostraron cambios en su comportamiento estadístico ($P<0.05$), por efecto de la interacción entre los factores estudiados (Tabla 16). Cabe reiterar que no se evidenció un criterio de crecimiento lineal de los valores de respuesta por efecto de la adición creciente del microorganismo estudiado.

Portillo et al. (2009) mencionan que el momento fundamental para que se generen propiedades sensoriales es el proceso de fermentación, donde se desarrollan los precursores del

aroma y el sabor final del producto terminado. Esto tiene que ver con las propiedades químicas, que a la vez están estrechamente relacionadas con la calidad sensorial por consecuencia de la fermentación. El método de fermentar las almendras de cacao tiene una vinculación con las características sensoriales, recalca Quevedo (2018) que es importante para el sabor y aroma las cajas fermentadoras cubiertas con hojas de plátano, eso ayuda a que exista la fermentación de microorganismos benéficos que cumplen la función de eliminar el mucilago, por lo tanto si existen remociones óptimas permitirán la eliminación del embrión y no existirá el sabor amargo, disminuyendo la pérdida de teobromina, y potenciando el sabor y aroma a chocolate.

Tabla 16. Efecto de la interacción variedades de cacao por la inducción de *Rhizobium japonicum* sobre las variables sensoriales cacao en su proceso fermentativo

VARIETADES	RHIZOBIUM JAPONICUM	AROMA	ACIDEZ	AMARGOR	CACAO	NUZ	FRUTOS SECOS	FLORAL	ESPECIAS	OTROS	INTENSIDAD
Nacional	0%	3.80	1.00	4.30	4	2.1	2.2	2.7	0.1	0.1	3.2
	3%	3.60	0.60	3.50	3.9	2.2	2.8	1.8	0.3	1.6	2.8
	5%	3.70	0.90	4.20	3.9	2.2	2.5	2.6	0.3	0.8	3.6
Trinitario	0%	3.70	0.60	3.60	3.3	2.7	2.6	3	0.2	0.4	4.8
	3%	3.50	0.60	3.80	3.4	2.5	2.4	2.7	0.2	0.4	4.8
	5%	3.90	0.40	4.20	3.8	2.4	2.3	2.2	0.3	0.6	3.4
EEM		0.9448	0.242	0.468	0.2768	0.19	0.3800	0.5939	0.0912	0.6972	1.0697
P<0.05		0.8601	0.4946	0.1471	0.5001	0.8405	0.5630	0.3855	0.8050	0.0349	0.0108

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Concentraciones de Cadmio

Basándonos en los resultados experimentales sobre la concentración de Cadmio en la almendra de cacao, luego de su proceso de fermentación, se puede decir que luego del análisis descriptivo, tanto en la variedad de cacao nacional como del trinitario, la inducción con *Rhizobium japonicum* tuvo efectos positivos en la reducción de la concentración de este elemento químico contaminante (Tabla 17).

En relación a lo anterior Pérez y Azcona (2012), indican que el Cadmio al ser un metal pesado se caracteriza por ser un bioacumulado en el cuerpo humano, produciendo daños perjudiciales e irreversibles a la salud de las personas. Las personas que consuman alimentos que contengan Cadmio, pudieran tener serios problemas de salud. El Cadmio está catalogado como tóxico.

Mientras Covarrubias et al. (2015) mencionan la utilización de bacterias que cumplen el rol de ser benéficas, pues se comportan como

bioreguladores al adicionar o inocular en semillas o plantas para disminuir los niveles de Cadmio. Estos bioreguladores ayudan al crecimiento, fortalecimiento y mejoramiento de la productividad, y cumplen la función de potenciadores de desarrollo, permitiendo a la absorción de nutrientes como fertilizantes. Adicionalmente, utilizar los microorganismos como el *Rhizobium japonicum*, favorece la fijación del nitrógeno.

Revoredo (2018), menciona que la utilización y aplicación de microorganismos es beneficiosa y con potencial para la disminución de Cadmio en variedades de leguminosas y soja, lo cual es una alternativa de minimización de costos con aplicaciones sencillas, además comenta que al verse afectados los altos contenidos de Cadmio se perjudican de manera tangente los mercados internacionales. Se ha evidenciado que la utilización de bacterias posee una eficacia quelante.

Tabla 17. Interacción de las variedades de cacao por la inducción de *Rhizobium japonicum* sobre las concentraciones de Cadmio en cacao

VARIETADES	RHIZOBIUM JAPONICUM	MG/ KG
Nacional	0%	0.36
	3%	0.34
	5%	0.35
Trinitario	0%	0.36
	3%	0.30
	5%	0.29

Elaborado por: Vásquez, L. 2021

Conclusiones

En función de los resultados obtenidos se concluye que, el análisis de los contenidos de Cadmio, en la presente investigación, cumplen con la norma establecida N° 488/2014 de la Unión Europea para los diferentes tratamientos obteniendo resultados favorables para la disminución del Cadmio en almendra de cacao por la inducción con *Rhizobium japonicum*.

Se observaron efectos no concluyentes de la variable variedad de cacao sobre las variables físico-químicas, de prueba de corte y sensoriales de la almendra de cacao fermentada, toda vez que, no se presentan diferencias estadísticas significativas para todas las variables estudiadas. Es importante mencionar, que no existe normativa específica para los valores de estas variables en función de la variedad de cacao, pudiéndose indicar que, al compararse con los encontrados por otros autores, los presentes re-

sultados guardan mucha relación (temperatura 28.00 hasta 41.38, pH 3.44 hasta 4.92, °Brix 13.14 hasta 8.02) con los de la literatura.

Existen efectos no concluyentes de la variable de inducción con *Rhizobium japonicum* sobre las variables físico-químicas, de prueba de corte y sensoriales de la almendra de cacao fermentada, toda vez que, que no se presentan diferencias estadísticas significativas para todas las variables estudiadas. Similarmente, se puede indicar que no se encuentran en la literatura valores referencia para las variables físico-químicas en función del empleo de un método de inducción microbiológico, sin embargo, al compararse con los encontrados por otros autores, los presentes resultados guardan mucha relación (temperatura 28.00 hasta 42.05, pH 3.33 hasta 4.90, °Brix 12.94 hasta 9.09,) con los de la literatura.

Referencias bibliográficas

- Álvarez Coello, L., Vera Chang, J., Vallejo Torres, C., Tuarez García, D. (2020). Aprovechamiento de almendras de jackfruit adicionando manteca de cinco clones experimentales de cacao extraída a partir de mazorcas infectadas con moniliasis para la obtención de crema de chocolate blanco. 2020; (May):61-8. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/342302007>
- Álvarez, C., Tovar, L., García, H., Morillo, F., Sánchez, P., Girón, C. (2014). Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) usando dos tipos de fermentadores. Revista Científica UDO Agrícola. 2010;10(1):76-87.
- ANECACAO. (2014). Actualidad y perspectivas del sector cacaotero en Ecuador. 2014;26. Disponible en: <http://www.anecacao.com/uploads/2014/09/1-El-Ecuador-Actualidad-y-Perspectivas-del-Sector-Cacaotero-ANECACAO-cumbre-mundial-del-cacao-2014.pdf>
- Araujo Abad, L.S. (2016). Verificación del método analítico de espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito para la cuantificación de Cadmio en almendra de cacao (*Theobroma cacao* L.) [Internet]. Tesis. Universidad Politécnica Salesiana; 2016. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Armijos Paredes, A.I. (2002). Características de acidez como parámetro químico de calidad en muestra de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y Ordinario de producción nacional durante la fermentación. [Internet]. Vol. 12, INIAP. Universidad Católica del Ecuador; 2002. Disponible en: <http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>
- Arvelo Sánchez, M.Á., González León, D., Maroto Arce, S., Delgado López, T.D., Montoya Rodríguez, P. (2017). Manual técnico del cultivo de cacao prácticas

- latinoamericanas. 1.a ed. Agricultura II de C para la A, editor. Costa Rica; 2017. 1-143 p.
- Castañeda Sedano, J., Rodríguez Campos, J., Cervantes Lugo E. (2016). Análisis del perfil de compuestos volátiles de cacao criollo (*Theobroma cacao* L.) Durante el proceso de fermentación y secado por componentes principales. 2016;8. Disponible en: [https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/414/1/Análisis del perfil de compuestos volátiles.pdf](https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/414/1/Análisis%20del%20perfil%20de%20compuestos%20volátiles.pdf)
- Covarrubias, S., García Berumen, J.A., Peña Cabrielas, J.J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Univ* [Internet]. 2015;25(NE-3):40-5. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/473/47324564010.pdf>
- Deltha Caloe, J. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1982;32(1):136-9. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/32/1/ijss-32-1-136.pdf?expires=1607387159&id=id&accname=guest&checksum=142D5996FA6E099814F41CF859D26006>
- Espinoza Solis, E., Arteaga Estrella, Y. (2015). Diagnóstico de los procesos de asociatividad y la producción de Cacao en Milagro y sus sectores aledaños. *Revista Ciencia Unemi*, 8(14). 2015. pp. 105-112.
- García Escobar HM, Martínez Ramírez RN. (1967). Determinación del perfil de sabor de doce cacaos autóctonos (*Theobroma cacao* L.) Producidos en siete fincas cacaoteras de El Salvador. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 1967;6(11):951-2. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/16512/1/13191670.pdf>
- Gonzales G. (2014). Estudio de caso asociación de productores orgánicos de Vines APOVINCES. 2014;1-10. Disponible en: <http://www.porlatierra.org/docs/b1f292514a3fb5c75b72cce3c825410d.pdf>
- Pérez García, P.E, Azcona Cruz, M.I. (2012). Los efectos del Cadmio en la salud. *Rev Espec Médico Quirúrgicas* [Internet]. 2012;17(3):199-205. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/473/47324564010.pdf>
- Portillo, E., Labarca, M., Grazziani, L., Cros, E., Davrieux, F. (2009). Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela Aroma. *Revista Científica UDO Agric.*;9(2):458-68.
- Quevedo Guerrero, M.J.N., Romero López, I.J.A., Tuz Guncay, I.G. (2018). Calidad físico química y sensorial de granos y licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) Usando cinco métodos de fermentación. *Revista Científica Agrosistemas*, 6(1), 115-127. Recuperado de <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/172>
- Quizhpi Nieves, E.X. (2016). Caracterización del mucílago de cacao CCN 51 mediante espectrofotometría uv-visible y absorción atómica [Internet]. Vol. 53, *Journal of chemical information and modeling*. 2016.
- Ramírez, A. (2002). Toxicología del Cadmio conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. 2002; Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v63_n1/toxicologia.htm
- Revoredo Marquina, A.G. (2018). Efecto del tratamiento con 3 cepas de estreptomicetos en la acumulación de Cadmio en plantas de *Theobroma cacao* L. [Internet]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2018. Disponible en: http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/1475%0Ahttp://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1475/Efecto_RevoredoMarquina_Andrea.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Santana, P., Vera, J., Vallejo, C., Álvarez, A. (2020). Mucílago de cacao, nacional y trinitario para la obtención de una bebida hidratante. (April 2020):1-128. Disponible en: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2262/1/T-UTEQ-0033.pdf>
- Vásquez, L.H. (2021). Inducción de *Rhizobium japonicum* en la masa fermentativa de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) nacional y Trinitario como estrategia para la disminución de Cadmio. Título de la Unidad de Integración Curricular. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias pecuarias, Carrera de Ingeniería en alimentos.
- Vega Vite, J.U. (2018). Evaluación de las características del licor de cacao ccn-51 (*theobroma cacao* L.) considerando diferentes aspectos de manejo en poscosecha. Vol. 1. Universidad de las fuerzas armadas; 2018.
- Velásquez Cardona, L.M., Rodríguez Sandoval, E., Chamarro Cadena, E.M. (2016). Diagnóstico de las prácticas de beneficio del cacao en el departamento de Arauca. *Revista Lasallista de Investigación*. 2016;13(1):94-104.
- Zambrano, A., Gómez, Á., Ramos, G., Romero, C., Lacruz, C., Rivas, E. (2010). Caracterización de parámetros físicos de calidad en almendras de cacao Criollo, Trinitario y Forastero durante el proceso de secado. *Agron Trop* [Internet]. 2010;60(4):389-96. Disponible en: [https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/414/1/Análisis del perfil de compuestos volátiles.pdf](https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/414/1/Análisis%20del%20perfil%20de%20compuestos%20volátiles.pdf)
- Zambrano Muñoz, D.M. (2018). “Estudio del contenido en Cadmio de cacao (*Theobroma cacao* L) ecuatoriano y su incidencia en el consumo humano” [Internet]. Universidad de Córdoba; 2018. Disponible en: https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/20041/tfm_denisse_margoth_zambrano_muñoz.pdf?sequence=1&isAllowed=y