



UNIVERSIDAD UTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA E
INDUSTRIAS**

CARRERA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

**DIFERENCIACIÓN DE GRANOS DE CACAO (*Theobroma
cacao*) ECUATORIANO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA
RAMAN Y QUIMIOMETRÍA**

**TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA DE ALIMENTOS**

MARÍA JOSÉ MEJÍA LASLUIA

DIRECTOR: JUAN BRAVO VÁSQUEZ

Quito, diciembre 2019

© Universidad UTE. 2019

Reservados todos los derechos de reproducción

FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

TRABAJO DE TITULACIÓN

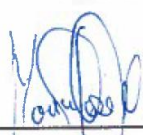
DATOS DE CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1724434186
APELLIDO Y NOMBRES:	Mejía Lasluisa María José
DIRECCIÓN:	Cayambe, Calle 10 de Agosto y Mejía
EMAIL:	mejiamajo07@gmail.com
TELÉFONO FIJO:	022361143
TELÉFONO MOVIL:	0959495154

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Diferenciación de granos de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) Ecuatoriano mediante espectroscopía Raman y Quimiometría.
AUTOR O AUTORES:	María José Mejía
FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Diciembre, 2019
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Juan Bravo Vásquez
PROGRAMA	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera de Alimentos
RESUMEN: Mínimo 250 palabras	En el Ecuador existen variedades de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) de diferentes calidades, siendo el cacao "Nacional" el de superiores características comparado por ejemplo con el CCN51. Sin embargo, este presenta una mayor productividad, resistencia a plagas y buenas características organolépticas, por lo

	<p>que, se suele mezclar con el cacao del complejo Nacional para su comercialización, por esta razón es necesario diferenciar entre las distintas variedades. Actualmente en el país, esta diferenciación se realiza visualmente, lo que lo vuelve subjetivo y tedioso. Para lo cual en la presente investigación se propuso la diferenciación de granos de cacao ecuatoriano mediante espectroscopía Raman y Quimiometría. Para lo cual se utilizó granos de cacao del denominado complejo Nacional, constituido por variedades (Nacional, Amazónico, Súper Árbol, ICS 95) de la provincia de Zamora Chinchipe y granos de la variedad CCN51 de distintas provincias. A estos granos enteros se aplicó la espectroscopía Raman y se analizaron los espectros con Quimiometría, para lo cual se utilizaron los modelos de análisis multivariado PCA y OPLS-DA con los espectros normalizados y suavizados en el programa SIMCA. Los resultados de los espectros Raman indican la diferencia que existe entre los espectros promedios de las muestras de cacao del complejo Nacional y CCN51 así como también se muestran los componentes principales que se encuentran en la corteza de las almendras de cacao principalmente lignina, celulosa y pectina; en el análisis quimiométrico con el modelo OPLS-DA se exhiben diferencias entre las distintas variedades analizadas y muestran que existe un buen agrupamiento condicionado por la variedad; y esto demuestra estadísticamente que la espectroscopía Raman permite diferenciar las variedades en las almendras de cacao.</p>
<p>PALABRAS CLAVES:</p>	<p>Cacao Nacional, CCN51 Espectroscopia Raman, PCA, OPLS-DA.</p>
<p>ABSTRACT:</p>	<p>In Ecuador there are cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i>) of different qualities, the "National" cocoa being the one of superior characteristics compared for example with CCN51. However, this presents a higher productivity, resistance to pests and good organoleptic characteristics, so it is usually mixed with cocoa from the National complex for marketing, for this reason it is necessary to differentiate between the different varieties. Currently in the country, this</p>

	<p>differentiation is done visually, which makes it subjective and tedious. For which in the present investigation the differentiation of Ecuadorian cocoa beans by Raman spectroscopy and Chemometry was proposed. To this end, cocoa beans from the so-called National complex were used, consisting of varieties (National, Amazon, Super Tree, ICS 95) from the province of Zamora Chinchipe and CCN51 varieties from different provinces. Raman spectroscopy was applied to these whole grains and the spectra were analyzed with Chemometrics, for which the PCA and OPLS-DA multivariate analysis models were used with the normalized and smoothed spectra in the SIMCA program. The results of the Raman spectra indicate the difference between the average spectra of the cocoa samples of the National complex and CCN51 as well as the main components found in the crust of cocoa almonds, mainly lignin, cellulose and pectin. ; in the chemometric analysis with the OPLS-DA model, differences between the different varieties analyzed are shown and show that there is a good grouping conditioned by the variety; and this shows statistically that Raman spectroscopy allows differentiating varieties in cocoa almonds.</p>
<p>KEYWORDS</p>	<p>National Cocoa, CCN51 Raman Spectroscopy, PCA, OPLS-DA,</p>

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución.

f. 
MARÍA JOSÉ MEJÍA LASLUISA

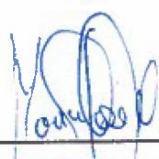
1724434186

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **MEJÍA LASLUIA MARÍA JOSÉ**, CI 1724434186 autora del trabajo de titulación: **Diferenciación de granos de cacao (*Theobroma cacao*) ecuatoriano mediante espectroscopía Raman y Quimiometría** previo a la obtención del título de **INGENIERA DE ALIMENTOS** en la Universidad UTE.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de titulación de grado para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad UTE a tener una copia del referido trabajo de titulación de grado con el propósito de generar un Repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Quito, diciembre de 2019.

f. 
MARÍA JOSÉ MEJÍA LASLUIA
1724434186

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutor, certifico que el presente trabajo de titulación que lleva por título **Diferenciación de granos de cacao (*Theobroma cacao*) Ecuatoriano mediante espectroscopía Raman y Quimiometría** para aspirar al título de **Ingeniera de Alimentos** fue desarrollado por **MEJÍA LASLUISA MARÍA JOSÉ**, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias; y que dicho trabajo cumple con las condiciones requeridas para ser sometido a las evaluación respectiva de acuerdo a la normativa interna de la Universidad UTE.



Juan Bravo Vásquez

DIRECTOR DEL TRABAJO

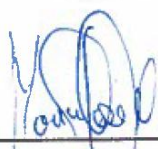
C.I. 1001367414

DECLARACION JURAMENTADA DEL AUTOR

Yo, **Mejía Lasluisa María José**, portadora de la cédula de identidad N° **172443418-6**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en ese documento.

La Universidad UTE puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

f: _____



MARIA JOSÉ MEJÍA LASLUISA

1724434186

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres Betty y Gilmar quienes con su inmenso amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, inculcando en mí el ejemplo de esfuerzo, responsabilidad y perseverancia, de no temer a las adversidades porque Dios siempre está conmigo.

A mi hermano Shilmar por su amor y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento y alegrar mi vida con cada detalle. Gracias por considerarme tu ejemplo a seguir.

A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas propuestos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi fortaleza, por todas las bendiciones que he recibido para poder llegar hasta este punto a pesar de los distintos obstáculos y darme la sabiduría para poder culminar esta etapa de mi vida con éxito.

A mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, que con amor y comprensión han sido mi mayor apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria. Infinitas Gracias Papitos.

A mi hermano Shilmar por ser mi compañero de vida y llenarme de alegría día tras día, por compartir buenos y malos momentos. Amarte infinitamente

A la Universidad UTE por el conocimiento y educación impartidos, en especial al Dr. Luis Ramos, por su guía, orientación e interés en mi formación, Gracias por la paciencia y por hacer posible que este trabajo de titulación saliera adelante. Al Centro de Investigación de Alimentos de la Universidad UTE por todas las facilidades prestadas. Al Programa de Café y Cacao del MAG por la provisión de las muestras. Al Dr. Valerian Ciobota de la empresa Rigaku por las medidas de los espectros Raman y al Dr. Fernando Ortega por el apoyo en el proceso quimiométrico.

Al Dr. Juan Bravo por su ayuda en este trabajo de titulación, ya que con su ayuda se logró los mejores resultados.

A mis amigas Pamela, Aleja, Cristina, Mili, Berenice, Anita por todos los años de amistad, por escucharme y apoyarme cuando más lo necesitaba.

A mis tías/os y primos/as, especialmente a mi tía Katy, Yolanda, Martha y Franklin que han sido un gran apoyo durante toda esta etapa por brindarme consejos e impulsarme a cumplir todas mis metas.

A mis compañeros y amigos, Evelyn Herrera, Andrea Martínez y Frank Vargas, porque formamos una linda amistad y equipo de trabajo dentro de la universidad apoyándonos el uno al otro durante esta formación profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PÁGINA

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. METODOLOGÍA.	9
2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	9
2.2. MEDICIÓN DE ESPECTROS RAMAN	9
2.3. PROCESAMIENTO ESPECTROSCÓPICO DE LA INFORMACIÓN	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
3.1. ESPECTRO RAMAN DE GRANOS DE CACAO	11
3.2. ASIGNACIONES DEL ESPECTRO RAMAN DE GRANOS DE CACAO	12
3.3. ESPECTROS RAMAN DE VARIEDADES DE GRANOS DE CACAO.	13
3.4. ESPECTROS RAMAN DE GRANOS DE CACAO EN DIFERENTES BIOZONAS	20
3.4.1. ESPECTROS RAMAN DE GRANOS DE CACAO NACIONAL POR BIOZONA	20
3.4.2. ESPECTROS RAMAN DE GRANOS DE CACAO ICS 95 POR BIOZONA	21
3.4.3. ESPECTROS RAMAN DE ALMENDRAS DE CACAO AMAZÓNICO POR BIOZONA	22
3.4.4. ESPECTROS RAMAN DE GRANOS DE CACAO SÚPER ÁRBOL POR BIOZONA	24
3.4.5. ESPECTRO RAMAN DE ALMENDRAS DE CACAO CCN 51 DE DIFERENTES PROVINCIAS	25
3.5. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO	26
3.5.1. PCA DE LOS RESULTADOS ESPECTROSCÓPICOS DE MUESTRAS DE GRANOS CACAO DEL COMPLEJO NACIONAL Y CCN51	27
3.5.2. OPLS-DA DE LOS RESULTADOS ESPECTROSCOPICOS DE LAS MUESTRAS DE GRANOS CACAO DEL COMPLEJO NACIONAL Y CCN51	28
3.5.2.1.OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao por provincia	28

3.5.2.2.OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao por biozona	29
3.5.2.3.OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao por genotipo	30
3.5.2.4.OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao por código.	31
3.5.2.5.OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao del genotipo Nacional.	32
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
4.1. CONCLUSIONES	33
4.2. RECOMENDACIONES	34
5. BIBLIOGRAFÍA	35
6. ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Asignaciones y frecuencias del espectro Raman de granos de cacao	12
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Espectro Raman de cacao Nacional (Zamora Chinchipe) y CCN51 (El Oro)	11
Figura 2. Espectros Raman de granos de cacao de distintas variedades...	14
Figura 3. Comparación de almendras de cacao CCN 51 con genotipo Nacional.....	16
Figura 4. Comparación de almendras de cacao Nacional con las distintas variedades	18
Figura 5. Comparación de almendras de cacao del genotipo Nacional	19
Figura 6. Espectros Raman de granos de cacao Nacional de diferentes biozonas.....	20
Figura 7. Espectros Raman de granos de cacao ICS 95 de diferentes biozonas.....	22
Figura 8. Espectros Raman de granos de cacao Amazónico de diferentes biozonas.....	23
Figura 9. Espectros Raman de granos de cacao Súper Árbol de diferentes biozonas.....	24
Figura 10. Espectros Raman de granos de cacao CCN51 de diferentes provincias.....	26
Figura 11. PCA de espectros Raman de granos de cacao del complejo Nacional y CCN51	27
Figura 12. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del Complejo Nacional y CCN51 por provincia.....	29
Figura 13. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del complejo Nacional y CCN51 por biozona.....	30
Figura 14. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del Complejo Nacional y CCN51 por genotipo.....	30
Figura 15. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del Complejo Nacional y CCN51 por código.....	31
Figura 16. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del Complejo Nacional.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO 1. Etapas de preparación de muestra.	38
ANEXO 2. Procedencia de muestras complejo Nacional Zamora Chinchipe.....	40
ANEXO 3. Procedencia de muestras CCN 51 de diferentes provincias.	41
ANEXO 4. Zonas biofísicas identificadas en Zamora Chinchipe.	42
ANEXO 5. Características de zonas biofísicas identificadas.	43
ANEXO 6. Mapa geográfico de Zamora Chinchipe.	44
ANEXO 7. Muestras de cacao zona biofísica 4- norte.....	45
ANEXO 8. Muestras de cacao zona biofísica 5- norte.....	46
ANEXO 9. Muestras de cacao zona biofísica 6- norte.....	47

RESUMEN

En el Ecuador existen variedades de cacao (*Theobroma cacao*) de diferentes calidades, siendo el cacao "Nacional" el de superiores características comparado por ejemplo con el CCN51. Sin embargo, este presenta una mayor productividad, resistencia a plagas y buenas características organolépticas, por lo que, se suele mezclar con el cacao del complejo Nacional para su comercialización, por esta razón es necesario diferenciar entre las distintas variedades. Actualmente en el país, esta diferenciación se realiza visualmente, lo que lo vuelve subjetivo y tedioso. Para lo cual en la presente investigación se propuso la diferenciación de granos de cacao ecuatoriano mediante espectroscopía Raman y Quimiometría. Para lo cual se utilizó granos de cacao del denominado complejo Nacional, constituido por variedades (Nacional, Amazónico, Súper Árbol, ICS 95) de la provincia de Zamora Chinchipe y granos de la variedad CCN51 de distintas provincias. A estos granos enteros se aplicó la espectroscopía Raman y se analizaron los espectros con Quimiometría, para lo cual se utilizaron los modelos de análisis multivariado PCA y OPLS-DA con los espectros normalizados y suavizados en el programa SIMCA. Los resultados de los espectros Raman indican la diferencia que existe entre los espectros promedios de las muestras de cacao del complejo Nacional y CCN51 así como también se muestran los componentes principales que se encuentran en la corteza de las almendras de cacao principalmente lignina, celulosa y pectina; en el análisis quimiométrico con el modelo OPLS-DA se exhiben diferencias entre las distintas variedades analizadas y muestran que existe un buen agrupamiento condicionado por la variedad; y esto demuestra estadísticamente que la espectroscopía Raman permite diferenciar las variedades en las almendras de cacao.

Palabras Clave: Cacao Nacional, CCN51, Espectroscopia Raman, PCA, OPLS-DA.

ABSTRACT

In Ecuador there are cocoa varieties (*Theobroma cacao*) of different qualities, the “National” cocoa being the one of superior characteristics compared for example with CCN51. However, this presents a higher productivity, resistance to pests and good organoleptic characteristics, so it is usually mixed with cocoa from the National complex for marketing, for this reason it is necessary to differentiate between the different varieties. Currently in the country, this differentiation is done visually, which makes it subjective and tedious. For which in the present investigation the differentiation of Ecuadorian cocoa beans by Raman spectroscopy and Chemometry was proposed. To this end, cocoa beans from the so-called National complex were used, consisting of varieties (National, Amazon, Super Tree, ICS 95) from the province of Zamora Chinchipe and CCN51 varieties from different provinces. Raman spectroscopy was applied to these whole grains and the spectra were analyzed with Chemometrics, for which the PCA and OPLS-DA multivariate analysis models were used with the normalized and smoothed spectra in the SIMCA program. The results of the Raman spectra indicate the difference between the average spectra of the cocoa samples of the National complex and CCN51 as well as the main components found in the crust of cocoa almonds, mainly lignin, cellulose and pectin. ; in the chemometric analysis with the OPLS-DA model, differences between the different varieties analyzed are shown and show that there is a good grouping conditioned by the variety; and this shows statistically that Raman spectroscopy allows differentiating varieties in cocoa almonds.

Keywords: National Cocoa, Raman Spectroscopy, PCA, OPLS-DA, CCN51.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao según expertos es originario de Sudamérica, se domesticó hace 3000 o 4000 años en regiones de la amazonia y el Orinoco por Aztecas, Toltecas y Mayas que fueron las primeras culturas que dieron importancia y uso al fruto (Ramos, 2009). El cacao llamado científicamente *Theobroma* que en griego se traduce como “comida de los dioses” es perteneciente a la familia de las esterculiáceas siendo una planta de tamaño mediano denominado así un árbol tropical que crece desenvueltamente en climas cálidos y húmedos, tiene flores que nacen en el tallo y frutos grandes que pueden ser rojos, anaranjados o amarillos (Leon Villamar, Calderon Salazar, & Mayorga Quinteros, 2018).

Theobroma cacao L se produce mayormente en África, América, Asia y Oceanía respectivamente; por otra parte Ecuador cuenta con alrededor del 62% de la producción global de cacao fino de aroma denominado “Arriba” proveniente principalmente del genotipo Nacional destacándose así como el primer exportador mundial de este tipo de producto (Castro de Doens, Gómez-García, & Vignati, 2018). Según la Vicepresidencia del Ecuador, (2014) en un diagnóstico de la cadena productiva del cacao en el Ecuador menciona que la mayor producción del cacao está localizada en las provincias del litoral (Los Ríos, Guayas, Manabí, Esmeraldas y El Oro), Nororiente del Ecuador (Sucumbíos, Orellana y Napo) y en las estribaciones de la Cordillera de los Andes; por otro lado, también es importante mencionar que la zona sur oriental especialmente la provincia de Zamora Chinchipe, ha ingresado de a poco en el mapa productor del cacao Nacional fino o de aroma.

El cultivo del cacao por sus requerimientos edafoclimáticos se encuentra vinculado con países que están ubicados en la franja ecuatorial, favoreciendo el desarrollo de la industria del cacao que está ligada a una actividad socioeconómica importante (Muñoz-Flores, 2015), de esta manera el cacao ha generado muchas fuentes de empleo que involucran a familias productoras del mismo siendo en su mayoría pequeños productores que han hecho de este producto su principal fuente de ingresos (Srinivasnaik & Suganthy, 2017). En la actualidad la cadena de valor del cacao en el país tiene una gran importancia económica y social ya que existe una área cultivada de 560 387 ha, con alrededor de 150 000 familias de productores (Castro de Doens et al., 2018). También es significativo mencionar que la mayor importancia del cacao se encuentra en las almendras ya que de cada mazorca se pueden extraer de 30 a 40 semillas y estas ser ampliamente utilizadas en las industrias alimentarias, farmacéuticas y cosmética (Muñoz-Flores, 2015).

Según el INEC en la encuesta nacional realizada en marzo del 2016 sobre empleo, desempleo y subempleo determinó que el 5 % de la población

económicamente activa (PEA) nacional se encuentra en el sector cacaoero y el 15 % de la PEA rural (Grail, 2018). Por otro lado, también es significativo mencionar que el cacao ocupa el tercer lugar entre los productos más comercializados en el mundo (Díaz-montenegro, Varela, & María, 2018). Según Trade Map - Estadísticas de comercio internacional en 2018, se exportaron 4 046 621 toneladas de cacao, lo que corresponde a \$ 9 657 354 (Statistics TM-IT, 2018).

Se conocen principalmente cuatro diferentes tipos de árboles de cacao como son: Forastero, Criollo, Trinitario y Nacional. Los Criollos son el primer grupo de cacao domesticado en el mundo que fue en sus inicios cultivado en América Central por los Mayas, los Forasteros se encuentran delimitados a lo largo de la región amazónica y son resistentes a las plagas y tienen una mayor tasa de producción, los Trinitarios son hibridaciones naturales entre el criollo y el forastero, el Nacional es un grupo primitivo que ha sido cultivado en la región Pacífico- Costera de Ecuador desconociendo su origen exacto se lo ha considerado como originario de este país (Romero, Bonilla EG Santos E L Peralta, & Galindo, 2010).

De esta clasificación, surgen dos categorías siendo así: granos de cacao finos y de sabor, y granos de cacao a granel. Los a granel son producidos por los árboles de Forastero que son reconocidos por su productividad ya que representan alrededor del 95 % de la producción mundial en este grupo, está considerado el genotipo Colección Castro Naranjal (CCN51) que se utiliza en su mayoría para la producción de chocolate; mientras que los granos de cacao fino y de aroma provienen de Criollo y Trinitario representando solo el 5% de la producción total del mundo destinado de esta manera a la fabricación de chocolates de alta calidad, sin embargo, se conoce que los árboles nacionales son un forastero autóctono del bosque húmedo Ecuatoriano y que también producen este tipo de granos de cacao y se encuentran en Ecuador. Es importante mencionar que el cacao fino y de sabor se lo conoce especialmente por sus cualidades de aroma y sabor, lo que le otorga un precio diferente al del cacao a granel u ordinario (Leon Villamar et al., 2018).

Los granos de cacao también podrían diferenciarse de alguna manera en 10 grupos dependiendo de sus características genéticas, que son: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purus, Nacional y Guayana (Motamayor et al., 2008; Thomas et al., 2012). Otra de las formas en que las personas clasifican el cacao, es por sus características físicas que son únicas para cada variedad, dependerá de cada país o región, en América del Sur se encontrará el Criollo de Colombia, el Pajarito, el Criollo de Venezuela, los Trinitarios, Porcelana, Forastero de Barlovento, Nacional, Camacita, Trinitario-Ecuador, Marañón, Común, Catongo y Calabacillo; en México y Centroamérica los cacao encontrados son criollo de México, lagarto, ceilan, cacao real, cacao de tipo criollo y matina (Enriquez, 1985).

El cacao Nacional también es conocido como "Arriba cacao", y cinco clases se diferencian según su calidad, "Arriba Superior Plantation Selecto Summer" (ASSPS), "Arriba Superior Summer Selecto" (ASSS), "Arriba Superior Selecto" (ASS), "Arriba Superior Navidad" (ASN), y "Arriba Superior Época" (ASE), esta clasificación ha sido definida por ICCO, y también afectará su precio (ICCO, 2015; Quingaisa & Riveros, 2007).

Los entes de control como AGROCALIDAD y comercializadores realizan distintas actividades de control sobre los granos de *Theobroma cacao* de exportación con la finalidad de buscar diferenciar entre el CCN51 y el cacao del complejo Nacional con sus distintas variedades ya que existe una mayor incertidumbre en el caso de comercialización y manejo del mismo así como en el uso de métodos y límites de aplicación dado que el método de evaluación suele ser visual lo que puede ocasionar subjetividad en los resultados. (AGROCALIDAD, 2017)

Con respecto a los métodos desarrollados para diferenciar entre variedades de cacao es importante reconocer a la espectroscopia Raman que es una rama de la espectroscopia de vibraciones siendo este un método novedoso de análisis e inspección de alimentos que es altamente preciso, rápido y no invasivo. Este método proporciona una gran cantidad de información como herramienta analítica vibracional molecular debido a la alta complejidad inherente a sus señales (Jin, Lu, Chen, Ding, & Gao, 2016). También proporciona una huella digital única de una molécula que es sensible tanto a su estructura molecular como a su composición y, por lo tanto, permite la identificación de diferentes polimorfos y fases del mismo compuesto en diferentes entornos (Nieuwoudt, Holroyd, McGoverin, Simpson, & Williams, 2016)

El principio básico de la espectroscopía Raman, se fundamenta en el efecto producido por una colisión inelástica entre el fotón incidente y la molécula de la muestra, que cambia la energía vibratoria o rotacional de la molécula, y la radiación dispersa se desplaza a una longitud de onda diferente, y este cambio se llama efecto Raman (Jin, Lu, Chen, Ding, & Gao, 2016).

Por otro lado, las medidas derivadas de la espectroscopia Raman generalmente se realiza en un punto seleccionado de la superficie de la muestra esto es por el tamaño del punto láser debido a que este método generalmente no puede cubrir un área grande, por lo que, se puede obtener información superficial puntual lo que es de gran importancia para la inspección de la calidad e inocuidad de los alimentos (Qin, Kim, Chao, & Cho, 2017).

En la espectroscopia Raman se examina la dispersión inelástica de la luz por lo que se puede analizar muestras tanto en estado sólido como en estado

líquido. Además, con esta técnica las muestras no requieren un proceso de preparación lo que evita la destrucción de la muestra en estudio (Samaniego, 2015).

El espectro Raman se lo puede manejar como una huella digital para efectuar análisis cuantitativos y cualitativos; donde el análisis cuantitativo se basa adicionalmente a la posición, en las medidas de la intensidad de las bandas que forman el espectro Raman. En cambio, el análisis cualitativo está basado en la comparación entre un espectro obtenido experimentalmente y otros espectros que son parte de una base de datos de referencia (Gallego, 2009).

Dos ventajas particulares y bien definidas de Espectroscopia Raman sobre la espectroscopía infrarroja son las señales de agua muy bajas y bandas generalmente discretas, que mejoran la sensibilidad para el análisis de soluciones acuosas, por ejemplo, fluidos biológicos y leche en comparación con las técnicas infrarrojas donde hay una interferencia de señales de agua. Por otro lado, la espectroscopia Raman en la industria alimentaria es muy útil ya que ayuda a la determinación de macro componentes como proteínas, carbohidratos y lípidos (Nieuwoudt et al., 2016).

La Quimiometría es un método que trata específicamente de todos los procesos que transforman las señales analíticas de datos complejos en información, esta se sitúa en un campo interdisciplinar y ha contribuido a hacer evidentes distintas tendencias de la química analítica actual como son la rapidez, abaratamiento de costos, miniaturización (Boqué & Ferré, n.d.). Es la solución y comprensión de problemas químicos mediante la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos donde se establece una sencilla relación numérica entre un conjunto de datos experimentales de origen químico donde se puede extraer información de forma eficiente (Olivieri & Rivas, 2011).

Uno de los campos fundamentales de la Quimiometría es la aplicación y desarrollo de nuevos métodos de calibración multivariable, los que permiten extraer la máxima información química del análisis de cierta muestra a partir de respuestas, así como de señales instrumentales con muy poca selectividad (Porcel, 2001).

De la misma manera otras áreas de aplicación de la Quimiometría vienen a ser la validación y pruebas de significación, procedimientos experimentales y la optimización de las mediciones químicas, extracción del máximo de información química a partir de distintos datos analíticos; con ayuda de esto se puede afrontar con mayor éxito las dificultades que surgen al emplear técnicas espectroscópicas o cromatográficas para el control de calidad de los distintos alimentos (Lucio, 2012).

En las disciplinas de control de calidad y monitoreo de procesos el uso de PCA (Análisis de componentes de principales) es un método de primer orden

para poder mostrar diferencias químicas entre las distintas mediciones espectrales de alta dimensión que en la química es muy frecuente (Worley & Powers, 2016).

Tanto el Análisis de Componente Principales (PCA) y las Proyecciones Ortogonales para el Análisis Discriminante de Estructuras Latentes (OPLS-DA) son grandes herramientas de modelado estadístico que generan información acerca de las separaciones entre distintos grupos experimentales basados en las mediciones espectrales de alta dimensión; estos modelos estadísticos deben ser usados con validación para así llegar a conclusiones confiables. OPLS-DA es usado a menudo como un método alternativo cuando PCA no muestra una separación adecuada entre grupos (Worley & Powers, 2016).

Por consiguiente, la visión práctica y experimental de estudiar la diferenciación de granos de cacao a través del uso de herramientas que conduzcan a la observación y exploración absoluta de la misma, se conduce hacia el uso de OPLS – DA (enfoque de modelo supervisado) en el que se les aplicará de manera minuciosa a las muestras con el fin de establecer diferencias en términos de calidad del grano de cacao, así como también excluir durante el proceso las tipologías presentadas desde la varianza en el manejo previo del pequeño productor a partir de su empirismo y la incertidumbre en la calidad de los mismos.

De la misma forma es necesario mostrar lo planteado por (Lennart, 2017) donde se explica que el OPLS-DA es una herramienta muy útil para encontrar diferencias entre dos grupos donde se indican cuáles son las fuerzas impulsoras entre las variables. OPLS-DA tiene una gran capacidad para separar la variación predictiva de la variación no predictiva ya que es un método muy adecuado para la clasificación de datos que cuentan con variables multicolineales y ruidosas lo que es muy frecuente cuando los datos son biológicos (Rantalainen, Cloarec, Nicholson, Holmes, & Trygg, 2006).

De modo que tanto el OPLS – DA, la Quimiometría y la espectroscopia Raman son grandes herramientas, técnicas y métodos que a la luz de la investigación son complementarios el uno con el otro en procesos interdisciplinarios ante la posibilidad de estudiar, explorar y analizar las muestras de cacao y con esto mostrar un resultado con un alto nivel de certeza a los objetivos planteados.

El objetivo general del presente trabajo de titulación fue diferenciar los granos de cacao (*Theobroma cacao*) ecuatoriano mediante espectroscopía Raman y Quimiometría.

Como objetivos específicos se plantearon los siguientes:

- Generar los espectros de diferentes variedades de cacao.

- Interpretar los espectros vibracionales de granos de cacao.
- Generar un método rápido para la evaluación de la autenticidad de los granos de cacao mediante espectroscopía Raman.

2. METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA.

La diferenciación se realizó con muestras de almendras de cacao del complejo Nacional recolectadas en la provincia de Zamora Chinchipe y muestras de almendras de cacao CCN51 recolectadas en las provincias de Esmeraldas, Guayas, El Oro, Bolívar y Manabí.

El estudio espectroscópico vibracional se desarrolló en los laboratorios de la Universidad UTE y con el apoyo de Rigaku para la medida de los espectros Raman de las almendras de cacao.

2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras fueron entregadas por el Programa de Café y Cacao del Ministerio de Agricultura (MAG), se recolectaron y prepararon en 5 diferentes etapas las que se describen en el Anexo 1.

Estas muestras cuentan con diferentes códigos para su medición espectroscópica la que se detalla en el Anexo 2 para las muestras del complejo Nacional (11 muestras) de Zamora Chinchipe y en el Anexo 3 para las muestras CCN 51 (5 muestras) de diferente provincia.

2.2. MEDICIÓN DE ESPECTROS RAMAN

Los espectros Raman de las almendras de cacao del complejo Nacional y CCN 51 fueron determinados con un espectrofotómetro Raman portátil FirstGuard™ (Rigaku Raman Technologies, Wilmington, MA, EE. UU), equipado con un láser de Nd:YAG de 1064 nm. La radiación Raman dispersada fue detectada con un detector de InGaAs y arreglo de fotodiodos. El tiempo de exposición para cada espectro Raman fue de 15 s y la potencia del láser fue colocada a 250 mW. Cada almendra de cacao fue medida en 4 puntos diferentes, un total de 25 almendras de cacao se utilizó para cada muestra y el promedio de las mediciones fue utilizado para poder graficar el espectro de la muestra.

2.3. PROCESAMIENTO ESPECTROSCÓPICO DE LA INFORMACIÓN

La información espectroscópica fue pre-procesada utilizando el software Umsramble y Origin. En los datos se realizó la corrección de la línea base, el suavizado y normalización. Posteriormente, los espectros promedios de cada

muestra de almendras de cacao fueron evaluados para luego ser normalizados con sus mínimos y máximos.

Con la información de los espectros promedio de las 11 muestras de almendras de cacao de Zamora Chinchipe y 5 muestras de CCN51 de diferentes provincias se procedió a graficar en Origin el espectro de cada una de las muestras y a compararlos por genotipos, biozonas y provincias.

A los espectros Raman de las almendras de cacao, se aplicó un análisis multivariado utilizando el programa SIMCA, con los modelos PCA y OPLS-DA, para lo cual se utilizó el promedio de los espectros normalizados y suavizados.

La evaluación multivariada inicial consistió en una evaluación de componentes principales (PCA); considerando que se necesita un método discriminatorio entre las distintas variedades de cacao se utilizó también un segundo método llamado OPLS-DA (Proyecciones Ortogonales para el Análisis Discriminante de Estructuras Latentes) donde se tomó en cuenta las variables de los espectros Raman así como también algunas variables cualitativas de las almendras de cacao.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ESPECTRO RAMAN DE GRANOS DE CACAO

Los espectros Raman de las muestras de cacao Nacional de la provincia de Zamora y uno tomado como referencia de cacao CCN51 (Provincia El Oro) se muestran en la Figura 1. En tales espectros se pueden observar las distintas señales provenientes de los componentes principales de las almendras de cacao, esto es lignina, celulosa y pectina principalmente.

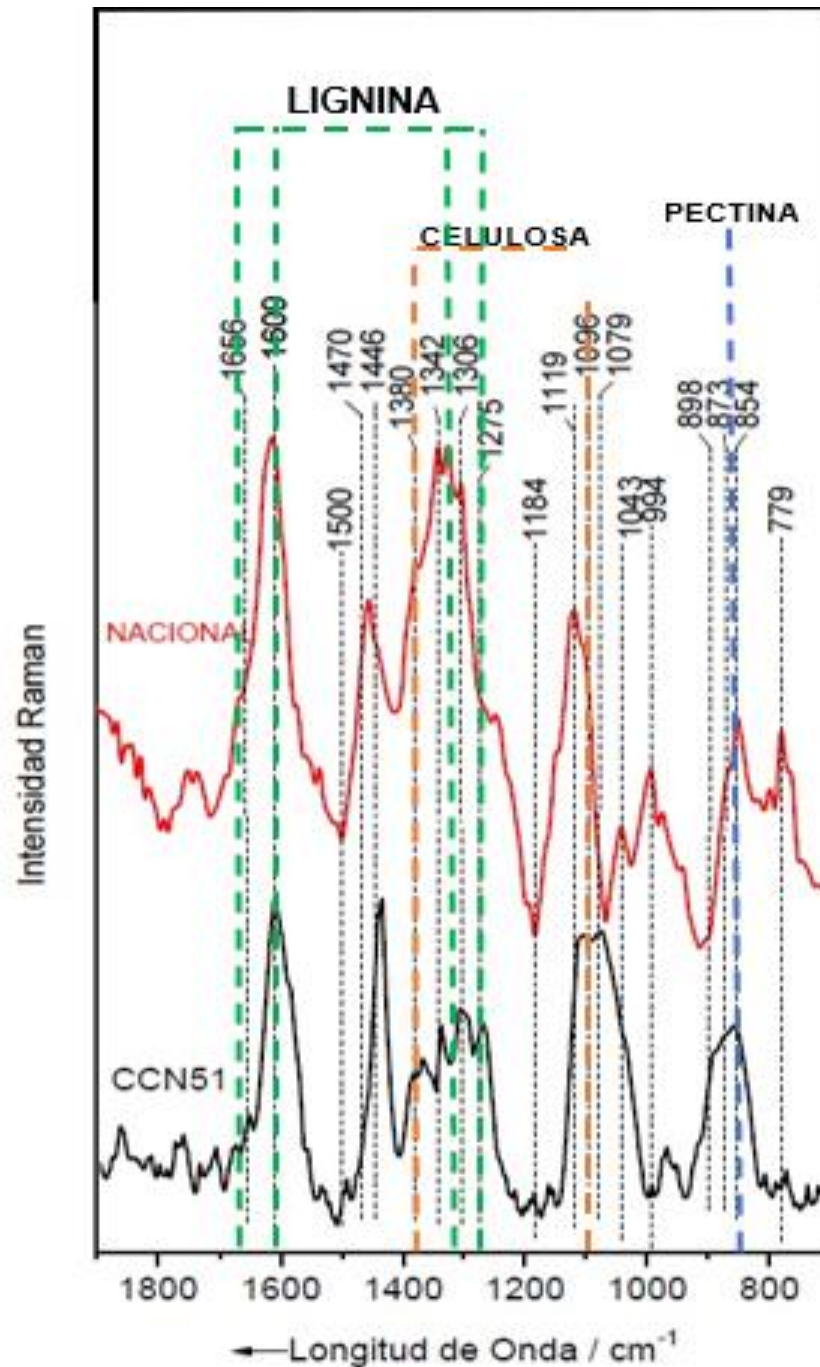


Figura 1. Espectro Raman de cacao Nacional (Zamora Chinchipe) y CCN51 (El Oro)

3.2. ASIGNACIONES DEL ESPECTRO RAMAN DE GRANOS DE CACAO

En la Tabla 1 de asignaciones y frecuencias se pueden observar las bandas más representativas de los espectros Raman de los granos de cacao.

Tabla 1. Asignaciones y frecuencias del espectro Raman de granos de cacao

Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignaciones
1664	Lignina (C=C)
1609	Lignina
1444	Lípidos
1380	Celulosa (CH)
1329	Lignina
1270-1275	Lignina
1119	Celulosa (C-O-C)
1096	Celulosa (C-O-C)
898	Celulosa (banda más débil)
862-850	Pectina

Las almendras de cacao al tratarse de un material vegetal y considerando que las medidas fueron realizadas sobre la corteza de la almendra, se esperaría que los espectros Raman obtenidos correspondan a la suma de los espectros individuales de los componentes presentes en la superficie. En estos materiales se deberían encontrar principalmente, celulosa, lignina, pectinas y por lo tanto, los espectros reflejarán estos componentes y de las demás sustancias presentes en la corteza de la almendra.

Los espectros Raman de los compuestos esperados se describe en la literatura, lignina (Himmelsbach & Akin, 1998; Sun, Simmons, & Singh, 2011), celulosa (Schrader, Klump, Schenzel, & Schulz, 1999), pectinas (Synytsya, Mate, & Machovic, 2003) y esta información se utilizará para la asignación de los espectros de las almendras de cacao (Vargas et al., 2016) .

Las bandas más fuertes y representativas para la celulosa se encuentran en 1096 cm⁻¹, 1119 cm⁻¹ y 1380 cm⁻¹; las dos primeras bandas se atribuyen a C-O modos de estiramiento de COH / C-O-C, mientras que la tercera banda se debe a deformaciones de CH.

Otra banda más débil de celulosa se encuentra en 898 cm⁻¹ (modo de estiramiento de semicírculo de anillo), esto se puede observar en los espectros Raman promedio de granos de cacao de ambas variedades Nacional y CCN51.

Las bandas más fuertes de la pectina aparecen en el rango de 850-862 cm⁻¹ dependiendo en gran manera de las características estructurales de las mismas.

Para la lignina los espectros Raman promedio de los granos de cacao de las bandas de las variedades Nacional y CCN51 se encuentran en aproximadamente 1664 cm^{-1} y 1609 cm^{-1} estas bandas tienen diferentes cambios cuando se comparan los espectros Raman de diferentes muestras entre sí. La primera banda se puede asignar a los modos de estiramiento $C = C$ ó $C = O$, mientras que la segunda banda se asigna a un modo de estiramiento de cuadrante de anillo.

Otra de las bandas para la lignina se observa como un hombro en 1630 cm^{-1} lo que puede asignarse a un modo de estiramiento $C=C$. Dentro de la estructura de la lignina se encuentran muchos grupos éter por lo cual las bandas cercanas a 1272 cm^{-1} y 1036 cm^{-1} pueden asignarse a los modos de estiramiento $Ar-O$ y $C-O$, respectivamente.

3.3. ESPECTROS RAMAN DE VARIEDADES DE GRANOS DE CACAO.

En la Figura 2 además de la identificación de las bandas principales de la corteza de las almendras de cacao, se pueden observar diferencias entre los espectros promedios de las muestras de granos de cacao del complejo nacional de Zamora Chinchipe y la de referencia de CCN51. Asimismo, se observan diferencias, aunque menores, entre los espectros individuales de las muestras de granos de cacao de Zamora (ICS95, NAC, SUP, AMA).

Las diferencias visuales más significativas se encuentran en el rango de $900-1200\text{ cm}^{-1}$ donde aparecen las bandas de la celulosa, otra variabilidad también se muestra en el rango de la lignina que se localiza entre $1609-1664\text{ cm}^{-1}$; de igual manera la pectina muestra su variación en el rango de $850-862\text{ cm}^{-1}$. Estas diferencias perceptibles a simple vista pueden atribuirse a las diferentes variedades de cacao ya que la más distinta entre estos espectros es la de referencia (CCN51), también se debe a la ubicación geográfica y a las condiciones bajo las cuales son cultivados los árboles de cacao.

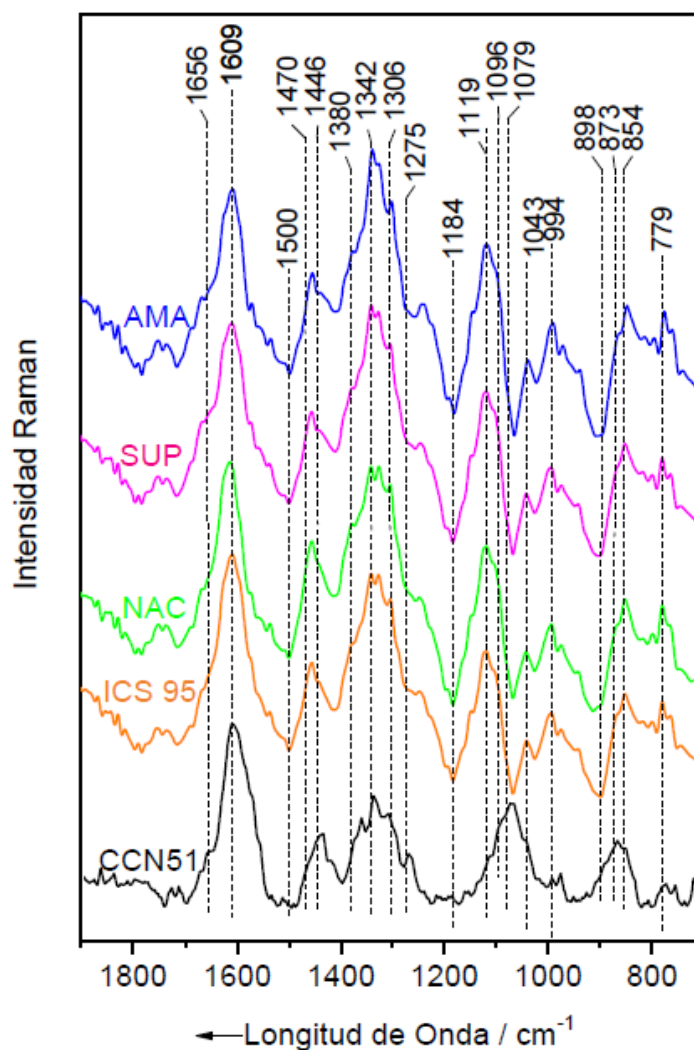


Figura 2. Espectros Raman de granos de cacao de distintas variedades

En la Figura 3 se puede observar la comparación del conjunto de espectros de las almendras de cacao del genotipo CCN51 con las distintas variedades del genotipo del Complejo Nacional.

La diferencia que existen entre los espectros del genotipo CCN51 y complejo Nacional se debe a su variabilidad en la composición (celulosa, pectina, lignina), así como también el tipo de suelo en el que son cultivados los granos de cacao y su ubicación geográfica. Cabe recalcar que para realizar estos gráficos las muestras del Complejo Nacional fueron de la provincia de Zamora Chinchipe, pero tenían diferentes biozonas (4,5,6) y las muestras del genotipo CCN51 son de diferentes provincias, lo que podría aportar a la variabilidad entre estos granos de cacao.

En la parte A se comparan los espectros Raman de las almendras de cacao CCN51 con los de la variedad Amazónico, donde se puede notar que existe una gran variabilidad, una de las razones como ya se explicó anteriormente es porque el CCN51 sus muestras son de diferentes provincias; también hay

que tomar en cuenta que en el Amazónico solo cuenta con dos biozonas (4 y 6) dentro de la provincia de Zamora Chinchipe. En este espectro se puede observar que la mayor variabilidad existe en las regiones que pertenecen a la lignina y se encuentra en el rango de 1329 cm^{-1} y 1609 cm^{-1} . Por lo tanto, los distintos factores como son la ubicación geográfica si interfieren en el espectro.

En la parte B se observa una comparación del CCN51 con ICS 95 donde se observa variabilidad baja en la zona de la celulosa en el rango de 898 cm^{-1} de la misma manera otra variabilidad alta y representativa que se puede observar claramente es en la región de $1300\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$ que son pertenecientes a la lignina; asimismo en la lignina existe otra variabilidad alta en la zona de 1609 cm^{-1} . Existe también una variabilidad baja en la zona $1052\text{ -}1084\text{ cm}^{-1}$ que se le puede atribuir a las bandas bajas de la celulosa.

En la parte C de la Figura 3 se muestra la comparación entre espectros de la variedad CCN 51 y espectros de la variedad Nacional es muy similar a la anterior comparación y se puede notar claramente que tiene una variabilidad baja en la zona perteneciente a la celulosa 898 cm^{-1} (banda más débil), también se observa unos picos muy altos que representan la variabilidad alta en la zona de la lignina en su mayoría ($1329, 1609\text{ cm}^{-1}$).

En la parte D de la misma Figura 3 se observa la comparación entre la variedad CCN51 y la variedad Súper Árbol donde se muestra una variabilidad alta en la zona perteneciente a la lignina ($1329, 1609\text{ cm}^{-1}$) que son las más representativas por lo que se puede atribuir que la cantidad de lignina en estas variedades es alta, de igual manera, pero en menor proporción la zona de la celulosa (1119 cm^{-1}) también muestra su variabilidad. También existen variabilidades bajas en menor proporción que son pertenecientes a las zonas de celulosa (898 cm^{-1}) de los espectros de las almendras de cacao.

Cabe recalcar que dentro de la Figura 3 el gráfico B, C y D se muestran similares notándose diferencias mínimas siendo igualmente el CCN51 de diferentes provincias y las subvariedades del Complejo Nacional (ICS 95, Nacional, Súper Árbol) de una única provincia.

Finalmente se observa claramente que cada comparación es distinta a otra, esto se debe porque el genotipo CCN51 las muestras fueron recolectadas de distintas provincias como son el Guayas, El Oro, Cotopaxi, Bolívar, Manabí; en cambio las muestras del genotipo Nacional solo fueron recolectadas en la provincia de Zamora Chinchipe.

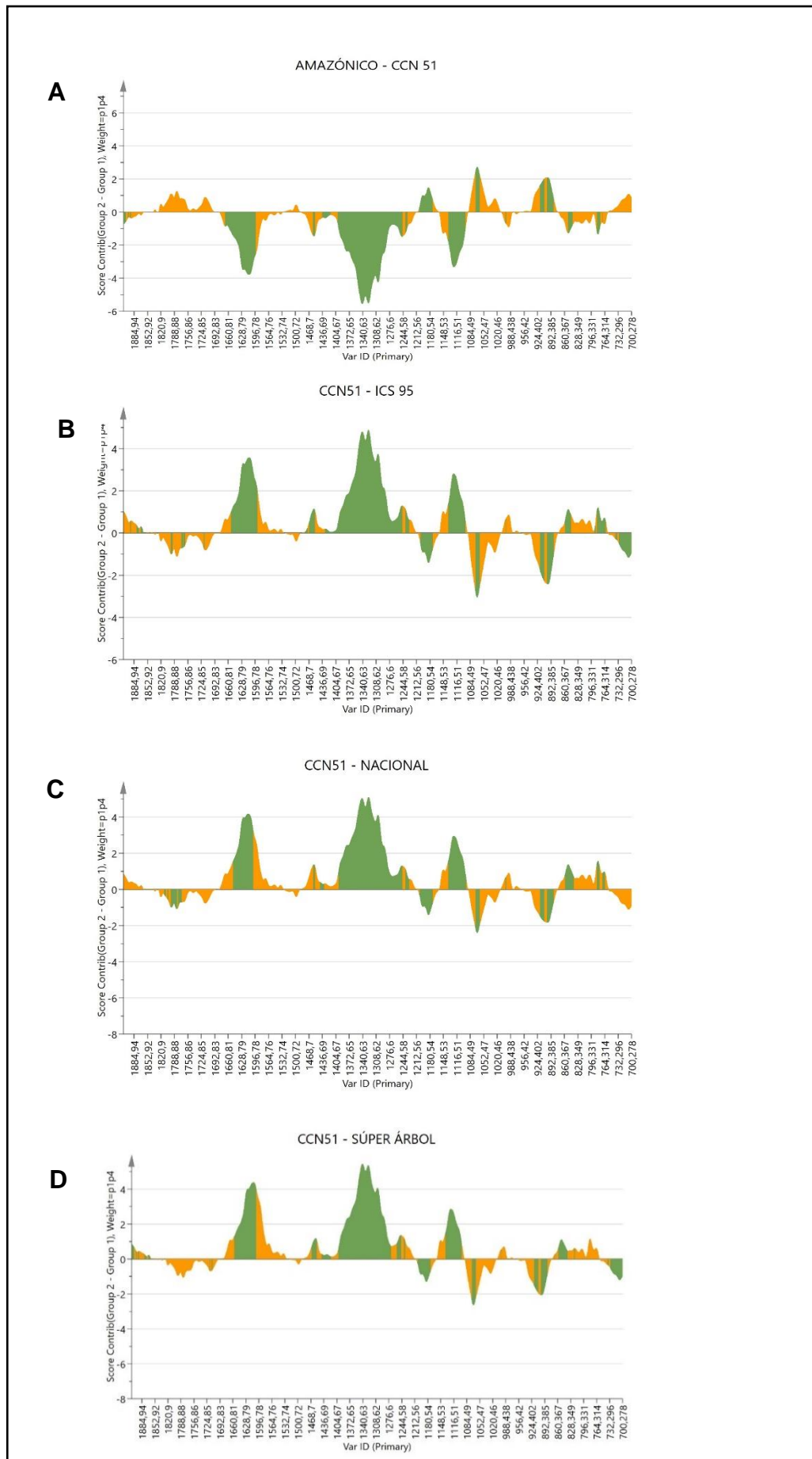


Figura 3. Comparación de almendras de cacao CCN 51 con genotipo Nacional

En la Figura 4 se puede observar un gráfico donde se muestra la comparación entre los espectros Raman de las distintas variedades del c Nacional que son pertenecientes a la provincia de Zamora Chinchipe.

A pesar de ser de la misma provincia las muestras han sido de diferentes biozonas lo que les hace distintas una de otra en menor magnitud. Estas muestras son diferentes por la ubicación geográfica, altitud, factores climáticos, tipo de suelo donde se encuentran localizadas las comunidades de cada biozona lo que influye en los distintos espectros de las almendras de cacao y se muestra la variabilidad de los mismos.

En la Figura 4 en la parte A se muestra la comparación de la variedad Nacional con el Amazónico que son pertenecientes a la misma provincia y al tipo Complejo Nacional; por lo que, se puede observar que la variabilidad en esta comparación es baja y principalmente focalizada en la zona de la lignina (1609 cm^{-1}), asimismo en el rango de $800\text{-}828\text{ cm}^{-1}$ que se puede atribuir a la zona de la pectina, por lo que se podría decir que también existe una variabilidad en este compuesto en los dos tipos de almendras de cacao.

En la parte B de la misma figura se observa la comparación entre la variedad Nacional y Súper Árbol donde se muestra que son algo distintas a las demás comparaciones, ya que se observa una variabilidad baja en la zona perteneciente a la pectina ($850\text{-}862\text{ cm}^{-1}$) de la misma manera otra de las diferencias bajas es en la zona de la celulosa en el rango de $990\text{-}1010\text{ cm}^{-1}$; las bandas altas representadas son de la lignina del rango de 1664 cm^{-1} .

En la parte D de la Figura 4 se indica la comparación que existe entre la variedad Nacional y la variedad ICS 95 de la provincia de Zamora Chinchipe se puede observar claramente que cuenta con una variabilidad baja en todo el espectro. Estos cambios en el espectro se observan principalmente en la zona espectral de la celulosa (898 cm^{-1}) seguido de la zona de la lignina ($1609\text{-}1664\text{ cm}^{-1}$) donde igualmente se muestra una variabilidad baja dentro del espectro; otro de los cambios bajos se muestra en el rango de 1380 cm^{-1} que es perteneciente a la zona espectral de la celulosa mostrándose deformaciones de CH (modos de flexión). De la misma manera la zona de la pectina también cuenta con una variabilidad baja ($850\text{-}862\text{ cm}^{-1}$).

Hay que tener en cuenta que para realizar estos espectros de las distintas variedades de cacao se tomó todos los espectros de cada genotipo y se comparó como grupo teniendo en cuenta que dentro de cada genotipo existen 3 biozonas en su mayoría, a pesar de ser de la misma provincia (Zamora Chinchipe) se podría atribuir parte de las variaciones a esta situación.

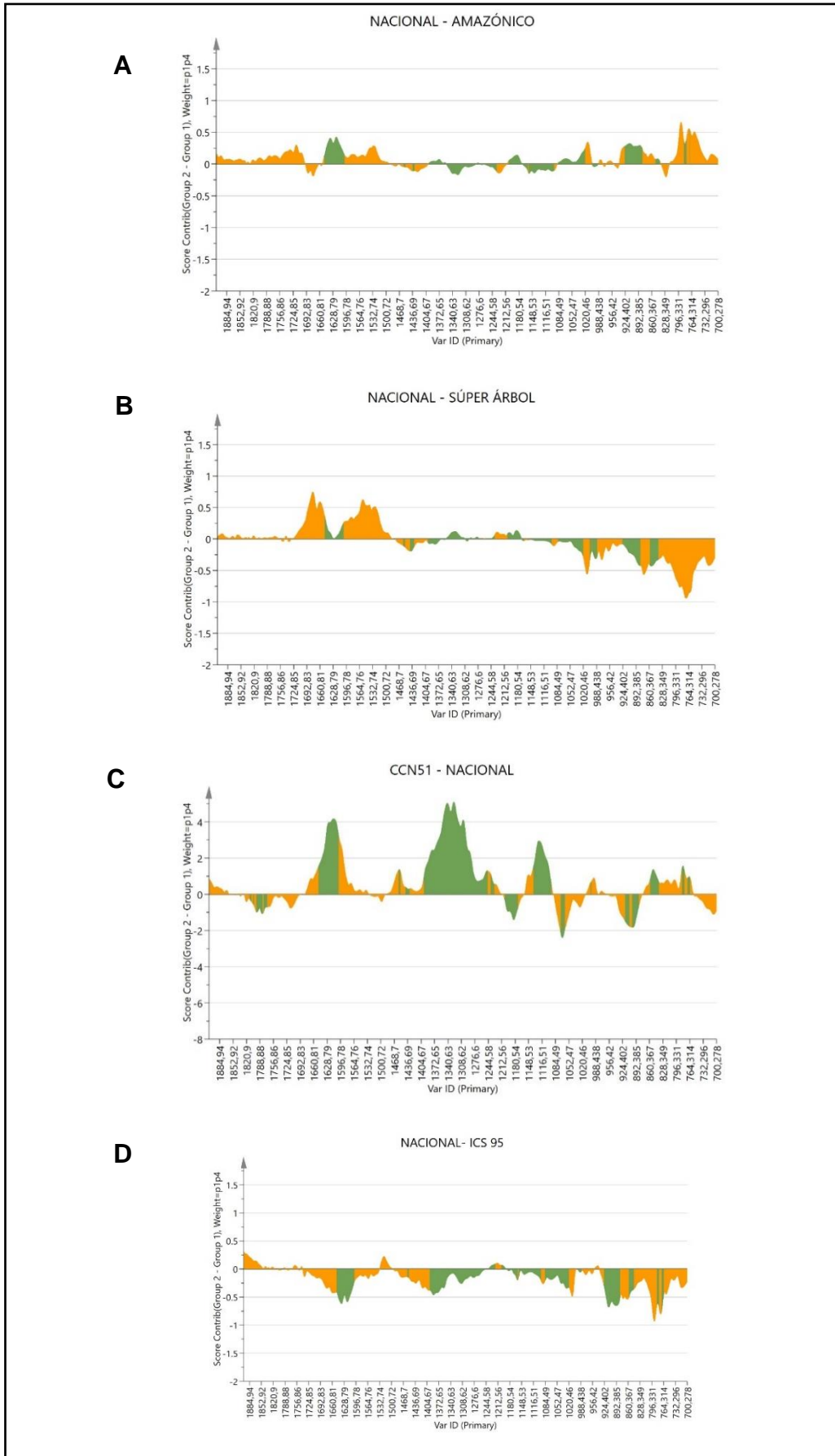


Figura 4. Comparación de almendras de cacao Nacional con las distintas variedades

En la Figura 5 se muestra una comparación de la variedad ICS 95 con la variedad Amazónico y Súper Árbol donde se observa una elevada variabilidad en los espectros Raman de estos tipos de cacao.

El gráfico A de la Figura 5 donde se muestra la comparación entre el ICS 95 y el Amazónico se muestra claramente que su variabilidad es medianamente alta como se puede observar en la zonas de la lignina que se encuentran ubicadas en 1664 cm^{-1} , 1329 cm^{-1} , 1275 cm^{-1} ; de la misma manera otra de las diferencias que se pueden observar es en las zonas de la celulosa que se muestran cercanas a 898 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} . Diferencias menores en los espectros se puede observar en el rango de 1530 cm^{-1} , que se le puede atribuir a las bandas a bajos números de onda de la celulosa.

El gráfico B de la Figura 5 se muestra la comparación entre los espectros ICS 95 y Súper Árbol, correspondientes a la misma provincia y donde se notan diferencias considerables principalmente en la zona de la lignina 1609 cm^{-1} , 1664 cm^{-1} y 1329 cm^{-1} , así como en la zona que pertenece a la pectina y que se observa en el rango 862 cm^{-1} . A pesar de ser de la misma provincia se muestran estas diferencias en los espectros en donde a más de las razones específicas de las superficies de las almendras también hay que considerar que se comparan espectros de almendras de 2 variedades que provienen de 3 biozonas diferentes, lo que también aporta a la variabilidad total.

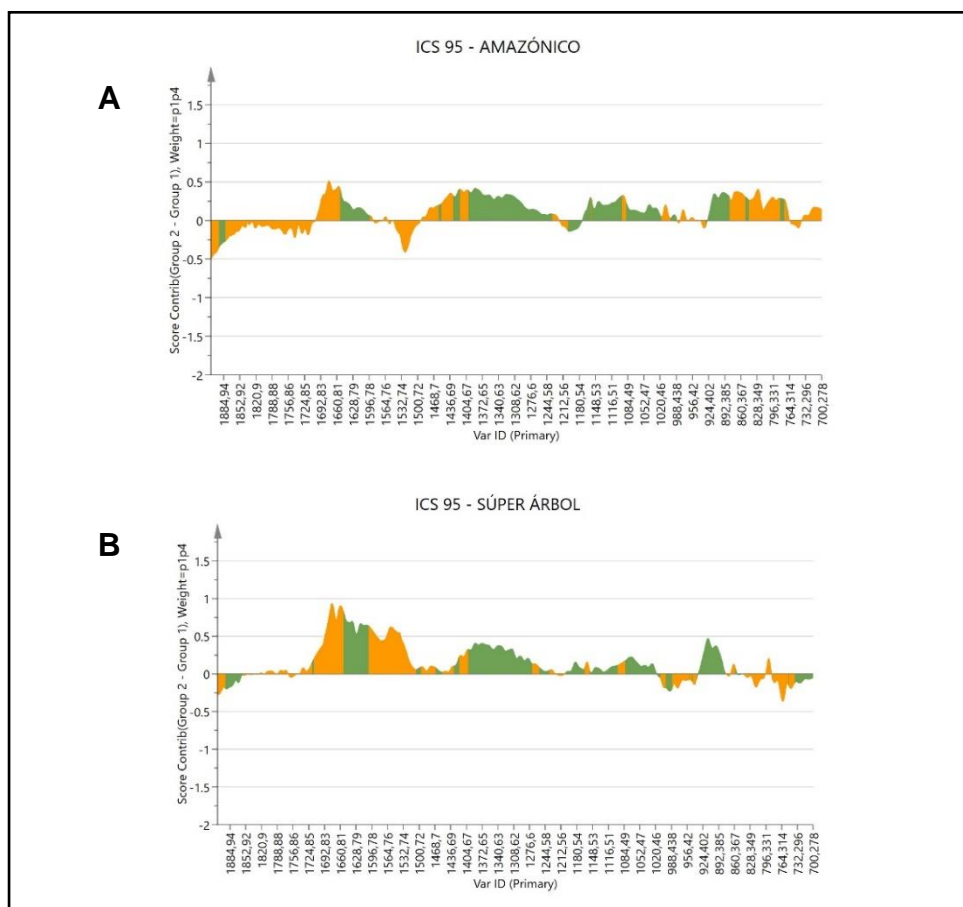


Figura 5. Comparación de almendras de cacao del genotipo Nacional

3.4. ESPECTROS RAMAN DE GRANOS DE CACAO EN DIFERENTES BIOZONAS

3.4.1. ESPECTROS RAMAN DE GRANOS DE CACAO NACIONAL POR BIOZONA

Considerando que la producción de cacao en Ecuador no se limita a una región única y homogénea, las variables no controladas e incluso no identificadas podrían afectar la composición de la cáscara de granos de cacao y generar un espectro Raman diferente, por tal razón, se realizaron determinaciones en muestras de la misma provincia y diferente biozona y de esta manera evaluar este factor en los espectros.

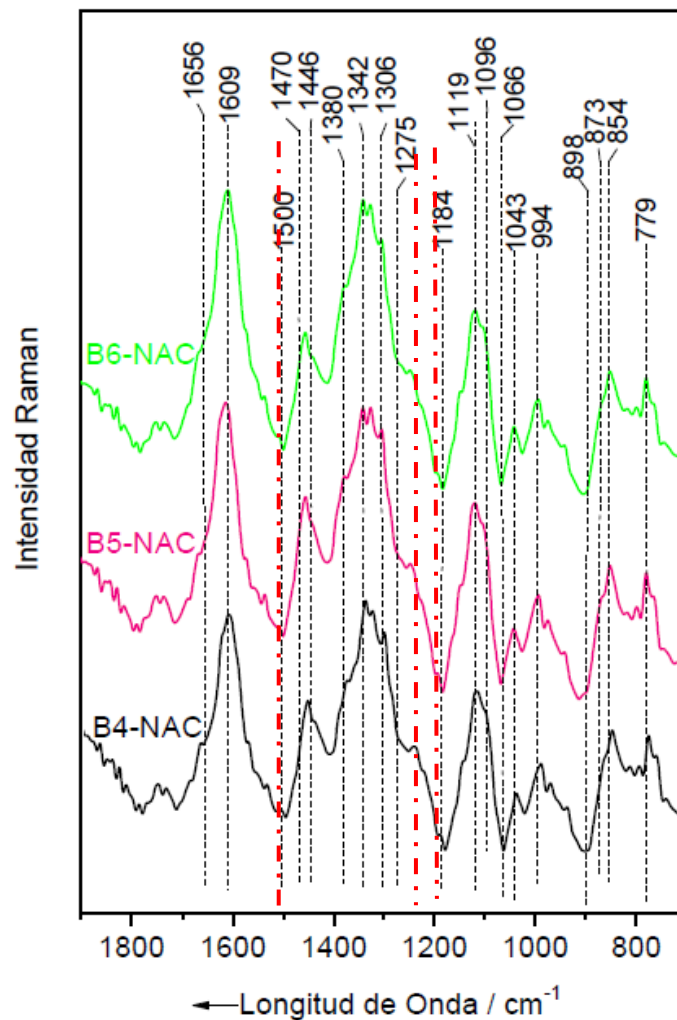


Figura 6. Espectros Raman de granos de cacao Nacional de diferentes biozonas.

En de la provincia de Zamora Chinchipe y en la biozona 4 el cacao de genotipo Nacional se encuentra ubicado en el cantón Yantzaza, parroquia Yantzaza, en la comunidad Simón Bolívar; en la biozona 5 se encuentra distribuido en el

cantón Paquisha, parroquia Triunfo Dorado en la comunidad Las Brisas y en la biozona 6 en el cantón El Pangui, parroquia El Pangui, comunidad Paraíso.

En la Figura 6 se pueden observar los espectros Raman de las almendras del cacao Nacional provenientes de diferentes biozonas y en donde se pueden notar pequeñas diferencias en los espectros, principalmente en las bandas de la lignina ya que en las 3 biozonas la banda en 1609 cm^{-1} se encuentra desplazada hacia mayores frecuencias. Por otro lado, en el rango de $1306\text{-}1342\text{ cm}^{-1}$ también varían los picos que son atribuidos de la misma forma a la lignina especialmente la banda centrada a 1329 cm^{-1} la que en la biozona 4 cuenta con una banda menos intensa, seguido de la biozona 6 que su banda perteneciente a la lignina es medianamente intensa y la de la biozona 5 que es la más notoria.

La biozona 5 es la más diferente en relación con la biozona 4 y 6 debido a que en el rango $1500\text{-}1609\text{ cm}^{-1}$ los picos del espectro de la biozona 5 son más intensas a diferencia de las otras biozonas y que estarían relacionados con el componente de la lignina que es sí es el que más varía en los espectros de este genotipo.

3.4.2. ESPECTROS RAMAN DE GRANOS DE CACAO ICS 95 POR BIOZONA

El genotipo ICS 95 de la provincia de Zamora Chinchipe de la biozona 4 se encuentra ubicado en el cantón Yantzaza, parroquia Los Encuentros, comunidad Nungui; de la biozona 5 del mismo genotipo tiene ubicación en el cantón Centinela del Cóndor, parroquia Triunfo Dorado y comunidad El Dorado. El ICS 95 en la biozona 6 se encuentra en el cantón el Pangui, parroquia el Pangui, comunidad Abdón Calderón.

En la Figura 7 se pueden observar los espectros del cacao del genotipo ICS 95 de diferentes biozonas, donde las bandas que más diferencia tienen son las que corresponden a la lignina que se encuentran ubicadas alrededor de 1329 cm^{-1} , donde se puede definir que la banda de lignina que tiene una menor intensidad es en la biozona 4 en relación a la biozona 5 y 6; también se puede observar ligeras diferencias en las bandas de menor intensidad en el rango $779\text{-}854\text{ cm}^{-1}$, que corresponderían al compuesto de la pectina.

De la misma manera las biozonas 4 y 6 son las más similares a relación de la biozona 5 que muestra una pequeña diferencia en el rango $1500\text{-}1609\text{ cm}^{-1}$ que pertenecen al compuesto de la lignina; estas diferencias se observan al compararlas visualmente.

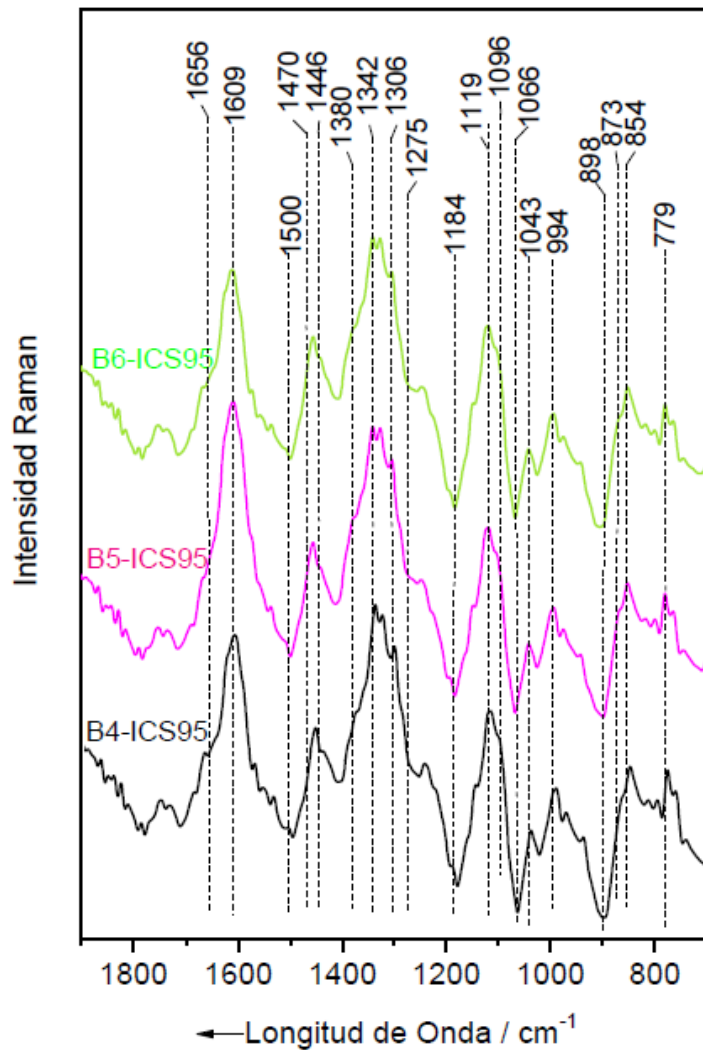


Figura 7. Espectros Raman de granos de cacao ICS 95 de diferentes biozonas.

3.4.3. ESPECTROS RAMAN DE ALMENDRAS DE CACAO AMAZÓNICO POR BIOZONA

En la provincia de Zamora Chinchipe el genotipo Amazónico de cacao de la biozona 4 se encuentra ubicado en el cantón Yantzaza, parroquia Los Encuentros, comunidad Nungui; en la biozona 5 no se encontró el genotipo Amazónico. Para la biozona 6 el mismo genotipo se encuentra situado en el cantón el Pangui, parroquia el Pangui, comunidad Abdón Calderón.

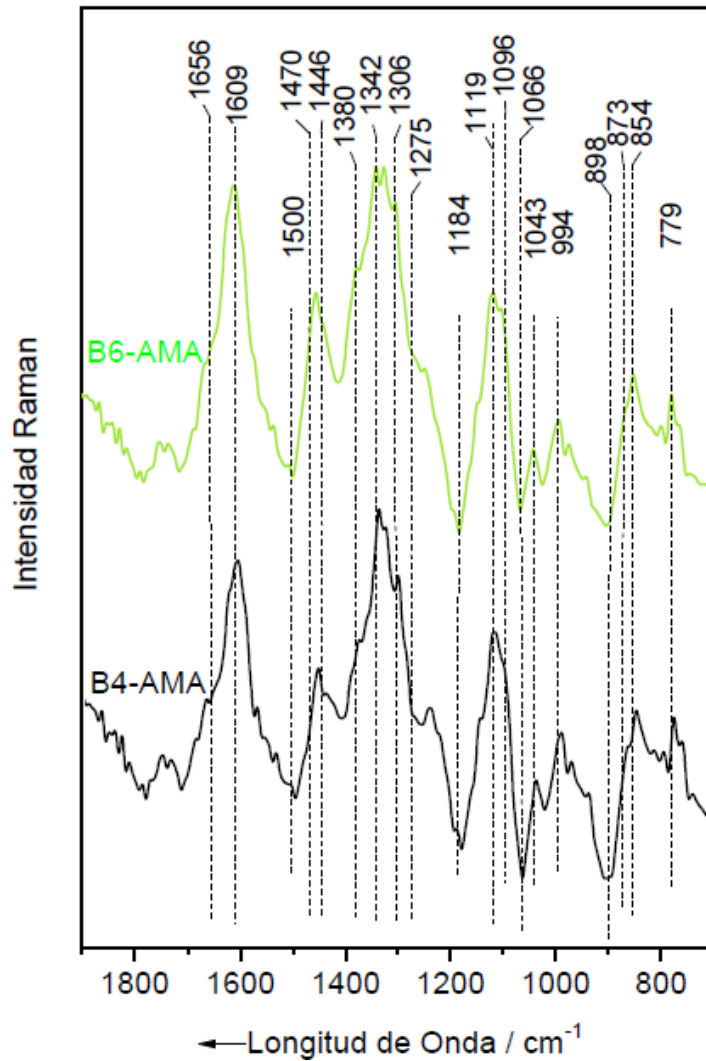


Figura 8. Espectros Raman de granos de cacao Amazónico de diferentes biozonas.

En la Figura 8 se puede observar los espectros Raman de granos de cacao del genotipo Amazónico tanto en la biozona 4 como en la biozona 6; en estos espectros a pesar de ser el mismo genotipo se evidencian ligeras diferencias como se puede observar en las bandas de 1329 cm^{-1} que se le atribuye nuevamente a la lignina en relación a su modo de flexión CH, donde la banda más intensa tiene la biozona 6 y la banda menos intensa la biozona 4, esto se debe a la ubicación geográfica ya que se encuentran en distintas comunidades lo que les hace diferentes uno de otro a pesar de ser del mismo genotipo.

Por otro lado, en el rango $1200\text{-}1275\text{ cm}^{-1}$ se encuentra también expresadas dispersiones Raman provocadas por la lignina donde se puede observar claramente la diferencia que existe en esas bandas ya que la biozona 4 muestra una banda más intensa a relación de la biozona 6 lo que indica que en la biozona 4 los granos de cacao poseen más lignina a relación de la biozona 6; asimismo en el rango de $779\text{-}854\text{ cm}^{-1}$ que se le atribuye a la pectina se nota una diferencia significativa ya que en la biozona 6 no cuenta

con bandas bajas como en la biozona 4 esto muestra que una biozona los granos de cacao cuentan con más pectina que en otra biozona lo que ayuda a poder identificarlos según el espectro cual es de mejor calidad en relación a sus componentes.

3.4.4. ESPECTROS RAMAN DE GRANOS DE CACAO SÚPER ÁRBOL POR BIOZONA

El genotipo Súper Árbol de la biozona 4 se encuentra ubicado en el cantón Yantzaza, parroquia Yantzaza, comunidad Simón Bolívar; en la biozona 5 el genotipo Súper Árbol está ubicado en el cantón Cantinela del Cóndor, parroquia Triunfo Dorado, comunidad Tuntiak. Para la biozona 6 el genotipo Súper Árbol se encuentra situado en el cantón el Pangui, parroquia el Pangui, comunidad Abdón Calderón.

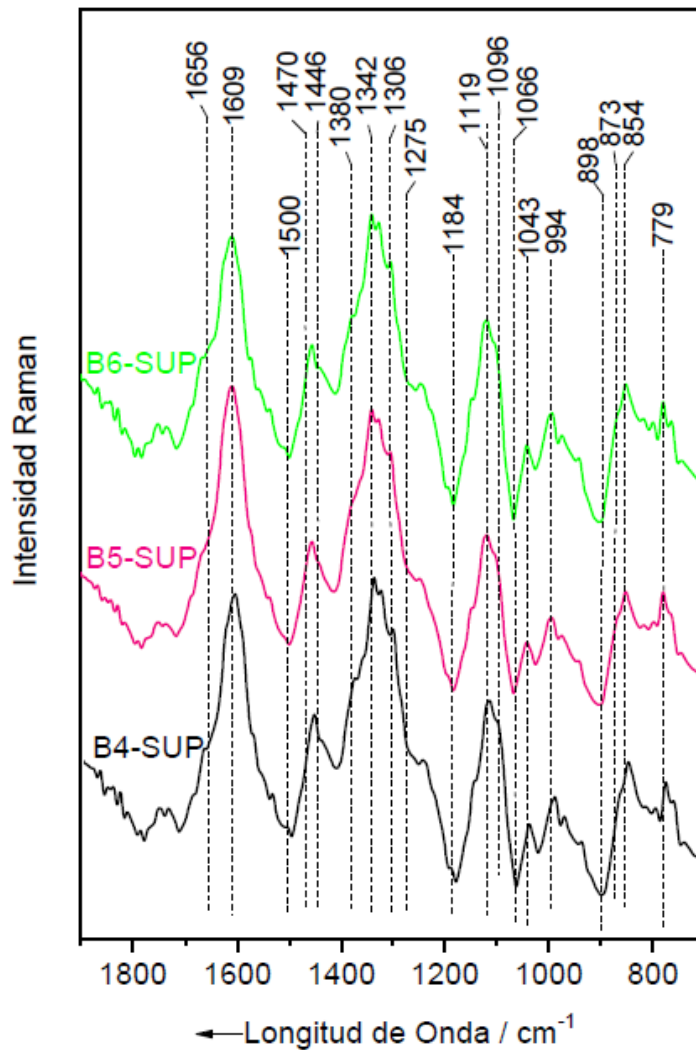


Figura 9. Espectros Raman de granos de cacao Súper Árbol de diferentes biozonas.

En la Figura 9 se pueden observar los espectros del genotipo Súper Árbol donde al ser del mismo genotipo tienen pequeñas diferencias entre ellos atribuidas al efecto de cada biozona en sus espectros. En el rango de $770-854\text{ cm}^{-1}$ que son bandas que corresponden a la pectina se puede notar en las 3 biozonas que las bandas se encuentran corridas acorde a cada biozona esto se debe a que cada una de las biozonas corresponde a una comunidad distinta a pesar de ser de la misma provincia por lo que se muestran de esta manera bandas menos intensas y más intensas; otras diferencias se encuentran también en el rango de $1500-1609\text{ cm}^{-1}$ donde se puede observar que las 3 biozonas están corridas hacia mayores frecuencias y que se produce en la región de dispersión de la lignina.

Los espectros Raman de la biozona 4 y la biozona 6 son en su mayoría similares, en cambio la biozona 5 presenta discrepancias en sus bandas por lo que se puede atribuir que la mejor calidad de granos de cacao en relación con sus componentes se encuentra en la biozona 4 y 6.

3.4.5. ESPECTRO RAMAN DE ALMENDRAS DE CACAO CCN 51 DE DIFERENTES PROVINCIAS

Para el genotipo CCN51 se tomó referencia el espectro promedio de diferentes provincias siendo, de la provincia de El Oro (CCN-4), cantón El Guabo, parroquia El Guabo; provincia de Cotopaxi (CCN-8), cantón La Mana, parroquia La Mana; provincia del Guayas (CCN-10), cantón Guayaquil; provincia de Manabí (CCN-14), cantón el Carmen, parroquia el Carmen; provincia de Bolívar (CCN-16), cantón Caluma, parroquia Caluma.

En la Figura 10 se pueden observar espectros promedios del genotipo CCN-51 de distintas provincias del Ecuador, a pesar de ser del mismo genotipo entre ellos sus espectros muestran diferencias. Como, por ejemplo, en la banda de 1444 cm^{-1} , atribuida según la literatura a los lípidos se observan diferencias entre los distintos espectros, de la misma manera en el rango $1079 - 1096\text{ cm}^{-1}$ que pertenecen a las bandas de la celulosa la muestra promedio de la provincia de Guayas (CCN-10) no forma pico a diferencia de las otras muestras. Por otro lado, en el rango $1270-1380\text{ cm}^{-1}$ la muestra promedio de la provincia del Guayas (CCN-10) se muestra con sus bandas menos intensas con relación a las demás provincias.

También existen diferencias en la zona espectral de la lignina cercanas a la banda 1329 cm^{-1} , donde las 5 muestras presentan diferencias. En el rango de $1300-1380\text{ cm}^{-1}$ que se le puede atribuir a la lignina también se muestra una diferencia significativa en la intensidad de las bandas.

Los espectros Raman de las muestras de cacao CCN-51 presentan diferencias en casi todo el espectro, esto se atribuye al efecto de su procedencia de diferentes provincias a pesar de ser del mismo genotipo.

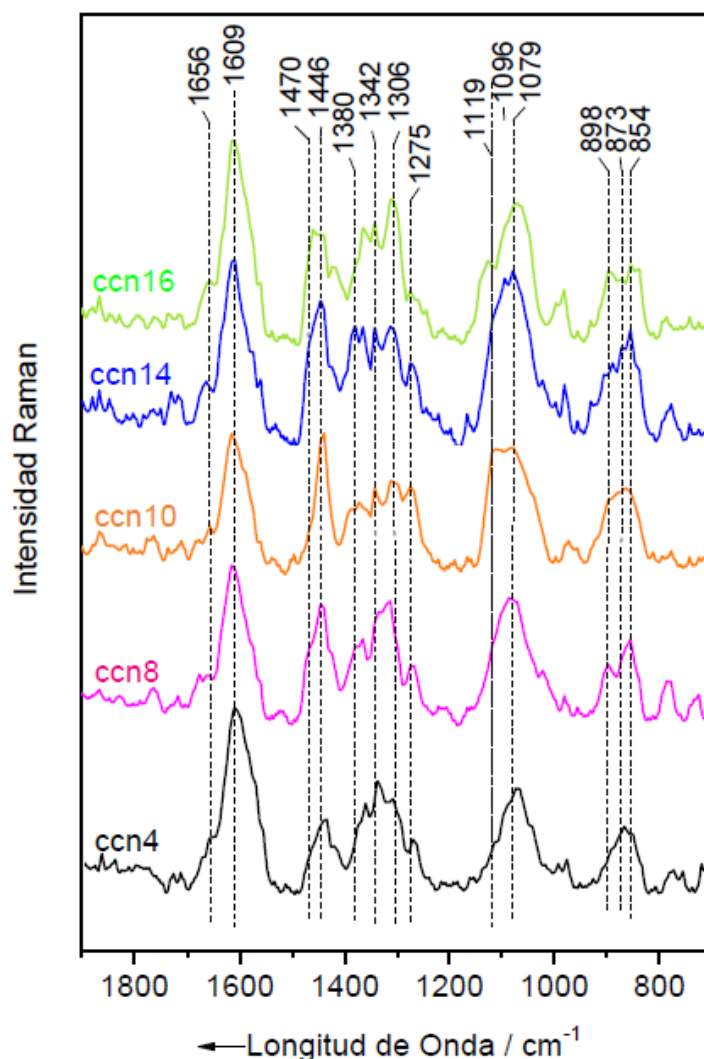


Figura 10. Espectros Raman de granos de cacao CCN51 de diferentes provincias.

3.5. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

Previamente mediante espectroscopía Raman se logró diferenciar entre los dos tipos principales de variedades de cacao (Nacional y CCN51), sin embargo, la variedad Nacional en la actualidad está constituida por algunas “variedades” de excelentes características organolépticas y mucha similitud de sus almendras.

Para esto se disponen de varias repeticiones de espectros Raman de almendras de las muestras tanto de cacao del Complejo Nacional y del genotipo CCN51, sobre las cuales se realizó el análisis multivariado utilizando

el programa SIMCA y los modelos PCA y OPLS-DA con los espectros Raman normalizados y suavizados.

3.5.1. PCA DE LOS RESULTADOS ESPECTROSCÓPICOS DE MUESTRAS DE GRANOS CACAO DEL COMPLEJO NACIONAL Y CCN51

El Análisis de Componentes Principales, PCA es un modelo para realizar un análisis quimiométrico donde se muestra la variabilidad que existe en los diferentes datos.

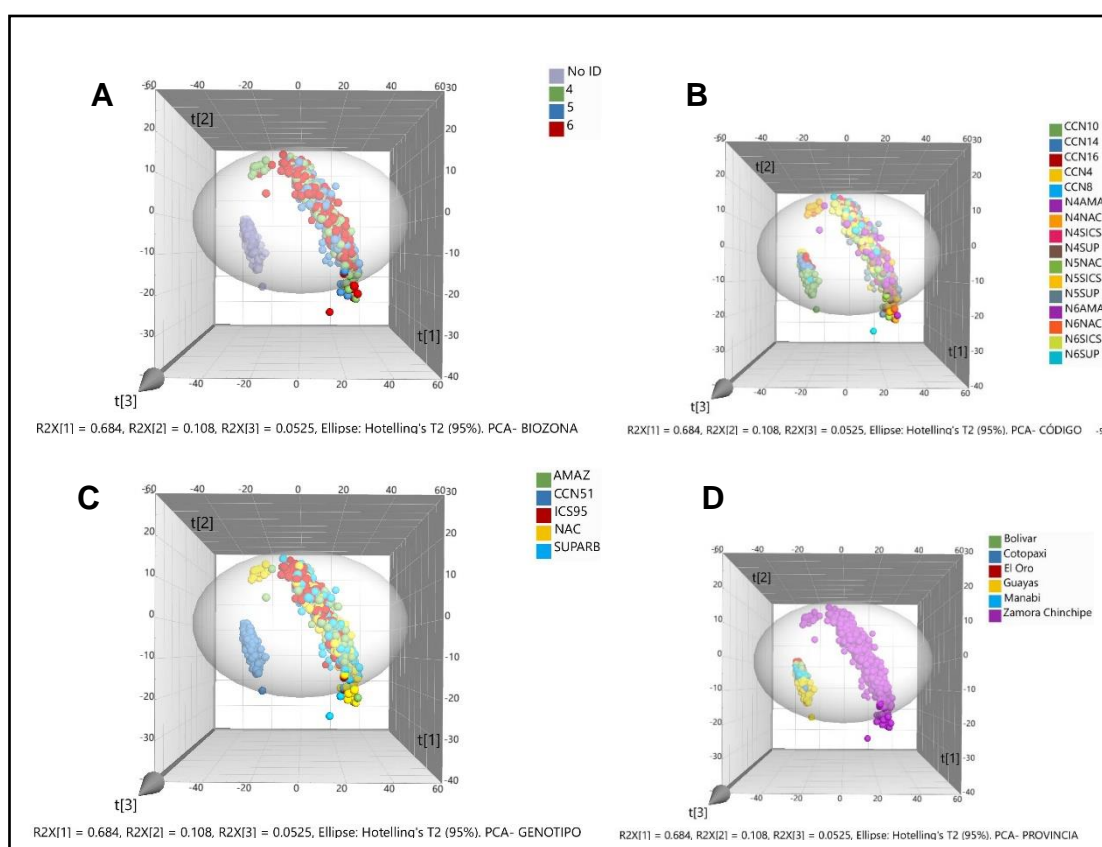


Figura 11. PCA de espectros Raman de granos de cacao del complejo Nacional y CCN51

La evaluación multivariada inicial consistió en una evaluación de componentes principales, PCA, en donde se observó una diferencia significativa entre los espectros Raman de todas las muestras de granos de cacao. Esto se puede a su vez visualizar en el gráfico 3D de los scores en donde las muestras manifiestan tendencias de separación entre el cacao del complejo Nacional y el CCN51 en todas las variables categóricas (biozona, código, genotipo, provincia).

En la Figura 11 se muestra el PCA de las diferentes variables categóricas en el gráfico A se puede observar el PCA por biozona donde la zona 4,5,6 se agrupan en un solo lugar ya que pertenecen a la misma provincia (Zamora

Chinchipe); en cambio la biozona no identificada se agrupa muy separado de las anteriores esto es porque pertenece a provincias diferentes. Se puede notar también que entre biozonas no se separan sino todas están juntas entre sí formando una sola nube de dispersión de los espectros.

De la misma manera el gráfico B corresponde a un PCA por código de la muestra y representados por colores independientes. En este gráfico igualmente se puede notar que se separan las nubes de datos de la dispersión de los espectros del cacao del Complejo Nacional del CCN51, con el consecuente agrupamiento de en un lado los del código CCN51 y en otro lado los del código Nacional con sus variedades.

En el gráfico C se muestra un PCA coloreado por genotipo, en donde de la misma forma se separan en un lado el genotipo CCN51 en un color azul y en otro lado se agrupan los del genotipo Nacional, Súper árbol, Amazónico y ICS 95 que pertenecen al mismo genotipo en diferentes colores.

En el gráfico D se muestra un PCA por provincia, en el cual la provincia de Zamora Chinchipe de donde son las muestras de cacao Nacional se agrupa en un solo lugar y muy separadas de estas se muestran las demás provincias (Bolívar, Cotopaxi, El Oro, Guayas y Manabí) de donde provienen las muestras de CCN51.

Cabe resaltar que con un análisis multivariado PCA sin tomar en cuenta las variables cualitativas si se puede diferenciar claramente entre los genotipos Nacional y CCN51 ya que las nubes de datos se agrupan en diferente posición de cada genotipo. Este modelo explica el 84.4 % de la variabilidad en los componentes, pero para poder diferenciarlos de una manera más detallada se exploró un segundo modelo que se describe a continuación.

3.5.2.OPLS-DA DE LOS RESULTADOS ESPECTROSCOPICOS DE LAS MUESTRAS DE GRANOS CACAO DEL COMPLEJO NACIONAL Y CCN51

3.5.2.1. OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao por provincia

Con el método OPLS-DA y considerando algunas variables cualitativas en el procesamiento de los datos, se puede observar en la Figura 12 que las muestras presentan una mejor separación en relación a la provincia de donde provienen, en base a sus espectros Raman porque en un solo lugar se observan las muestras pertenecientes a la provincia de Zamora Chinchipe de donde es el genotipo Nacional y en otro grupo se agrupan las del genotipo CCN51 que son pertenecientes a distintas provincias. Sin embargo, se requiere de un número elevado de componentes principales (entre 12 y 13)

para conseguir un porcentaje alto de diferenciación (aproximadamente del 85 %).

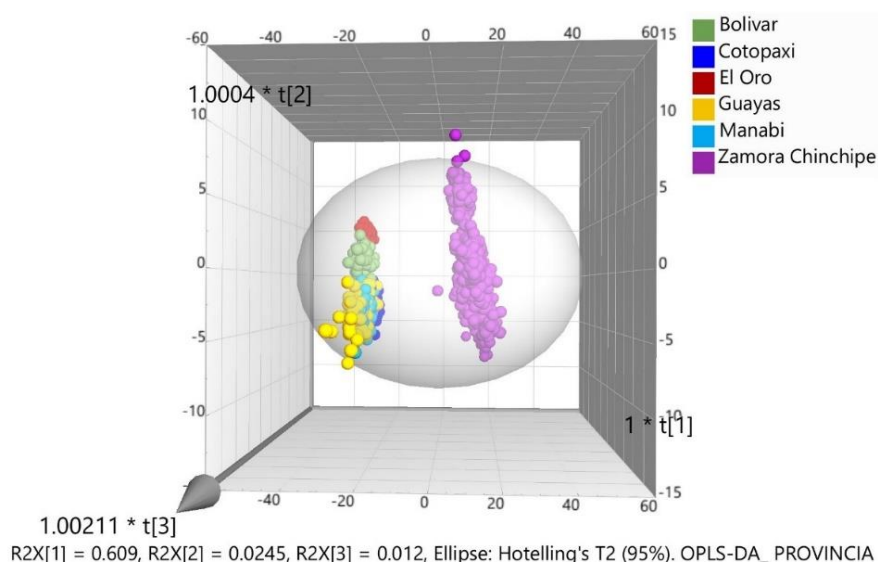


Figura 12. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del Complejo Nacional y CCN51 por provincia.

3.5.2.2. OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao por biozona

En la Figura 13 se muestra un OPLS-DA coloreado por biozona y que su tendencia es muy similar al PCA por provincia. En este gráfico se muestra la comparación realizada entre los espectros de granos de cacao del Complejo Nacional y CCN51 provenientes de varias biozonas y en donde se puede observar la separación de estas muestras en diferentes grupos asociadas a diferentes localidades de Zamora Chinchipe. Esto es especialmente útil si se pueden visualizar las zonas del espectro en donde se pueden centrar los esfuerzos para detectar sustancias que podrían ser diferentes entre una biozona y otra de los granos de cacao.

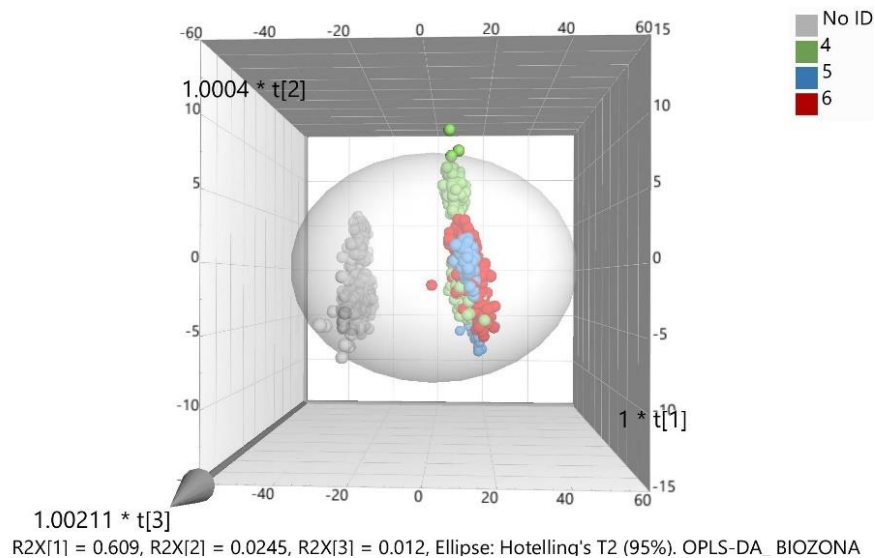


Figura 13. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del complejo Nacional y CCN51 por biozona.

3.5.2.3. OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao por genotipo

En la Figura 14 se muestra un gráfico de OPLS-DA por genotipo donde se observa claramente en color azul el genotipo CCN51 agrupado, distante al genotipo Nacional que se muestra a su lado contrario con las diferentes sub variedades: Amazónico, ICS 95, Súper Árbol y Nacional. Este análisis quimiométrico con algunas variables cualitativas permite la separación de manera significativa. Y lo que viene dado principalmente por las diferencias en los espectros relacionados a las diferentes cantidades y tipo de lignina entre otros componentes de la corteza de los granos de cacao.

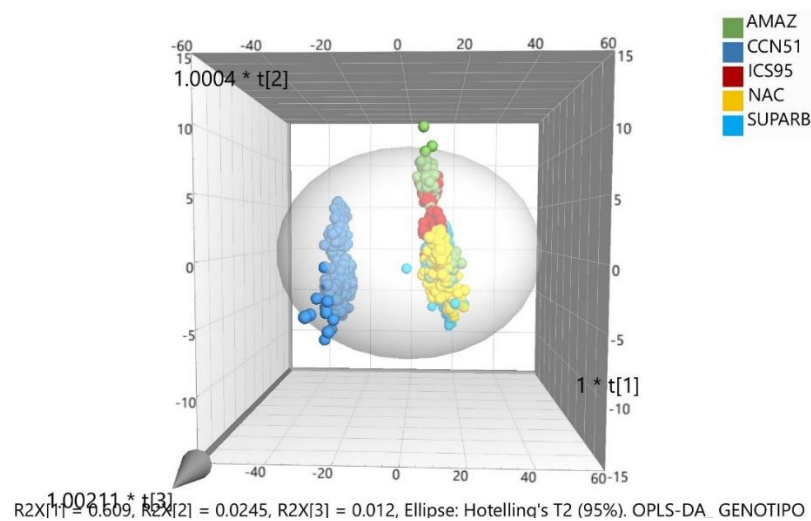


Figura 14. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del Complejo Nacional y CCN51 por genotipo.

En general se observa un agrupamiento y separación entre los distintos tipos de muestras (de diferente genotipo), también se pueden observar ciertas tendencias de agrupamiento entre las variedades originarias de la misma provincia y biozona.

3.5.2.4. OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao por código.

En la Figura 15 se muestra un OPLS-DA por código en donde aparte de las variables propias del espectro Raman se han tomado en cuenta ciertas variables cualitativas de las muestras. Se puede observar claramente como las muestras del genotipo CCN51 se asocian en un solo lugar y en otro lugar las del genotipo del Complejo Nacional.

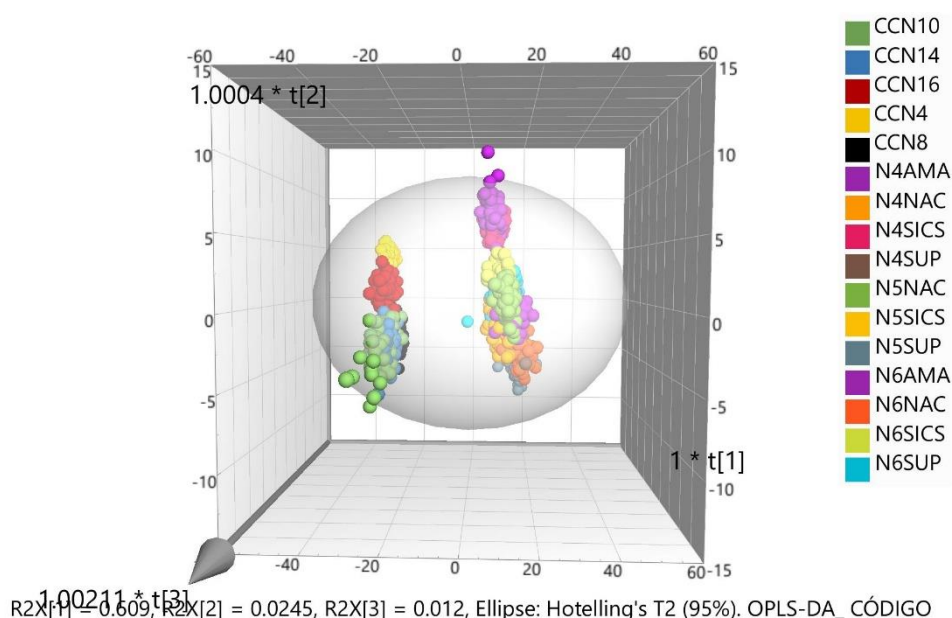


Figura 15. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del Complejo Nacional y CCN51 por código.

Este OPLS-DA es muy similar al PCA, se observan los genotipos del Complejo Nacional agrupados cada uno por las diferentes biozonas y por las subvariedades que cuentan; el genotipo CCN51 se agrupa cada espectro con diferente color por la provincia a la que pertenece muy separado del complejo Nacional. Estas agrupaciones se deben a las variables categóricas (biozona, provincia, código, genotipo) que estuvieron establecidas inicialmente para lograr una buena separación entre los distintos genotipos.

3.5.2.5. OPLS-DA de resultados espectroscópicos de muestras de granos de cacao del genotipo Nacional.

Asimismo, en la Figura 16 se muestra un OPLS-DA de los espectros Raman solamente de granos de cacao del Complejo Nacional donde se tomaron en cuenta también algunas variables cualitativas. En el gráfico A se muestran los resultados separados por biozonas (4,5,6), en donde se puede observar claramente que se agrupan por colores dependiendo de su origen. En el gráfico B se indica un OPLS-DA por genotipo donde se observan agrupados y separados ligeramente el genotipo Nacional, ICS 95, Amazónico y Súper Árbol. Por otro lado, en el gráfico C se encuentra un OPLS-DA por código donde se pueden observar agrupamiento entre los espectros que son similares (misma biozona) y separación entre las subvariedades del complejo Nacional. Este modelo OPLS-DA es de gran ayuda ya que muestra una separación adecuada entre grupos lo que permite establecer diferencias en términos de calidad del grano de cacao.

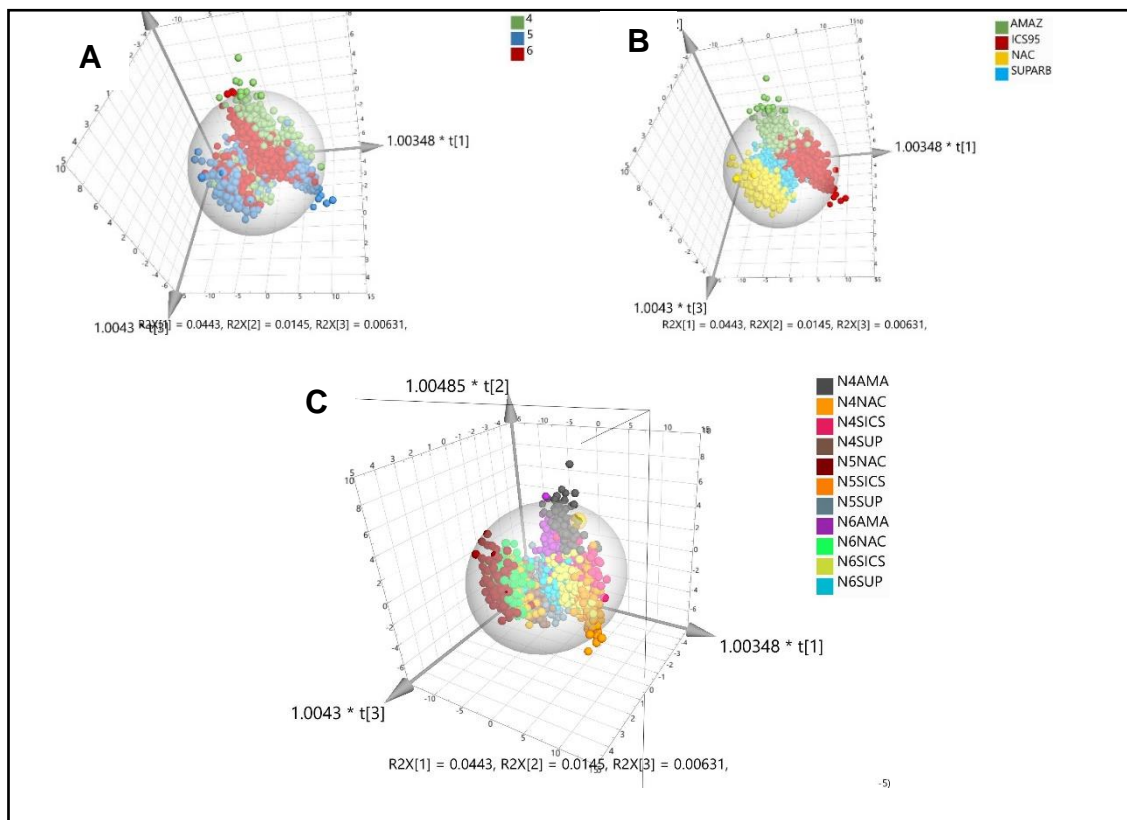


Figura 16. OPLS-DA de espectros Raman de granos de cacao del Complejo Nacional

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- Se generó los espectros de las dos variedades de cacao tomando en cuenta las provincias de procedencia de estos, donde los espectros Raman generados de las variedades del complejo Nacional difieren una de otra por sus diferencias en la composición de la corteza de los granos de cacao y también debido a que son de distinta biozona, aunque de la misma provincia de Zamora Chinchipe. Estas variaciones en los espectros del cacao del complejo Nacional de la misma provincia se pueden atribuir a las diferencias de temperatura, nutrientes del suelo, lluvias, entre otros. De la variedad CCN51 los espectros generados son diferentes por ser de distinta provincia lo que influye en gran manera su ubicación geográfica.
- En la evaluación de los espectros Raman de los granos de cacao se logró encontrar principalmente que el componente mayoritario y el que difiere notablemente es la lignina conforme a sus bandas de dispersión a $1270\text{-}1275\text{ cm}^{-1}$, 1329 cm^{-1} , 1609 cm^{-1} , 1664 cm^{-1} ; seguido de la celulosa con sus bandas típicas a 898 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} , 1119 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} ; y la pectina con bandas observadas en el rango de $850\text{-}862\text{ cm}^{-1}$.
- El modelo OPLS-DA es útil para poder diferenciar entre cada variedad de cacao, ya considera las variables cualitativas (biozona, provincia, genotipo, código), ya que se observó agrupamiento entre las muestras similares y separación entre los distintos tipos de muestras con espectros Raman diferentes.
- Utilizando espectroscopia Raman y Quimiometría se diferenció la variedad CCN51 y complejo Nacional, ya que sus espectros son distintos especialmente en las zonas espectrales en las que aparecen las dispersiones Raman de la lignina. Es decir, con este método se genera una nueva alternativa para la diferenciación de estas dos variedades en contraste a los métodos visuales que son subjetivos.

4.2. RECOMENDACIONES

- Se sugiere que las muestras de almendras de cacao que se analizaran provengan de la misma provincia y biozonas, tanto del genotipo del complejo Nacional como del genotipo CCN51, ya que con esto se podrían comparar los espectros eliminando directamente esta variable.
- Se recomienda utilizar la espectroscopia Raman y Quimiometría como herramientas claves para poder diferenciar entre las variedades de cacao y esto resulte beneficioso para poder comercializar y exportar el cacao ecuatoriano a todo el mundo.

5. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- AGROCALIDAD. (2017). Consultoría implementación métodos de análisis de insumos y productos agropecuarios por espectroscopía raman. Retrieved from <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2017/04/TDR-RAMAN-13-04-2017.pdf>
- Barrientos, P. (2015). *El comercio del cacao y su influencia en la agricultura peruana*. 20, 7–23.
- Boqué, R., & Ferré, J. (n.d.). *Quimiometría, Una disciplina útil para el análisis químico*. 1–10. Retrieved from <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/quimio.pdf>
- Castro de Doens, L., Gómez-García, R., & Vignati, F. (2018). Observatorio del cacao fino y de aroma para América Latina. *Iniciativa Latinoamericana Del Cacao*, 1–18. Retrieved from http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1258/OLC_CAF_bol_etin_3_Español-final.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Díaz-montenegro, J., Varela, E., & María, J. (2018). Livelihood strategies of cacao producers in Ecuador : Effects of national policies to support cacao farmers and specialty cacao landraces. *Journal of Rural Studies*, 63(December 2017), 141–156. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2018.08.004>
- Enriquez, G. (1985). *Curso sobre el cultivo del Cacao*. Orton IICA/CATIE.
- Gallego, Á. (2009). *Instrumento portátil para medición de compuestos fenólicos en vino tinto usando espectroscopía raman* (Pontificia Universidad Católica de Chile). Retrieved from <https://repositorio.uc.cl/bitstream/handle/11534/1365/530505.pdf?sequence=1>
- Grail, H. (2018). *La Denominación de origen para cacao arriba . En busca del Santo Grial*.
- Himmelsbach, D. S., & Akin, D. E. (1998). *Near-Infrared Fourier-Transform Raman Spectroscopy of Flax (Linum usitatissimum L .) Stems*. 8561(97), 991–998.
- ICCO. (2015). Review of Annex “C” of the Intern. ICCO.
- Jin, H., Lu, Q., Chen, X., Ding, H., & Gao, H. (2016). *The use of Raman spectroscopy in food processes: A review*. 4928(December 2015). <https://doi.org/10.1080/05704928.2015.1087404>
- Lennart, E. (2017). *Explaining differences or grouping data? When to apply OPLS-DA vs PCA for metabolomics and other -omics data analysis* (pp. 1–39). pp. 1–39. sartorius stedim biotech.
- Leon Villamar, F., Calderon Salazar, J., & Mayorga Quinteros, E. (2018).

Estrategias para el cultivo, comercialización y exportación del cacao fino de aroma en Ecuador / Strategies for cultivation, marketing and export of aroma fine cocoa in Ecuador. *Ciencia Unemi*, 9(18), 45. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss18.2016pp45-55p>

Lucio, J. (2012). *Aplicación de Métodos Quimiométricos para la Caracterización y Control de Calidad de Plantas Medicinales*. Retrieved from http://grupsderecerca.uab.cat/chemometrics/sites/grupsderecerca.uab.cat/chemometrics/files/pagefiles/tesis_jrlg.pdf

Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>

Muñoz-flores, J. E. (2015). *Comparacion genética de tres fuentes del cacao theobroma cacao L., mediante el uso de marcadores microsatelites genetic comparison from three sources of cocoa theobroma cacao L. using microsatellites markers comparação genética entre três fontes de caca*. 13(1), 10–18.

Nieuwoudt, M. K., Holroyd, S. E., McGoverin, C. M., Simpson, M. C., & Williams, D. E. (2016). Raman spectroscopy as an effective screening method for detecting adulteration of milk with small nitrogen-rich molecules and sucrose. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2520–2536. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10342>

Olivieri, A. C., & Rivas, G. A. (2011). *La química analítica en el siglo XXI*. 51–56. Retrieved from <http://www.cienciahoy.org.ar/ch/ln/hoy124/QuimicaAnalitica.pdf>

Porcel, M. (2001). *Aplicación de técnicas quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos cinético-espectrofotométricos de análisis*. (25–26), 1–85. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Programa Café y Cacao. (2016). *Mapas Organolépticos, una estrategia comercial viable para el desarrollo adecuado de los territorios cacaoteros ecuatorianos*.

Qin, J., Kim, M. S., Chao, K., & Cho, B. (2017). Raman Chemical Imaging Technology for Food and Agricultural Applications. *Journal of Biosystems Engineering*, 42(3), 170–189. <https://doi.org/10.5307/JBE.2017.42.3.170>

Quingaisa, E., & Riveros, H. Estudio de caso: denominacion de origen “cacao arriba.” , IICA § (2007).

Ramos, F. (2009). *Propuesta de Creación del Museo del Cacao en Guayaquil*.

Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E., & Trygg, J. (2006). *OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification* y. (July 2014). <https://doi.org/10.1002/cem.1006>

- Romero, C. A., Bonilla EG Santos E L Peralta, J. A., & Galindo, G. (2010). Identificación Varietal de 41 Plantas Seleccionadas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Provenientes de Cuatro Cultivares Distintos de la Región Amazónica Ecuatoriana, Mediante el Uso de Marcadores Microsatélites. *Revista Tecnológica ESPOL-RTE*, 23(1), 121–128. Retrieved from <http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/viewFile/44/16>
- Samaniego, M. B. (2015). Aplicación de la espectroscopía Raman en conservación del patrimonio cultural. <https://doi.org/10.1192/bjp.112.483.211-a>
- Schrader, B., Klump, H. H., Schenzel, K., & Schulz, H. (1999). *Non-destructive NIR FT Raman analysis of plants* &. 509, 201–212.
- Srinivasnaik, S., & Suganthy, M. (2017). *Development and Evaluation of Integrated Pest Management Strategy against Sucking Pest Complex of Cocoa , Theobroma cacao L . Development and Evaluation of Integrated Pest Management Strategy against Sucking Pest Complex of Cocoa , Theobroma cacao L . Dep.* (February). <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.602.096>
- Statistics TM-IT. (2018). Lista de los exportadores para el producto seleccionado Producto: 1801 Cacao en grano, entero o partido, crudo o tostado.
- Sun, L., Simmons, B. A., & Singh, S. (2011). *Understanding Tissue Specific Compositions of Bioenergy Feedstocks Through Hyperspectral Raman Imaging*. 108(2), 286–295. <https://doi.org/10.1002/bit.22931>
- Synytsya, A., Mate, P., & Machovic, V. (2003). *Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins*. 54, 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00158-9)
- Thomas, E., van Zonneveld, M., Loo, J., Hodgkin, T., Galluzzi, G., & van Etten, J. (2012). Present Spatial Diversity Patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047676>
- Vargas, P., Ciobota, V., Salinas, W., Kampe, B., Aponte, P. M., Rösch, P., ... Ramos, L. A. (2016). *Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy*. 211, 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.017>
- Vicepresidencia del Ecuador. (2014). *Diagnóstico de la Cadena Productiva del Cacao en el Ecuador*.
- Worley, B., & Powers, R. (2016). PCA as a predictor of OPLS-DA model reliability. *Current Metabolomics*, 4(2), 97–103. <https://doi.org/10.2174/2213235X04666160613122429.PCA>

6. ANEXOS

6. ANEXOS

ANEXO 1.

ETAPAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA.

ETAPA 0 = ZONIFICACIÓN

A nivel nacional existen alrededor de 11 zonas que cuentan con condiciones agroclimáticas y biofísicas similares las cuales son idóneas para el cultivo de cacao. En Zamora Chinchipe se encuentran identificadas 4 zonas biofísicas: Zona tres, Zona cuatro, Zona cinco y Zona seis.

En la etapa de zonificación se realizó una superposición de mapas físicos donde se tomó en cuenta las temperaturas, precipitaciones, heliofanía, tipos de suelos, nivel de fertilidad y el uso de los suelos.

ETAPA 1 = IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS

Descriptores de mazorcas:

- Color de la mazorca de 2 meses de edad
- Color de la mazorca madura
- Forma de la mazorca
- Forma del ápice
- Forma de la constricción basal
- Rugosidad de la cáscara
- Dureza de la cáscara.

A partir de los cuales se identificaron genotipos de tipo nacional, amazónico con sub- “variedades” de altos amazónicos, bajos amazónicos, trinitario con sub variedades de súper árbol, Segregación de ICS 95 y criollo.

Adicionalmente, las muestras se clasificaron según la región, zona biofísica y genotipo.



Segregación de ICS 95

Nacional

Alto Amazónico

Súper árbol

ETAPA 2= RECOLECCIÓN DE MUESTRAS



Cosecha

- En horas de la mañana, utilizando tijeras de podar
- Mazorcas aptas para el cultivo



Trazabilidad

- Información referente al productor y la finca



Clasificación

- Variedad
- Zona Biofísica

En esta etapa del muestreo del cacao de cada zona biofísica se recogió una muestra por cada variedad. Para cada muestra se recolectaron 25 mazorcas y se obtuvieron 2kg de cacao en baba, a partir del cual se desarrolló el proceso siguiente de la investigación.

ETAPA 3= FERMENTACIÓN



Caja Rohan

- Condiciones ambientales



Remoción

- Intervalos definidos cada 24 horas

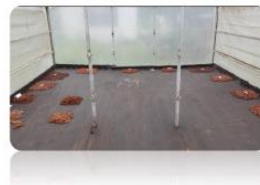


Cubrimiento

- Costal
- Saco de yute

ETAPA 4= SECADO

- ❖ Secado en marquesina durante 15 días



- ❖ Remoción dos veces al día



ANEXO 2.
**PROCEDENCIA DE MUESTRAS COMPLEJO
NACIONAL ZAMORA CHINCHIPE.**

PROCEDENCIA DE MUESTRAS						
MUESTRAS COMPLEJO NACIONAL - ZAMORA CHINCHIPE						
N° de muestra	CANTÓN	PARROQUIA	Comunida d/ Recinto	Coordenadas (UTM)		CÓDIGO
				X	Y	
1	Yantzaza	Los Encuentros	Nungui	768845	9588168	N4SICS
2	Yantzaza	Los Encuentros	Nungui	768845	9588168	N4AMA
3	Yantzaza	Yantzaza	Simón Bolívar	749507	9580888	N4SUP
4	Yantzaza	Yantzaza	Simón Bolívar	760801	9584409	N4NAC
5	Centinela del Cóndor	Triunfo-Dorado	El Dorado	754138	9564611	N5SICS
6	Centinela del Cóndor	Triunfo-Dorado	Tuntiak	756665	9568773	N5SUP
7	Paquisha	Triunfo-Dorado	Las Brisas	757196	9565460	N5NAC
8	El Pangui	El Pangui	Abdón Calderón	767500	9601697	N6SICS
9	El Pangui	El Pangui	Abdón Calderón	767500	9601697	N6AMA
10	El Pangui	El Pangui	Abdón Calderón	767500	9601697	N6SUP
11	El Pangui	El Pangui	Paraíso	763645	9600628	N6NAC

CÓDIGO MUESTRAS DE CACAO	
SICS	Segregación ICS 95
AMA	Amazónico
SUP	Súper Árbol
NAC	Nacional

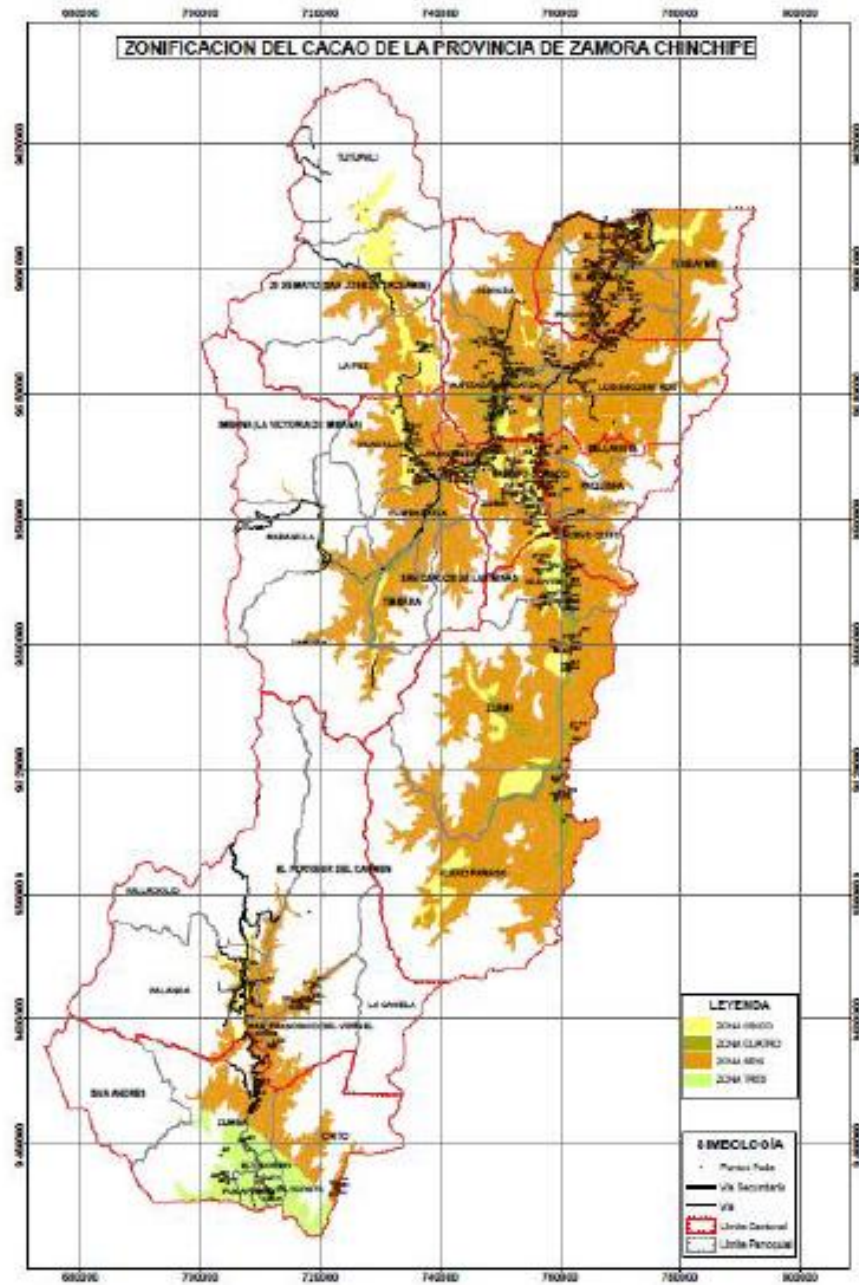
ANEXO 3.

**PROCEDENCIA DE MUESTRAS CCN51 DE
DIFERENTES PROVINCIAS.**

PROCEDENCIA DE MUESTRAS							
MUESTRAS CCN-51 POR PROVINCIAS							
N° de muestra	GENOTIPO	CÓDIGO	PROVINCIA	CANTÓN	SITIO	Coordenadas (UTM)	
						X	Y
1	CCN-51	CCN-4	EL ORO	EL GUABO	BALALOM	632443	9641679
2	CCN-51	CCN-8	COTOPAXI	LA MANA	LA MANA	695352	9894580
3	CCN-51	CCN-10	GUAYAS	GUAYAQUIL	CERECITA (HDA. DON JORGE)	583696	9741209
4	CCN-51	CCN-14	MANABI	EL CARMEN	EL CARMEN	665982	9935321
5	CCN-51	CCN-16	BOLIVAR	CALUMA	CALUMA	694202	9819498

ANEXO 4.

ZONAS BIOFÍSICAS IDENTIFICADAS EN ZAMORA CHINCHIPE.



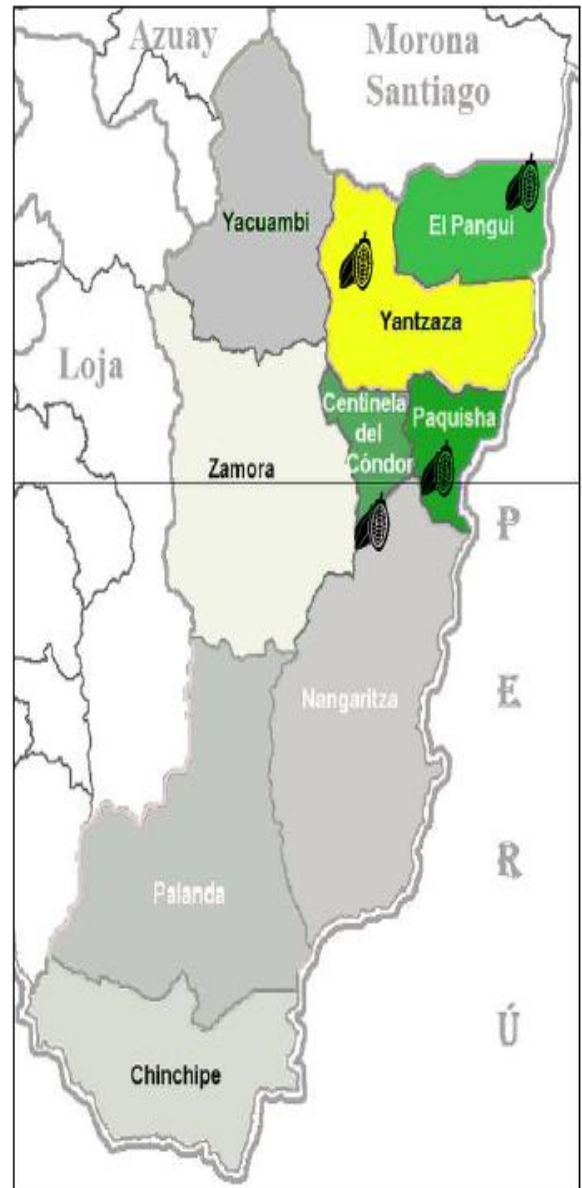
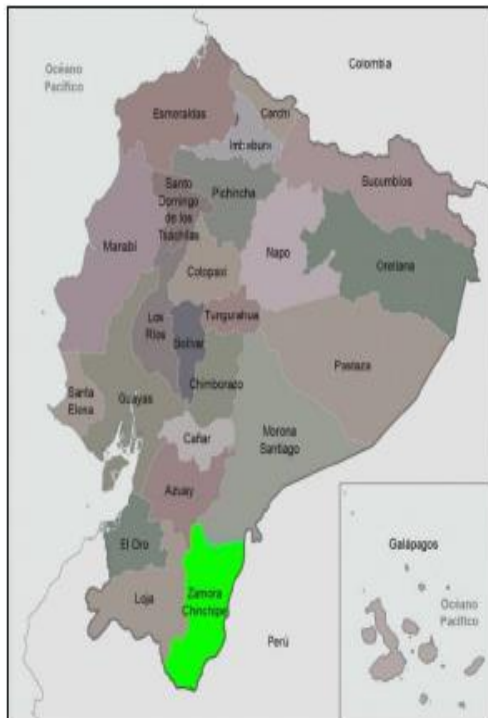
- ZONA TRES
- ZONA CUATRO
- ZONA CINCO
- ZONA SEIS

ANEXO 5. CARACTERÍSTICAS DE ZONAS BIOFÍSICAS IDENTIFICADAS.

ZONAS	INTERACCIÓN	PRECIPITACIÓN (mm)	FERTILIDAD	TEMPERATURA	MSM	PH / ACIDES	PROFUNDIDA D	DRENAJE	NIVEL FREÁTICO	TEXTURAS	PROGRESIÓN	MATERIA ORGÁNICA	TOXICIDAD	PENIENTE	SALINIDAD
ZONA 1	Zon_Prec_Zona Edáfica 3	500 A 1200	MUY BAJA	<15 °C		pH alcalino, muy ácido	SUPERFICIAL	MALO O EXCESIVO DRENAJE	POCO PROFUNDO SUPERFICIAL	arenosas y arcilla pesada,	ABUNDANTE	MUY BAJO	ALTA	>70 %	MUY ALTA
ZONA 4	Zon_Prec_Zona Edáfica 1		ALTA A MEDIANA	20 a 26 °C		pH ligeramente ácido y neutro	PROFUNDOS Y MODERADAM ENTE PROFUNDOS	BUENO	PROFUNDO	francas, franco arcillosas, franco limosas, franco arcillo arenosa	SIN POCA	BUENO	SIN	0 A 25 %	SIN SALINIDAD
ZONA 5	Zon_Prec_Zona Edáfica 2	1200 a 3500	BAJA	15 a 20 °C		pH ácido y moderadam ente alcalino	POCO PROFUNDO	MODERADO	MODERADA MENTE PROFUNDO	limosas, franco arcillo limosas, franco arenosas, arcillo arenosas, arcillo limosas, arcillosas, arenio francosas	FRECUENTE	BAJO	MEDIANA	25 a 70 %	MEDIANA
ZONA 6	Zon_Prec_Zona Edáfica 3		MUY BAJA	<15 °C		pH alcalino	SUPERFICIAL	MALO O EXCESIVO DRENAJE	POCO PROFUNDO SUPERFICIAL	arenosas y arcilla pesada, muy ácido	ABUNDANTE	MUY BAJO	ALTA	>70 %	MUY ALTA

ANEXO 6.

MAPA GEOGRÁFICO DE ZAMORA CHINCHIPE.



ANEXO 7.

MUESTRAS DE CACAO ZONA BIOFÍSICA 4- NORTE.



ANEXO 8.
MUESTRAS DE CACAO ZONA BIOFÍSICA 5- NORTE.



ANEXO 9.
MUESTRAS DE CACAO ZONA BIOFÍSICA 6- NORTE.

