



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**CARRERA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS**

**APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE CACAO CCN-  
51 PARA ELABORACIÓN DE BEBIDA ALCOHÓLICA A  
PARTIR DEL EXUDADO DE MUCILAGO CON ADICIÓN  
DE CASCARILLAS IRRADIADAS CON UV-C**

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

**TEODORO GUILLERMO ALARCON SALEM**

**DIRECTORA: INGENIERA YOLANDA ARGÜELLO**

**Quito, Agosto 2013**

© Universidad Tecnológica Equinoccial. 2013.  
Reservados todos los derechos de reproducción

# DECLARACIÓN

Yo **ALARCON SALEM TEODORO GUILLERMO**, 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 este documento.

La Universidad Tecnológica Equinoccial 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.

---

Alarcón Salem Teodoro Guillermo

1716167182

# CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo que lleva por título “Aprovechamiento de subproductos de cacao CCN-51 para elaboración de bebida alcohólica a partir del exudado de mucilago con adición de cascarillas irradiadas con UV-C”, que, para aspirar al título de Ingeniero de Alimentos fue desarrollado por Teodoro Alarcón, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería; y cumple con las condiciones requeridas por el reglamento de Trabajos de Titulación artículos 18 y 25.

---

Ing. Yolanda Argüello.

**DIRECTORA DEL TRABAJO**

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO**

A Dios, a todas las personas que hicieron posible la culminación de mi carrera.

A mi padre Guillermo Alarcón Bustillos.

A mi madre Marcela Salem Abarca.

A mi hermana Sofía Alarcón Salem.

A mi novia Gabriela Martínez Cifuentes.

Por la dedicación, el tiempo y la paciencia.

Por demostrar fidelidad y ser un ejemplo en mi vida convirtiéndose en mis modelos.

A mis abuelitos por estar junto a mí y apoyarme en todo.

A mi familia en general.

A mi Universidad, la cual me ha formado y me ha entregado las herramientas para representarla de la mejor manera en la sociedad.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
<b>RESÚMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
2.1 ANTECEDENTES.....	4
2.2 UBICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS PAÍSES PRODUCTORES DE CACAO.....	5
2.2.1 VARIEDADES O ECOTIPOS DE CACAO.....	7
2.2.2 VARIEDADES DE CACAO CULTIVADAS.....	8
2.3 CONSUMO.....	11
2.4 CULTIVO DE CACAO EN EL ECUADOR.....	12
2.5 COSECHA.....	13
2.6 TRANSFORMACIÓN INDUSTRIAL DEL CACAO.....	16
2.6.1 SECTORES DE UTILIZACIÓN.....	17
2.6.2 TRANSFORMACIÓN DEL CACAO.....	19
2.6.2.1 Cosecha.....	19
2.6.2.2 Recolección.....	19
2.6.2.3 Pre fermentación.....	20
2.6.2.4 Fermentación.....	20
2.6.2.5 Secado.....	22
2.7 ALMENDRA DE CACAO.....	23
2.8 PULPA DE CACAO.....	24
2.9 CASCARILLA DE CACAO.....	25
2.10 OCRATOXINA A EN CACAO.....	27
2.10.1 MICOLOGÍA Y PRODUCCIÓN.....	27
2.10.2 TÓXICO CINÉTICA.....	28
2.10.3 TOXICIDAD.....	29

2.10.4 LA NEFROPATÍA ENDÉMICA DE LOS BALCANES (NEB).....	29
2.10.5 NEUROTOXICIDAD.....	29
2.10.6 TERATOGENICIDAD.....	30
2.10.7 OTA EN ECUADOR.....	31
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>32</b>
3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MOHOS EN LA CASCARILLA DE CACAO.....	32
3.2 SELECCIÓN DE DOSIS EFECTIVA DE RADIACIÓN UV-C.....	34
3.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	34
3.2.2 INOCULACIÓN.....	35
3.2.3 TRATAMIENTO CON RADIACIÓN UV-C.....	36
3.3 INOCULACIÓN ARTIFICIAL DE MOHOS EN CASCARILLAS DE CACAO.....	37
3.3.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO E INOCULACIÓN DE MOHOS.....	37
3.4 EFECTO DE LA RADIACIÓN UV-C.....	38
3.5 OBTENCIÓN DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DE CACAO....	39
3.5.1 PROCESOS EXTRACCION DE EXUDADO DE MUCILAGO DE CACAO.....	40
3.5.2 COSECHA.....	40
3.5.3 PREFERMENTACION.....	40
3.5.4 SELECCIÓN.....	40
3.5.5 PESADO.....	40
3.5.6 LAVADO Y DESINFECCIÓN.....	41
3.5.7 CORTE.....	41
3.5.8 SEPARACIÓN ALMENDRAS Y PLACENTA.....	41
3.6 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EXUDADO.....	42
3.6.1 ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE EXUDADO DE MUCILAGO DE CACAO.....	43

3.6.2 PROCESO DE ELABORACIÓN DE LOS DISTINTOS MOSTOS.....	43
3.6.3 ELABORACION DE BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO.....	46
3.6.4 ACONDICIONAMIENTO DE MOSTOS.....	47
3.6.5 SULFITADO.....	48
3.6.6 INOCULACIÓN.....	48
3.6.7 ANÁLISIS.....	49
3.6.8 FERMENTACIÓN.....	49
3.6.9 TRASIEGO.....	49
3.6.10 ENVASADO.....	49
3.6.11 MADURACIÓN 1.....	49
3.6.12 TRASIEGO 2.....	49
3.6.13 MADURACIÓN 2.....	50
3.6.14 BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO CON CASCARILLAS IRRADIADAS.....	50
3.7 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA....	50
3.8 ANÁLISIS SENSORIAL DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO.....	52
3.9 DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE DEL VINO DE CACAO.....	53
3.9.1 MÉTODO RELACIÓN BLOUIN Y PEYNAUD.....	53
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MOHOS.....	54
4.2 SELECCIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE RADIACIÓN UV-C (ensayo in vitro).....	55
4.3 INOCULACIÓN ARTIFICIAL DE MOHOS EN CASCARILLAS DE CACAO.....	56
4.3.1 <i>Aspergillus spp.</i> .....	56
4.3.2 <i>Penicillium spp.</i> .....	57



	<b>PÁGINA</b>
4.4 EFECTO DE LA RADIACIÓN UV-C SOBRE EL DESARROLLO DE ASPERGILLUS EN CASCARILLAS DE CACAO. (Ensayo cuantitativo).....	57
4.5 RESULTADO DEL RENDIMIENTO DEL EXUDADO DE MUCILAGO DE CACAO EJERCIENDO PRESION 1:1.....	59
4.6 SEPARACIÓN DE PARTES CONSTITUTIVAS Y PESO INDIVIDUAL: CÁSCARA, ALMENDRAS Y PLACENTA.....	59
4.7 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DE CACAO.....	60
4.7.1 RESULTADOS DE LA ELABORACIÓN DE LOS DISTINTOS MOSTOS PARA LA FERMENTACIÓN.....	61
4.8 RESULTADOS DE LA FERMENTACIÓN DE BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO CCN-51.....	61
4.9 RESULTADOS DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO.....	66
4.10 DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE DEL LICOR DE CACAO.....	68
4.11 RESULTADOS DE ANÁLISIS SENSORIAL DE BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO.....	71
4.11.1 CALIFICACIÓN APARIENCIA.....	73
4.11.2 CALIFICACION COLOR.....	74
4.11.3 CALIFICACION OLOR.....	74
4.11.4 CALIFICACION SABOR.....	75
4.11.5 CALIFICACION ACIDEZ.....	75
4.11.6 CALIFICACION SABOR A CACAO.....	76
4.11.7 CALIFICACION ACEPTABILIDAD GLOBAL.....	76
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>77</b>
5.1 CONCLUSIONES.....	77
5.2 RECOMENDACIONES.....	79
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Límites de los granos defectuosos para su clasificación.....	5
<b>Tabla 2.</b> Países productores de cacao a nivel mundial.....	7
<b>Tabla 3.</b> Diferencia entre el cacao criollo y el forastero.....	11
<b>Tabla 4.</b> Fechas de cosecha en diferentes países.....	14
<b>Tabla 5.</b> Diferencias entre almendras fermentadas adecuadamente y defectuosas.....	23
<b>Tabla 6.</b> Mostos acondicionados para fermentación.....	44
<b>Tabla 7.</b> Parámetros utilizados en formulación de mostos para bebida alcohólica de cacao.....	45
<b>Tabla 8.</b> Mostos corregidos a 22 Brix, escogidos para análisis Físico-Químico.....	51
<b>Tabla 9.</b> Análisis físico-químico del vino de frutas según norma INEN 0374:87.....	51
<b>Tabla 10.</b> Análisis físico-químico del licor de frutas según norma INEN 1932:92.....	52
<b>Tabla 11.</b> Resultados de rendimiento de extracción del jugo exudado de cacao.....	59
<b>Tabla 12.</b> Pesos y porcentaje de partes constitutivas del cacao.....	60
<b>Tabla 13.</b> Resumen características Físico-Químicas exudado de mucílago de cacao.....	60
<b>Tabla 14.</b> Gradiente Brix consumidos/día según tratamientos.....	65
<b>Tabla 15.</b> Azúcares consumidos (g/l) a los 10 días de fermentación...	66
<b>Tabla 16.</b> Resultados análisis Físico – Químicos mostos T1, T3.....	67

<b>Tabla 17.</b> Comparación de resultados del grado alcohólico probable y real del licor de cacao a diez días de fermentación.....	69
<b>Tabla 18.</b> Gradiente Grado Alcohólico Probable según Tratamientos..	71
<b>Tabla 19.</b> Análisis Sensorial por Atributos del Licor de Cacao.....	73
<b>Tabla 20.</b> Calificación apariencia .....	73
<b>Tabla 21.</b> Calificación Color.....	74
<b>Tabla 22.</b> Calificación Olor.....	74
<b>Tabla 23.</b> Calificación Sabor.....	75
<b>Tabla 24.</b> Calificación Acidez.....	75
<b>Tabla 25.</b> Calificación sabor a Cacao .....	76
<b>Tabla 26.</b> Calificación Aceptabilidad Global.....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Fruto de Cacao Fermentado y secado.....	5
<b>Figura 2.</b> Distribución mundial de países productores de Cacao.....	6
<b>Figura 3.</b> Principales países consumidores de cacao.....	12
<b>Figura 4.</b> Proceso de industrialización del cacao.....	18
<b>Figura 5.</b> Incubación <i>Aspergillus spp</i> a 25 C.....	33
<b>Figura 6.</b> Identificación de <i>Aspergillus spp.</i> 10X y 40X.....	34
<b>Figura 7.</b> Inóculo aislado <i>Aspergillus spp.</i> .....	34
<b>Figura 8.</b> Comparación suspensión de propágulos y escala Mac Farland.....	35
<b>Figura 9.</b> Irradiación cajas Petri inoculadas.....	36
<b>Figura 10.</b> Determinación desarrollo fúngico en cascarillas de cacao..	38
<b>Figura 11.</b> Mazorcas de cacao CCN-51 .....	39
<b>Figura 12.</b> Lavado y desinfección mazorcas de cacao.....	41
<b>Figura 13.</b> Corte de mazorcas de cacao.....	41
<b>Figura 14.</b> Separación de almendras de cacao.....	42
<b>Figura 15.</b> Extracción exudado de mucílago de cacao.....	42
<b>Figura 16.</b> Análisis Brix exudado de mucílago de cacao.....	43
<b>Figura 17.</b> Procedimientos realizados en la elaboración de bebida alcohólica de cacao adicionando cascarillas de cacao.....	47
<b>Figura 18.</b> Comparación concentraciones de propágulos y dosis irradiación UV-C.....	55
<b>Figura 19.</b> Cultivo de <i>Aspergillus</i> luego de 21 días de incubación	

	<b>PÁGINA</b>
a 25 C.....	58
<b>Figura 20.</b> Recuento total de mohos y efecto de radiación UV-C durante almacenamiento.....	58
<b>Figura 21.</b> Cinética de fermentación de bebida alcohólica de cacao CCN-51 en base al consumo de azúcares para todos los tratamientos.....	62
<b>Figura 22.</b> Cinética de fermentación de bebida alcohólica de cacao CCN-51 en base al consumo de azúcares entre los tratamientos T2,T4, T6 y T8.....	63
<b>Figura 23.</b> Cinética de fermentación de bebida alcohólica de cacao CCN-51 en base al consumo de azúcares entre los tratamientos T1, T3, T5 y T7.....	64
<b>Figura 24.</b> Grado alcohólico probable para tratamiento 1.....	68
<b>Figura 25.</b> Grado alcohólico probable para tratamiento 3.....	69
<b>Figura 26.</b> Comparación grado alcohólico real y probable; tratamientos 1 y 3.....	70

# ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>PÁGINA</b>
<b>ANEXO 1</b>	
FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO DE IRRADIACIÓN UV-C EN CASCARILLAS DE CACAO CNN-51.....	88
<b>ANEXO 2</b>	
FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL LICOR DE CACAO.....	91
<b>ANEXO 3</b>	
TABLAS DE CONTINGENCIA DE DATOS OBTENIDOS EN LA ELABORACIÓN DE LICOR DE CACAO.....	95
<b>ANEXO 4</b>	
DATOS PROMEDIO Bx, AZUCARES CONSUMIDOS g/L, GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE (RELACIÓN 17.5 gr. DE AZÚCAR- 1°ALCOHOL).....	98
<b>ANEXO 5</b>	
FICHA DE ANÁLISIS SENSORIAL.....	101
<b>ANEXO 6</b>	
TABLA DE FRECUENCIA DE CALIFICACIONES DE ANÁLISIS SENSORIAL DE LICOR DE CACAO.....	103
<b>ANEXO 7</b>	
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL LICOR DE CACAO (TRATAMIENTO 1).....	104

**ANEXO 8**

ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL LICOR DE CACAO  
(TRATAMIENTO 3)..... 105

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue la caracterización física y química de los subproductos para adecuarlas en el proceso de elaboración de una bebida alcohólica, mejorando las características organolépticas con la adición de cascarillas de cacao desinfectadas por radiación UV-C.

Se desarrollaron varios mostos, caracterizados y estandarizados para la fermentación alcohólica de mucílago de cacao, añadiendo cascarillas irradiadas por medio de UV-C, garantizando que la materia prima esté libre de microorganismos, especialmente hongos de los Géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, generadores en ciertas condiciones de humedad y temperatura, de la *Ocratoxina tipo A* (OTA); micotoxina causante de graves problemas de salud en los consumidores de chocolate y derivados del cacao (Jonsyn, Maxwell, Hendrickse, 2003).

Para el tratamiento de desinfección de la cascarilla se aislaron los hongos de la flora natural presente en el cacao de tipo CCN-51, se identificaron las cepas existentes por medio de siembras en cajas de petri con agar Sabouraud.

Las cepas de hongos que se aislaron del cacao fermentado y sometido a condiciones óptimas de desarrollo, fueron los Géneros *Aspergillus* y *Penicillium*; se sometieron a varios niveles de irradiación del tipo UV-C hasta determinar el nivel óptimo de (23 kJ/m<sup>2</sup>) para su inactivación, y evitar la formación de OTA en la bebida alcohólica tipo vino.

Se llevó a cabo la fermentación según el procedimiento estandarizado por Luzuriaga (2011) para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de diversas formulaciones de mostos, tomando en cuenta factores como: cantidad de azúcar para corregir los sólidos solubles, adición y no adición de



levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y porcentaje de cascarilla de cacao irradiada, añadida para su maceración, en niveles de 100% y 50%. Cada mosto se trabajó por duplicado.

Se evaluó la calidad fisicoquímica de las bebidas alcohólicas de los tratamientos experimentales que cumplan con las normas INEN 1932.92 y 0374.87 para licores y vinos de frutas, establecidas respectivamente. Finalmente, se realizó una prueba sensorial con calificación por atributos para cada tratamiento, determinado así el tratamiento de mayor aceptación por parte del consumidor. La bebida alcohólica de mayor valor ponderado fue la elaborada con mosto corregido a 22 °Brix, fermentado con levadura del Género *Saccharomyces Cerevisiae* y con el 50% de cascarillas irradiadas con una dosis UV-C de 23 kJ/m<sup>2</sup>.

## ABSTRACT

The objective of this research was to characterize the physical and chemical products (cocoa processing waste CCN-51), such as mucilage exudate and cocoa husks, to fit in the preparation of an alcoholic beverage improving the organoleptic characteristics with the addition of cocoa husks disinfected by UV-C radiation.

Developed several musts characterized and standardized alcoholic fermentation of adding cocoa husk mucilage irradiated by UV-C, ensuring that the raw material is free of microorganisms, especially fungi of the genera *Penicillium* and *Aspergillus*, trainers under certain conditions of moisture and temperature Ochratoxin A (OTA) mycotoxin causing serious health problems in consumers of chocolate and cocoa products. (Jonsyn, Maxwell, Hendrickse, 2003).

For treatment of the scale disinfection fungi were isolated from natural flora present in cocoa CCN-51 type, identifying existing strains through sowing in petri dishes with agar Sabourou this stage still very relevant in this study.

The fungal strains were isolated from fermented cocoa and optimum under development were the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, and therefore subjected to various levels of irradiation of UV-C type to determine the optimum level (23 kJ / m<sup>2</sup>) for inactivation, and prevent the formation of OTA in wine alcoholic beverage type and produce a product safe for human consumption.

Was conducted by the alcoholic fermentation by Luzuriaga standardized procedure (2011) for the production of an alcoholic beverage from various formulations of must, taking into account factors such as: amount of sugar to correct the soluble solids, addition and no addition yeast (*Saccharomyces*

cerevisiae) and percentage of cocoa husk added for maceration irradiated at levels of 100% and 50%, each must had repeated in duplicate.

We evaluated the physicochemical characteristics of quality experimental treatments that meet standards 1932.92 and 0374.87 INEN for spirits and fruit wines repectivamente and finally established a sensory test was rated by attributes for each treatment, and given the treatment of increased consumer acceptability, being the alcoholic beverage highest weighted value was prepared with wort adjusted to 22 Brix, fermented with yeast of the genus *Saccharomyces Cerevisiae* and 50% of hulls irradiated with a UV dose-C of 23 kJ / m<sup>2</sup>.

## **1. INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

El cacao ecuatoriano es uno de los productos más cotizados a nivel mundial, siendo el cacao fino de aroma o de altura uno de los productos más renombrados por su calidad en elaboración de chocolate principalmente; mas en el Ecuador se cultiva una especie de cacao de tipo CCN-51, mismo que presenta mayor tamaño y por ende mejor rendimiento, lamentablemente presenta menor calidad en cuanto a características organolépticas sensoriales que su contraparte de altura, por lo que el valor del grano de cacao CCN-51 es menor al mencionado; se busca aprovechar los subproductos de este tipo de cacao para crear productos con lo que se dé un mayor valor a sus subproductos o productos de desecho nunca usados en la industria, a no ser para alimentación de ganado específicamente como es el caso de las cascarillas de cacao.

Mediante esta investigación se desea conocer los parámetros necesarios para establecer un margen de seguridad e inocuidad alimentaria en estos productos, con el fin de utilizarlos en pro de la innovación alimentaria en el país.

El cacao en el Ecuador es uno de los productos de mayor demanda a nivel mundial, ya que al poseer una heliofanía de 12 horas, los frutos presentan características únicas y muy apreciadas en la industria chocolatera.

El país exporta el grano como tal o se procesa máximo como pasta de cacao sin darle un mayor valor agregado, peor aún aprovechar los desechos que se producen en los tratamientos propios de tostado y fermentación de la almendra; por lo que en el presente estudio se busca dar un valor a los subproductos que no se utilizan y presentan la calidad biológica y características organolépticas que podrían ser aprovechadas; con tratamientos como la irradiación UV-C para eliminar la contaminación por especies de hongos y evitar la formación de micotoxinas que afectarían a la

salud de los consumidores; así creando una bebida alcohólica a base de subproductos de cacao del tipo CCN-51 tales como el exudado de mucílago y las cascarillas, de esta manera pasaríamos de ser un país exportador de cacao como materia prima a exportadores de productos con un valor agregado especial, seguros e inocuos para el consumo humano.

Para tal propósito se ha planteado los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

Elaborar una bebida alcohólica a partir de exudado de mucílago de cacao, con la adición de las cascarillas de cacao desinfectadas por radiación UV-C.

### **Objetivos Específicos**

- Analizar las características físicas del exudado de mucílago de cacao para su posterior acondicionamiento en la elaboración de una bebida alcohólica.
- Analizar las características microbiológicas de las cascarillas de cacao.
- Establecer los valores o rangos seguros en la irradiación por medio del método UV-C para el tratamiento de eliminación de hongos *Aspergillus* y *Penicillium*; por ende reducción del riesgo de presencia de Ocratoxina A (OTA) en las cascarillas de cacao.
- Aprovechar las características físicas, organolépticas y químicas de los diferentes subproductos del fruto de cacao, tales como pulpa y cascarillas, para la elaboración de una bebida alcohólica con características propias de estos subproductos de la agroindustria del cacao.

- Determinar la mejor formulación de un mosto fermentable para la elaboración de la bebida alcohólica de exudado de mucílago y cascarilla de cacao.

## **2. MARCO TEÓRICO**



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES

El árbol de cacao, (*Theobroma cacao* L., familia *Sterculiaceae*) es normalmente un árbol pequeño, entre 4 y 8 metros hasta 10 metros de alto. El tallo es recto, la madera de color claro, casi blanco; y la corteza es delgada de color café. El fruto (la nuez de cacao) puede alcanzar una longitud de 15-25 centímetros. Cada fruto contiene entre 30 y 40 semillas, que una vez secas y fermentadas se convierten en cacao en grano. Las semillas son de color marrón-rojizo en el exterior y están cubiertas de una pulpa blanca y dulce (Fortin C., United Nations Conference on Trade and Development; 2002).

Sus frutos son una especie de vainas y aparecen sobre la copa de los árboles y debajo de sus ramas. Cuando están maduros, las vainas se cortan y se extraen los frijoles que hay dentro de ellas para luego ser fermentados y secados.

Para obtener una producción ideal, los árboles de cacao necesitan una precipitación anual entre 1150 y 2500 mm y temperaturas entre 21 C y 32 C (Fortin C., United Nations Conference on Trade and Development; 2002).

Los Estándares Internacionales para Cacao requieren que el cacao de calidad negociable sea fermentado, completamente seco, libre de granos con olor a humo, libre de olores anormales y de cualquier evidencia de adulteración; es decir inocuo y de calidad suficiente para su posterior proceso (Figura 1).

Debe encontrarse razonablemente libre de insectos vivos, de granos partidos, fragmentos y partes de cáscara y uniforme en tamaño.



**Figura 1.** Fruto de Cacao fermentado y secado.

En todo el mundo, el nivel estándar para medición del cacao es el procedente de Ghana. En la Tabla 1 se muestra cómo el cacao se clasifica sobre la base de la cuenta de los granos defectuosos en la prueba de corte. Los granos defectuosos no deben exceder los siguientes límites:

**Tabla 1.** Límites de los granos defectuosos para su clasificación, basado en cacao Ghana.

GRADO I	GRADO II
Granos mohosos máximo 3%.	Granos mohosos máximo 4%.
Granos pizarrosos máximo 3%.	Granos pizarrosos máximo 8%.
Granos planos, germinados o dañados por insectos, máximo en total 3%.	Granos planos, germinados o dañados por insectos, máximo en total 6%.

(Fortin C., United Nations Conference on Trade and Development; 2002)

## 2.2 UBICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS PAÍSES PRODUCTORES DE CACAO

En la Figura 2; el mapa indica las áreas de color verde la ubicación y distribución de los países productores de cacao. Como se puede observar, la producción mundial está distribuida entre los países de América del Sur, América Central, México, el Caribe, África, Asia y Oceanía; los cuales cuentan con tierras de bosques húmedos tropicales.



**Figura 2.** Distribución mundial de países productores de Cacao.

(Batista L., 2009)

El cultivo del cacao tuvo su origen en América y principalmente se cultiva en África del Oeste, América Central y Sud América y Asia. Según la producción anual los ocho países principales productores en el mundo son (en orden descendente): Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador y Malasia. Estos países representan el 90% de la producción mundial (Ventura, 2003).

**Tabla 2.** Países productores de cacao a nivel mundial.

<b>América</b>	
Belice	Guatemala
Bolivia	Haití
Brasil	Honduras
Colombia	Jamaica
Costa Rica	México
Cuba	Nicaragua
Dominica	Panamá
Rep. Dominicana	Perú
Ecuador	Santa Lucia
El Salvador	Trinidad y Tobago

<b>África</b>	
Benín	Guineas
Camerún	Liberia
Congo	Madagascar
Congo República Democrática	Sao Tome y Príncipe
Costa de Marfil	Sierra Leona
Guinea Ecuatorial	Tanzania
Gabón	Togo
Ghana	Uganda
Granada	Venezuela

(Batista L., 2009)

### **2.2.1 VARIEDADES O ECOTIPOS DE CACAO**

Existen tres variedades de árboles de cacao. La más conocida es la variedad Forastero, que representa el 90% del cacao producido en el mundo. Se encuentra en África del Oeste y Brasil. El segundo grupo es el Criollo, que produce "cacao fino y de aroma", cultivado principalmente en el Caribe, Venezuela, Nueva Guinea Papúa, las Antillas, Sri Lanka, Timor

Oriental y Java. Por último, existe la variedad Trinitario, que es un cruce entre el Criollo y el Forastero (Villavicencio, 2001).

Existen dos clases de cacao: el cacao básico y el cacao fino y de aroma. Más del 90% del cacao producido cada año puede considerarse como cacao básico o a granel. El cacao básico procede en su mayoría de África y Brasil, en especial de la variedad forastero. El cacao fino y de aroma tiene características distintivas de aroma y sabor, buscadas por los fabricantes de chocolate. Representa únicamente 5% de la producción mundial de cacao (Villavicencio, 2001).

Algunos otros autores consideran que el cacao del Ecuador es un cuarto tipo genético, tomando en consideración sus características de aroma y sabor, las cuales son diferenciadas de los tres grupos mencionados y se denomina Cacao Nacional del Ecuador.

En la Tabla 4, podemos notar con cierto detalle las características genéticas que diferencian el Criollo del Forastero. El Forastero es muy superior al Criollo en su comportamiento a nivel de campo. Sin embargo, el Criollo es mejor en su calidad para el consumo.

## **2.2.2 VARIEDADES DE CACAO CULTIVADAS**

Se pueden citar cinco grandes variedades de cacao cultivados a nivel mundial que son:

**Criollo:** El cacao Criollo es el cacao de “Alta Calidad” por excelencia, es el más raro y el más buscado de todas las variedades de cacao. Su árbol, muy frágil y de bajo rendimiento, requiere un cuidado extremo, un cuidado del cual depende la calidad del chocolate futuro. Este cacao excepcional sólo puede encontrarse en pequeñas cantidades (5 a 10% de la producción mundial de cacao) en las áreas de cacao originales (Villavicencio, 2001).

**Forastero:** La variedad Forastero es el cacao que se cultiva más comúnmente (aprox. 80% de la producción mundial). Resiste bien a las enfermedades y es mucho más productivo que el Criollo. No clasificado como de “Alta Calidad”, este cacao se usa como base, para mezclar con tipos superiores.

**Trinitario:** La variedad de Trinitario es un híbrido de Criollo y Forastero, el cual debe su nombre al cruce obtenido en la isla de Trinidad dónde hace cuatro siglos los españoles cultivaban Criollo. Las plantaciones fueron destruidas por un huracán y después de esto se replantaron con Forastero. Rápidamente, aparecieron híbridos espontáneos entre el Forastero recientemente plantado y el Criollo que había sobrevivido el desastre.

El Trinitario es un cacao excelente y debido a su gran resistencia, generalmente se usa para plantar donde se está sustituyendo Criollo.

Se estima que entre 10 a 15% de la producción del cacao mundial es cacao Trinitario, una variedad que combina los mejores aspectos de las otras dos variedades. Granada, una isla jardín surcada por arroyos y cubierta con montañas, produce Trinitario de “Alta Calidad” apreciado en el mundo entero (Agama & Quiroz, 2006).

**Nacional del Ecuador:** Este tipo fue cultivado exclusivamente hasta 1920, y posee características fijas y constantes semejantes al tipo Forastero amelonado. Existen pocas plantaciones, predominando las que son producto del cruzamiento natural de la variedad local con materiales introducidos desde Venezuela y Trinidad (Agama & Quiroz, 2006).

**CCN-51:** El CCN-51 es un cacao clonado de origen ecuatoriano que el 22 de junio del 2004 fue declarado, mediante acuerdo ministerial, un bien de alta

productividad.

Con esta declaratoria, el Ministerio de Agricultura brinda apoyo para fomentar la producción de este cacao, así como su comercialización y exportación.

“Este cacao es, actualmente, uno de los más productivos del mundo”, comentó Sergio Cedeño Amador, presidente de la Asociación de Productores de Cacao Fino y de Aroma (Aprocafa).

El creador del cacao CCN-51 fue el agrónomo Homero Castro Zurita, con la Colección Castro Naranjal 51. El científico ecuatoriano desarrolló en 1965 un clon de cacao de la doble hibridación de material genético Trinitario y Forastero de origen amazónico. Castro investigó desde 1952 las diversas variedades del grano y finalmente obtuvo la del tipo 51, que es tolerante a las enfermedades, de alta productividad y calidad (Guaman, 2007).

La diferencia de la productividad de este cacao clonado con el cacao criollo (fino y de aroma de gran demanda internacional) es bastante amplia, según los datos de Aprocafa. El grano criollo o nacional tiene una productividad de apenas 6 quintales por hectárea.

Los sembríos cacaoteros de toda variedad están ubicados especialmente en las provincias de Los Ríos, El Oro y Manabí. Dentro de la riqueza productiva agrícola, el grano aporta con más de 6%, pues se mantiene como una de las principales exportaciones del Ecuador. En el mercado externo el país compite con la producción cacaotera de países como Camerún y Brasil.

**Tabla 3.** Diferencia entre el cacao criollo y el forastero.

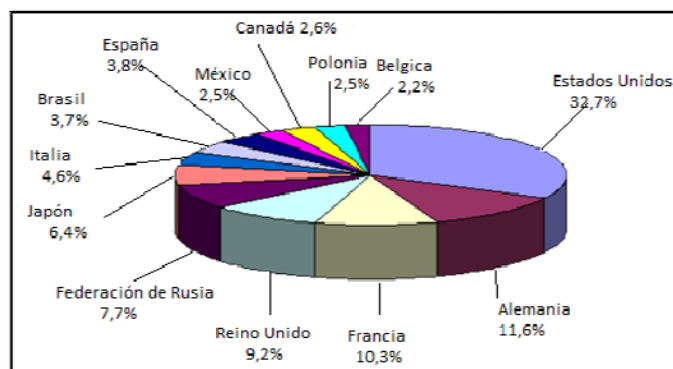
	<b>Criollo</b>	<b>Forastero</b>
Árbol	Débil y pequeño	Robusto y grande
Hojas	Grandes, color verde oscuro	Pequeñas, color verde claro
Mazorcas	Forma cundeamor y angoleta	Amelonado y calabacillo
Cáscara	Fina y suave	Gruesa y dura
Superficie	Rugosa	Lisa
Almendras	Blancas, violeta pálido (rosado) y de forma redondeadas	Pigmentadas, violeta oscuro y de forma aplanada
Plagas	Susceptible	Tolerantes
Sabor	Fino	Ordinario
Adaptación	Pobre y limitada	Muy buena.

(Batista L., 2009)

## **2.3 CONSUMO**

A pesar de que el cacao se produce en los países en desarrollo, se consume principalmente en los países desarrollados. Los compradores en los países consumidores son los transformadores y los productores de chocolate. Unas pocas compañías multinacionales dominan tanto la transformación como la producción de chocolate. El siguiente gráfico representa los principales consumidores de cacao, basado en el consumo doméstico aparente de cacao, que se calcula sumando las moliendas a las importaciones netas de productos de cacao y de chocolate en equivalente en grano.





**Figura 3.** Principales países consumidores de cacao en 2004 y 2005, basado en estadística de ICCO. (UNCTAD, 2005)

Tomando en cuenta las estadísticas de los últimos 30 años, se puede ver en la Figura 5; que con excepción de ocho años, la oferta de cacao ha sido superior a la demanda.

## 2.4 CULTIVO DE CACAO EN EL ECUADOR

La Asociación Nacional de Exportadores de Cacao ANECACAO, emite el certificado de la calidad comercial del cacao de exportación, facultad que ha sido concedida mediante Acuerdo Interministerial MAG-MICIP No. 287 del 22 de junio de 1998 (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2006).

Según el último Censo Agropecuario del 2000; se encuentran vinculadas a la actividad cacaotera alrededor de 100000 personas, de lo que se desprende que en el país se encuentran involucradas alrededor de 100000 familias; si tomamos en cuenta que en cada unidad productiva existen al menos 5 miembros por familia, el número de personas vinculadas es de alrededor de 500000. A esta actividad debemos añadir, los comerciantes, los industriales, el personal de las plantas transformadoras del cacao y los exportadores de cacao en grano. De acuerdo con esta cifra, la Población Económicamente

Activa (PEA) del cacao es de aproximadamente el 12% de la PEA agrícola y el 4% aproximadamente de la PEA total del país.

La producción de cacao aporta al PIB agropecuario en alrededor del 7% y con el 0.40% del PIB total (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2006).

Frente a este panorama es importante la adopción de políticas encaminadas al progreso de este subsector agrícola, a fin de mejorar las plantaciones de cacao, los rendimientos de este producto por hectárea y por lo tanto mejorar el nivel de vida de los productores. Es importante ofrecer un producto de excelente calidad en el mercado internacional, ya que en el caso ecuatoriano se ha perdido prestigio y se puede recuperar la imagen de ser exportador de cacao fino y de aroma, conforme lo efectuó durante siglos. Es importante mejorar la competitividad e incrementar los ingresos provenientes de las exportaciones, tomando en consideración que el ingreso de divisas es uno de los pilares fundamentales para el mantenimiento del proceso de dolarización en nuestra economía (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2006).

## **2.5 COSECHA**

A pesar de que los frutos maduran a lo largo del año, normalmente se llevan a cabo dos cosechas en un año: la cosecha principal y la cosecha intermedia. La cosecha intermedia es en general menor que la cosecha principal, sin embargo, el tamaño relativo varía según a cada país (Fortin C., United Nations Conference on Trade and Development, 2002).

En la Tabla 4; se observa las fechas de cosecha en los países productores de cacao.

**Tabla 4.** Temporadas de cosecha en diferentes países.

<b>País</b>	<b>Cosecha principal</b>	<b>Cosecha intermedia</b>
Brasil	Oct- Marzo	Junio- Sep
Camerún	Sep - Marzo	Mayo- Agost
Costa de Marfil	Oct- Marzo	Mayo- Agost
Ecuador	Marzo-Junio	Oct- Febrero
Ghana	Sep - Marzo	Mayo- Agost
Indonesia	Sep - Dic	Marzo- Julio
Malasia	Sep- Febrer	Marzo- Mayo
Nigeria	Sep- Marzo	Mayo- Agost

(Batista L., 2009)

Se requieren de 5 a 6 meses entre la fertilización y la cosecha de los frutos. La temporada de cosecha dura alrededor de 5 meses. La cosecha del cacao consiste en cortar los frutos maduros de los árboles, abrirlos (normalmente con un machete) y extraer las semillas de los frutos. Estas semillas se ponen a fermentar entre 2 y 8 días antes de secarlas al sol. Los granos se ponen luego en sacos y se embarcan.

El cacao se produce típicamente en minifundios o bajo sistemas de agricultura de subsistencia. Sin embargo, en Malasia y Brasil pueden encontrarse plantaciones y fincas. El cacao se debe sembrar en filas, espaciadas entre sí de 3 metros, lo cual da una densidad de alrededor 950 a 1330 árboles/hectárea, dependiendo de la fertilidad de la tierra y del clima (Fortin C., United Nations Conference on Trade and Development, 2002).

Antes de sembrar el cacao es necesario sembrar árboles de sombra temporal y permanente de 6 a 9 meses. La siembra del cacao debe realizarse en la primera mitad de la temporada de lluvia para tener suficiente tiempo para que el árbol se establezca antes de la siguiente temporada seca. A pesar de que el cacao madura 24 meses después de la siembra inicial, los árboles llegan a ser productivos únicamente después de cinco

años. Los rendimientos son máximos entre el octavo y décimo año, pero se pueden obtener buenos rendimientos durante varias décadas. En condiciones normales, los árboles tradicionales rinden entre 300 y 500 kg/ha por año. Los árboles híbridos presentan rendimientos mayores, por encima de los 1000 kg/ha.

Las condiciones climáticas y las enfermedades son los principales factores que afectan la producción. Se estima que hasta un 30% de la producción mundial se pierde debido a las enfermedades (Fortin C., United Nations Conference on Trade and Development, 2002).

Bajo condiciones normales la producción de mazorcas ocurre a partir del tercer año. El rendimiento promedio estimado en una plantación de híbridos mejorados de 3 años de edad es de 99 libras por tarea (718.08 kg /ha), el cual refleja un rendimiento promedio de 1.50 libras por planta (0.68 kg/planta).

A partir del quinto año de edad, la producción se considera de importancia comercial por su rendimiento de 300 libras/ha, (2,182 kg/ha), lo que indica un rendimiento de 4.28 libras/árbol (1.95 kg/planta) (Fortin C., United Nations Conference on Trade and Development, 2002).

El corte de las mazorcas se realiza cuando tienen entre 5 a 6 meses de formadas.

El color de la superficie cambia de verde a amarillo y de rojo a rojo naranja, indicando su estado óptimo de madurez (Fortin C., United Nations Conference on Trade and Development, 2002).

Cuando el cacao se encuentra en su máxima producción, el corte debe realizarse cada 15 días, evitando que las mazorcas se sobre maduren.

El corte debe realizarse cortando las mazorcas por el pedúnculo con una cuchilla.

Nunca deberá halarse forzando y destruyendo el cojín o punto de la próxima floración.

Después de cortadas, las mazorcas son recolectadas y agrupadas en montones en diferentes puntos de la finca para proceder a la quiebra y descorazonado.

La quiebra y descorazonado de las mazorcas consiste en abrir las mazorcas para extraer las semillas y eliminar la placenta que es donde las semillas están adheridas.

En los últimos años, los pequeños y medianos productores han adoptado la práctica de vender el cacao en estado fresco debido al alto costo que conlleva la construcción de estructuras para fermentación y secado, además del alto costo del manejo (Fortin C., United Nations Conference on Trade and Development, 2002).

## **2.6 TRANSFORMACIÓN INDUSTRIAL DEL CACAO**

La transformación del cacao y la producción de chocolate son dos procesos diferentes que, aunque ligados, requieren diferentes procedimientos para obtener los productos finales. La transformación de cacao significa básicamente convertir el cacao en grano en cacao sin cáscara, licor, manteca, torta y polvo. La fabricación de chocolate incluye la mezcla y refinado del licor de cacao, la manteca de cacao y otros ingredientes tales como la leche y el azúcar (Edeca, 2008).

Para poder iniciar la transformación de los granos, se debe limpiar minuciosamente toda sustancia exterior. Los granos pueden ser tostados

con o sin la cáscara. En general los fabricantes de chocolate prefieren tostar los granos antes de extraer la cáscara, mientras que los transformadores de cacao prefieren tostar el grano sin cáscara.

Una vez tostados los granos y la cáscara extraída, se muele el cacao sin cáscara hasta obtener una pasta que se conoce como licor de cacao. El licor de cacao que se destina a la transformación en manteca de cacao y torta se refina hasta obtener partículas muy pequeñas, mientras que si su destino es la fabricación de chocolate no es necesario molerlo tan finamente. El licor debe pasar por unas prensas hidráulicas que extraen un porcentaje de manteca de cacao, dejando atrás la torta de cacao. (Edeca, 2008).

La torta de cacao se muele hasta obtener un polvo fino se utiliza principalmente en la industria de la confitería y la panadería. La manteca de cacao se utiliza en la fabricación de chocolate, mezclándose con licor de cacao y azúcar. Una vez combinada, se vierte esta mezcla dentro de grandes agitadores llamados conches, que la remueven a altas temperaturas. Este proceso alisa las partículas y puede tomar entre algunas horas y tres días. El chocolate líquido obtenido será utilizado por la industria de confitería, de panadería o de productos lácteos o será convertido en barras para la venta en el mercado (Barazarte, Sangronis & Unai, 2011).

### **2.6.1 SECTORES DE UTILIZACIÓN**

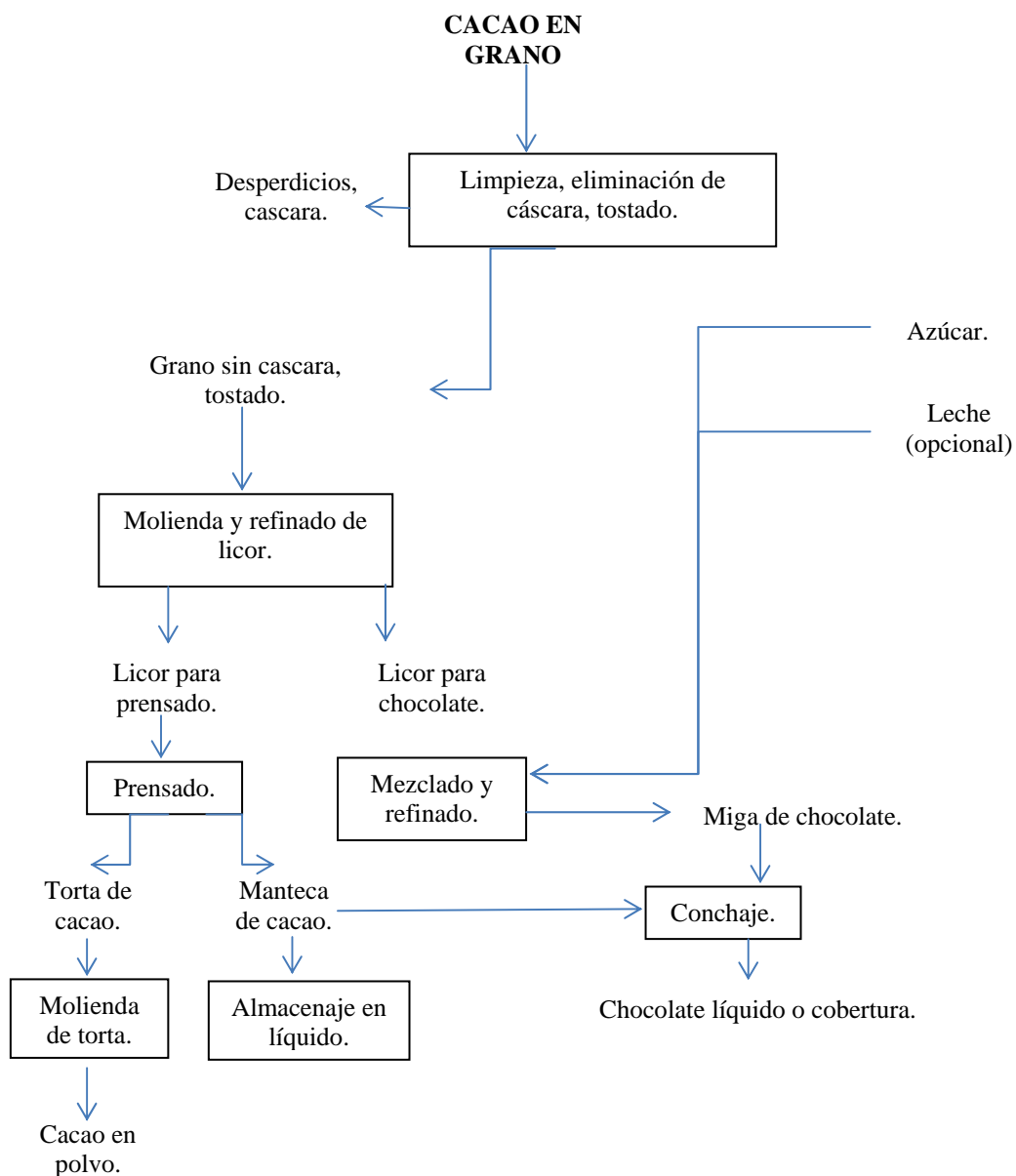
A partir de las semillas del cacao se obtiene el cacao en grano, los cuatros productos intermedios (licor de cacao, manteca de cacao, pasta de cacao y cacao en polvo) y el chocolate. A pesar de que el mercado de chocolate es el mayor consumidor de cacao en términos de equivalente en grano, productos intermedios tales como el cacao en polvo y la manteca de cacao son utilizados en diversas áreas (Braudeau, 2003).

El cacao en polvo se usa esencialmente para dar sabor a galletas, helados, bebidas y tortas. Además de su utilización para dar sabor, se emplea

también en la producción de coberturas para confitería y en postres congelados.

En medicina tradicional es un remedio para las quemaduras, la tos, los labios secos, la fiebre, la malaria, el reumatismo, las mordidas de culebra y otras heridas. Se dice que es antiséptico y diurético

En la Figura 4 se observa el proceso de industrialización de cacao.



**Figura 4.** Proceso de industrialización del cacao.

(Barazarte et al., 2011)

## **2.6.2 TRANSFORMACIÓN DEL CACAO**

Para transformar el cacao en un producto de valor se debe realizar procesos tales como la cosecha, recolección, selección, partido y desgranado; además de una pre fermentación, fermentación, secado y almacenamiento para conservarlo adecuadamente hasta su proceso industrial (Agama & Quiroz, 2006).

### **2.6.2.1 Cosecha**

Se empieza cuando la mazorca está completamente madura, lo que se advierte por sus caracteres externos, especialmente el color (amarillo-rojizo); el sonido de la mazorca cambia a consecuencia de haberse soltado los granos y la pulpa de las paredes (Nosti, 2009).

### **2.6.2.2 Recolección**

Tras separar el fruto del árbol, se procede a partirlo a mano, y separar la pulpa y la cáscara de los granos de cacao, que es la parte valiosa del fruto. Es importante que el grano quede limpio de pulpa y cáscara para que el proceso de fermentación llegue a buen término (Fernández, 2010).

La recolección del cacao se lleva a cabo durante todo el año, especialmente de mayo a diciembre, aunque en lugares como África se realiza entre septiembre y febrero.

El recolector sabe cuando llega el momento de la cosecha guiándose por el sonido que produce la vaina al ser golpeada, además de por su color. La recogida de los frutos se realiza manualmente con un cuchillo especial unido a un palo que permite la recolección de los frutos de las ramas superiores.



La habilidad del obrero es esencial para evitar tales lesiones, pues el corte debe darse limpiamente, sin herir la mazorca y mucho menos el cojinete floral o sus proximidades, o sea que teóricamente el corte ha de separar el pedúnculo de su parte basal ensanchada. El trozo de pedúnculo que queda en el árbol se seca y cae, cicatrizando perfectamente el ensanchamiento basal; por esto el corte ideal se consigue con tijeras de podar pequeñas (Nosti, 2009).

### **2.6.2.3 Pre fermentación**

La pre fermentación tiene lugar en la mazorca del cacao, es recomendable una vez cosechado dejar el fruto 24 horas en almacenamiento antes de pasar a la sala de fermentación, tomando en cuenta la temperatura y no pasar nunca del tiempo establecido, ya que puede causar una sobre fermentación, cambiando las características deseadas.

### **2.6.2.4 Fermentación**

Inmediatamente el cacao llega a la sala de fermentación se deposita en cajas de madera o se acumula en montones o se deja en sacos en el mismo secadero.

La fermentación es el proceso mediante el cual los granos son sometidos a altas temperatura, provocadas por levaduras y bacterias que invaden el mucílago de la masa de las almendras sometidas al proceso (Batista L., 2009).

Este procedimiento tiene como objetivo provocar la muerte del embrión de las almendras, eliminar el mucílago, dejando las semillas limpias, y promover la eliminación de una serie de ácidos amargos indeseables logrando así el desarrollo de las características orgánicas típicas de un buen cacao, como son el aroma, el sabor, y el color.

El proceso de fermentación del cacao se desarrolla en varias etapas, transformaciones físicas y químicas que ocurren en el interior y exterior de las almendras.

Estas etapas de la fermentación son conocidas como: Fermentación Aeróbica y Fermentación Anaeróbica.

En un proceso de beneficiado para la producción de cacao de una buena calidad final, es de mucho cuidado tener en cuenta la relación entre la temperatura, la acción de los microorganismos y la presencia de oxígeno, con precisiones en la cantidad y el tiempo de las remociones.

Según Acebey & Rodríguez (2002), el manejo correcto para las fermentaciones anaeróbicas y aeróbicas son claves para el acabado final de un buen producto.

En cambio, cuando no se observan las técnicas apropiadas, como precisión de las remociones, ocurren cambios bioquímicos indeseables durante la fermentación.

Estos resultan en un producto final de mala calidad que se convierte en una pérdida comercial, debido al mal olor, mal sabor y mala presentación del cacao. Estos procesos inapropiados son conocidos como: fermentación láctica y fermentación butírica.

Mediante la fermentación los granos de cacao llegan a desarrollar los precursores del sabor y aroma que les son característicos, y que se terminan de obtener durante el tostado. La fermentación se lleva a cabo de diversas formas, pero todas se basan en apilar una cantidad de almendras frescas, con la pulpa suficiente para que los microorganismos produzcan calor, elevando la temperatura e impidiendo que mucho aire circule entre las almendras (Agama & Quiroz, 2006).

### **2.6.2.5 Secado**

Para que el producto pueda ser almacenado, con la seguridad de que no se afectará por causa del ataque de hongos, es necesario acondicionar su humedad a un contenido de agua cercano a 7%. De otro lado, debe tenerse en cuenta, que durante el proceso de secado del grano continúa el desarrollo de algunos de los procesos de transformación física y química, los cuales no alcanzan a completarse mientras el producto están en la pila de la fermentación. Durante esta etapa se termina la oxidación y transformación de los polifenoles desapareciendo por completo el color violeta de las almendras, con lo que el grano se torna totalmente marrón, generando las características organolépticas deseables (Buchert, 2000).

Las condiciones más favorables del secado se obtienen cuando se realizan con el calor del sol, que es la fuente más barata y adecuada. Si se utiliza secado artificial debe tenerse cuidado para que la temperatura no sobrepase los 60 grados centígrados. El proceso debe ser lento y a bajas temperaturas al principio del secado, por lo cual el primer día de asoleada, es aconsejable utilizar la plena exposición solo durante las primeras y las últimas horas del día (Buchert, 2000).

En el proceso de secado, se remueve la masa de cacao frecuentemente para la distribución pareja del calor y el secado uniformes. Para ello deben usarse utensilios de madera y en ningún momento herramientas metálicas que se deterioran y causan perjuicios a la apariencia del grano (Buchert, 2000).

En el cacao fermentado y otro que no lo esté pueden establecerse las siguientes características:

**Tabla 5.** Diferencias entre almendras fermentadas adecuadamente y defectuosas.

<i>Almendra seca bien fermentada</i>	<i>Almendra seca sin fermentar o mal fermentada</i>
Hinchada o más gruesa	Más bien aplanada
La cáscara se separa fácilmente	Por lo general es difícil separar la cáscara
Color marrón o chocolate	Color violáceo en su interior o blanquecino
Naturaleza quebradiza	Naturaleza compacta
Sabor medianamente amargo	Sabor astringente
Aroma agradable	Aroma desagradable

(Márquez & Aguirre, 2003)

## 2.7 ALMENDRA DE CACAO

Entre los parámetros que influyen en la selección de un determinado tipo de cacao por los fabricantes de chocolate, se encuentran aspectos físicos tales como, el tamaño del grano, el porcentaje de cáscara, contenido de grasa, dureza de la manteca y la humedad (Álvarez, 2004).

Los fabricantes de chocolate le dan enorme importancia y frecuentemente monitorean el sabor y la calidad del chocolate que fabrican, ya que estos parámetros afectan la demanda de los productos.

Sabores extraños ocasionados por mohos, el humo, la acidez y la astringencia son el resultado de los factores condicionantes de la calidad final de las almendras durante la pos cosecha (fermentación y secado).

El tamaño de la almendra es importante porque puede afectar al rendimiento de grasa. Los fabricantes prefieren comprar almendras con porcentajes más bajo de cascarillas compatible con una adecuada protección de la almendra.

Según el Manual de Productos Básicos (UNCTAD, 1991) los promedios de almendras en peso menores de uno suministran altos porcentajes de cascarillas con bajos niveles en el contenido graso (Álvarez, 2004).

Resulta evidente que la calidad aromática de un chocolate está relacionada con el origen de las almendras, con la fermentación y secado y con el proceso de tostado (Cross & Jeanjean, 1997). El aroma del cacao está constituido por una fracción constitutiva, presente en la almendra fresca, de una fracción desarrollada durante la fermentación y secado y por último, por una fracción formada durante el tostado (Cross & Jeanjean, 1997).

## **2.8 PULPA DE CACAO**

Las semillas de cacao están rodeadas por una pulpa aromática la cual procede de sus tegumentos. La pulpa mucilaginosa está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%), y sales (8-10%). Durante el proceso de cosecha de las semillas de cacao (el producto de exportación), la pulpa es removida por fermentación e hidrolizada por microorganismos. La pulpa hidrolizada es conocida en la industria como "exudado". Durante la fermentación la pulpa provee el sustrato para varios microorganismos que son esenciales para el desarrollo de los precursores del sabor del chocolate, los cuales son expresados completamente después, durante el proceso de tostado. Aunque la pulpa es necesaria para la fermentación, a menudo hay más pulpa de la necesaria este exceso de pulpa tiene un delicioso sabor tropical. (Kalvatchev, 1998).

Aproximadamente 40 litros de pulpa se pueden obtener de 800 kilos de semillas frescas (Kalvatchev, 1998).

El exudado de cacao se puede utilizar para producir nata, un producto parecido al agar y consumido como postre en Asia (Samsiah, Lan & Chong, 1991).

La pulpa puede ser consumida fresca en forma de jugos o batidos. Además, la pulpa se puede preservar por congelación y ser utilizada para dar sabor a helados y yogures (Kalvatchev, 1998).

## **2.9 CASCARILLA DE CACAO**

La cáscara del cacao posee un pigmento que es un poliflavonoglucosido con peso molecular sobre los 1500, este pigmento es muy requerido por ser resistente a calor y luz, muy estable a pH de 3 a 11, y muy usado como colorante de alimentos (Leung, 1980).

Cada tonelada de semilla seca representa cerca de 10 toneladas de cáscara del cacao (peso fresco). Hoy en día, las cáscaras son producto de desecho de la industria del cacao, y representa un grave problema para las industrias deshacerse de él. Este desecho se convierte en una fuente significativa de enfermedades cuando es usado como abono en las plantaciones. Las cáscaras frescas o secas pueden ser utilizadas como alimento para el ganado. El contenido de teobromina restringe la proporción en la cual puede ser consumido, por lo que su uso ha sido limitado.

Reportes indican que este alimento puede constituir el 20% de una ración para aves de corral, de 30-50% para cerdos, y 50% para ovejas, cabras y ganado lechero (Wood & Lass, 1985).

Su aceptación por los animales es satisfactoria. La cáscara de cacao contiene de 3-4% de sales de potasio sobre base seca (Wood & Lass, 1985).

La ceniza ha sido usada para fabricar jabón en Ghana y Nigeria (Odwole & Arueya, 1990).

Es rica en magnesio y teobromina y muy útil en caso de debilidad, diarrea e inflamación.

El cacao, originario de América Central, era ya cultivado y consumido, tanto su semilla como su cáscara, por los antiguos mayas hace más de 2.500 años. Precisamente en su cascarilla se hallan sus principales propiedades terapéuticas y medicinales (Cuesta, 2007).

Además de ser rico en magnesio, ácidos oleico y linoleico, vitaminas y pectinas, la cáscara de cacao es rica en el alcaloide teobromina que le confiere sus virtudes más relevantes sobre la salud, siendo un excelente aliado en caso de:

Cuadros inflamatorios. La teobromina es diurética y antiinflamatoria, por lo que resulta un buen tratamiento complementario para paliar la retención de líquidos o edemas en el organismo. Para ello se tomará en decocción dos veces al día a razón de una cucharada de cáscara de cacao por dosis.

Deficiencia de magnesio. En todo tipo de deficiencias de magnesio, la decocción de la cáscara de cacao ofrece un buen aporte de este mineral. Sus efectos se notan a largo plazo. Puede endulzarse con miel o un poco de azúcar integral de caña para que no resulte excesivamente amarga.

La teobromina es un estimulante suave, por lo que resulta un buen sustitutivo del café, cuya cafeína es mucho más excitante (Cuesta, 2007).

Es eficaz para cortar diarreas y recobrar el buen funcionamiento del intestino, con la ventaja sobre otras sustancias de que elimina las bacterias patógenas intestinales, propias de las diarreas (Cuesta, 2007).

La cáscara de cacao puede adquirirse en herboristerías y tiendas de dietética, y aunque es un alimento natural, no deben tomarlo aquellas personas que presenten alergias a los derivados del cacao, estreñimiento, acné, hipercolesterolemia grave y dolencias renales (Reyes, Vivas, & Romero, 2004).

Pese a todos sus beneficios la cascarilla de cacao en el país no es utilizada industrialmente, por lo que se pretende incorporarla en el mucílago exudado para su fermentación y creación de una bebida alcohólica con características propias de cacao mejoradas y evitar el desecho de una materia prima llena de beneficios.

## **2.10 OCRATOXINA A EN CACAO**

Las ocratoxinas constituyen una familia de toxinas cuya estructura molecular consiste en un núcleo de isocumarina unido a una molécula de L-fenilalanina mediante un enlace amida (Krogh, 2000).

De todas ellas, la más importante es la ocratoxina A (OTA) (C.A. No.303-47-9), aislada por primera vez a partir de cultivos de *Aspergillus ochraceus*. (Van der Merwe, Steyn, Fourie, Scott & Theron; 1965).

La OTA es una micotoxina mayoritariamente presente en las contaminaciones primarias por mohos de muchos productos vegetales y de modo particular en cereales y legumbres de regiones geográficas tanto templadas como frías y húmedas. Puede considerarse como una de las micotoxinas más frecuentes en la contaminación de los granos de cereales, junto a las aflatoxinas y las toxinas del género *Fusarium* y *Alternaria* (López, 2001).



### **2.10.1 MICOLOGÍA Y PRODUCCIÓN**

Los hongos productores de OTA pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, el primero dominante en climas tropicales y el segundo en climas fríos o templados (López, 2001).

Por este motivo se ha propuesto que la ocratoxicosis en Alemania y Escandinavia podría estar relacionada con el género *Penicillium*, mientras que en Francia lo estaría con el *Aspergillus*, misma lógica se aplica al Ecuador, ya que al poseer clima templado es mayor la presencia de *Aspergillus* (Creppy, Betbeder & Gharbi, 1991).

### **2.10.2 TÓXICO CINÉTICA**

La mayoría de especies animales presentan una primera y rápida absorción de la OTA en el estómago facilitada por sus propiedades ácidas, seguida de una absorción intestinal lenta, cuando entre la sangre y la luz intestinal se da un gradiente de concentración favorable (Galtier, 1991).

Una de las propiedades toxicocinéticas más significativas de la OTA es su alta afinidad por proteínas plasmáticas. Esta unión será determinante de la persistencia de la toxina en la sangre y por lo tanto de su toxicidad (Delacruz & Bach, 1990).

En la mayoría de los mamíferos la acumulación de la OTA se da principalmente en el riñón, seguido de otros órganos como hígado, páncreas e intestino. Sin embargo en las aves, la toxina no presenta una acumulación importante en ningún órgano particular (Fuchs, Appelgren, Hagelberg & Hult, 1992).

En cuanto a su eliminación, la excreción renal parece ser el principal mecanismo, condicionado como ya se ha indicado por la unión de la OTA a proteínas plasmáticas (Hamilton, Huff, Harris & Wyatt, 2002).

Debido a que la leche materna es el primer y único alimento de los niños, podría suponer un peligro para lactantes pudiendo incluso superar en algunos casos los niveles máximos tolerados (Omar, Hasinoff, Mejilla & Rahimtula, 2000).

### **2.10.3 TOXICIDAD**

Dosis elevadas y únicas de la toxina pueden dar lugar a una intoxicación aguda cuyos principales signos clínicos son anorexia, pérdida de peso, poliuria, polidipsia, hemorragias digestivas y deshidratación, que provocan la muerte pocas semanas después de la administración (López, 2001).

La ingestión de alimentos contaminados, aunque siempre con dosis menores de 0.2 mg/kg de peso corporal, durante periodos inferiores a 4 meses, da lugar a la aparición de un efecto tóxico renal en todas las especies de mamíferos monogástricos (Dörrenhaus & Föllmann, 2004).

### **2.10.4 LA NEFROPATÍA ENDÉMICA DE LOS BALKANES (NEB)**

La NEB fue descrita por primera vez a finales de 1950 y consiste en una insuficiencia renal crónica bilateral frecuentemente asociada a uroteliomas y carcinoma renal (Plestina, 2002).

Los síntomas suelen ser anemia, proteinuria, amarillamiento de la piel, dolor de cabeza, anorexia y uremia. Los signos patológicos hallados en los enfermos fallecidos como consecuencia de NEB son: una marcada reducción del tamaño del riñón y ciertos cambios en el córtex renal como

fibrosis intersticial, hialinización glomerular, degeneración del epitelio tubular y pérdida del borde en cepillo del túbulo renal (Plestina, 2002).

### **2.10.5 NEUROTOXICIDAD**

La OTA se acumula en el encéfalo y en su actividad toxico dinámica tiene como receptores algunas estructuras integradas en el mesencéfalo ventral, hipocampo, estriado y cerebelo. En experimentos de carcinogénesis realizados con ratas y ratones, la administración crónica de OTA puede provocar cáncer hepático y renal (Fukui et al, 1987).

### **2.10.6 TERATOGENICIDAD**

La OTA ha resultado teratogénica en ratón, rata, hamster y gallina pero no en cerdo, debido probablemente a diferencias en la desigual transferencia placentaria entre las especies. Se ha visto que una de las principales dianas es el sistema nervioso central y se han observado malformaciones craneales en los fetos (Fukui et al, 1987).

Según estudios realizados de varias muestras de chocolate y derivados del cacao de diversos países para identificación de OTA; ciento ocho muestras fueron adquiridas en España, las 188 restantes se obtuvieron en quince países extranjeros: Alemania (n = 45), EE. UU. (n = 20), Holanda (n = 22), Gran Bretaña (n = 16), Bélgica (n = 15), Suiza (n = 15), Noruega (n = 13), Francia (n = 12), Hungría (n = 7), Suecia (n = 6), Dinamarca (n = 6), Italia (n = 4), Ucrania (n = 3), Argentina (n = 2) Y Japón (n = 2).

Aplicando un método analítico, basado en la utilización de columnas de inmuno afinidad y cromatografía líquida con adición post columna de hidróxido amónico, con un límite de cuantificación de 0, 012 ug/kg. Se ha detectado la presencia de OTA en todas excepto una, de las muestras analizadas (99, 7% positivas) (Burdaspal & Legarda, 2003).

Los resultados obtenidos en los productos derivados del cacao comercializados, implican que un consumidor de 60 kg de peso, con un consumo medio de 8,6 g/día, una ingesta aproximada de 2,14 ng/día de OTA (0,036 ng/kg de peso corporal/día), lo cual representa el 0,26% y el 0,71 % de la ingesta máxima diaria tolerable, establecida y revisada por el Comité Mixto FAO/OMS sobre Aditivos Alimentarios en el año 2001 (Burdaspal & Legarda, 2003).

Estos datos nos demuestran tanto la susceptibilidad del cacao a la contaminación con OTA, como la amplitud de la exposición a esta toxina y el hecho de que el consumo de productos derivados del cacao en condiciones normales parece suponer una fracción muy minoritaria de la ingesta diaria tolerable de OTA en la dieta.

#### **2.10.7 OTA EN ECUADOR**

Con el apoyo de la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao (Anecacao) el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, realizó un análisis a 45 muestras de la cosecha de cacao 2010, a 15 empresas exportadoras de las provincias de Guayas, Los Ríos y Santo Domingo de los Tsáchilas para verificar la calidad de cacao que se está exportando y si contenía en algún grado la ocratoxina A, que es considerada cancerígena y que está en constante supervisión en los sistemas de alerta de la Unión Europea.

“El resultado de esta investigación en todas las muestras analizadas fue de 0%, de incidencia de ocratoxina A, lo que garantiza la calidad e inocuidad del cacao de producción nacional” (Espín, 2012).

Esta noticia investigativa es de mucha importancia ya que al ser el cacao uno de los principales productos de exportación del país, se muestra una seguridad relativa sobre el tema de OTA en el cacao nacional, no así en los

subproductos que no son utilizados de manera industrial; tales como los que se propone utilizar en esta investigación, como son las cascarillas de cacao.

### **3. METODOLOGÍA**

### **3. METODOLOGÍA**

A continuación se detalla la metodología aplicada en el análisis de las características físicas del exudado de mucilago de cacao, el aislamiento e identificación de mohos en cascarilla de cacao, la selección de la dosis efectiva de la radiación UV-C para eliminar los hongos productores de Ocratoxina A, la elaboración de una bebida alcohólica a partir del mosto de mucilago de cacao, la incorporación de las cascarillas irradiadas en el mosto fermentable para la creación de un licor a base de cacao con mejores características organolépticas a las del vino de cacao (*Theobroma cacao L.*) (Luzuriaga, 2011).

#### **3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MOHOS EN LA CASCARILLA DE CACAO**

En la primera fase del estudio se aislaron e identificaron mohos causantes del apareamiento de Ocratoxina A en cacao (*Theobroma cacao L.*).

Se pesó una muestra de 10g de cacao y se suspendió en 90 ml de agua destilada estéril (dilución 10-1).

Se homogenizó y, a partir de ésta, se realizaron cinco diluciones sucesivas ( $10^{-5}$ ) en tubos de ensayo que contenían 9 ml de agua destilada estéril.

A partir de estas diluciones se inoculó 1 ml por la técnica de vertido en cajas de Petri con agar Sabouraud. Estas muestras se incubaron de 3 a 5 días en una incubadora marca FANEM, modelo 502 a una temperatura de 25 C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se observaron los diferentes tipos de hongos según las características de las colonias, de cada colonia diferente se tomó con el asa de inoculación una porción de micelio que se inoculó por

depósito en el centro de una caja petri con agar Sabouraud, con el fin de aislar los hongos encontrados; (Figura 5).

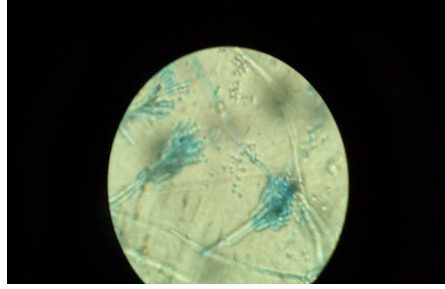


**Figura 5.** Incubación *Aspergillus spp.* a 25 C.

Estas muestras se incubaron a 25 C y los resultados se observaron luego de 3 a 5 días. Este procedimiento se repitió hasta obtener, visualmente, colonias puras de cada tipo de hongo aislado. La pureza del cultivo se comprobó realizando una tinción con azul de lactofenol.

La identificación de los hongos se realizó mediante la observación microscópica, utilizando un microscopio binocular modelo CARL ZEISS - JENA, Alemania, con tinción simple utilizando azul de lactofenol y se comparó la morfología de cada hongo en el Manual Introduction to Food-Borne Fungi (Samson, Hoekstra, Frisvad & Filtenborg, 1995). De esta forma se determinó el género y especie de cada uno de los hongos aislados. (Figura 6).





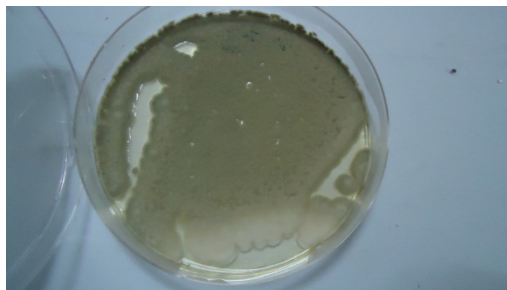
**Figura 6.** Identificación de *Aspergillus spp.* 40X.

### **3.2 SELECCIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE RADIACIÓN UV-C**

Con el fin de determinar la dosis efectiva de radiación UV-C para el control del crecimiento de mohos aislados e identificados en el cacao, se realizó un análisis al que se denominó ensayo cuantitativo in vitro según se detalla a continuación.

#### **3.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

La preparación del inóculo se realizó a partir de cultivos de cada hongo aislado e identificado crecido por 5 días a 25 C, en agar Sabouraud, como se observa en la Figura 7.



**Figura 7.** Inóculo aislado de *Aspergillus spp.*

Se prepararon suspensiones acuosas de conidios, mediante la remoción del micelio y esporas utilizando un hisopo estéril.

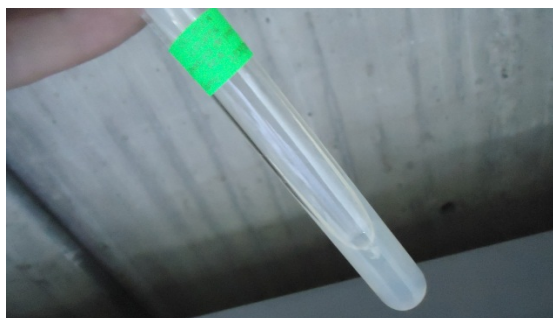
La concentración de propágulos (esporas y micelio) fue determinada a través del estándar Mac Farland.

La escala Mac Farland relaciona “la turbidez de patrones de sulfato bórico” (mezcla de cloruro bórico al 1% y ácido sulfúrico al 1%) con el número de bacterias presentes en una muestra (Arcos, 1998).

Esta escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario ( $BaCl_2$ ) en presencia del ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ); está compuesta por 10 patrones, cada uno con diferente composición los cuales permiten interpretar aproximadamente la concentración de las diluciones bacterianas (Díaz, Fernández, García, de la Hoz & Ordoñez, 1997).

### 3.2.2 INOCULACIÓN

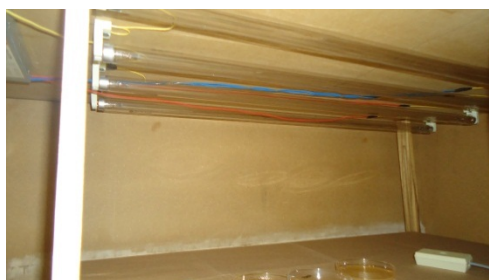
Se utilizó el estándar Mac Farland #2, que equivale a una concentración de  $6 \times 10^8$  UFC/ml y la interpretación se realizó por comparación visual. A partir de la suspensión de esporas preparada, se realizaron diluciones sucesivas hasta  $10^4$ . De las diluciones de  $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^4$  se tomaron 100  $\mu$ L de cada una de éstas y se inocularon por la técnica de extensión con perlas de vidrio estériles en agar Sabouraud. Figura 8.



**Figura 8.** Comparación suspensión de propágulos y escala Mac Farland.

### 3.2.3 TRATAMIENTO CON RADIACIÓN UV-C

Inmediatamente después de la inoculación, las cajas petri se colocaron destapadas bajo cuatro lámparas UV-C (lámpara UV Germicida G30T8) a una distancia de 30 cm y se irradiaron con dosis de 12 y 23 kJ/m<sup>2</sup>, según datos obtenidos experimentalmente de dosis UV-C. La intensidad de la radiación se midió con un radiómetro digital UV (UVX Radiometer UVP). Las cajas inoculadas e irradiadas fueron incubadas de 3-5 días con una temperatura de 25 C, a estas muestras se las denominó tratadas irradiadas. De las mismas diluciones (10<sup>8</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>4</sup>) se inocularon e incubaron muestras directamente a 25 C es decir, sin someter a radiación UV-C y a estas se les denominó control (no irradiados). Como se observa en la Figura 9.



**Figura 9.** Irradiación cajas Petri inoculadas.

Transcurrido el tiempo de incubación se observó el crecimiento de los mohos en las cajas petri tratadas y controles; se realizó el recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Se comparó el crecimiento de cada uno de los mohos y las diferentes diluciones inoculadas y se determinó la dosis de radiación UV-C que produjo menor crecimiento de mohos.

Las dosis de 12 y 23 kJ/m<sup>2</sup> de radiación UV-C se determinaron en una primera fase del proyecto de investigación “Estudio de la aplicación de radiación UV-C y atmósfera modificada para disminuir el deterioro de uvilla (*Physalis peruviana* L.) de exportación” desarrollado en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería de la Universidad Tecnológica Equinoccial.

### **3.3 INOCULACIÓN ARTIFICIAL DE MOHOS EN CASCARILLAS DE CACAO**

Con el fin de conocer el efecto de la radiación UV-C sobre el crecimiento de mohos inoculados artificialmente en cáscaras de cacao, se realizó un ensayo de carácter cualitativo in vivo, con el fin de determinar el tiempo de almacenamiento en el que las cascaras de cacao presenten desarrollo fúngico.

#### **3.3.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO E INOCULACIÓN DE MOHOS**

De cada uno de los mohos aislados e identificados se preparó una suspensión acuosa de propágulos.

Como se indicó anteriormente, de las diluciones  $10^8$ ,  $10^6$  y  $10^4$  se realizó la inoculación de las esporas y micelio por aspersion con un atomizador plástico estéril, sobre cascaras de cacao.

Las bandejas se dividieron en 2 grupos: “control” y “tratadas” respectivamente. Las bandejas se incubaron a una temperatura de 25 C y se inspeccionó cada 3 días hasta observar que exista desarrollo fúngico en cascaras de cacao (Figura10).



**Figura 10.** Determinación desarrollo fúngico en cascarillas de cacao.

### **3.4 EFECTO DE LA RADIACIÓN UV-C SOBRE EL DESARROLLO DE MOHOS EN LA CASCARILLA DE CACAO**

El efecto de la radiación UV-C sobre los microorganismos puede variar de especie a especie, e incluso en la misma especie según el medio de cultivo utilizado, el tipo de célula, fase del cultivo y densidad del microorganismo (Wright, H., Cairns, W, 2000).

En este sentido, con el fin de conocer el efecto de la radiación UV-C sobre el desarrollo de mohos en las cascarillas de cacao, se realizó un análisis cuantitativo in vivo. La preparación del inóculo y la inoculación de mohos se realizaron, con la diferencia de que se realizó el recuento de mohos, utilizando un método de conteo estándar, en las muestras tratadas y controles. Las bandejas inoculadas artificialmente se incubaron a 25 C durante 21 días.

Según el estándar Mac Farland, se pesaron 10g de cascarillas de cacao inoculadas artificialmente con concentraciones  $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^4$  UFC/mL y se homogenizó en 90 ml de agua destilada estéril (dilución 10-1) a partir de la cual se realizaron dos diluciones sucesivas (10-2 y 10-3), de cada una de estas se tomó 1 mL y se inoculó por vertido en cajas petri con agar

Sabouraud. Al quinto día de incubación a 25 C, se realizó el recuento de UFC/g.

El recuento de mohos se realizó después de la inoculación y del tratamiento con luz UV-C (día 0) y a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento, tiempo en el que se observó el desarrollo fúngico según el análisis cualitativo. El análisis se realizó por duplicado.

### **3.5 OBTENCIÓN DEL EXUDADO DEL MUCÍLAGO DE CACAO**

Las mazorcas de cacao fueron recolectadas en varias fincas de la zona de Santo Domingo de los Tsáchilas, teniendo en cuenta el mismo tipo de Cacao de clase CCN-51, típica de esta zona del país.

La recolección se llevó a cabo en forma manual, veinticuatro horas antes de su procesamiento en la planta piloto de alimentos de la Universidad Tecnológica Equinoccial.

Para la selección de las mazorcas a ser procesadas se tomó en cuenta su madurez (color) y apariencia física que nos puede alertar de enfermedad o presencia de hongos en la mazorca.



**Figura 11.** Mazorcas de cacao CCN-51.

### **3.5.1 PROCESOS EXTRACCION DE EXUDADO DE MUCILAGO DE CACAO**

Siendo la presente Tesis la continuación de la Tesis “Elaboración de vino a partir de mucilago de cacao” (Luzuriaga, 2011) de la Universidad Tecnológica Equinoccial; el proceso de extracción ya se determinó y partiremos de la manera más óptima y de mejor rendimiento para el presente estudio.

### **3.5.2 COSECHA**

Las mazorcas fueron cosechadas de forma manual tomando en cuenta aspectos de madurez y apariencia física.

### **3.5.3 PREFERMENTACION**

Una vez cosechadas las mazorcas, se esperó veinticuatro horas para su proceso en planta, en este tiempo las almendras pasan por el proceso de pre fermentación a una temperatura de 25 C.

### **3.5.4 SELECCIÓN**

Se selecciona las mazorcas que cumplan con parámetros de inocuidad, eliminando aquellas que presenten cortes, colores extraños y presencia de plagas.

### **3.5.5 PESADO**

Se pesaron las mazorcas utilizando una balanza marca UWE, modelo 30KE, en la Planta Piloto de Alimentos de la Universidad Tecnológica Equinoccial.

### 3.5.6 LAVADO Y DESINFECCIÓN

Cada mazorca fue lavada con agua y jabón, posteriormente se desinfectó con solución clorada de 100 ppm y enjuagada con agua potable.



**Figura 12.** Lavado y desinfección mazorcas de cacao.

### 3.5.7 CORTE

Con cuchillos de acero inoxidable se procede a realizar cortes tanto longitudinales como transversales evitando al máximo dañar las almendras.



**Figura 13.** Corte de mazorcas de cacao.

### 3.5.8 SEPARACIÓN ALMENDRAS Y PLACENTA

De forma manual se separa las almendras de la placenta, mismas que se almacenan en un bowl de acero inoxidable, para su posterior pesado.





**Figura 14.** Separación de almendras de cacao.

### **3.6 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EXUDADO**

A partir de los datos de Luzuriaga (2011) se obtuvo exudado ejerciendo presión en relación 1:1 p/p, para lo cual, utilizamos las cáscaras propias de las mazorcas, con una protección plástica para evitar la contaminación cruzada, sobre las almendras y placenta.

Se sometió a una presión en relación 1:1 en peso, (kg almendras mucilaginosas: kg de cáscaras de cacao), por un lapso de veinticuatro horas, tiempo en el cual se drenó la totalidad del jugo de las almendras y placenta.



**Figura 15.** Extracción exudado de mucílago de cacao.

### 3.6.1 ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE EXUDADO DE MUCILAGO DE CACAO

El líquido obtenido en el proceso de extracción fue sometido a análisis de grados Brix y pH, utilizando un refractómetro Hannah de escala 0-32 y potenciómetro de la Planta de Alimentos de la Universidad Tecnológica Equinoccial.



**Figura 16.** Análisis Brix del exudado de mucílago de cacao.

### 3.6.2 PROCESO DE ELABORACIÓN DE LOS DISTINTOS MOSTOS PARA LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

En el proceso de elaboración de los mostos fermentables se partió de los tratamientos derivados de la combinación de diferentes factores de estudio que son:

Variables independientes:

- Sólidos solubles.  
Niveles: -Natural del exudado de mucílago.  
-Corregido a 22 Brix.
- Porcentaje de cascarillas de cacao irradiadas:  
Niveles: - 50% por almendra.  
-100% por almendra.

- Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

Niveles:       - Con adición de levadura.  
                   - Sin adición de levadura.

**Tabla 6.** Mostos acondicionados para fermentación.

Mostos	% Cascarilla irradiada	Sólidos solubles	Levadura
1	100	Corregido*	Adición.
2	100	Natural del exudado**	Adición
3	50	Corregido	Adición.
4	50	Natural del exudado	Sin adición
5	100	Corregido	Sin adición
6	100	Natural del exudado	Sin adición
7	50	Corregido	Sin adición
8	50	Natural del exudado	Adición

\* Corregido a 22 Bx (Arozarena, 2007).

\*\*18 Bx del exudado.

Para el acondicionamiento y formulación de los distintos mostos, se emplearon los siguientes parámetros y las cantidades recomendadas en la formulación de mostos para vinos de frutas (Arkell, 2009).

**Tabla 7.** Parámetros utilizados en la formulación de los mostos para bebida alcohólica de cacao.

Parámetro	Cantidad	Unidad
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.15*	g/l mosto
pH mosto	3.79**	Constante en todas las muestras
Metabisulfito de sodio	0.16***	g/l mosto
Temperatura de fermentación	25.5	C. Constante en todas las muestras

\* (Ruiz & Martínez, 2006)

\*\* Natural del cacao. Ideal en vinos. (Arozarena, 2007)

\*\*\* (Arozarena, 2007)

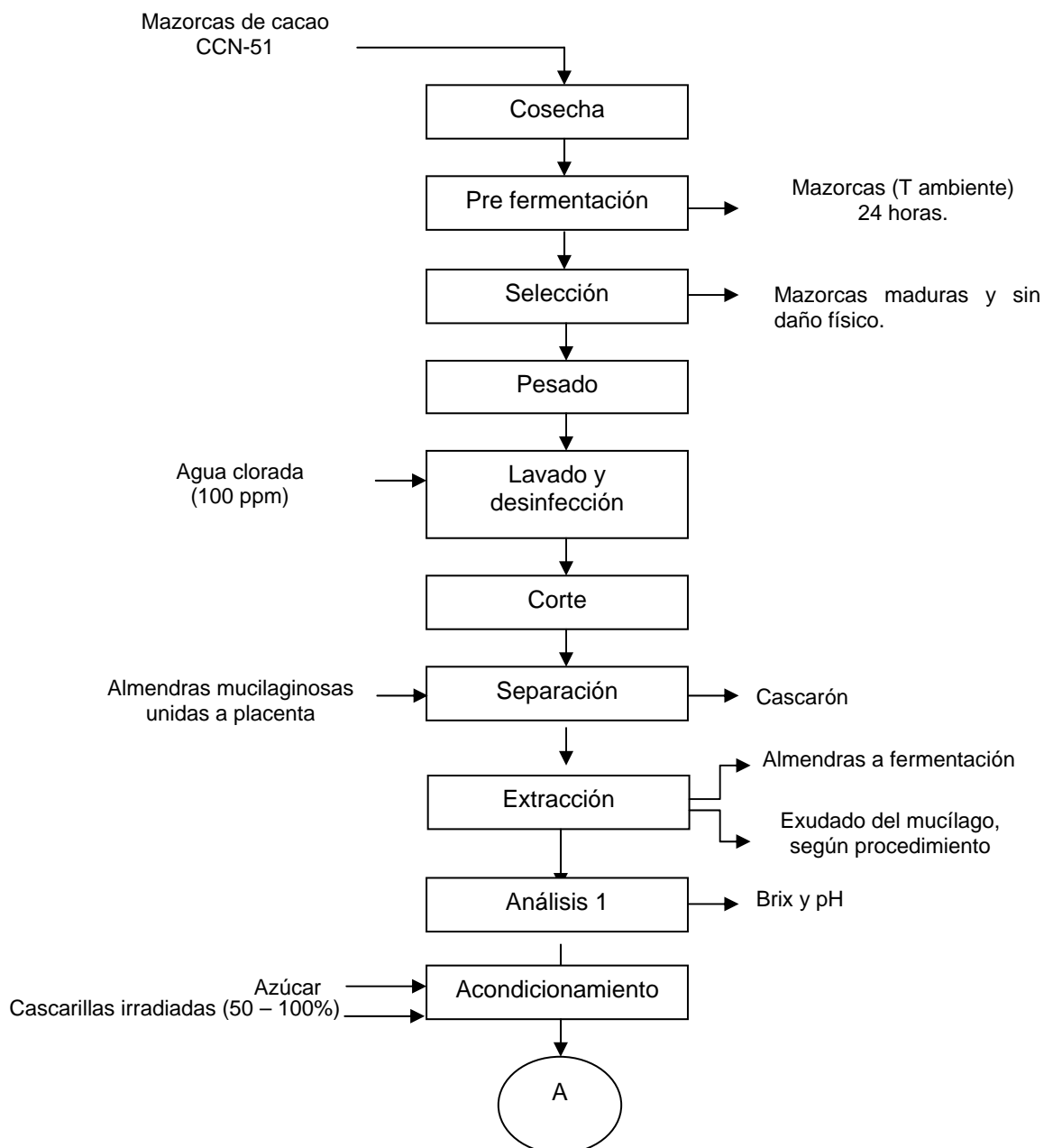
Para cada mosto formulado se realizaron 2 réplicas, dando un total de 16 muestras.

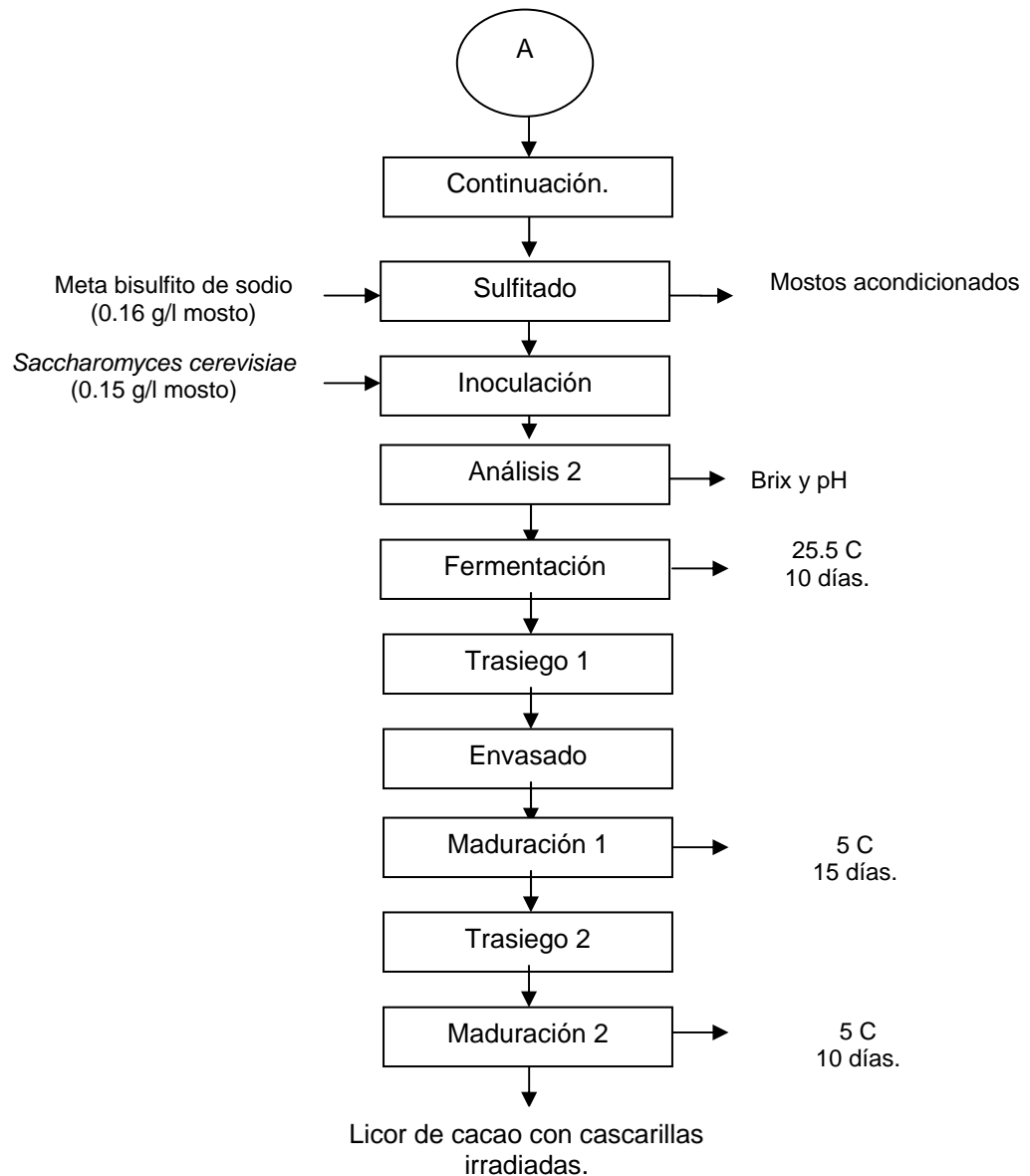
Para realizar la fermentación de los mostos, se utilizó un micro fermentador, adaptado por Luzuriaga (2011), que consta de un Erlenmeyer de 500 ml, tapado herméticamente con un corcho de plástico en la parte superior y acoplado a éste una trampa de aire mediante el uso de un tubo Pyrex.

Una vez que se prepararon los mostos en los micro fermentadores fueron colocados en una estufa de marca FANEM, modelo 502, y la adecuamos a 25.5 C, temperatura similar a las condiciones climáticas a las zonas cacaoteras óptimas para fermentación de levaduras.

### 3.6.3 ELABORACION DE BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO ACONDICIONADO CON CASCARILLAS DE CACAO IRRADIADAS CON UV-C

La elaboración de una bebida alcohólica de cacao, con adición de cascarillas de cacao previamente irradiadas se muestra de manera sintetizada en el siguiente cuadro





**Figura 17.** Procedimientos realizados en la elaboración de bebida alcohólica de cacao adicionando cascarillas de cacao.

### 3.6.4 ACONDICIONAMIENTO DE MOSTOS

En el caso de los mostos 1, 2, 3,4 se procede a su acondicionamiento con la adición de azúcar con la siguiente fórmula: (Arozarena, 2007)

$$\text{Zum}o(Bx) + \text{Azúcar}(Bx) = \text{Mosto}(Bx) \quad [1]$$

#### **3.6.4.1 Tipos de mostos experimentales:**

T1: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T2: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T3: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

T4: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T5: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T6: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T7: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T8: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

En los tratamientos que contienen los mostos 1, 2, 5, 6 se añadirá un 100% de cascarilla irradiada respecto al peso.

En los tratamientos que contienen los mostos 3, 4, 7, 8 se añadirá 50% de cascarillas respecto al peso de almendra utilizada.

#### **3.6.5 SULFITADO**

Se adiciona metabisulfito de sodio a las dieciséis replicas en concentraciones similares es decir: 0.16 g/L mosto (Ruiz citado en Luzuriaga, 2011).

#### **3.6.6 INOCULACIÓN**

La inoculación de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) fue realizada a los mostos de los Tratamientos 1, 2, 3 y 8 respectivamente.

Se empleó levadura activa seca rehidratada (levadura de panadería) en los 4 tipos de mostos y sus réplicas, en total se adicionaron levadura a 8 muestras, en una concentración de 0.15 g/l mosto.

### **3.6.7 ANÁLISIS**

En todas las muestras de mosto se analizaron el pH y sólidos solubles, mediante el uso de un refractómetro Hannah de escala 0-32 Brix.

### **3.6.8 FERMENTACIÓN**

Utilizando una estufa FANEM, modelo 502, se procedió a la fermentación de los mostos a una temperatura constante de 25.5 C, por el lapso de diez días.

### **3.6.9 TRASIEGO 1**

Una vez transcurridos los diez días se procede al trasiego desde los micro fermentadores a botellas de vidrio en temperatura ambiente.

### **3.6.10 ENVASADO**

Para este proceso se utilizó botellas tipo viñeras de color verde, previamente desinfectadas y esterilizadas, llevándolo a cabo en temperatura ambiente y su posterior encorchado de manera manual.

### **3.6.11 MADURACIÓN 1**

Los mostos elaborados se llevaron a un proceso de maduración por quince días en botella de vidrio color verde, en un lugar oscuro y con temperatura ambiental de aproximadamente 5 C.

### **3.6.12 TRASIEGO 2**

Transcurridos los quince días de maduración se procede a un segundo trasiego a temperatura ambiente.



### **3.6.13 MADURACIÓN 2**

Se lleva a cabo por diez días adicionales en la misma botella, en un lugar oscuro y con temperatura ambiental de 5 C aproximadamente.

### **3.6.14 BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO CON CASCARILLAS IRRADIADAS**

La bebida fermentada que ha llegado a un nivel de azúcar estable después de mínimo 10 días de fermentación se considera una bebida alcohólica terminada.

## **3.7 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LA BEBIDA ALCOHÓLICA**

Para la caracterización de la bebida alcohólica de cacao, se tomaron en cuenta parámetros como grado alcohólico, acidez total, dióxido de azufre libre y dióxido de azufre total, requeridos por la norma INEN 0374:87 referente a "Vino de Frutas", así mismo se toma en cuenta la norma INEN 1932:92 referente a "Licores de Frutas".

En los análisis fisicoquímicos realizados que cumplen con las características adecuadas están:

**Tabla 8.** Mostos corregidos a 22 Brix, escogidos para análisis Físico-Químico.

MOSTOS	%	SÓLIDOS SOLÚBLES	LEVADURA
1	100%	Corregido	Adición.
3	50%	Corregido	Adición.

Estos mostos presentan buen sabor, olor y es agradable a la vista, siendo los elegidos para la realización de los análisis posteriores ya que cumplen con el propósito de obtener una bebida alcohólica con sabor característico de cacao.

Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos de la bebida alcohólica se utilizaron los métodos de análisis detallados en la Tabla 9 por duplicado.

**Tabla 9.** Análisis físico-químico del vino de frutas según norma INEN 0374:87.

PARÁMETRO ANALIZADO	UNIDAD	REQUISITO DE LA NORMA INEN 0374:87		MÉTODO DE ANÁLISIS
		MIN	MAX	
Grado Alcohólico a 15 C	°GL	5	18	INEN 360
Acidez Total (ácido acético)	g/L AA	---	2.0	INEN 341
Dióxido de Azufre Libre	g/L	---	0.04	INEN 357
Dióxido de Azufre Total	g/L	---	0.32	INEN 356

(INEN, 2007)

Como se explicó con anterioridad se debe tomar en cuenta la norma INEN 1932:92 sobre "Licores de Frutas"; cuyos valores de referencia son:

**Tabla 10.** Análisis físico-químico del licor de frutas según norma INEN 1932:92.

PARÁMETRO ANALIZADO	UNIDAD	REQUISITO DE LA NORMA INEN 1932:92.		MÉTODO DE ANÁLISIS
		MIN	MAX	
		Grado Alcohólico a 15 C	°GL	
Acidez Total (ácido acético)	*	---	40.0	INEN 341

(INEN, 2007)

### 3.8 ANÁLISIS SENSORIAL DE BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO

El grado de aceptación de cada una de las muestras con las mejores características fisicoquímicas se realiza solicitando a varios panelistas participar en un panel sensorial, de esta manera llegaremos a identificar el mejor tratamiento y aceptabilidad por parte del público consumidor, evaluando: dulzor, acidez y grado alcohólico de los dos tipos de bebidas alcohólicas de cacao obtenidas.

En el análisis sensorial y grado alcohólico se presentaron tres muestras a los panelistas más un blanco como testigo.

La evaluación de la bebida alcohólica de cacao se desarrolló con la presencia de consumidores habituales de vino y licores de frutas para lo cual se puso a disposición de ellos, una ficha de evaluación sensorial para registro de los datos de diferentes tratamientos; Anexo 8.

### **3.9 DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE DE VINO DE CACAO**

#### **3.9.1 MÉTODO RELACIÓN BLOUIN & PEYNAUD**

Para determinar el grado alcohólico probable de los diferentes tratamientos, se tomó como referencia lo mencionado por Blouin & Peynaud (2004):

“La gran variación del rendimiento de la fermentación alcohólica en su transformación de azúcar a alcohol hace difícil un cálculo preciso. Son necesarios aproximadamente de 16 a 19 g de azúcar por litro de mosto para producir 1 % vol. De alcohol. Dada la imposibilidad de prever el rendimiento futuro de la fermentación, es recomendable calcular la adición de azúcar tomando como referencia de 17 a 17,5 g/l para los vinos blancos”.

## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos después de un tratamiento de irradiación UV-C en las cascarillas de cacao para la eliminación de hongos causantes de la formación de ocratoxina A, para su posterior uso en la elaboración de una bebida alcohólica a base de mucílago y cascarillas de cacao (*Theobroma cacao L.*).

El estudio se dividió en cuatro fases, en la primera se aislaron e identificaron mohos causantes de la aparición de Ocratoxina A en cascarillas de cacao; en la segunda fase se seleccionó la dosis de radiación UV-C que influyó sobre el crecimiento fúngico de los mohos aislados. En una tercera fase se inoculó artificialmente los mohos en las cascarillas de cacao y posteriormente fueron tratadas con radiación UV-C (dosis efectiva) determinando su tiempo de desarrollo en la cascarilla y, en una cuarta fase de estudio, se cuantificó la población de mohos durante el almacenamiento.

### 4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MOHOS

La identificación de los hongos se realizó mediante la observación microscópica con tinción simple, utilizando azul de lactofenol y se comparó la morfología de cada hongo en el Manual Introduction to Food-Borne Fungi (Samson et al., 1995).

Una vez obtenidos los cultivos puros de cada tipo de hongo observado, se determinaron 2 tipos de hongos causantes de la aparición de ocratoxina A en cascaras de cacao, los géneros aislados e identificados fueron:

- *Aspergillus spp.* Principalmente.
- *Penicillium spp.* En baja concentración.

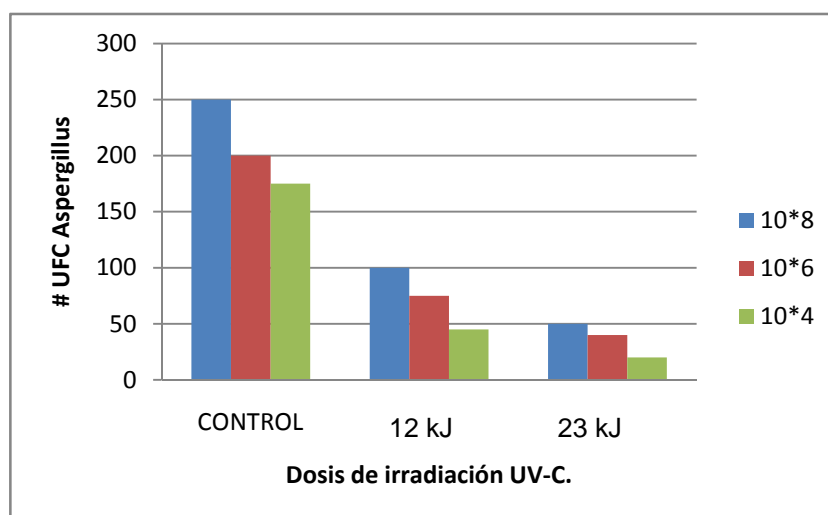
## 4.2 SELECCIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE RADIACIÓN

### UV-C (ensayo in vitro)

Para seleccionar la dosis de radiación UV-C (dosis de 12 kJ/m<sup>2</sup> y 23 kJ/m<sup>2</sup>) que influya sobre el crecimiento de mohos causantes de la aparición de ocratoxina A en cascarillas de cacao se irradiaron cajas petri inoculadas con una suspensión de propágulos de cada moho aislado e identificado. Se compararon tres concentraciones diferentes (10<sup>8</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>4</sup> UFC/ml) de esporas (tratadas) frente a muestras que no fueron irradiadas (controles).

A medida que la concentración de propágulos disminuye se hace evidente el efecto de la radiación UV-C, ya que se sabe que el efecto de la radiación UV-C depende, entre otros factores, de la densidad del microorganismo (Wright et al., 2000).

	CONTROL	12kJ	23kJ
10 <sup>8</sup>	250	100	50
10 <sup>6</sup>	200	75	40
10 <sup>4</sup>	175	45	20



**Figura 18.** Comparación concentraciones de propágulos y dosis irradiación UV-C.

Al realizar la comparación de las muestras control frente a las tratadas, según el método de conteo estándar se puede observar que las muestras tratadas presentan menor crecimiento en cuanto al número de UFC, por ejemplo, para la concentración  $10^6$  de la muestra control, el crecimiento del *Aspergillus* fue bastante elevado resultando muy numeroso para contar (MNPC), mientras al aplicar la dosis de  $12 \text{ kJ/m}^2$  se encontraron alrededor de 80 UFC y al aplicar la dosis de  $23 \text{ kJ/m}^2$  se encontraron 30 UFC.

### **4.3 INOCULACIÓN ARTIFICIAL DE MOHOS EN CASCARILLAS DE CACAO**

Se realizó un ensayo de carácter cualitativo in vivo con el fin de determinar el tiempo de almacenamiento en el que las cascarillas presenten desarrollo fúngico y el efecto de la radiación UV-C (dosis  $23 \text{ kJ/m}^2$ ) sobre el crecimiento de mohos inoculados artificialmente en cascarillas de cacao.

Las bandejas con cascarillas de cacao inoculadas artificialmente se incubaron a una temperatura de  $25 \text{ C}$  fueron inspeccionadas visualmente cada 5 días.

Se estableció un método de calificación de escala 1 a 4 (donde 1=sin desarrollo fúngico; 2 = desarrollo fúngico ligero; 3 = desarrollo fúngico moderado; 4= desarrollo fúngico elevado). Por medio de este método evaluaremos la validez del experimento.

#### **4.3.1 *Aspergillus spp.***

Cuando se inoculó *Aspergillus spp.* sobre las cascarillas de cacao la diferencia visual fue mínima con las cascarillas de control a los 21 días, dándonos como resultado unas cascarillas de cacao casi idénticas en cuanto característica visual, por lo que es necesaria la determinación por medio de siembra en Agar Sabouraud, de esta manera sabremos la cantidad real de hongos eliminados.



#### **4.3.2 *Penicillium spp.***

De igual manera al inocular *Penicillium spp.* en las cascarillas de cacao la diferencia visual para simple apreciación es mínima, teniendo en cuenta que se debe hacer la siembra en Agar Sabouraud para determinar la cantidad de hongos.

#### **4.4 EFECTO DE LA RADIACIÓN UV-C SOBRE EL DESARROLLO DE ASPERGILLUSEN CASCARILLAS DE CACAO (Ensayo cuantitativo)**

Las cascarillas de cacao inoculadas artificialmente con *Aspergillus*, principal iniciador de la formación de ocratoxina A, fueron tratadas con una dosis de 23 kJ/m<sup>2</sup> y almacenadas durante 21 días a una temperatura de 25 C.

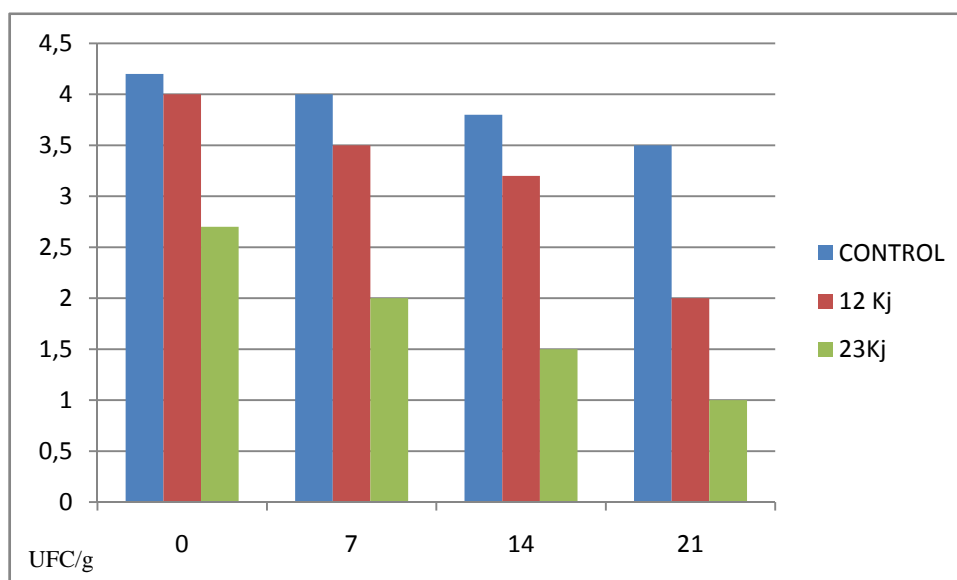
Durante este período se evaluó el efecto de la radiación UV-C luego de la inoculación de una concentración de 10<sup>6</sup> UFC/mL de *Aspergillus* (Figura 19).

Cuando se inoculó *Aspergillus spp.* no se observó diferencia en el desarrollo fúngico de cascarillas de cacao control y tratados (23 kJ/m<sup>2</sup>) a lo largo del almacenamiento, por lo que se hace una nueva siembra en cajas petri con agar Sabouraud, de esta manera se determina la verdadera concentración de *Aspergillus spp.*, presente en las muestras (Figura 20.)



**Irradiación UV-C 23 kJ/30 minutos.**

**Figura 19.** Cultivo de *Aspergillus* en muestra tratada ( $23 \text{ kJ/m}^2$ ) luego de 21 días de incubación a 25 C.



**Figura 20.** Recuento total de mohos (*Aspergillus*) y el efecto de la radiación UV-C (12 y  $23 \text{ kJ/m}^2$ ) durante el almacenamiento según escala visual.

Las cascarillas inoculadas con *Penicillium spp.* un iniciador secundario de la formación de Ocratoxina A, fueron tratadas al igual que las inoculadas con *Aspergillus* con una dosis de  $23 \text{ kJ/m}^2$  y almacenadas durante 21 días a una temperatura de 25 C.

No se observó desarrollo fúngico en las cascarillas de cacao control y tratados ( $23 \text{ kJ/m}^2$ ) a lo largo del almacenamiento, por lo que se hace una

nueva siembra en cajas petri con agar Sabouraud, incubándolas por 21 días, obteniendo un nulo crecimiento de *Penicillium spp.*

#### 4.5 RESULTADO DE RENDIMIENTO DE EXUDADO DE MUCILAGO DE CACAO EJERCIENDO PRESIÓN 1:1

A continuación se muestra los datos obtenidos del rendimiento del exudado ejerciendo presión en relación 1:1 con cascara y almendras.

**Tabla 11.** Resultados de rendimiento de extracción del jugo exudado de cacao.

MÉTODO	# MAZORCAS	PESO ALMENDRA FRESCA (Kg)	VOLUMEN EXUDADO (Kg)	TIEMPO DE PROCESO	RENDIMIENTO%	BRIX		pH	
						INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
PRESION 1:1	125	37,9	8,01	24 HORAS	21,13	14,1	16,8	3,63	3,72

#### 4.6 SEPARACIÓN DE PARTES CONSTITUTIVAS Y PESO INDIVIDUAL: CÁSCARA, ALMENDRAS Y PLACENTA

Los resultados obtenidos en cuanto a los pesos promedio del fruto de cacao y sus partes constitutivas, son presentados a continuación:

**Tabla 12.** Pesos y porcentaje de partes constitutivas del cacao.

<b>Elemento</b>	<b>Peso Promedio*</b> <b>(Kg)</b>	<b>Porcentaje</b> <b>(%)</b>
Fruto	1.3	100
Cáscara	0.82	63.07
Almendras	0.38	29.23
Placenta	0.10	7.69

\* Promedios obtenidos de un tamaño de muestra n = 51 mazorcas

#### **4.7 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL EXUDADO DE MUCÍLAGO DE CACAO**

**Tabla 13.** Resumen características Físico – Químicas exudado de mucilago de cacao.

<b>PROGRAMA DE EXÁMEN</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>
Sólidos Solubles (Brix)	%	16.8	REFRACTÓMETRO*
Densidad	g/cm <sup>3</sup>	1.06	DENSÍMETRO*
pH	-	3.63	pH-metro*

\*Desarrollado en la Planta Piloto de Alimentos UTE

#### **4.7.1 RESULTADOS DE LA ELABORACIÓN DE DISTINTOS MOSTOS PARA LA FERMENTACIÓN**

Mediante el método óptimo de extracción se obtiene 16 muestras de 500 ml de líquido exudado de mucílago de cacao para elaborar 8 mostos diferentes con 2 réplicas, cada uno.

En los mostos 1, 2, 5, 6 se añadirá un 100 % de cascarilla irradiada respecto al peso.

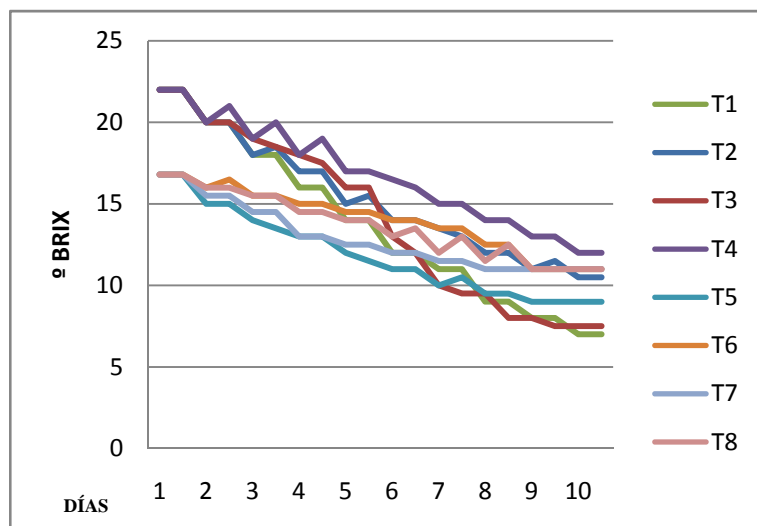
En los mostos 3, 4, 7, 8 se añadirá 50 % de cascarillas respecto al peso de almendra utilizada.

Así: para 500 g de muestra de 16.8 Bx, son necesarios 33.3 g de azúcar para elevar los sólidos solubles a 22 Bx.

#### **4.8 RESULTADOS DE LA FERMENTACIÓN DE BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO CCN-51**

Los tratamientos 1, 3, 5 y 7 inician el proceso de fermentación con 22 Bx; mientras que los tratamientos 2, 4, 6 y 8 inician con 16.8 Bx a temperatura constante de 25.5 C.

Se puede observar en la figura 21, que a los 10 días de fermentación los tratamientos que más consumieron los azúcares durante este proceso fueron el 1, 3, 5 y 7; contrario a los tratamientos 2, 4, 6 y 8 que en el día 10 el consumo de Bx fue bajo.



**Figura 21.** Cinética de fermentación de bebida alcohólica de cacao CCN-51 en base a consumo de azúcares para todos los tratamientos.

T1: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T2: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T3: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

T4: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura

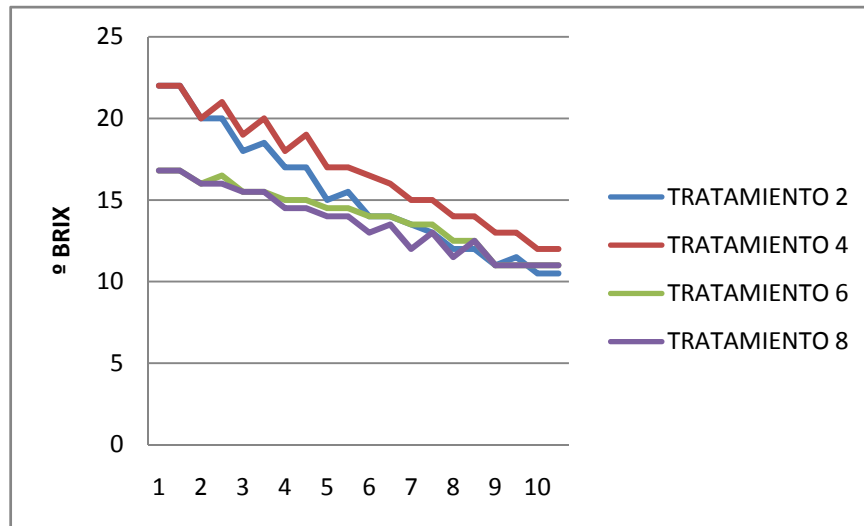
T5: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T6: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T7: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T8: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

En la figura 22 se muestra las diferencias entre los tratamientos 2, 4, 6 y 8 en los que se ha partido de un Brix de 16,8 llegando a un Brix final elevado, dándonos así una bebida de baja graduación alcohólica.



**Figura 22.** Cinética de fermentación de bebida alcohólica de cacao CCN-51 en base a consumo de azúcares; T2, T4, T6, T8.

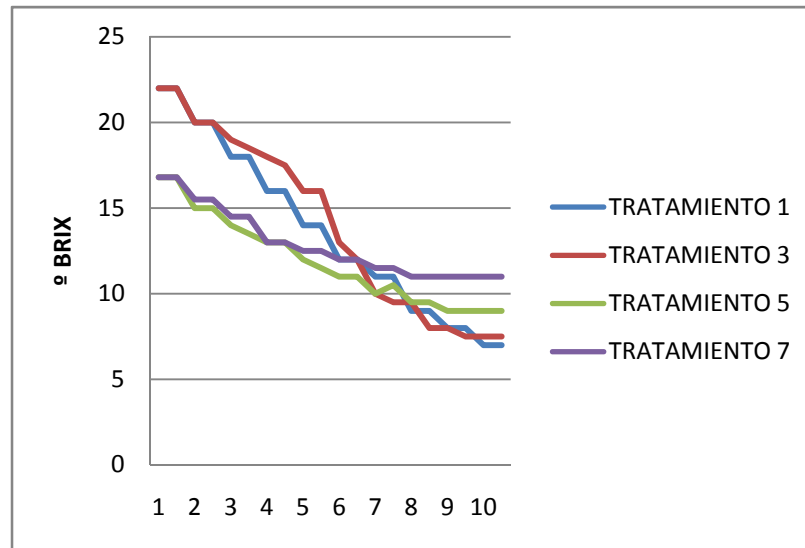
T2: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T4: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T6: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T8: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

En la figura 23 se evidencia las diferencias en los tratamientos 1, 3, 5 y 7; partiendo de un Brix corregido de 22, Se demostró así, la mayor eficacia de los métodos descritos, al producir un mayor grado alcohólico.



**Figura 23.** Cinética de Fermentación de bebida alcohólica de cacao CCN-51 en base a consumo de azúcares; T1, T3, T5, T7.

T1: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T3: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

T5: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T7: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura.

Se desarrolla análisis estadístico, para determinar las diferencias significativas entre tratamientos, en función de la gradiente de grados Brix consumidos por día, como lo muestran los datos obtenidos en la Tabla 14.



**Tabla 14.** Gradiente Brix consumidos/día según Tratamientos.

<i>Tratamiento</i>	<i>X ± S</i>	<i>*</i>
1	1,70 ±0,0	c
2	0,71±0,016	e
3	1,80 ±0,040	c
4	0,75 ±0,012	e
5	2,58 ±0,021	a
6	0,77 ±0,0	e
7	2.41 ±0,091	b
8	0,96 ±0,136	d

x±S (n=2)

- Letras distintas significan diferencias significativas.

T1: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T2: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T3: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

T4: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura

T5: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T6: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T7: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T8: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

Con adición de levaduras, en los tratamientos 1 y 3, se acelera la velocidad de la cinética de fermentación ya que, el consumo de los azúcares es más rápido, y cuando la fermentación se estabiliza, es decir, se detiene el consumo de azúcares, los azúcares consumidos son mayores a la vez que se alcanza mejor textura organoléptica.

Como se puede observar en la Tabla 15, la cantidad de azúcares consumidos en cada tratamiento, al finalizar la fermentación, es decir, al décimo día, fueron analizados estadísticamente, como se muestra en el Anexo 6, obteniendo los siguientes resultados, los cuales partieron de los datos tabulados en el Anexo 3.

**Tabla 15.** Azúcares Consumidos (g/l) según Tratamientos a los 10 días de fermentación.

TRATAMIENTOS	AZÚCAR CONSUMIDA	*
T1	15 ±0.0	a
T2	6.8±0.0	b
T3	15 ±0.0	a
T4	6.8±0.0	b
T5	15 ±0.0	a
T6	6.8±0.0	b
T7	15 ±0.0	a
T8	6.9±0.1	b

$\bar{x} \pm S$  (n=2)

- Letras distintas significan diferencias significativas.

T1: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T2: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.

T3: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

T4: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura

T5: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T6: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T7: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura.

T8: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

#### 4.9 RESULTADOS DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO

Partiendo de las anteriores mediciones se establecen dos tratamientos idóneos para realizar un análisis físico químico siendo estos:

**T1**=100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura y **T3**=50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura; dado que al ser acondicionados a 22 Brix poseen las propiedades específicas para una adecuada fermentación a través del tiempo, además al tener presencia de levaduras, estas ayudan al mayor consumo de azúcares llega a un grado alcohólico superior.

A continuación se detallan los resultados de los análisis de propiedades químicas, realizadas a los tratamientos, tomando como referencia la Norma INEN 1932:92 “Análisis Físico-Químico del Licor de Frutas” y complementándolos según norma INEN 0374:87 “Análisis Físico-Químico del Vino de Frutas” presentando las siguientes características:

**Tabla 16.** Resultados análisis Físico – Químicos mostos T1, T3.

PARÁMETRO ANALIZADO										
Tratamientos	Grado Alcohólico* a 15 C (°GL)		Grado Alcohólico** a 15 C (°GL)		Acidez Total* (ácido acético) (g/L)		Acidez Total** (ácido acético) (g/L)		Anhídrido Sulfuroso Libre** (g/L)	
	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX
	15	45	5	18	-	40	-	2	-	0,04
T1	13,9				19,32				0,0768	
T3	14,9				12,74				0,051	

(LASA, 2012)

Laboratorio de Análisis de Alimentos y Productos Procesados

\* Norma INEN 1932:92

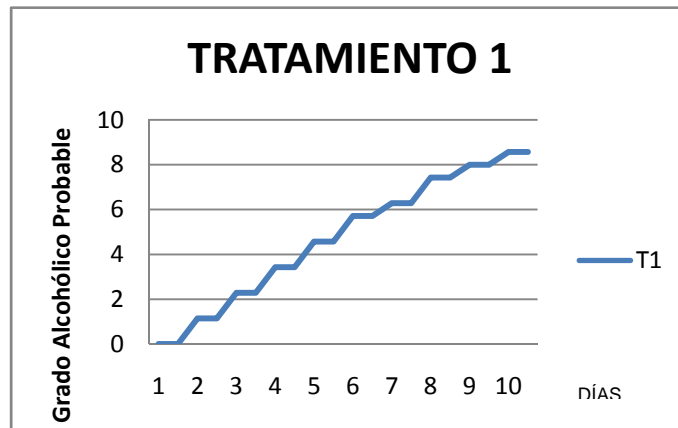
\*\* Norma INEN 0374:87

Se observa que los valores de acidez expresada en ácido acético de los Tratamientos 1 y 3 superan los valores de la Norma INEN 0374:87, debido a que al ser una bebida de maceración junto con las cascarillas de cacao, a la acidez propia del cacao se añade la acidez de estas cascarillas tomando otras características propias de un licor más ácido por lo que se compara con la Norma INEN 1932:92 correspondiente a “Análisis Físico-Químico del Licor de Frutas” teniendo valores dentro del límite permitido; se puede atribuir además el incremento de acidez propio de la bebida alcohólica a una posible contaminación por bacterias acéticas en la maceración, manipulación o irradiación de las cascarillas de cacao que se incorporan a los diferentes tipos de mosto (Hernández, 2008).

## 4.10 DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE DE LICOR DE CACAO

Para determinar el grado alcohólico teórico que alcanzaran los tratamientos T1 y T3, se empleó la fórmula propuesta por Blouin & Peynaud, donde:

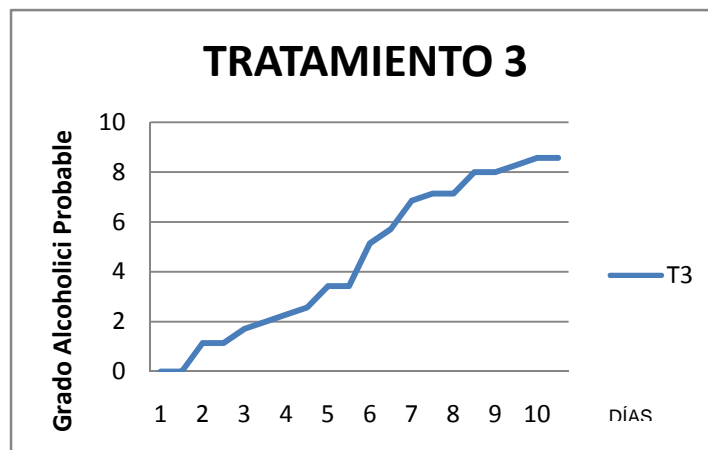
$$\text{Grado alcohólico probable} = \frac{\text{Azúcares consumidos } \left(\frac{\text{g}}{\text{l}}\right)}{17.5 \left(\frac{\text{g}}{\text{l}}\right)} \times 1 \% \text{ vol. alcohol [2]}$$



**Figura 24.** Grado alcohólico probable (17.5 g/l de azúcar produce 1°GL)\* para tratamiento 1\*\*.

\* (Blouin & Peynaud, 2004)

\*\* T1=100% cascarilla, Brix corregido (22), Adición levadura



**Figura 25.** Grado alcohólico probable (17.5 g/l de azúcar produce 1°GL)\*  
para tratamiento 3\*\*.

\* (Blouin & Peynaud, 2004)

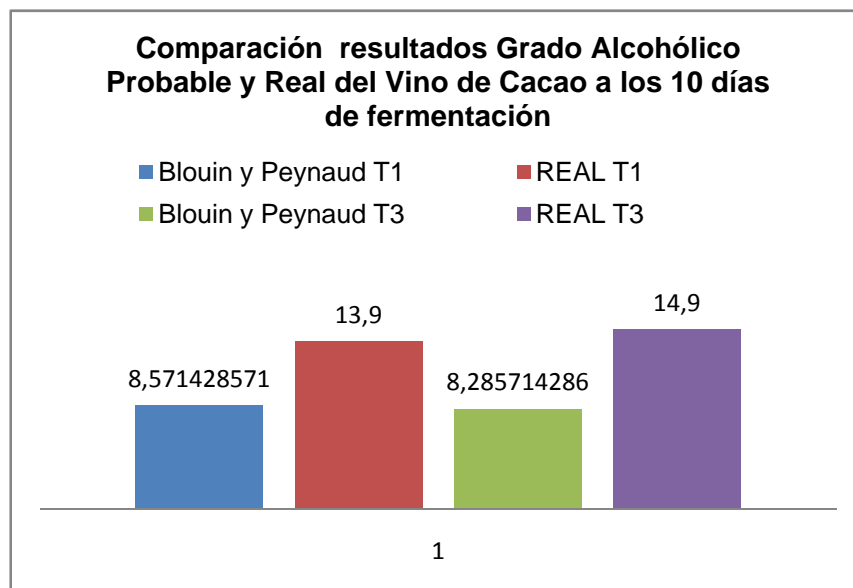
\*\* T3=50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura

**Tabla 17.** Comparación de resultados del grado alcohólico probable y real del licor de cacao a los 10 días de fermentación.

	<b>Grado Alcohólico Probable (Blouin &amp; Peynaud)</b>	<b>Grado Alcohólico Real (análisis químico)</b>
<b>TRATAMIENTOS</b>		
1	8,57	13,9
3	8,21	14,9

T1=100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura.

T3= 50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura.



**Figura 26.** Comparación grado alcohólico real y probable; tratamientos 1 y 3.

**T1**=100% cascarilla, Brix corregido (22), adición levadura.

**T3**=50% cascarilla, Brix corregido (22), adición levadura.

Se puede considerar que la relación Blouin & Peynaud está muy lejos del verdadero grado alcohólico obtenido en los tratamientos 1 y 3 ya que varía con 5.33 y 6.61 grados respectivamente.

Como se puede observar en la Tabla 18 se realiza el análisis estadístico; para determinar las diferencias significativas entre tratamientos, en función del gradiente de grado alcohólico por día de cada tratamiento.

**Tabla 18.** Gradiente Grado Alcohólico Probable (17.5g/L - 1%vol.alcohol) / día según Tratamientos.

Tratamiento	X ± S	*
1	0,97 ±0,0	e
2	0,41±0,009	ed
3	1,03 ±0,023	ed
4	0,43 ±0,007	d
5	1,48 ±0,014	c
6	0,44 ±0,0	b
7	1,33 ±0,107	a
8	0,51 ±0,033	a

X±S (n=2)

- Letras distintas significan diferencias significativas.

- T1: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.  
T2: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y con levadura.  
T3: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.  
T4: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura  
T5: Mosto con 22 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.  
T6: Mosto con 18 Brix y con 100% de cascarilla irradiada y sin levadura.  
T7: Mosto con 22 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y sin levadura.  
T8: Mosto con 18 Brix y con 50% de cascarilla irradiada y con levadura.

#### **4.11 RESULTADOS DE ANÁLISIS SENSORIAL DE BEBIDA ALCOHÓLICA DE CACAO**

Una vez realizados los análisis químicos a las muestras de licor de cacao, requeridos por la Norma INEN 1932:92 y la Norma INEN 0374:87 se realizó la evaluación sensorial a las muestras que cumplieron con los parámetros, las cuales corresponden a los tratamientos 1 y 3.

La evaluación fue realizada por 10 panelistas ya que, al no contar con mayor cantidad de licor se tuvo que reducir las muestras a catar.

El entrenamiento de los panelistas tuvo como objetivos principales:

- Conseguir que todos los evaluadores detecten y reconozcan los atributos más comunes y entrenarlos en el uso de escalas.
- Familiarización con el producto: aprender a reconocer las características y/o defectos del vino y la metodología de evaluación.
- Conocer y aprender a utilizar la ficha de cata utilizada (Anexo 5).
- Adquirir la capacidad de reconocer, recordar y puntuar los atributos del producto de forma coherente.
- Ser capaz de percibir sutiles diferencias entre las muestras.
- Conseguir la evaluación con la misma puntuación de una muestra repetida en la misma sesión de cata (repetitividad) y en distintas sesiones de cata (reproducibilidad)

El entrenamiento consistió en la asistencia a 2 sesiones teórico prácticas en las que se realizaron:

- Pruebas de reconocimiento de defectos a concentraciones diferentes.
- Pruebas de ordenación por intensidad de atributos positivos y negativos
- Pruebas de cata de diversos vinos con distintas intensidades de defectos y atributos positivos.
- Proyección de videos sobre análisis sensorial de bebidas y cata de vinos.

Después de cada sesión de entrenamiento se comentaron los resultados y se dio la oportunidad de volver a examinar las muestras y verificar los resultados en los que hubo desacuerdos.

La Tabla 19 se obtiene a partir de los datos tabulados en el Anexo 6, correspondiente a las calificaciones obtenidas en el Análisis Sensorial por atributos de la bebida alcohólica de cacao.

**Tabla 19.** Análisis Sensorial por Atributos de Licor de Cacao.

	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
<b>APARIENCIA</b>	4,6 ± 0,52	4,8 ± 0,42	3,2 ± 0,42
<b>COLOR</b>	3,4 ± 0,84	3,8 ± 0,42	4,6 ± 0,52
<b>OLOR</b>	4,3 ± 0,83	4,6± 0,7	3,2 ± 0,42
<b>SABOR</b>	4,4 ± 0,84	4,9 ± 0,32	4,6 ± 0,7
<b>ACIDEZ</b>	2,9 ± 0,74	2,8 ± 0,63	2,3 ± 0,82
<b>SABOR A CACAO</b>	4,10 ± 0,57	4,8 ± 0,42	2,2 ± 0,42
<b>ACEPTABILIDAD GLOBAL</b>	4,0 ± 0,67	4,6± 0,7	4,7 ± 0,48

**M1:**100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M2:**50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M3:** Vino blanco de uva (muestra testigo).



#### 4.11.1 CALIFICACIÓN APARIENCIA

Como se observa en la tabla 20; la muestra 2 cumple con mejores calificaciones en cuanto a apariencia que la muestra 1 y la muestra 3, por lo que se considera superior en este aspecto.

**Tabla 20.** Calificación Apariencia.

Variables de descripción	Muestras	Niveles de Calificación				
		1	2	3	4	5
APARIENCIA	M1	6	4			
	M2	8	2			
	M3		2	8		

**M1:**100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M2:**50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M3:** Vino blanco de uva (muestra testigo).

#### 4.11.2 CALIFICACION COLOR

En la tabla 21 se puede observar que la muestra 2 cumple mejor las expectativas en cuanto a color que las otras dos muestras, siendo la que mejor apreciación de color presenta.

**Tabla 21.** Calificación Color.

Variables de descripción	Muestras	Niveles de Calificación				
		1	2	3	4	5
COLOR	M1		6	2	2	
	M2		8	2		
	M3	6	4			

**M1:**100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M2:**50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M3:** Vino blanco de uva (muestra testigo).

#### 4.11.3 CALIFICACION OLOR

La muestra 2 presenta mejor calificación en cuanto a olor, tomando en cuenta olor a cacao característico, teniendo aceptación positiva de siete catadores, en el nivel uno de “Me agrada mucho”; siendo la mejor muestra.

**Tabla 22.** Calificación Olor.

Variables de descripción	Muestras	Niveles de Calificación				
		1	2	3	4	5
OLOR	M1	5	3	2		
	M2	7	2	1		
	M3		2	8		

**M1:**100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M2:**50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M3:** Vino blanco de uva (muestra testigo).

#### 4.11.4 CALIFICACION SABOR

En cuanto a la apreciación de sabor se evidencia en la tabla 23, que entre las muestras 1 y 2 tienen calificaciones altas, es decir cumplen con un estándar de aceptabilidad en el paladar.

**Tabla 23.** Calificación Sabor.

Variables de descripción	Muestras	Niveles de Calificación				
		1	2	3	4	5
SABOR	M1	6	2	2		
	M2	9	1			
	M3	7	2	1		

**M1:**100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M2:** 50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M3:** Vino blanco de uva (muestra testigo).

#### 4.11.5 CALIFICACION ACIDEZ

La acidez propia de la fruta de cacao produce un licor más ácido de los comunes, además se puede presentar contaminación por bacterias acéticas, teniendo a las muestras uno y dos con una alta calificación en acidez, se puede concluir que se puede reducir la acidez con un mayor control en las trampas de aire en la etapa de fermentación.

**Tabla 24.** Calificación Acidez.

Variables de descripción	Muestras	Niveles de Calificación				
		1	2	3	4	5
ACIDEZ	M1		2	5	3	
	M2		1	6	3	
	M3			5	3	2

**M1:**100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M2:**50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M3:** Vino blanco de uva (muestra testigo).

#### 4.11.6 CALIFICACION SABOR A CACAO

Apreciamos que las muestras de licor de cacao son claramente identificadas por los catadores, teniendo la muestra 2 como la de mayor característica propia de cacao y eliminando a la muestra 3 ya que al ser vino blanco de uva no presenta ninguna característica de cacao.

**Tabla 25.** Calificación Sabor a Cacao.

Variables de descripción	Muestras	Niveles de Calificación				
		1	2	3	4	5
SABOR A CACAO	M1	2	7	1		
	M2	8	2			

---

M3

10

---

**M1:**100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M2:**50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M3:** Vino blanco de uva (muestra testigo).

#### 4.11.7 CALIFICACION ACEPTABILIDAD GLOBAL

En cuanto a la aceptabilidad total de las muestras catadas, los panelistas demuestran una valoración de 7 en “Me agrada mucho”; en las muestras 2 y 3, ya que la muestra 3 es de vino blanco de uva, se observa que la muestra 2 es la mejor en aceptabilidad global, en cuanto a características de cacao.

**Tabla 26.** Calificación Aceptabilidad Global.

Variables de descripción	Muestras	Niveles de Calificación				
		1	2	3	4	5
ACEPTABILIDAD GLOBAL	M1	2	6	2		
	M2	7	2	1		
	M3	7	3			

**M1:**100% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M2:**50% cascarilla, Brix Corregido (22), Adición Levadura **M3:** Vino blanco de uva (muestra testigo).

## **5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 CONCLUSIONES

- A dosis de 12 y 23 kJ, se reduce el crecimiento de *Penicillium* y *Aspergillus spp.* en las cascarillas de cacao teniendo así una materia prima apta para el uso alimenticio libre de contaminantes.
- En el caso de las cascarillas inoculadas con *Aspergillus spp.* se hace más evidente la reducción de UFC en el transcurso de los 21 días de incubación a 37°C; de 4.3 a tan solo 1 UFC por medio de una irradiación con dosis de 23 kJ/m<sup>2</sup>.
- La formulación adecuada de los mostos para elaborar Licor de Cacao que cumplen con los valores indicados en las Normas para Licor de Frutas y Vino de Frutas respectivamente son las muestras 1 y 3; se realiza análisis sensorial de las dos muestras, obteniendo una aceptación global mayor la muestra “Mucilago de Cacao, añadiendo 50% de cascarillas de cacao irradiadas con UV-C, Brix Corregido a 22 y con adición de levadura”; se alcanza un grado alcohólico de 14,9% vol. alcohol y una concentración de sólidos solubles de 7 Brix.
- Otra formulación aceptable fue la de la Muestra 1 con “100% cascarillas de cacao irradiadas con UV-C, Brix Corregido a 22 y con adición de levadura”; se logró grado alcohólico de 13,9% vol. alcohol y concentración de sólidos solubles residuales de 7 Brix; la diferencia radica en la cantidad de cascarillas de cacao, dándole mayor acidez a este tratamiento, por lo tanto una astringencia alta y poco agradable en comparación con la muestra 3.
- Otras formulaciones de mostos no cumplen con los niveles de calidad buscados, ya sea por exceder la acidez de norma, menor grado

alcohólico y demás que se puede atribuir a la ausencia de levadura añadida, siendo el caso de estos mostos no admitidos una fermentación incompleta.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Estudiar los costos de trabajar con esta tecnología a nivel de granjas productoras de cacao. **Realizar un estudio de pre factibilidad** sobre el tema en próximas investigaciones; siendo lo más recomendable la implementación de una planta de irradiación UV-C, en el lugar donde se acopie la producción total de las plantaciones que deseen entrar en el proyecto.
- Se recomienda utilizar un equipo de extracción que ejerza presión sobre una masa determinada como las almendras de cacao para obtener el exudado del mucilago, en el que se pueda calibrar y escoger la presión necesaria, ya que en el método usado de presión 1:1 con cascara de cacao quedan espacios muertos donde no se aprovecha al 100% la presión. Recomendar optimización de prensado para el prensado por medio de estudio sobre (presiones, cambios sensoriales en el grano sometido a presión, pre tratamientos y tiempos de pos cosecha)
- Seguir desarrollando estudios acerca del cacao fino de aroma o cacao arriba, enfocada en mercados específicos.



## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Acebey & Rodríguez (2002). Manual sobre el Manejo Post – Cosecha del Cacao. Editado por CONACADO. República Dominicana.
- Agama, Juan; Quiroz, James (2006). Programa de Capacitación en la Cadena del Cacao, Ecuador.
- Álvarez, C. F. (2004). Obtención, caracterización y optimización del proceso de extracción del aceite de la semilla de mango. Tesis Licenciatura; UNAM; Facultad de Química; México D. F.
- Arcos, M.L. (1998). Aislamiento, conservación y evaluación de la cinética de crecimiento y actividad celulolítica de cepas de *Fibrobacter succinogenes* de bovinos en pastoreo de gramíneas tropicales. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Arkell, J. (2009). El Vino. Buenos Aires, Argentina: ALBATROS.
- Armas, R. (2000). Normas prácticas para la elaboración de vinos en canarias. España.
- Arozarena, I. (2007). Seminarios Internacionales. Elaboración de Vinos de Frutas, Ambato, Ecuador.

- Barazarte, Humberto, Sangronis Elba, & Unai, Emaldi. (2011). La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): Una posible fuente comercial de pectinas. Recuperado el 2 de abril, de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222008000100009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S000406222008000100009&script=sci_arttext).
- Batista, L. (2009). Guía Técnica: El cultivo de Cacao. (1era Edición). República Dominicana.
- Blouin, J., & Peynaud, É. (2004). Enología práctica: Conocimiento y Elaboración del Vino (4th ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Braudeau, J. (2003). El Cacao. Barcelona, España: BLUME.
- Buchert, Juan Pablo. (2000). Asociación Cámara Nacional de Cacao Fino de Aroma de Costa Rica. Costa Rica.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. (2003). Ochratoxin A in commercial coffee in Spain.
- Cuesta, A. (2007). El aprovechamiento de las ventajas competitivas de la producción del cacao en el Ecuador para impulsar el desarrollo de una marca país. Tesis de Grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Creppy EE, Betbeder AM, Gharbi A. (1991). Action of ochratoxin A, a mycotoxin from *Aspergillus ochraceus* on the first step of the acylation reaction catalyzed by eukaryotic phenylalanyl-tRNA synthetase.

Cross, E., & N. Jeanjean. (1997). Formation I arôme cacao. In: Cacao et Chocolat - Production et caractéristiques. Lavoisier. Paris.

Díaz, O.; Fernández, M.; García, G.D.; de la Hoz, L. & Ordoñez, J.A. (1997). Proteolysis in dry-fermented sausages: The effect of selected exogenous proteases.

Delacruz L & Bach PH (1990) The role of ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity. Journal of Biopharmaceutical Sciences.

Dörrenhaus A & Föllmann W (2004). Los efectos de la ocratoxina A en la reparación del ADN en cultivos de hepatocitos de rata y las células porcinas vejiga urinaria epiteliales. Archives of Toxicology 71: 709-713.

Edeca, Industria del Polvo y la Manteca del Cacao. (2008). Disponible en: [www.edeca.satnet.net](http://www.edeca.satnet.net), Ecuador.

Espín, Susana, Dra. (2012). Estación Experimental Santa Catalina. Departamento de Nutrición y Calidad. INIAP.

Fernández (2010). El cultivo de las setas (*Pleurotus* spp.): una tecnología de producción de alimentos. Ediciones Cuéllar. Mexico.

Fortin C., Conference on Trade and Development. (2002). United Nations, New York y Ginebra.

- Fuchs, R., Appelgren, L., Hagelberg, S. & Hult, K. (1992). Carbon-14-ochratoxin A distribution in the Japanese quail.
- Fukui Y, Hoshino K, Kameyana Y, Yasui T, Toda C, Nagano H (1987) Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. Food and Chemical Toxicology.
- Galtier P. (1991). Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. Lyon, Francia.
- Guaman, C. (2007). Estudio de factibilidad para el cultivo de "cacao 51" en la parroquia Cristóbal Colon de la ciudad de Santo Domingo de los Colorados y su comercialización, Escuela Politécnica Nacional del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Hamilton, PB, Huff WE, Harris JR, Wyatt RD (2002). Fenómenos naturales de ocratoxicosis en aves de corral. Poultry. Sciences 61: 1832-1841.
- Hernandez, H. (2008). Bacterias acéticas: Técnicas de detección y eliminación. Vinoteq, España.
- INEN. (2006). Instituto Ecuatoriano de Normalización, Cacao en grano. Requisitos. Norma Técnica Ecuatoriana (NTE). Cuarta Revisión. Quito.
- INEN. (2007). Instituto Ecuatoriano de Normalización, Vino de Frutas. Requisitos. Norma Técnica Ecuatoriana (NTE). 0374:87, Quito.

- INEN. (2007). Instituto Ecuatoriano de Normalización, Licores de Frutas. Requisitos. Norma Técnica Ecuatoriana (NTE). 1932:92, Quito.
- INEN. (2007). Instituto Ecuatoriano de Normalización, Licores de Frutas. Requisitos. Norma Técnica Ecuatoriana (NTE). 1932:92, Quito.
- INEN. (2007). Instituto Ecuatoriano de Normalización, Determinación del grado alcohólico en vinos. Norma Técnica Ecuatoriana (NTE). 0360:78, Quito.
- INEN. (2007). Instituto Ecuatoriano de Normalización, Determinación de la acidez \* 4. Norma Técnica Ecuatoriana (NTE). 0341:78, Quito.
- INEN. (2007). Instituto Ecuatoriano de Normalización, Determinación del anhídrido sulfuroso libre en vinos. Norma Técnica Ecuatoriana (NTE). 0357:78, Quito.
- INEN. (2007). Instituto Ecuatoriano de Normalización, Determinación de anhídrido sulfuroso total en vinos. Norma Técnica Ecuatoriana (NTE). 0356:78, Quito.
- Jonsyn, FE; Maxwell, SM; Hendrickse, RG. (2003). Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. *Mycopathologia* 131: 121-126.
- Kalvatchev, (1998). *Theobroma cacao*. Un nuevo enfoque para nutrición y salud.

Krogh, P (2000). Ochratoxins in food. En: P Krogh Mycotoxins in food. Food science and technology series of monographs, Academic Press.

LASA, (2012). Laboratorio de Análisis de Alimentos y Productos Procesados.

Leung, A.Y. (1980). Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. John Wiley & Sons. New York.

López de Cerain A; (2001). Efectos tóxicos de la Ocratoxina A. Pamplona. España.

Luzuriaga. (2011). Elaboración de vino a partir de mucilago de cacao. Quito, Ecuador.

MAGAP (2006). Subsecretaría de Agricultura, Dirección de Políticas y Estrategias Agrícolas. Ecuador.

Márquez, J & Aguirre, M. (2003). Manual Técnico de Cosecha y Beneficio del Cacao. Edición Agustín García. Impreso en La Habana, Cuba.

Nosti, Jaime (2009). Cacao, café y té. Colección Agrícola Salvat.

Odwole, O. & Arueya, G. (1990). An economic analysis of soap production from cocoa pod husk.

- Omar RF, Hasinoff BB, Mejilla F, Rahimtula AD (2000). Mecanismo de la ocratoxina A en la peroxidación lipídica estimulada. *Biochemical Pharmacology* 40: 1183-1191.
- Plestina, R (2002). Nefrotoxicidad de Ocratoxina A. *Aditivos alimenticios y Contaminantes*. 13: 49-50.
- Reyes, H.; Vivas, J & Romero A. (2004). La Calidad de Cacao. Factores determinantes de la calidad. (en línea). Consultado 22 de sep. del 2008. Disponible en: [www.ceniap.goc.ve](http://www.ceniap.goc.ve)
- Ruiz, M.J. & Martínez M. (2006). Iron (III) chloride hexahydrate does not enhance methotrexate cytotoxicity on *Saccharomyces cerevisiae*.
- Samsiah, S., Lan, Y. & Chong, C. (1991). Development of food products from cocoa pulp and sweatings. In: *Abstracts Int. Cocoa Conf. Challenges in the 90s*, Kuala Lumpur, Malasia.
- Samson, R.A.; Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. (1995). *Introduction to Food-borne Fungi*. 5th edition. Holanda.
- UNCTAD, Centro de Comercio Interno. (1991). *Manual de Productos Básicos. Cacao fino de aroma. Estudio de la producción y el comercio mundial*. Ginebra.
- United Nations, Centro de Comercio Interno, UNCTAD (2005). *United Nations*, New York y Ginebra.



- Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh.
- Ventura, M. (2003). Selección de árboles de cacao nativo (*Theobroma cacao* L.) e híbridos de buena calidad y rendimiento. En: 14va. Conferencia Internacional de Investigación en cacao. Sección de poster págs. 421-425. ACCRA, Ghana.
- Villavicencio. (2001). Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.
- Wood, G., & Lass, R. (1985). Cocoa. 4-th ed. Longman, Essex, Inglaterra.
- Wright, H.B.; Cairns, W.L. (2000). Desinfección de agua por medio de luz ultravioleta.

**ANEXOS**

## **ANEXO I**

### **FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO DE IRRADIACIÓN UV-C EN CASCARILLAS DE CACAO CNN-51**

**ALMENDRAS DE CACAO CON HONGOS.**



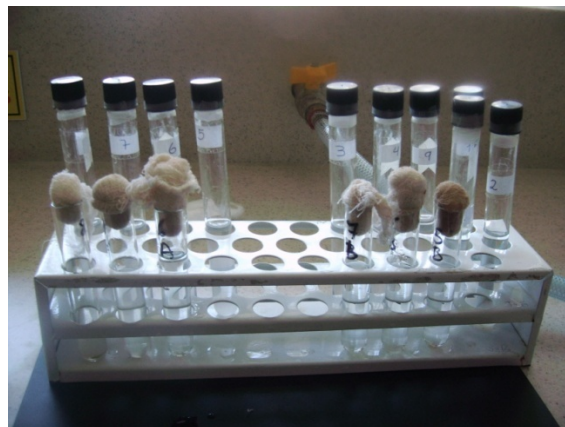
**CASCARILLAS DE CACAO CCN-51**



## PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



## SIEMBRA DE PROPÁGULOS DE ASPERGILLUS spp.



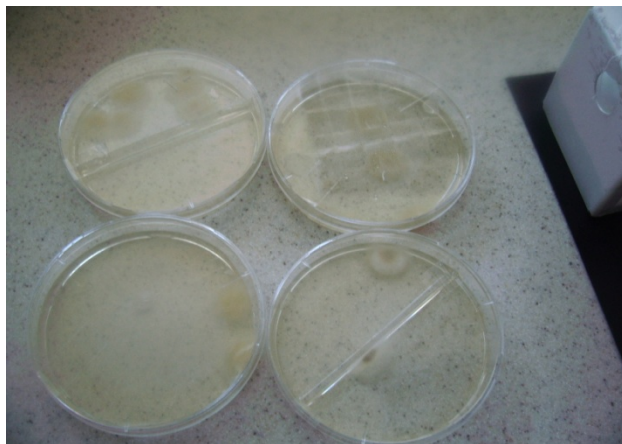
## INCUBACIÓN DE ASPERGILLUS spp.



## IRRADIACION UV-C



## CAJAS PETRI IRRADIADAS



**ANEXO II**  
**FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL**  
**LICOR DE CACAO**

**LAVADO**



**SEPARACIÓN PARTES CONSTITUTIVAS**





## **ALMENDRAS MUCILAGINOSAS**



## **EXTRACCIÓN DE EXUDADO**



## **EXUDADO DE MUCÍLAGO DE CACAO**



## MOSTOS



### MOSTO A SER ACONDICIONADO CON CASCARILLA IRRADIADA



### ACONDIDIONAMIENTO DE MOSTOS CON CASCARILLA DE CACAO





## MOSTOS ACONDICIONADOS CON CASCARILLAS DE CACAO IRRADIADAS



### ANEXO III

## TABLAS DE CONTINGENCIA DE DATOS OBTENIDOS EN LA ELABORACIÓN DEL LICOR DE CACAO

TRATAMIENTO	DIA	PROMEDIO BRIX DE 2 REPLICAS	PROMEDIO AZUCAR CONSUMIDO g/100ml	PROMEDIO AZUCAR CONSUMIDO g/L	PROMEDIOGRADO ALCOHOLICO PROBABLE (relacion 17,5 g azucar - 1 grado alcohol)
1	1	22	0	0	0
1	2	20	2	20	1,14
1	3	18	4	40	2,29
1	4	16	6	60	3,43
1	5	14	8	80	4,57
1	6	12	10	100	5,71
1	7	11	11	110	6,29
1	8	9	13	130	7,43
1	9	8	14	140	8,00
1	10	7	15	150	8,57
2	1	16,8	0	0	0,00
2	2	16	0,8	8	0,46
2	3	15	1,8	18	1,03
2	4	14,5	2,3	23	1,31
2	5	13,55	3,25	33	1,86
2	6	13	3,8	38	2,17
2	7	12,5	4,3	43	2,46
2	8	11,5	5,3	53	3,03
2	9	11	5,8	58	3,31
2	10	10	6,8	68	3,89
3	1	22	0	0	0,00
3	2	20	2	20	1,14
3	3	19	3	30	1,71
3	4	18	4	40	2,29
3	5	16	6	60	3,43
3	6	13	9	90	5,14
3	7	10	12	120	6,86
3	8	9,5	12,5	125	7,14
3	9	8	14	140	8,00
3	10	7	15	150	8,57

Continuación

4	1	16,8	0	0	0,00
4	2	16	0,8	8	0,46
4	3	15,5	1,3	13	0,74
4	4	15	1,8	18	1,03
4	5	14	2,8	28	1,60
4	6	13	3,8	38	2,17
4	7	12	4,8	48	2,74
4	8	11,5	5,3	53	3,03
4	9	11	5,8	58	3,31
4	10	10	6,8	68	3,89
5	1	22	0	0	0,00
5	2	21	1	10	0,57
5	3	19	3	30	1,71
5	4	18	4	40	2,29
5	5	16	6	60	3,43
5	6	13	9	90	5,14
5	7	10	12	120	6,86
5	8	8	14	140	8,00
5	9	7	15	150	8,57
5	10	7	15	150	8,57
6	1	16,8	0	0	0,00
6	2	16	0,8	8	0,46
6	3	15	1,8	18	1,03
6	4	14,5	2,3	23	1,31
6	5	14	2,8	28	1,60
6	6	13	3,8	38	2,17
6	7	12	4,8	48	2,74
6	8	11	5,8	58	3,31
6	9	10,5	6,3	63	3,60
6	10	10	6,8	68	3,89
7	1	22	0	0	0,00
7	2	21	1	10	0,57
7	3	19	3	30	1,71
7	4	18	4	40	2,29
7	5	16	6	60	3,43
7	6	13	9	90	5,14
7	7	10	12	120	6,86
7	8	8	14	140	8,00
7	9	7	15	150	8,57
7	10	7	15	150	8,57

Continuación

8	1	16,8	0	0	0,00
8	2	15	1,8	18	1,03
8	3	14,5	2,3	23	1,31
8	4	14	2,8	28	1,60
8	5	13	3,8	38	2,17
8	6	12	4,8	48	2,74
8	7	11	5,8	58	3,31
8	8	10,5	6,3	63	3,60
8	9	10	6,8	68	3,89
8	10	10	6,8	68	3,89

## ANEXO IV

### DATOS PROMEDIO Bx, AZUCARES CONSUMIDOS g/L, GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE (RELACIÓN 17,5 g AZÚCAR - 1 GRADO ALCOHOL)

° BRIX	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>DIA</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>PROMEDIO</b>
1	22	16,8	22	16,8	22	16,8	22	16,8
2	20	16	20	16	21,25	16,25	21,25	15
3	18	15	18,75	15,5	19,25	15	19	14,25
4	16	14,5	17,75	15	18	14,25	18	13,75
5	14	13,55	16	14,25	15,5	13,75	15,5	12,75
6	12	13,05	12,5	13	12,5	13	12,5	11,5
7	11	12,55	9,75	12	9,5	12,25	9,5	11
8	9	11,5	8,75	11,5	7,75	11	8	10,5
9	8	11,25	7,75	11,25	7	10,5	7,25	10
10	7	10	7	10	7	10	7	9,9

## AZUCARES CONSUMIDOS g/L

AZUCAR CNS. g/l	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
DIA	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	20	8	20	8	7.5	5.5	7.5	18
3	40	18	32.5	13	27.5	18	30	25.5
4	60	23	42.5	18	40	25.5	40	30.5
5	80	32.5	60	25.5	65	30.5	65	40.5
6	100	37.5	95	38	95	38	95	53
7	110	42.5	122.5	48	125	45.5	125	58
8	130	53	132.5	53	142.5	58	140	63
9	140	55.3	142.5	55.5	150	63	147.5	68
10	150	68	150	68	150	68	150	69

## GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE (RELACIÓN 17,5 g AZÚCAR - 1 GRADO ALCOHOL)

GRADO ALCOHOLICO PROBABLE (relación 17,5 g azúcar - 1 grado alcohol)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
DIA	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1,14	0,45	1,14	0,45	0,28	0,17	0,285	1,028
3	2,28	1,028	2	0,74	1,428	1,028	1,714	1,6
4	3,42	1,31	2,57	1,028	2,285	1,6	2,285	1,8857
5	4,57	1,82	3,42	1,314	4	1,885	4	2,457
6	5,71	2,11	5,71	2,17	5,714	2,171	5,714	3,314
7	6,28	2,4	7,14	2,74	7,428	2,457	7,428	3,314
8	7,42	3,028	8	3,02	8,285	3,314	8	3,6
9	8	3,028	8,28	3,02	8,571	3,6	8,2857	3,8857
10	8,57	3,885	8,57	3,88	8,571	3,885	8,5714	4

## **ANEXO V**

### **FICHA DE ANÁLISIS SENSORIAL**

**Indicaciones:**

A continuación se dispone de 2 muestras de vino o licor de cacao y 1 muestra testigo, las cuales deberán ser catadas de izquierda a derecha, bebiendo agua después de cada evaluación.

Marque con una "x" la calificación que le parezca, según la característica solicitada.



CARACTERISTICAS	CALIFICACION	DESCRIPCION	M1	M2	M3
APARIENCIA	5	Me agrada mucho			
	4	Me agrada poco			
	3	Ni me agrada, ni me desagrada			
	2	Me desagrada poco			
	1	Me desagrada mucho			
COLOR	5	Me agrada mucho			
	4	Me agrada poco			
	3	Ni me agrada, ni me desagrada			
	2	Me desagrada poco			
	1	Me desagrada mucho			
OLOR	5	Me agrada mucho			
	4	Me agrada poco			
	3	Ni me agrada, ni me desagrada			
	2	Me desagrada poco			
	1	Me desagrada mucho			
SABOR	5	Me agrada mucho			
	4	Me agrada poco			
	3	Ni me agrada, ni me desagrada			
	2	Me desagrada poco			
	1	Me desagrada mucho			
ACIDEZ	5	Demasiado acido			
	4	Muy acido			
	3	Moderadamente acido			
	2	Ligeramente acido			
	1	Nada acido			
SABOR A CACAO	5	Definido			
	4	Muy característico			
	3	Medianamente característico			
	2	Poco característico			
	1	Nada característico			
ACEPTABILIDAD GLOBAL	5	Me agrada mucho			
	4	Me agrada poco			
	3	Ni me agrada, ni me desagrada			
	2	Me desagrada poco			
	1	Me desagrada mucho			

## ANEXO VI

### TABLA DE FRECUENCIA DE CALIFICACIONES DEL ANÁLISIS SENSORIAL DEL LICOR DE CACAO

Variables de descripción	Muestras	Niveles de Calificación					Total
		5	4	3	2	1	
APARIENCIA	M1	6	4	0	0	0	
	M2	8	2	0	0	0	
	M3	0	2	8	0	0	
	<b>TOTAL</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>30</b>
COLOR	M1	0	6	2	2	0	
	M2	0	8	2	0	0	
	M3	6	4		0	0	
	<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>2</b>		<b>30</b>
OLOR	M1	5	3	2	0	0	
	M2	7	2	1	0	0	
	M3		2	8	0	0	
	<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>11</b>			<b>30</b>
SABOR	M1	6	2	2	0	0	
	M2	9	1	0	0	0	
	M3	7	2	1	0	0	
	<b>TOTAL</b>	<b>22</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>30</b>
ACIDEZ	M1	0	2	5	3	0	
	M2	0	1	6	3	0	
	M3			5	3	2	
	<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>30</b>
SABOR A CACAO	M1	2	7	1	0	0	
	M2	8	2	0	0	0	
	M3	0	0	0	8	2	
	<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>30</b>
ACEPTABILIDAD GLOBAL	M1	2	6	2	0	0	
	M2	7	2	1	0	0	
	M3	7	3	0	0	0	
	<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>30</b>

## ANEXO VII

# ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LICOR DE CACAO (TRATAMIENTO 1)



### INFORME DE RESULTADOS

INF. LASA 14-03-12-41739  
ORDEN DE TRABAJO No. 0012849

SOLICITADO POR: SR. TEODORO ALARCON  
DIRECCIÓN: LA VICENTINA  
TELÉFONO / FAX: 3227-273  
TIPO DE MUESTRA: VINO PUERTO QUITO CON AZUCAR AL 100% CASCARILLA  
PROCEDENCIA: LABORATORIO  
IDENTIFICACIÓN: M2  
COD. MUESTRA: 3137-12

FECHA RECEPCION: 29-02-12  
FECHA DE ANÁLISIS: 29-02/09-03-12  
FECHA DE ENTREGA: 14-03-12  
NÚMERO DE MUESTRAS: UNO (1)  
MUESTREO: SOLICITANTE

### ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO

PARAMETRO ANALIZADO	RESULTADO	UNIDAD	METODO DE ANALISIS
GRADO ALCOHOLICO A 15°C	13,9	°GL	INEN 340
ANHIDRIDO SULFUROSO LIBRE	76,8	mg /L.	INEN 357
ACIDEZ TOTAL acido acético	1932,8	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHIDRO EXP. ACIDO ACETICO	INEN 343

  
Dr. Marco Guillermo Ruales  
GERENTE DE LABORATORIO

LASA se responsabiliza exclusivamente de los análisis, el resultado se refiere únicamente a la muestra recibida en el laboratorio  
Producción y venta en: N53-113 y Gonzalo Cordero, Quito • Teléfonos: 2468-659 • 2469-1814 • 2269-012  
Telefax: 2468-659 • Cel.: 09 9236-287 • e-mail: info@laboratoriolasa.com  
web: www.laboratoriolasa.com • Quito - Ecuador

Pág. 1 de 1



## ANEXO VIII

# ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LICOR DE CACAO (TRATAMIENTO 3)



### INFORME DE RESULTADOS

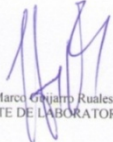
INF. LASA 14-03-12-41738  
ORDEN DE TRABAJO No. 0012849

SOLICITADO POR: SR. TEODORO ALARCON  
DIRECCIÓN: LA VICENTINA  
TELÉFONO / FAX: 3227-273  
TIPO DE MUESTRA: VINO PUERTO QUITO CON AZUCAR AL 50% CASCARILLA  
PROCEDECIA: LABORATORIO  
IDENTIFICACIÓN: M1  
COD. MUESTRA: 3136-12

FECHA RECEPCION: 29-02-12  
FECHA DE ANÁLISIS: 29-02/09-03-12  
FECHA DE ENTREGA: 14-03-12  
NÚMERO DE MUESTRAS: UNO (1)  
MUESTREO: SOLICITANTE

### ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO

PARAMETRO ANALIZADO	RESULTADO	UNIDAD	METODO DE ANALISIS
GRADO ALCOHOLICO A 15° C	14,9	°GL	INEN 340
ANHIDRIDO SULFUROSO LIBRE	51,2	mg/L	INEN 357
ACIDEZ TOTAL acido acético	1274,6	mg/ 100 ml DE ALCOHOL ANHIDRO EXP. ACIDO ACETICO	INEN 343

  
Dr. Marco Chirripo Ruales  
GERENTE DE LABORATORIO

LASA se responsabiliza exclusivamente de los análisis, el resultado se refiere únicamente a la muestra recibida en el laboratorio  
Prohibida su reproducción parcial o total por cualquier medio sin permiso por escrito del Laboratorio

Av. de la Prensa N53-113 y Gonzalo Gallo • Teléfonos: 2469- 814 / 2269-012  
Telefax: 2468-659 • Cel.: 09 9236-287 • e-mail: info@laboratoriolasa.com  
web: www.laboratoriolasa.com • Quito - Ecuador

Pág. 1 de 1

