

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS



CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS

EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS
FISICOQUÍMICAS DURANTE LA FERMENTACIÓN DE
CACAO CLON CCN51 Y CRIOLLO (*Theobroma cacao* L.)
A DIFERENTES ALTURAS GEOGRÁFICAS Y SU
INFLUENCIA EN LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL LICOR
DE CACAO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

AUTOR: Bach. Lucero Cruz Suarez

ASESOR: Mg. Hans Himbler Minchán Velayarce

CO-ASESOR: Dr. Ralph Stein Rivera Botonares

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE BIOMOLÉCULAS (Código LI_IIA_01)

JAÉN – PERÚ

2026

Lucero Cruz Suarez

EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DURANTE LA FERMENTACIÓN DE CACAO CLON CCN51 Y CRI...

 Quick Submit Quick Submit Universidad Nacional de Jaen

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::1:3615114901

80 páginas

Fecha de entrega

21 jul 2026, 2:47 p.m. GMT-5

19.505 palabras

Fecha de descarga

21 jul 2026, 2:51 p.m. GMT-5

109.704 caracteres

Nombre del archivo

TESIS_LUCERO_CRUZ_SUAREZFP_-_LUCERO_CRUZ_SUAREZ.pdf

Tamaño del archivo

3.3 MB

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN

Dra. Maria Marleni Torres Cruz
Responsable de la Unidad de Investigación
de la Facultad de Ingeniería

2% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Fuentes principales

- 1%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 1%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN



Dra. María Marleni Torres Cruz
Responsable de la Unidad de Investigación
de la Facultad de Ingeniería



ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Jaén, el día 19 de junio de 2026, siendo las 08:30 horas, se reunieron de manera **presencial**, los integrantes del Jurado:

Presidente: Dra. Dra. María Alina Cueva Ríos

Secretario: Dr. Gary Charly García Guevara

Vocal: Dr. Juan Dario Ríos Mera, para evaluar la Sustentación del:

- () Informe de Plan de Trabajo de Investigación
(X) informe Final de Tesis
() Trabajo de Suficiencia Profesional

Titulado: "EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DURANTE LA FERMENTACIÓN DE CACAO CLON CCN51 Y CRIOLLO (*Theobroma cacao* L.) A DIFERENTES ALTURAS GEOGRÁFICAS Y SU INFLUENCIA EN LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LICOR DE CACAO", presentado por la Bachiller Lucero Cruz Suarez, de la Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de Jaén.

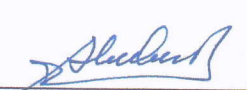
Después de la sustentación y defensa, el Jurado acuerda:

- (X) Aprobar () Desaprobar (X) Unanimidad () Mayoría

Con la siguiente mención:

- | | | |
|----------------|------------|--------|
| a) Excelente | 18, 19, 20 | () |
| b) Muy bueno | 16, 17 | () |
| c) Bueno | 14, 15 | (14) |
| d) Regular | 13 | () |
| e) Desaprobado | 12 ó menos | () |

Siendo las 9:30 horas del mismo día, el Jurado concluye el acto de sustentación confirmado su participación con la suscripción de la presente.


Dra. María Alina Cueva Ríos
Presidente de Jurado Evaluador


Dr. Gary Charly García Guevara
Secretario de Jurado Evaluador


Dr. Juan Dario Ríos Mera
Vocal de Jurado Evaluador

**"AÑO DE LA RECUPERACIÓN Y CONSOLIDACIÓN DE LA ECONOMÍA
PERUANA"**

ANEXO N°06:

**DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO
DE LA TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (PREGRADO)**

Yo, Cruz Suarez Lucero, egresado de la carrera Profesional de Ingeniería de industrias Alimentarias de la Facultad de INGENIERIA de la Universidad Nacional de Jaén, identificado (a) con DNI 77913796.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy Autor del trabajo titulado:

"Evaluación de características fisicoquímicas durante la fermentación del cacao clon ccn51 y criollo (*Teobroma cacao* L.) a diferentes alturas geográficas y su influencia en los compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante del licor de cacao".

Asesorado por Mg. Hans Himbler Minchán Velayarce.

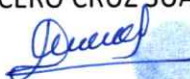
El mismo que presento bajo la modalidad de presencial para optar; el Título Profesional/Grado Académico de Ingeniera de industrias alimentarias.

2. El texto de mi trabajo final respeta y no vulnera los derechos de terceros, incluidos los derechos de propiedad intelectual. En el sentido, el texto de mi trabajo final no ha sido plagiado total ni parcialmente, para la cual he respetado las normas internacionales de citas y referencias de las fuentes consultadas.
3. El texto del trabajo final que presento no ha sido publicado ni presentado antes en cualquier medio electrónico o físico.
4. La investigación, los resultados, datos, conclusiones y demás información presentada que atribuyo a mi autoría son veraces.
5. Declaro que mi trabajo final cumple con todas las normas de la Universidad Nacional de Jaén.
6. Soy consciente de que el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio, es objeto de sanciones universitarias y/o legales.

El incumplimiento de lo declarado da lugar a responsabilidad del declarante, en consecuencia; a través del presente documento asumo frente a terceros, la Universidad Nacional de Jaén y/o la Administración Pública toda responsabilidad que pueda derivarse por el trabajo final presentado. Lo señalado incluye responsabilidad pecuniaria incluido el pago de multas u otros por los daños y perjuicios que se ocasionen.

JAEN 05 DE OCTUBRE DEL 2026.

LUCERO CRUZ SUAREZ



ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	8
II.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
	2.1. Lugar de ejecución.....	13
	2.2. Población, muestra y muestreo:	14
	2.3. Material.....	15
	2.4. Métodos, técnicas, procedimientos y técnicas de recolección de datos:.....	15
III.	RESULTADOS	34
	3.1 Características fisicoquímicas del grano fermentado.	35
	3.2 Características Proximales del licor de cacao	36
	3.3 Contenido de TPC y capacidad antioxidante del licor de cacao	38
	3.4 Análisis de Componentes principales	39
IV.	DISCUSIONES.....	43
	4.1. Características fisicoquímicas del grano fermentado	43
	4.2. Características Proximales del licor de cacao.....	45
	4.3. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante del licor de cacao.....	46
	4.4. Análisis de Componentes Principales.....	47
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	51
	5.1 Conclusiones.....	51
	5.2 Recomendaciones	51
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
VII.	ANEXOS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concentraciones del patrón de ácido gálico utilizadas para la curva de calibración de TPC.	27
Tabla 2 Concentraciones del patrón de Trolox empleadas en la curva de calibración de la capacidad antioxidante (DPPH).	29
Tabla 3. Características fisicoquímicas del grano fermentado, composición proximal, contenido de TPC y capacidad antioxidante del licor de cacao obtenida de las variedades CCN51 y Criollo cultivadas a 1096 y 404 m s.n.m.....	34
Tabla 4 Significancia estadística de la variedad, la altitud y su interacción en parámetros fisicoquímicos del grano de cacao fermentado.	35
Tabla 5 Efectos principales e interacción de la variedad y la altitud en los parámetros fisicoquímicos del grano de cacao fermentado.	36
Tabla 6 Significancia estadística de la variedad, la altitud y su interacción en la determinación de humedad, cenizas, proteínas y grasas del licor de cacao.	36
Tabla 7 Efectos principales y de interacción de la variedad y la altitud sobre la humedad, cenizas, grasas, proteínas del licor de cacao.	37
Tabla 8 Significancia estadística de la variedad, la altitud y su interacción en la determinación TPC Y AOA DPPH del licor de cacao.....	38
Tabla 9 Efectos principales y de interacción de la variedad y la altitud sobre TPC (mg GAE/g), AOA DPPH (mg TE/g) del licor de cacao.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ubicación geográfica de las zonas de colecta de dos variedades de cacao, en diferentes altitudes. Farm A a 1096 m.n.s.m, Farm B a 404 m.n.s.m.	13
Figura 2 Flujograma para la obtención de licor de cacao a partir de las variedades Cacao Castro Naranjal (CCN51) y Criollo.....	20
Figura 3 Curva de calibración del ácido gálico para la determinación del contenido de TPC.....	28
Figura 4 Curva de calibración para análisis de capacidad antioxidante DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$)	30
Figura 5 Esquema del diseño factorial 2×2 (variedad $\times$ altitud) empleado en el estudio.	31
Figura 6 Flujo de trabajo experimental para evaluar el efecto de la altitud y la variedad de cacao sobre la fermentación espontánea, los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del licor de cacao.	32
Figura 7 Análisis de Componentes Principales (PCA) de las variables fisicoquímicas del cacao en función de la altitud.	40
Figura 8 Análisis de Componentes Principales (PCA) de las variables fisicoquímicas del cacao en función de la variedad.....	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Sistema de Monitoreo Multiparamétrico utilizado en la fermentación	66
Anexo 2 Sistema de sensores utilizados para el monitoreo multiparamétrico durante la fermentación del cacao	68
Anexo 3 Sistema de fermentación de cacao instrumentado con sensores para monitoreo en campo.....	69
Anexo 4 Recolección, selección y quebrado de mazorcas de cacao previo a la fermentación	70
Anexo5 Diferenciación crítica entre especies denominadas “laurel ornamental” y “laurel amazónico” y su uso en fermentación de cacao.	71
Anexo 6 Diseño y dimensiones de los cajones fermentadores utilizados en el estudio .	72
Anexo7 Registro de Temperatura y humedad ambiental durante la fermentación.	73
Anexo 8 Evolución de la humedad y la temperatura de la masa de cacao durante la fermentación	74
Anexo 9 Etapas post-fermentativas para la obtención de licor de cacao.....	75
Anexo 10 Determinación del pH del grano de cacao durante la fermentación	76
Anexo 11 Determinación de la acidez titulable del grano de cacao fermentado.....	76
Anexo 12 Determinación del contenido de humedad en el licor de cacao.....	77
Anexo 13 Determinación del contenido de cenizas del licor de cacao	77
Anexo 14 Determinación del contenido de proteínas en el licor de cacao.....	78
Anexo 15 Determinación del contenido de grasas en el licor de cacao.	79
Anexo16 Determinación de los TPC Folin- Ciocaltiu.....	79
Anexo 17 Determinación del contenido de capacidad antioxidante en el licor de cacao	80

RESUMEN

La calidad funcional del cacao está fuertemente influenciada por factores genéticos y ambientales, siendo la altitud uno de los menos estudiados en interacción con la variedad. El objetivo fue evaluar el efecto de la variedad de cacao y la altitud geográfica sobre las características fisicoquímicas, el contenido de TPC y la capacidad antioxidante del licor de cacao obtenido mediante fermentación espontánea. El estudio se desarrolló bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2×2 , considerando dos variedades de cacao (CCN51 y Criollo) cultivadas a 404 y 1096 m s.n.m. Se realizó un monitoreo multiparamétrico durante la fermentación determinando pH, acidez titulable, así mismo, análisis proximal, TPC y capacidad antioxidante. Los resultados mostraron que el contenido de TPC fue significativamente mayor en el clon CCN51 cultivado a 1096 m s.n.m. (64.46 ± 0.88 mg equivalentes de ácido gálico por gramo en base húmeda), así como la mayor capacidad antioxidante (38.90 ± 0.32 mg equivalentes de Trolox por gramo). El cacao Criollo presentó mayor contenido proteico y menor pH del grano fermentado. Se concluye que la interacción variedad–altitud determina de manera significativa la calidad fisicoquímica y funcional del licor de cacao, aportando criterios técnicos para la valorización del cacao en sistemas de producción diferenciados por altitud.

Palabras claves: calidad fisicoquímica, capacidad antioxidante, polifenoles, genotipo, ambiente de cultivo.

ABSTRACT

The functional quality of cocoa is strongly influenced by genetic and environmental factors, with altitude being one of the least studied in interaction with cocoa variety. The objective of this study was to evaluate the effect of cocoa variety and geographical altitude on the physicochemical characteristics, total phenolic content, and antioxidant capacity of cocoa liquor obtained through spontaneous fermentation. The research was conducted under a completely randomized experimental design with a 2×2 factorial arrangement, considering two cocoa varieties (CCN51 and Criollo) cultivated at 404 and 1096 m above sea level. Multiparametric monitoring was performed during fermentation, and pH, titratable acidity, cut test, proximate composition, total phenolic content, and antioxidant capacity were determined. The results showed that total phenolic content was significantly higher in the CCN51 clone cultivated at 1096 m above sea level (64.46 ± 0.88 mg gallic acid equivalents per gram), along with the highest antioxidant capacity (38.90 ± 0.32 mg Trolox equivalents per gram wet base). Criollo cocoa exhibited higher protein content and lower fermented bean pH. It is concluded that the variety–altitude interaction significantly determines the physicochemical and functional quality of cocoa liquor, providing technical criteria for cocoa valorization in altitude-differentiated production systems.

Keywords: physicochemical quality, antioxidant capacity, polyphenols, genotype, cultivation environment.

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un producto estratégico para la industria global del chocolate, cuya demanda de granos con atributos sensoriales diferenciados, denominados “finos y de aroma”, ha experimentado un crecimiento sostenido frente a los cacaos ordinarios o *bulk* (Álvarez et al., 2022). La calidad final del grano es el resultado de una interacción compleja entre el genotipo, las condiciones edafoclimáticas del cultivo y el manejo postcosecha, siendo la variedad Criollo valorada por su perfil aromático complejo y el clon CCN51 reconocido por su alta productividad, contenido graso y resistencia a enfermedades, aunque históricamente asociado a una menor calidad organoléptica y mayor astringencia (Fang et al., 2020; Jaimez et al., 2022a; Sanchez-Capa et al., 2022; Wexler-Goering y Alvarado-Marengo, 2024). Sin embargo, la distinción comercial y la valorización entre estas categorías requieren una validación científica rigurosa de sus perfiles fisicoquímicos y funcionales bajo condiciones específicas de producción (Fang et al., 2020; Wexler-Goering y Alvarado-Marengo, 2024).

La fermentación representa la etapa crítica en la transformación bioquímica del grano, donde la actividad microbiana de levaduras y bacterias induce la proteólisis de proteínas de reserva y la degradación de azúcares, generando los precursores del sabor (aminoácidos libres, péptidos y azúcares reductores) esenciales para la reacción de Maillard durante el tostado (Balcázar-Zumaeta et al., 2023; Sanchez-Capa et al., 2022). Este proceso exotérmico conlleva cambios drásticos en el pH y la temperatura de la masa, facilitando la difusión de metabolitos como el ácido acético y láctico hacia el cotiledón, lo que induce la muerte del embrión y la consecuente reducción de la astringencia y amargor mediante la oxidación y polimerización de polifenoles y metilxantinas (Hernández et al., 2019; Nascimento et al., 2024; Polanía-Hincapié et al., 2023). No obstante, la variabilidad en las prácticas de fermentación, sumada a las condiciones ambientales del sitio de procesamiento, pueden resultar en perfiles de calidad heterogéneos que afectan la aceptabilidad sensorial del licor de cacao (Balcázar-Zumaeta et al., 2023; Vásquez Cortez et al., 2025).

Desde una perspectiva funcional, el cacao es una fuente rica en compuestos bioactivos, principalmente flavanoles (como catequina y epicatequina) y alcaloides (teobromina y cafeína), los cuales, además de definir las propiedades sensoriales, otorgan capacidad antioxidante y beneficios cardiovasculares significativos (Chapa-

Gonza et al., 2025; De Barros Kobi et al., 2024; Surprise, Moussoyi Moundanga et al., 2024). La concentración de estos metabolitos secundarios, así como el perfil de ácidos grasos de la manteca de cacao, no es estática; está fuertemente modulada por el estrés abiótico asociado al gradiente altitudinal y la temperatura ambiental del sitio de cultivo, factores que influyen en la biosíntesis de lípidos y la acumulación de antioxidantes como mecanismo de defensa vegetal (Abdelmoiz et al., 2025; Tsegay et al., 2020). A pesar de la evidencia que existe sobre el efecto individual del genotipo y el procesamiento, existe una necesidad crítica de elucidar la interacción sinérgica entre la altura geográfica y la dinámica de fermentación sobre la retención de compuestos funcionales en genotipos contrastantes (Polanía-Hincapié et al., 2023).

La selección de las altitudes evaluadas (404 y 1096 m s.n.m.) respondió a la necesidad de representar dos pisos altitudinales contrastantes característicos de la producción cacaotera en la región nor-oriental del Perú. Estas altitudes permitieron evaluar el efecto del gradiente térmico sobre el metabolismo del grano y la dinámica fermentativa. En particular, altitudes mayores a 1000 m s.n.m. se asocian con temperaturas más bajas y mayor humedad relativa, condiciones que pueden modular la biosíntesis de compuestos fenólicos y lípidos como respuesta al estrés abiótico (Abdelmoiz et al., 2025; Tsegay et al., 2020). Por otro lado, zonas de menor altitud (~400 m s.n.m.) presentan temperaturas más elevadas que aceleran la cinética fermentativa y la degradación de compuestos bioactivos (Polanía-Hincapié et al., 2023). En este contexto, la elección de estas dos altitudes permitió evaluar de manera comparativa el efecto del ambiente sobre la calidad fisicoquímica y funcional del cacao, bajo condiciones representativas de sistemas productivos reales en la región.

En las zonas cacaoteras de Jaén y San Ignacio, la comercialización de granos sin fermentar o con fermentación inadecuada representa una práctica recurrente que limita la valorización del producto, reduciendo significativamente su precio en el mercado (Cortez et al., 2024; Mayra et al., 2024). Esta situación se agrava por el desconocimiento del efecto sinérgico que ejercen el genotipo y las condiciones edafoclimáticas, particularmente el gradiente altitudinal, sobre la composición de compuestos bioactivos del licor de cacao. Estudios previos han demostrado que la fermentación modifica significativamente el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante del cacao (Cempaka et al., 2023; Cortez et al., 2023). Sin

embargo, aún no está claramente establecido cómo la interacción entre la variedad (Criollo y CCN51) y la altitud influye en la retención de estos compuestos bioactivos durante el procesamiento poscosecha en el norte del Perú.

Ruiz-Santiago et al. (2024) reportaron que durante la fermentación de clones CCN51 y la variedad Criollo, el pH del cotiledón disminuyó significativamente a medida que la temperatura alcanzaba 47 °C. Observaron que el índice de fermentación para CCN51 se acercó a 1.0 a las 120 horas, mientras que para el Criollo propusieron un valor de 2.5 basado en espectrofotometría. Asimismo, documentaron un incremento del 70% en TPC en Criollo al final del proceso, contrastando con la disminución de metilxantinas.

Mayra et al. (2024) determinaron que el tiempo de fermentación reduce significativamente la capacidad antioxidante y los TPC en variedades CCN-51 y Nacional. Reportaron que el CCN-51 retuvo mayor capacidad antioxidante (descendiendo de 1852.78 a 785.61 $\mu\text{mol TE/g}$) y contenido fenólico (de 162.82 a 52.92 mg GAE/g) en comparación con la variedad Nacional. Estos hallazgos validan la influencia del genotipo en la cinética de degradación de compuestos bioactivos bajo condiciones fermentativas similares.

Polanía-Hincapié et al. (2023) evaluaron la composición química de clones en el sur de Colombia, encontrando que el CCN-51 presentó altos contenidos de acidez (0.51%), grasa (63.61%) y proteína (12.85%) durante la fermentación. Además, este genotipo destacó por su elevado contenido de TPC (64.56 mg g⁻¹) y capacidad reductora DPPH (325.55 $\mu\text{mol g}^{-1}$), evidenciando diferencias significativas frente a otros clones regionales en su perfil bromatológico y funcional.

Quispe-Sanchez (2023) reportaron que durante la fermentación de genotipos Criollo (CAP-39) y CCN-51, el pH alcanzó su máximo a las 48 horas antes de descender, con una acidez titulable inversa. Observaron pérdidas significativas de compuestos bioactivos, donde el Criollo mostró una reducción del 74.73% en epicatequina (de 8.19 a 2.07 mg/g) y el CCN-51 una pérdida del 50.21%, confirmando la degradación oxidativa de flavanoles dependiente del genotipo y el procesamiento.

Vásquez Cortez et al. (2025) demostraron que la fermentación controlada en cajas Rohan optimizó las condiciones fisicoquímicas en cacao CCN51 y Nacional,

alcanzando temperaturas de 49.5 °C y un pH final de 5.0 a 5.2. Este método permitió una capacidad antioxidante superior (hasta 720.15 μmol Trolox/g en CCN51 con inducción microbiana) y un 83.6% de granos bien fermentados, superando significativamente a los métodos tradicionales en la conservación de la calidad funcional y organoléptica.

Mota-Gutierrez et al (2021) establecieron una relación positiva entre el gradiente altitudinal y la morfología del grano, donde cultivos entre 801 y 1000 m s.n.m. presentaron mayor peso promedio de almendra seca (147.47 g por 100 unidades) frente a zonas bajas (<200 m s.n.m., 130.6 g). Asimismo, el porcentaje de cascarilla disminuyó al 11.08% en las zonas de mayor altitud, sugiriendo un mayor rendimiento del grano comestible en pisos térmicos superiores.

Samaniego et al. (2021) evaluaron el cacao Nacional en Ecuador, reportando que el contenido de grasa total varió entre 45.61 y 52.13 g/100 g, siendo superior en la región amazónica respecto a la costa. Identificaron que los ácidos grasos mayoritarios, como el palmítico y esteárico, así como el perfil insaturado, mostraron variabilidad significativa según la procedencia geográfica, confirmando que las condiciones edafoclimáticas de la zona de cultivo modulan la biosíntesis lipídica.

Álvarez et al. (2022) estudiaron el beneficio del cacao Criollo venezolano, reportando que el contenido de grasa cruda se mantuvo estable (53.64-54.71%) durante la fermentación y secado. Observaron una disminución significativa en la proteína cruda de 16.12% en grano sin fermentar a 14.12% en tostado, y una reducción drástica de TPC de 14.40 a 2.00 mg/g. Estos cambios fisicoquímicos resaltan la susceptibilidad de la fracción nitrogenada y fenólica ante el procesamiento térmico.

(Guillen-Guerrero y de la Rosa-Millan, 2025) analizaron el efecto de la temperatura de fermentación, encontrando que el contenido de grasa (53-54%) y proteína (16-17%) se mantuvo estable, mientras que los azúcares libres disminuyeron drásticamente. Reportaron una caída significativa en la capacidad antioxidante de 795 a 85 μM Trolox eq y en el contenido fenólico de ~180 a 22.32 mg/g tras el tostado, indicando que el procesamiento térmico es crítico para la retención de bioactivos.

Chapa-Gonza et al. (2025) compararon el perfil químico del clon CCN51 frente a genotipos de aroma fino, encontrando que el CCN51 presentó un contenido de humedad de 5.68%, proteína de 14.51% y grasa de 27.12% en grano crudo. Además, este clon exhibió el mayor contenido de TPC (125.40 mg TAE/g) y un pH de 5.4, diferenciándose significativamente de los genotipos nativos que mostraron menores cargas polifenólicas y variabilidad en su composición proximal.

En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo general la evaluación de características fisicoquímicas durante el proceso fermentativo de cacao Clon Colección Castro Naranjal (CCN51) y criollo a diferentes alturas geográficas y su influencia en los TPC y capacidad antioxidante del licor de cacao. Los objetivos específicos fueron (i) Evaluar las características físicas y químicas en el proceso fermentativo del cacao en dos variedades clon CCN51 y Criollo en las tres alturas geográficas (404 m s.n.m. , 1096 m s.n.m.), (ii) Determinar los TPC en el licor de cacao, proveniente de granos fermentado de las variedades clon CCN51 y Criollo en tres alturas geográficas (404 m s.n.m., 1096 m s.n.m.) (iii) Determinar la capacidad antioxidante en el licor de cacao, proveniente de granos fermentado de las variedades clon CCN51 y Criollo en tres alturas geográficas (404 m.s.n.m., 1096 m s.n.m.).

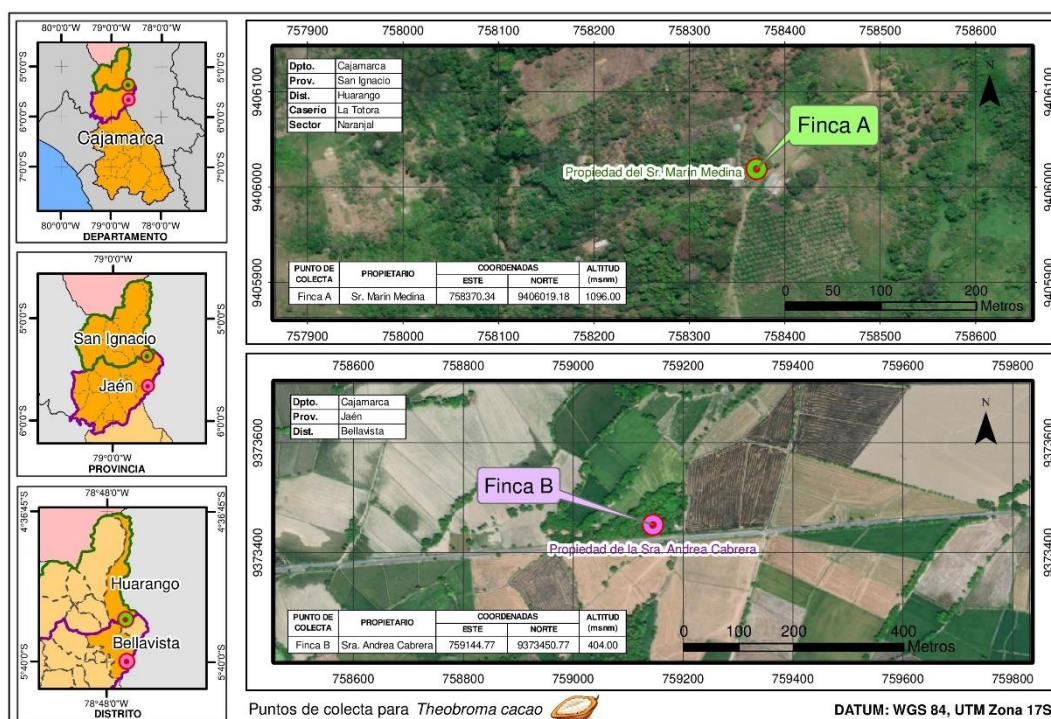
II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

Este estudio se realizó empleando granos de cacao de las variedades CCN51 y Criollo cultivados en dos zonas con distinta altitud. La zona de mayor altitud (1096 m s.n.m.) correspondió al sector El Naranjal, caserío La Totorá, distrito de Huarango, Provincia de Jaén, Departamento de Cajamarca (Figura 1) de donde se colectaron las muestras procedentes de la finca del señor Marín Medina (UTM zona 17S, 758370.34E, 9406019.18N). La zona de menor altitud (404 m s.n.m.) correspondió al distrito de Bellavista, donde las muestras fueron obtenidas de la parcela de la señora Andrea Cabrera (UTM zona 17S, 759144.74E, 9373450.77N).

Figura 1

Ubicación geográfica de las zonas de colecta de dos variedades de cacao, en diferentes altitudes. Finca A a 1096 m n.s.m, Finca B a 404 m n.s.m.



Las características fisicoquímicas como pH y acidez se determinaron en la provincia de Jaén, en el Laboratorio de Química de la Carrera Profesional Tecnología Médica de la Universidad Nacional de Jaén, Car. Jaén San Ignacio Km. 24 Sec. Yanayacu- Jaén. Los procesos de fermentación y secado se realizaron en condiciones controladas en las localidades de origen correspondientes a cada altitud. Las etapas

de tostado, descascarillado, refinado y obtención del licor de cacao se ejecutaron en las instalaciones de la Cooperativa de Servicios Múltiples Sol&Café Ltda., ciudad de Jaén, departamento de Cajamarca. Los análisis de TPC y capacidad antioxidante se desarrollaron en la provincia de Chachapoyas, en el Laboratorio de Nutrición Animal y Bromatología de Alimentos de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Triunfo, Chachapoyas.

2.2. Población, muestra y muestreo:

2.2.1. Población

La población por estudiar correspondió a las mazorcas de cacao *Theobroma cacao* L. CCN51 y Criollos provenientes de la fermentación y recolectadas de dos alturas geográficas el Naranjal (1096 m s.n.m.) y Bellavista (404 m s.n.m.).

2.2.2. Muestra

Fueron aproximadamente 480 unidades de mazorca, por variedad y por altura geográfica. Obteniéndose a partir de estos 120 kilogramos de granos de cacao en mucílago, tanto para la variedad CCN51y criollo. De esta forma para todos los tratamientos, se utilizaron 480 mazorcas, que beneficiadas representaron 120 Kg de granos en mucílago, aproximadamente.

2.2.3. Muestreo

La recolección del material biológico se ejecutó en el mes de Julio y agosto del 2024 mediante un muestreo no probabilístico dirigido, aplicando criterios de selección sistemática para garantizar la representatividad fenotípica y sanitaria del lote. En la fase de campo, se seleccionaron aleatoriamente árboles representativos dentro de las parcelas experimentales, recolectando únicamente mazorcas en estado óptimo de madurez fisiológica, exentas de daños mecánicos y libres de enfermedades fúngicas visibles (Álvarez et al., 2022; De Barros Kobi et al., 2024; Polanía-Hincapié et al., 2023; Samaniego et al., 2021). Posteriormente, para la gestión de las muestras en laboratorio y la obtención de la unidad analítica, se aplicó la técnica de cuarteo, la cual permitió reducir y homogeneizar la masa total de granos fermentados y secos hasta obtener submuestras representativas (entre 150 g y 250 g) destinadas a la caracterización fisicoquímica y funcional, asegurando así la reproducibilidad de los resultados analíticos (Hernández et al., 2019; Ortega et al., 2021).

2.3. Material

2.3.1. Reactivos químicos

Los reactivos empleados en la presente investigación incluyeron metanol (50 % y 80 %, Sigma-Aldrich, EE. UU.), éter de petróleo (Merck, Alemania), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Sigma-Aldrich, EE. UU.), Trolox (Sigma-Aldrich, EE. UU.), tartrato de sodio-potasio tetrahidratado (J.T. Baker, EE. UU.), hidróxido de sodio (NaOH, J.T. Baker, EE. UU.), carbonato de sodio (Na_2CO_3 , J.T. Baker, EE. UU.) y el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica y se emplearon sin purificación adicional.

2.4. Métodos, técnicas, procedimientos y técnicas de recolección de datos:

El presente estudio se desarrolló bajo un enfoque de análisis de proceso–producto final, en el cual la fermentación del cacao fue considerada como la etapa experimental principal, mientras que el licor de cacao obtenido representó la matriz de evaluación final. Este enfoque permitió establecer relaciones causales entre las condiciones del proceso fermentativo y la calidad del producto final, integrando la evaluación de variables de proceso y variables de respuesta en un mismo diseño experimental.

2.4.1 Metodologías:

2.4.1.1. Sistema de monitoreo multiparamétrico utilizado durante la fermentación

El seguimiento continuo de las variables fisicoquímicas durante el proceso fermentativo se realizó mediante un sistema automatizado de adquisición de datos basado en microcontrolador Arduino (Arduino, Mega 2560 Pro, Italia), equipado con sensores específicos para cada variable (ver Anexo 1).

La temperatura interna de la masa fermentativa se registró mediante sensores digitales DS18B20 (Maxim Integrated, EE.UU.) con rango de medición de $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ y precisión de $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, montados en sondas porta-sensores de acero inoxidable AISI 304 (5 cm diámetro $\times$ 40 cm longitud) insertadas a diferentes profundidades (10, 20 y 30 cm) en la masa. La humedad de la masa se monitoreó mediante sensores capacitivos V1.2 (DFROBOT, China) calibrados previamente con estándares gravimétricos. Las condiciones ambientales (temperatura y humedad

relativa) del recinto de fermentación se registraron simultáneamente mediante sensores DHT22/AM2302 (Aosong, China) y BME280 (Bosch Sensortec, Alemania) (ver Anexo 2)

El sistema operó con alimentación eléctrica dual adaptado a cada localidad: en Bellavista (404 m s.n.m.), mediante red eléctrica convencional regulada con convertidores DC-DC Step-Down XL4005; en El Naranjal (1096 m s.n.m.), mediante sistema autónomo de energía solar fotovoltaica compuesto por panel solar policristalino de 50W, controlador de carga PWM 12/24V y batería de ciclo profundo de 12V-18Ah, con autonomía superior a 72 horas. Los datos se almacenaron localmente en tarjetas MicroSD de 32 GB y se sincronizaron mediante módulos RTC DS3231 (precisión: ± 2 ppm). La adquisición automática de datos se realizó con frecuencia de 1 lectura por hora durante la totalidad del periodo fermentativo, generando archivos en formato CSV con estructura: fecha, hora, temperatura de masa ($^{\circ}\text{C}$), humedad de masa (%), temperatura ambiental ($^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (%) (Anexo 3).

2.4.1.2. Recolección, selección y quebrado de mazorcas de cacao

Las mazorcas de cacao de las variedades CCN51 y Criollo fueron recolectadas manualmente en cada parcela experimental, seleccionándose únicamente frutos fisiológicamente maduros según coloración externa característica y ausencia de daños visibles. Se descartaron mazorcas con signos de enfermedades, infestación por insectos, daños mecánicos o sobre maduración, a fin de asegurar la homogeneidad de la materia prima (Anexo 4).

El quebrado de las mazorcas se realizó de forma manual mediante herramientas no metálicas, evitando daños en el cotiledón y contaminación externa. Los granos frescos en mucílago fueron extraídos cuidadosamente, colocados en recipientes de polietileno de grado alimentario limpio previamente desinfectado (solución de hipoclorito de sodio de 100–200 ppm) y sometidos a una selección adicional, eliminándose granos inmaduros, germinados o defectuosos. La masa fresca de granos en mucílago fue pesada para estandarizar la carga inicial y transferida inmediatamente a los fermentadores correspondientes para iniciar el proceso fermentativo bajo las condiciones experimentales establecidas.

2.4.1.3. Fermentación espontánea de granos de cacao.

La fermentación espontánea de los granos de cacao se realizó en dos localidades con distinta altitud geográfica (El Naranjal y Bellavista). En ambos sitios se emplearon las variedades CCN51 y Criollo, cultivadas bajo condiciones agroclimáticas propias de cada zona (Figura 1).

Los cajones fermentadores utilizados en este estudio fueron elaborados con madera de laurel amazónico *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken perteneciente a la familia Boraginaceae (Ecuador Forestal, 2012). Su selección se fundamenta en el conocimiento técnico local y en evidencia científica que respalda su uso en fermentación de cacao. Mendoza, (2020) evaluó cajones de laurel, pino y guayacán blanco para la fermentación de cacao, reportando mejores atributos organolépticos en el tratamiento Laurel–Cacao Nacional. Asimismo, una revisión sobre fermentadores en San Martín, Perú, destaca al laurel como madera adecuada por su resistencia a la humedad y ausencia de resinas que afecten la calidad del grano (Andrade et al., 2019). En consecuencia, el uso de madera de laurel amazónico constituye una práctica técnicamente sustentada, inocua y validada por productores cacaoteros (Botanical-online, 2022; Ecuador Forestal, 2012; Erazo et al., 2021; MEFCCA, 15/02026; SMART, 2023; UNICEN, 2025) (Anexo 5).

En cada localidad se instalaron tres fermentadores de madera de Laurel de tipo cajón rectangular, contruidos con tablonos de madera de 2.5 cm de grosor, con dimensiones internas de 40 × 40 × 45 cm (con cámara adicional para remoción) y capacidad real aproximada de 40 kg de masa fresca por unidad. Los fermentadores contaron con aproximadamente 12 orificios de drenaje de 1 cm de diámetro distribuidos uniformemente en el fondo para facilitar la evacuación del exudado generado durante el proceso fermentativo (Anexo 6). La masa de cacao se distribuyó homogéneamente en los fermentadores al inicio del proceso y se cubrió completamente con bolsas de polietileno de calibre comercial, siguiendo las prácticas predominantes en la zona para favorecer la retención de calor, incrementar la temperatura de la masa y mantener condiciones de humedad adecuadas durante las fases anaeróbica y aeróbica de la fermentación.

La remoción manual de los granos se efectuó cada 24 h en ambos genotipos, utilizando palas de madera esterilizadas para evitar contaminación cruzada (Subroto

et al., 2023). Esta operación permitió homogeneizar la temperatura de la masa, favorecer la aireación y redistribuir los microorganismos fermentativos a través de toda la masa. Las condiciones climáticas propias de cada zona, particularmente la temperatura ambiental y humedad relativa, determinaron diferencias en la duración total del proceso fermentativo (Anexo 7). En El Naranjal (1096 m s.n.m), el clon CCN51 se fermentó durante 7 días y la variedad Criollo durante 5 días, mientras que en Bellavista (404 m s.n.m) ambas variedades completaron la fermentación en 4 días. El criterio para determinar el final de la fermentación fue la estabilización de la temperatura de la masa por debajo de 55 °C (**50° C** para Bellavista y **45° C** para El Naranjal) durante 24 h consecutivas y la ausencia de exudado. Adicionalmente, también se consideró la prueba de corte, en donde se consideró un 78% de granos fermentados como mínimo (Anexo 8).

Las condiciones de temperatura y humedad durante la fermentación fueron monitoreadas de forma continua, considerando su influencia directa en la actividad microbiana y en la cinética del proceso. De acuerdo con la literatura, la fermentación del cacao se desarrolla óptimamente en rangos de temperatura de la masa entre 45 y 50 °C, mientras que la temperatura ambiental suele oscilar entre 25 y 35 °C, con humedades relativas superiores al 70% (Balcázar-Zumaeta et al., 2023; Polanía-Hincapié et al., 2023).

Al finalizar el proceso fermentativo, las muestras se recolectaron asépticamente tomando 100 g de masa fermentada de la zona central de cada fermentador, utilizando utensilios de acero inoxidable previamente esterilizados con alcohol al 70% v/v. Las muestras se depositaron en recipientes herméticos de polietileno de alta densidad previamente rotulados con variedad, altitud de cultivo (m s.n.m.), localidad y fecha. El transporte se realizó inmediatamente en cajas térmicas de poliestireno expandido (tecnopor), equipadas con acumuladores de frío tipo gel pack previamente congelados a -18 °C, con el fin de mantener la cadena de frío (temperatura interna ≤ 5 °C) durante el traslado hacia el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología Médica de la Universidad Nacional de Jaén, ubicado en la carretera Jaén–San Ignacio, km 24, sector Yanayacu, Jaén, donde se realizaron los análisis de pH y acidez titulable dentro de las 4 h posteriores a la recolección.

Prueba de corte del grano fermentado (%Pc)

El grado de fermentación se evaluó mediante la prueba de corte (cut test), siguiendo el protocolo estándar descrito por la NTP-ISO 2451-2028 INACAL (Instituto Nacional de Calidad, 2018). Se seleccionaron aleatoriamente 50 granos fermentados por tratamiento, los cuales se cortaron longitudinalmente con un bisturí para exponer la sección transversal del cotiledón. Se evaluó visualmente la proporción de granos bien fermentados (color marrón uniforme), parcialmente fermentados (presencia parcial de color violeta), no fermentados (color violeta intenso o pizarroso) y defectuosos (mohosos, infestados o germinados). Los resultados se expresaron como porcentaje de granos bien fermentados (%Pc).

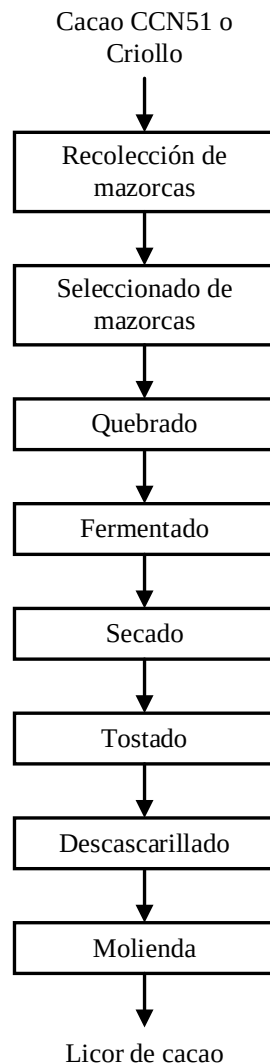
Secado, tueste, molienda y refinado para la producción de licor de cacao

Los granos fermentados fueron sometidos a un proceso estandarizado de secado, tostado, molienda y refinado para la obtención del licor de cacao. El secado se realizó a temperatura ambiente en un secador solar tipo carpa sanitaria, diseñado para garantizar la inocuidad durante la deshidratación. El proceso tuvo una duración total de 4 días, con una temperatura ambiente promedio de $(32 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C})$

Los pasos completos y detallados desde la recolección hasta la obtención del licor de cacao se hallan en la Figura 2.

Figura 2

Flujograma para la obtención de licor de cacao a partir de las variedades Cacao Castro Naranjal (CCN51) y Criollo



El laboratorio de la Cooperativa de Servicios Múltiples Sol&Café tenía establecido un rango de tostado de 120 °C para la variedad Criollo y 125 °C para el clon CCN51. Con el fin de evitar la introducción de una nueva variable independiente en el diseño experimental, se empleó un valor promedio de 123 °C como temperatura fija de tostado para ambas variedades.

Por lo que, para el tostado, se procesaron 1 kg de granos por fermentador en un tostador (Pinhalense, TP-02-N° 238322, Brasil) a 123 °C para ambas variedades

durante 23 minutos. Posteriormente, los granos tostados fueron sometidos a una primera molienda en una licuadora (Oster4655, México) durante 10 minutos, obteniéndose una pasta preliminar.

La pasta resultante fue refinada en una refinadora (Premier Chocolate Refiner, life stylePG – 508, EE. UU) a 39 °C durante 12 horas, hasta alcanzar la fluidez y granulometría propias del licor de cacao. El licor refinado se envasó en moldes de 1 kg y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su almacenamiento en refrigeración (Anexo 9).

2.4.1.4. Determinación de características fisicoquímicas durante la fermentación del grano cacao

Determinación de pH AOAC 970.21 (AOAC, 2019)

Al finalizar cada proceso fermentativo, se determinó el pH del grano siguiendo el método AOAC 970.21 (AOAC, 2019). Un gramo de grano fermentado finamente triturado se dispersó en 25 mL de agua destilada, agitado hasta obtener una suspensión homogénea y medido con un pH-metro digital de mesa (Hanna Instruments, HI6221, EE.UU.) (Anexo 10).

Acidez titulable AOAC 970.21 (AOAC, 2016)

La acidez titulable se cuantificó también de acuerdo con AOAC 970.21 (AOAC, 2016). Se pesó 1 g de grano triturado en una fiola de 100 mL, se añadieron 50 mL de agua destilada y la mezcla se agitó durante 30 min. Posteriormente, se aforó a volumen, se dejó decantar y se filtró mediante tela organza. Un alícuota de 25 mL del filtrado se tituló con NaOH estandarizado utilizando fenolftaleína como indicador (Anexo 10). y se anotó el volumen de hidróxido de sodio (NaOH) gastado para finalmente introducir el valor en la ecuación (1) (Anexo11).

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(V1 \times N \times \text{Peq})}{V2} \times 100 \dots (11)$$

Donde:

V1 = Volumen consumido de NaOH en la valoración

N = Normalidad de la solución de NaOH 0.1N

Peq = Valor del miliequivalente en gramos del ácido cítrico (0,064)

V2= Volumen de la muestra (mL)

2.4.1.5. Análisis proximal de licor de cacao

Humedad AOAC-926.01 (AOAC, 2019)

Se pesaron 1.0 g de licor de cacao y se colocaron en la placa de un analizador de humedad A&D MX-50 (A&D Weighing, Japón). Una vez finalizado el proceso, se anotó el resultado obtenido por el equipo. Los resultados son expresados en porcentaje (%) (Anexo 12).

Cenizas AOAC-923.03 (AOAC, 2019)

Previamente, se colocaron los crisoles en la estufa (CLN 115, Pol-Eko, Alemania) a 105 ± 25 °C; luego se pasaron a un desecador y se enfriaron a temperatura ambiente. Esta operación se repitió hasta obtener el peso constante (W_1). Seguidamente, la muestra de 1g (W_2) se llevó a incinerar en la mufla (ECO 110/15, Protherm, Alemania) a 550 ± 25 °C durante 3 a 5 h, hasta observar cenizas blancas, ligeramente grises o hasta el peso constante. Luego, se enfriaron en un desecador y, cuando alcanzaron la temperatura ambiente, se pesaron (W_3) (Anexo 13). El residuo como cenizas totales se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Cenizas totales (\%)} = \frac{W_3 - W_1}{W_2} * 100 \quad \dots(2)$$

Determinación de proteína total mediante método de combustión tipo Dumas AOAC -990.03 (Association of Official Analytical Chemists., 2019).

El contenido de proteína total del licor de cacao fue determinado mediante el método de combustión tipo Dumas siguiendo el principio establecido en el método oficial AOAC 990.03, empleando un analizador elemental LECO CHNS-628 (LECO Corporation, St. Joseph, Michigan, USA), el cual permite la determinación del nitrógeno total mediante combustión a alta temperatura y detección por conductividad térmica. Previamente al análisis, las muestras fueron homogeneizadas, secadas hasta peso constante para minimizar interferencias por humedad y posteriormente molidas en un molino de cuchillas hasta obtener una granulometría aproximada de 149 μm , con la finalidad de asegurar la homogeneidad y favorecer una combustión completa. El contenido de humedad fue determinado previamente para expresar los resultados en base húmeda

Para cada determinación se pesaron entre 0.1000 y 0.2500 g de muestra utilizando una balanza analítica (precisión ± 0.0001 g), colocándose la muestra en

cápsulas de estaño (LECO Corporation, USA), las cuales fueron selladas formando un pellet compacto para evitar pérdidas de material y garantizar una adecuada introducción en el autosampler del equipo. El análisis se realizó mediante combustión completa de la muestra en atmósfera de oxígeno puro (O₂) como gas oxidante, empleando helio (He) como gas portador, lo cual permitió el transporte eficiente de los gases de combustión hacia el sistema de detección. Durante el proceso, la muestra fue sometida a temperaturas aproximadas de 950 °C en el horno de combustión y cerca de 850 °C en la zona de post-combustión, asegurando la oxidación total de la materia orgánica. Como resultado de la combustión, los compuestos nitrogenados fueron transformados inicialmente en óxidos de nitrógeno (NO_x), los cuales posteriormente fueron reducidos a nitrógeno molecular (N₂) mediante una columna reductora con cobre metálico, mientras que el CO₂ y el vapor de agua fueron eliminados mediante absorbentes específicos como Anhydrone (remoción de H₂O) y Lecosorb (remoción de CO₂), permitiendo que únicamente el nitrógeno molecular llegue al detector de conductividad térmica (TCD), donde fue cuantificado.

La calibración del equipo se realizó utilizando EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como estándar primario de referencia debido a su contenido conocido de nitrógeno (9.56 %), realizándose corridas de calibración inicial y verificaciones periódicas del blanco mediante cápsulas vacías para comprobar la estabilidad instrumental y corregir posibles desviaciones analítica (Anexo 14). Posteriormente, el porcentaje de nitrógeno total obtenido fue convertido a proteína cruda utilizando el factor de conversión general para alimentos (6.25), mediante la ecuación:

$$\text{Proteínas (\%)} = \text{Nitrógeno total (\%)} \times 6.25 \dots (3)$$

Asimismo, cuando fue necesario expresar los resultados en base seca, se aplicó la corrección por humedad mediante la ecuación:

$$\text{Proteínas} = \frac{\text{Proteínas b.h} \times 100}{100 - \text{Humedad}} \dots (4)$$

donde Proteína bs corresponde al contenido de proteína en base seca y Proteína b.h al contenido de proteína en base húmeda. Todas las determinaciones se realizaron

por triplicado para asegurar la reproducibilidad analítica, considerándose aceptables aquellos resultados cuyo coeficiente de variación fue menor al 2 %, siguiendo los criterios de control de calidad analítica recomendados para métodos de combustión tipo Dumas.

Grasas (método soxhlet) AOAC-920.39 (AOAC, 2019)

El contenido de grasa total del licor de cacao fue determinado mediante extracción continua en equipo Soxhlet, de acuerdo con el método AOAC 920.39 (AOAC, 2019). Previamente, las muestras de licor de cacao fueron homogeneizadas y secadas hasta peso constante para eliminar la humedad residual que pudiera interferir en la eficiencia de la extracción lipídica. Posteriormente, se pesaron aproximadamente 2–3 g de muestra seca y se colocaron en cartuchos de celulosa previamente acondicionados.

La extracción se realizó utilizando éter de petróleo como solvente orgánico, manteniendo un ciclo continuo de reflujo durante un periodo no menor a 6 h, asegurando la completa solubilización y recuperación de la fracción lipídica. Finalizado el proceso, el solvente fue eliminado por evaporación y el residuo graso recuperado fue secado en estufa a 105 °C hasta peso constante, seguido de enfriamiento en desecador (Anexo 15).

El contenido de grasa total fue calculado gravimétricamente por diferencia de masa y expresado como porcentaje (%) de grasa sobre base seca, de acuerdo con la siguiente relación:

$$Grasas (\%) = \frac{M_2 - M_1}{M_0} * 100 \quad \dots (5)$$

Donde:

M_0 = masa de la muestra seca.

M_1 = masa del matraz vacío

M_2 = masa del matraz con la grasa extraída.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Determinación de Carbohidratos totales.

El contenido de carbohidratos totales del licor de cacao fue determinado por el método indirecto por diferencia, de acuerdo con procedimientos ampliamente utilizados en análisis proximal de alimentos (AOAC, 2019a). Este método se basa en la estimación del contenido de carbohidratos a partir de la diferencia entre el 100 % del peso total de la muestra y la suma de los componentes previamente determinados: humedad, proteína, grasa y cenizas (Guillen-Guerrero y de la Rosa-Millan, 2025). La cuantificación se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Carbohidratos (\%)} = 100 - (\% \text{ H} + \% \text{ P} + \% \text{ G} + \% \text{ C}) \dots (6)$$

Donde H, humedad; P, proteínas; G, grasas; C; cenizas

Los resultados fueron expresados en base húmeda.

2.4.1.6. Determinación del contenido de Compuestos Fenólicos Totales (TPC)

Preparación de la Muestra y Obtención del Extracto

Las muestras de licor de cacao fueron desgrasadas antes de la extracción de TPC. Se pesaron 2 g de licor de cacao y se transfirieron a tubos Falcon de 15 mL, añadiendo 10 mL de éter de petróleo. La mezcla se agitó en un shaker (Tecnal, TE-0854, Brasil), a 300 rpm durante 20 min y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Este procedimiento de desgrasado se repitió en tres ciclos consecutivos. El material resultante se mantuvo en una campana de extracción (BioSmartest, FH1200, China) durante 48 h para asegurar la completa eliminación del solvente.

Para la extracción, se pesaron 100 mg de muestra de cacao, a los cuales se adicionaron 9 mL de metanol al 50 % (V/V) (CH_3OH , alcohol metílico). La mezcla fue homogenizada durante 1 minuto en un agitador (Tecnal, TE-0854, Brasil). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (Thermo Cientific, Sorvalx1RPRO, EE. UU) a 3000 rpm durante 30 minutos, y el sobrenadante obtenido fue filtrado utilizando papel filtro Whatman N°42.

Determinación de Compuestos Fenólicos Totales (TPC)

Para la extracción, se pesaron 100 mg de muestra de cacao, a los cuales se adicionaron 9 mL de metanol al 50 % (V/V) (CH_3OH , alcohol metílico). La mezcla fue homogenizada durante 1 minuto en un agitador (Tecnal, TE-0854, Brasil). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (Thermo Cientific, Sorvalx1RPRO, EE. UU) a 3000 rpm durante 30 minutos, y el sobrenadante obtenido fue filtrado utilizando papel filtro Whatman N°42.

El contenido total de compuestos fenólicos (TPC) se cuantificó mediante el método colorimétrico de Folin–Ciocalteu (Folin y Ciocalteu, 1927; Singleton y Rossi, 1965). Para la reacción colorimétrica, en un tubo de ensayo se mezclaron 0.1 mL del extracto con 1.0 mL del Reactivo C (reactivo alcalino cúprico), obteniéndose un volumen final de 1.1 mL. La mezcla se homogenizó y se dejó reposar entre 10 y 15 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente, se preparó un blanco reemplazando el extracto por metanol al 50 % (V/V) (CH_3OH).

Posteriormente, se adicionaron 0.2 mL del Reactivo D (reactivo de Folin–Ciocalteu) y la mezcla se dejó reposar durante 60 minutos en condiciones ambientales para el desarrollo del color. Finalmente, la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 660 nm utilizando un espectrofotómetro UV–Vis (Thermo Cientific, Multiskan Sky High, EE.UU).

Preparación de reactivos

El Reactivo A fue preparado utilizando tartrato doble de sodio y potasio tetrahidratado ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (sal de Rochelle) al 2.7 % p/v. Para ello, se disolvieron 27 g del compuesto en 1 L de agua destilada. Para preparar 100 mL, se pesaron 2.7 g y se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Este reactivo fue almacenado a 4 °C, con una estabilidad máxima de 2 meses.

El Reactivo B consistió en una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) (soda ash) al 2 % p/v preparada en hidróxido de sodio 1 N (NaOH) (soda cáustica). Para su preparación, se disolvieron 1.2 g de NaOH en 2.4 mL de agua destilada, posteriormente se añadieron 6 g de Na_2CO_3 hasta su completa disolución, y finalmente se completó el volumen hasta 300 mL con agua destilada. Este reactivo también se conservó a 4 °C con una estabilidad máxima de 2 meses.

El Reactivo C (reactivo alcalino cúprico) fue preparado mezclando los Reactivos A y B en proporción 1:99. Para 300 mL, se añadieron 3 mL del Reactivo A a 297 mL del Reactivo B. Es importante respetar el orden de adición (primero A y luego B). Este reactivo debe prepararse inmediatamente antes de su uso, ya que no es estable para almacenamiento.

El Reactivo D correspondió al reactivo de Folin–Ciocalteu (mezcla de ácidos fosfomolibdico $H_3PMo_{12}O_{40}$ y fosfotúngstico $H_3PW_{12}O_{40}$), utilizado como reactivo colorimétrico para la determinación de compuestos fenólicos. Para su preparación, se diluyeron 25 mL del reactivo comercial Folin–Ciocalteu con 25 mL de agua destilada, obteniendo un volumen final de 50 mL, suficiente para aproximadamente 50 determinaciones.

Para la cuantificación del contenido de TPC, se elaboró una curva de calibración empleando ácido gálico como estándar en un rango de concentración de 0 a 600 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones patrón fueron preparadas mediante diluciones sucesivas en metanol al 50%, manteniendo un volumen final constante. Las concentraciones, así como los volúmenes correspondientes de ácido gálico y solvente utilizados en cada punto de calibración, se presentan en la Tabla (Anexo 16).

Tabla 1

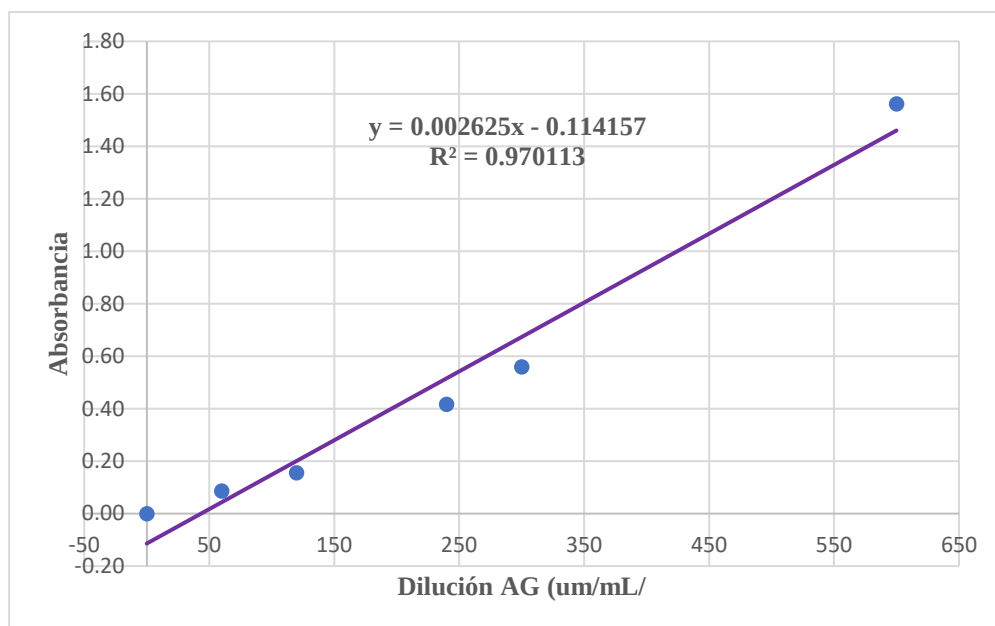
Concentraciones del patrón de ácido gálico utilizadas para la curva de calibración de TPC.

Nº	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Acido gálico (μL)	Metanol 50% (μL)	Total (μL)
1	0	0	250	250
2	60	5	245	250
3	120	10	240	250
4	240	20	230	250
5	300	25	225	250
6	600	50	200	250

La relación lineal entre la concentración de ácido gálico y la absorbancia fue evaluada mediante regresión lineal, obteniéndose un ajuste adecuado del modelo que permitió la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos totales en las muestras analizadas. La ecuación de la recta de calibración y el coeficiente de determinación asociado se presentan en la Figura 3.

Figura 3

Curva de calibración del ácido gálico para la determinación del contenido de TPC



El TPC se calculó a partir de la concentración obtenida mediante la curva de calibración de ácido gálico, considerando el volumen total del extracto y la masa de muestra empleada. La cuantificación se realizó utilizando la ecuación:

$$TPC \left(\frac{mgEAG}{g \text{ b.h.}} \right) = \frac{CxV}{1000xm} \dots (7)$$

Donde:

C: concentración obtenida a partir de la curva de calibración (µg/mL).

V: volumen total del extracto (mL) → en este caso 10 mL.

m: masa de muestra (g) utilizada en la extracción.

2.4.1.7. Determinación de la Actividad antioxidante DPPH

La capacidad antioxidante se determinó mediante el radical DPPH utilizando extractos metanólicos (Brand-Williams et al., 1995). Se pesaron 100 mg de muestra y se mezclaron con 5 mL de metanol al 80% en un tubo Falcon. La suspensión se agitó en vortex (Tecnal, TE-0854, Brasil) durante 1 min, se centrifugó a 3000 rpm por 30 min y el sobrenadante se filtró con papel Whatman N.º 42. El residuo sólido se extrajo nuevamente con 4 mL de metanol, repitiendo el proceso de agitación y centrifugación bajo las mismas condiciones. El extracto filtrado fue empleado directamente para el análisis.

La solución madre de DPPH se preparó disolviendo 3.9 mg del radical en 50 mL de metanol al 80% y añadiendo 1 mL de metanol absoluto, ajustando su absorbancia inicial a 1.09 a 515 nm. Para cada reacción, se mezclaron 950 μ L de la solución de DPPH con 50 μ L del extracto. Las mezclas se mantuvieron en oscuridad a 25 °C durante 3 h y 50 min, tras lo cual se midió la absorbancia a 515 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La curva de calibración se construyó empleando Trolox como estándar. La solución madre se preparó disolviendo 5 mg en 5 mL de metanol al 80%. Se prepararon diez diluciones (0–340 μ g/mL) ajustando el volumen con metanol absoluto hasta 50 μ L por tubo. Para cada punto de la curva, se mezclaron 950 μ L de DPPH con 50 μ L de la dilución de Trolox, con dos repeticiones por concentración. La absorbancia se midió a 515 nm en un espectrofotómetro UV–Vis ((Thermo Cientific, Multiskan Sky High EE.UU).

La capacidad antioxidante se expresó como μ mol equivalentes de Trolox por gramo de muestra (μ mol TE/g b.h.), utilizando la concentración calculada a partir de la curva de calibración (Tabla 2, Figura 4, Anexo 17).

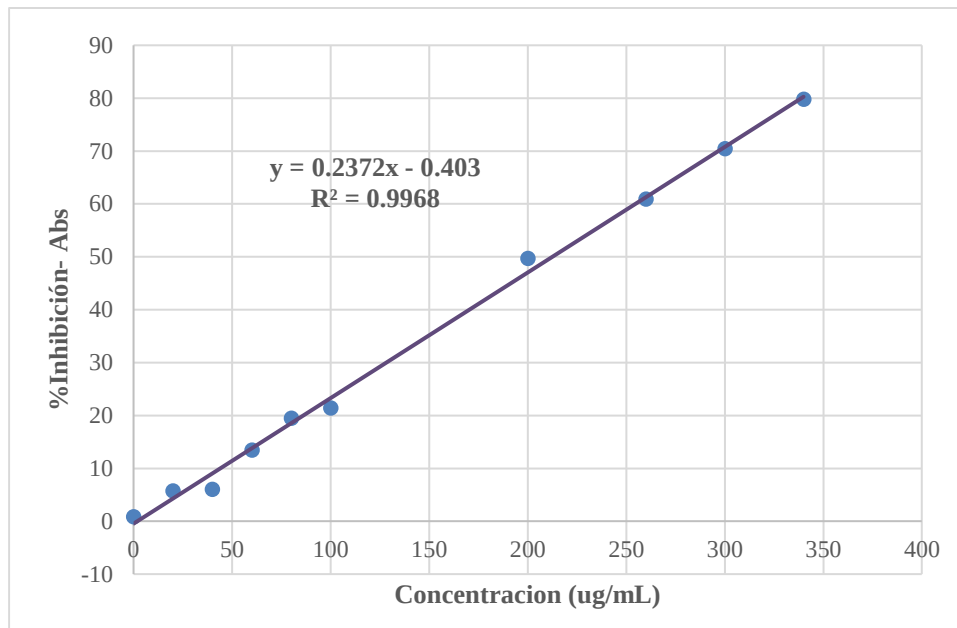
Tabla 2

Concentraciones del patrón de Trolox empleadas en la curva de calibración de la capacidad antioxidante (DPPH).

Nº	Concentración (μ g/mL)	Trolox (μ L)	Metanol 100% (μ L)	Total (μ L)
1	340	17	33	50
2	300	15	35	50
3	260	13	37	50
4	200	10	40	50
5	100	5	45	50
6	80	4	46	50
7	60	3	47	50
8	40	2	48	50
9	20	1	49	50
10	0	0	50	50

Figura 4

Curva de calibración para análisis de capacidad antioxidante DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$)



2.4.2 Variables del estudio

Variables independientes

- Altura geográfica de las parcelas: el Naranjal 1096 m s.n.m. y Bellavista 404 m s.n.m.
- Variedades de cacao CCN51 y Criollo.

Variables dependientes

- Indicadores de calidad del grano fermentado, como el pH, la acidez titulable y el porcentaje de granos bien fermentados determinado mediante prueba de corte (%Pc).
- TPC
- Capacidad antioxidante.
- Composición proximal del licor de cacao: humedad, cenizas, grasas, proteínas y carbohidratos.

Adicionalmente, durante el proceso fermentativo se realizó el monitoreo continuo de variables de proceso, tales como temperatura de la masa, humedad de la masa, temperatura ambiental y humedad relativa, las cuales fueron registradas con fines de control y caracterización del sistema, sin ser consideradas variables respuesta del diseño experimental.

2.4.3 Diseño de la investigación

La investigación se desarrolló bajo un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2×2 , evaluando dos factores experimentales: variedad de cacao (A) y altitud geográfica (B). El factor variedad incluyó dos niveles: A1 (clon CCN51) y A2 (variedad Criollo), mientras que la altitud comprendió dos niveles: B1 (404 m s.n.m., Bellavista) y B2 (1096 m s.n.m., El Naranjal). La combinación de los niveles generó cuatro tratamientos experimentales (A1B1, A1B2, A2B1 y A2B2), cuyo esquema se presenta en la Figura 5.

Figura 5

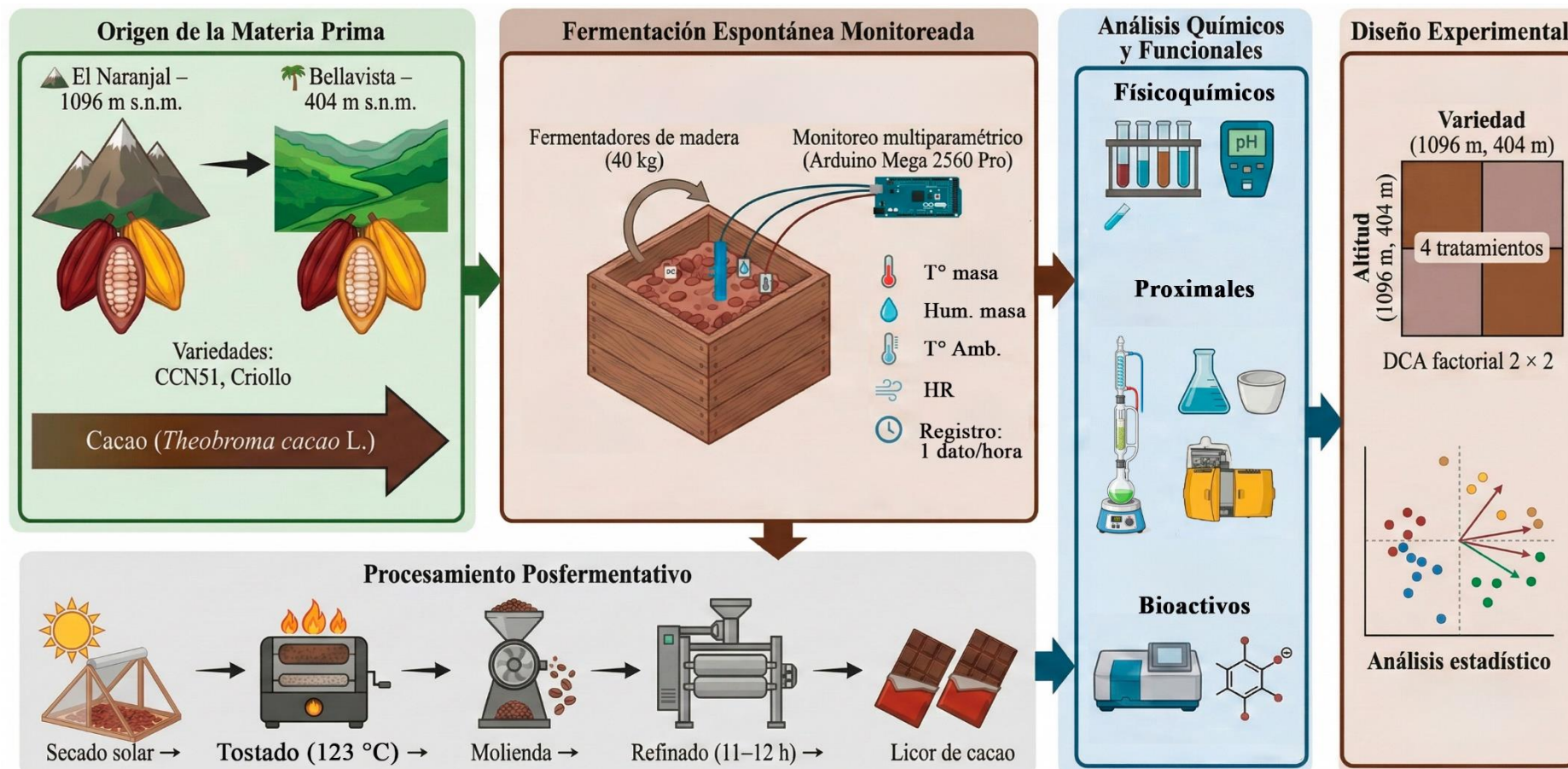
Esquema del diseño factorial 2×2 (variedad $\times$ altitud) empleado en el estudio.

		Variedades	
		A1:CCN51	A2: Criollo
Altitud	B1:404	A1B1	A1B1
	B2:1096	A1B2	A2B2

La Figura 6 presenta de manera esquemática el flujo de trabajo seguido en esta investigación.

Figura 6

Flujo de trabajo experimental para evaluar el efecto de la altitud y la variedad de cacao sobre la fermentación espontánea, los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del licor de cacao.



Nota: Figura elaborada con apoyo de herramientas de inteligencia artificial generativa (Gemini), basada exclusivamente en el diseño experimental y la información científica desarrollada por los autores.

2.4.4. Análisis estadísticos de datos

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza factorial de dos vías (ANOVA), considerando como factores la variedad y la altitud. Previamente al análisis, se evaluaron los supuestos de normalidad de los residuos y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene, respectivamente. La homogeneidad de varianzas se cumplió para todas las variables analizadas ($p > 0.05$). Aunque algunas variables presentaron desviaciones de la normalidad, el diseño balanceado y la homogeneidad de varianzas permitieron la aplicación del ANOVA paramétrico, considerando la robustez del método frente a desviaciones moderadas de este supuesto.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \dots (8)$$

donde, μ representa la media global, A el efecto de la i -ésima variedad, B el efecto de j -ésima altitud, $(AB)_{ij}$ el efecto de la interacción Variedad $\times$ Altitud, y ε_{ijk} el error experimental.

Cuando el ANOVA indicó efectos significativos ($p < 0.05$), las medias se compararon mediante la prueba de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$) para los efectos principales y las interacciones.

Con el fin de explorar patrones multivariados y relaciones entre las variables fisicoquímicas, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) empleando todas las variables medidas. Los datos fueron previamente centrados y estandarizados (z-score). Los resultados se representaron mediante biplots, incorporando elipses de confianza al 95% como herramienta descriptiva para visualizar la dispersión multivariada de los grupos definidos por variedad y altitud.

Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron en RStudio (R v.4.4.2) empleando los paquetes *readxl*, *dplyr*, *tidyr*, *FactoMineR*, *factoextra*, *ggplot2*, *reshape2*, *psych*, *pheatmap*, y *corrplot*.

III. RESULTADOS

Los valores individuales de las características fisicoquímicas del grano fermentado, la composición proximal, así como el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y la capacidad antioxidante del licor de cacao para cada combinación de variedad y altitud se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3.

Características fisicoquímicas del grano fermentado, composición proximal, contenido de TPC y capacidad antioxidante del licor de cacao obtenida de las variedades CCN51 y Criollo cultivadas a 1096 y 404 m s.n.m.

Variedad cacao	m s.n.m.	Grano Fermentado			Pasta de Cacao						
		pH	%acidez	%Pc corte	% Hum	% cenizas	% grasas	% proteínas	% Carbohidratos	TPC (mg AG/g b.h.)	AOA DPPH (mg trolox/g b.h.)
CCN51	1096	4.9	5.20%	83%	1.72	3.89	57.30	13.53	23.56	63.83	38.73
CCN51	1096	4.89	5.20%	83%	1.98	3.97	56.73	13.56	23.76	64.09	38.69
CCN51	1096	4.8	5.20%	83%	1.85	3.78	57.05	13.69	23.63	65.47	39.27
Criollo	1096	4.12	5.20%	83%	1.82	3.34	56.09	14.65	24.1	54.76	37.26
Criollo	1096	4.13	5.20%	92%	1.76	3.31	55.72	14.75	24.46	55.14	37.38
Criollo	1096	4.12	5.20%	83%	1.79	3.43	55.87	14.88	24.02	54.72	37.49
CCN51	404	4.7	4.40%	83%	1.72	3.61	51.05	13.92	29.7	58.46	37.45
CCN51	404	4.6	4.30%	83%	1.84	3.56	50.90	13.94	29.76	57.5	38.3
CCN51	404	4.7	4.20%	92%	1.72	3.64	51.04	13.94	29.67	55.26	37.18
Criollo	404	4.65	4.80%	83%	1.78	3.77	55.01	14.4	25.04	38.34	36.95
Criollo	404	4.64	4.10%	83%	1.74	3.51	54.81	14.61	25.33	39.64	37.22
Criollo	404	4.65	4.10%	92%	1.64	3.77	54.92	14.49	25.17	39.22	37.65

Nota: Valores individuales correspondientes a tres repeticiones por tratamiento (n = 3), expresados en base húmeda (b.h.). %Pc: proporción de granos bien fermentados determinada mediante prueba de corte; TPC: contenido de compuestos fenólicos totales (mg equivalentes de ácido gálico/g); AOA DPPH: capacidad antioxidante (mg equivalentes de Trolox/g). m s.n.m.: metros sobre el nivel del mar.

3.1 Características fisicoquímicas del grano fermentado.

pH, acidez titulable y Pc corte del grano fermentado

El pH del grano de cacao fermentado presentó efectos altamente significativos de la variedad ($p < 0.0001$), la altitud ($p = 0.0001$) y de la interacción variedad $\times$ altitud ($p < 0.0001$) (Tabla 4). La acidez titulable mostró un efecto significativo únicamente de la altitud ($p = 0.0001$), sin efectos de la variedad ni de la interacción ($p > 0.05$; Tabla 4). Por su parte, el porcentaje de granos bien fermentados (%Pc) no presentó diferencias significativas en función de la variedad, la altitud ni de su interacción ($p > 0.05$; Tabla 4).

Tabla 4

Significancia estadística de la variedad, la altitud y su interacción en parámetros fisicoquímicos del grano de cacao fermentado.

Fuente de variabilidad	pH	Acidez (%)	%Pc corte
A: Variedad	<0.0001	0.8931	0.5976
B: Altitud	0.0001	0.0001	0.5976
A $\times$ B	<0.0001	0.8931	0.5976
C.V. (%)	0.88	4.37	5.28

En cuanto a los efectos principales e interacción de la variedad y la altitud, la acidez titulable del grano fermentado mostró un efecto significativo de la altitud ($p = 0.0001$), sin efectos significativos de la variedad ni de la interacción variedad $\times$ altitud ($p > 0.05$; Tabla 4). Las medias de pH, acidez titulable y porcentaje de granos bien fermentados (%Pc) para cada factor y sus combinaciones se presentan en la Tabla 5.

Las medias de pH del grano fermentado mostraron diferencias significativas entre variedades y altitudes, observándose los valores más altos en el clon CCN51, particularmente a 1096 m s.n.m., mientras que la variedad Criollo presentó valores inferiores en ambas altitudes (Tabla 5).

En cuanto a la acidez titulable, se evidenciaron diferencias significativas entre altitudes, registrándose mayores valores a 1096 m s.n.m. en ambas variedades, sin diferencias entre estas dentro de cada nivel altitudinal (Tabla 5).

Para el porcentaje de granos bien fermentados (%Pc), no se observaron diferencias significativas entre variedades, altitudes ni en sus combinaciones, manteniéndose valores similares entre todos los tratamientos evaluados (Tabla 5).

Tabla 5

Efectos principales e interacción de la variedad y la altitud en los parámetros fisicoquímicos del grano de cacao fermentado.

Variedad	Altitud	pH del grano fermentado	Acidez del grano fermentado (%)	%Pc corte grano fermentado
Criollo	–	4.39 ± 0.29 ^b	4.77 ± 0.54	84.50 ± 3.67
CCN51	–	4.77 ± 0.12 ^a	4.75 ± 0.50	86.00 ± 4.65
MSD		0.05	0.28	5.99
–	1096	4.49 ± 0.41 ^b	5.20 ± 0.00 ^a	84.50 ± 3.67
–	404	4.66 ± 0.04 ^a	4.32 ± 0.26 ^b	86.00 ± 4.65
MSD		0.05	0.28	5.99
Criollo	1096	4.12 ± 0.01 ^c	5.20 ± 0.00	86.00 ± 5.20
Criollo	404	4.65 ± 0.01 ^b	4.33 ± 0.40	86.00 ± 5.20
CCN51	1096	4.86 ± 0.06 ^a	5.20 ± 0.00	83.00 ± 0.00
CCN51	404	4.67 ± 0.06 ^b	4.30 ± 0.10	86.00 ± 5.20
MSD		0.10	0.54	11.77

3.2 Características Proximales del licor de cacao

La humedad del licor de cacao no mostró diferencias significativas en función de la variedad, la altitud ni de su interacción ($p > 0.05$; Tabla 5). Los valores medios de humedad se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

Significancia estadística de la variedad, la altitud y su interacción en la determinación de humedad, cenizas, proteínas y grasas del licor de cacao.

Fuente de variabilidad	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasas (%)	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)
A: Variedad	0.3359	0.0042	<0.0001	<0.0001	0.1778
B: Altitud	0.1176	0.6861	<0.0001	0.4572	0.0063
A × B	0.829	0.0007	<0.0001	0.0004	<0.0001
C.V. (%)	4.58	2.65	0.33	0.63	9.73

El contenido de cenizas en el licor de cacao mostró un efecto significativo de la variedad ($p = 0.0042$) y de la interacción variedad × altitud ($p = 0.0007$), sin efecto

principal de la altitud ($p = 0.6861$; Tabla 6). Las medias correspondientes a cada combinación de factores se detallan en la Tabla 7. El contenido de carbohidratos presentó un efecto significativo de la altitud ($p = 0.0063$) y de la interacción variedad $\times$ altitud ($p < 0.0001$), sin efecto significativo de la variedad como factor principal ($p = 0.1778$).

Tabla 7

Efectos principales y de interacción de la variedad y la altitud sobre la humedad, cenizas, grasas, proteínas del licor de cacao.

Variedad	Altitud	Humedad en el licor de cacao (%)	Cenizas en el licor de cacao (%)	Grasas en el licor de cacao (%)	Proteínas en el licor de cacao (%)	Carbohidratos licor de cacao (%)
Criollo	–	1.76 $\pm$ 6.15	3.52 $\pm$ 20.48 ^b	55.40 $\pm$ 0.55 ^a	14.63 $\pm$ 17.39 ^a	24.69 $\pm$ 0.57
CCN51	–	1.80 $\pm$ 10.48	3.74 $\pm$ 16.51 ^a	54.01 $\pm$ 3.31 ^b	13.76 $\pm$ 19.45 ^b	26.68 $\pm$ 3.32
MSD		10.85	12.83	0.24	11.86	
–	1096	1.82 $\pm$ 8.92	3.62 $\pm$ 29.40	56.46 $\pm$ 0.66 ^a	14.18 $\pm$ 64.70	23.92 $\pm$ 0.34 ^b
–	404	1.74 $\pm$ 6.42	3.64 $\pm$ 10.76	52.96 $\pm$ 2.15 ^b	14.22 $\pm$ 31.80	27.45 $\pm$ 2.48 ^a
MSD		10.85	12.83	0.24	11.86	
Criollo	1096	1.79 $\pm$ 2.83	3.36 $\pm$ 6.24 ^c	55.89 $\pm$ 0.19 ^b	14.76 $\pm$ 11.86 ^a	24.19 $\pm$ 0.23 ^b
Criollo	404	1.72 $\pm$ 6.91	3.68 $\pm$ 15.01 ^{ab}	54.91 $\pm$ 0.10 ^c	14.50 $\pm$ 10.42 ^b	25.18 $\pm$ 0.15 ^b
CCN51	1096	1.85 $\pm$ 12.85	3.88 $\pm$ 9.54 ^a	57.03 $\pm$ 0.29 ^a	13.59 $\pm$ 8.44 ^d	23.65 $\pm$ 0.10 ^b
CCN51	404	1.76 $\pm$ 6.68	3.60 $\pm$ 4.04 ^{bc}	51.00 $\pm$ 0.08 ^d	13.93 $\pm$ 1.08 ^c	29.71 $\pm$ 0.05 ^a
MSD		21.31	25.20	0.48	23.29	5.44

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Tukey HSD (p -valor < 0.05). MSD: diferencia mínima significativa. Media $\pm$ DE ($n = 3$). Los valores de humedad, cenizas, proteínas y carbohidratos están expresados en base seca multiplicados por 100.

El contenido de grasa en el licor de cacao presentó diferencias altamente significativas para la variedad, la altitud y su interacción ($p < 0.0001$ en todos los casos; Tabla 6). Las medias de grasa para cada variedad, altitud y combinación de factores se muestran en la Tabla 7.

En cuanto al contenido de proteína en el licor de cacao, se observó un efecto altamente significativo de la variedad ($p < 0.0001$), sin efecto principal de la altitud ($p = 0.4572$), aunque con una interacción variedad $\times$ altitud significativa ($p = 0.0004$; Tabla 6). Las medias correspondientes se presentan en la Tabla 7.

3.3 Contenido de TPC y capacidad antioxidante del licor de cacao

El contenido de TPC mostró efectos altamente significativos de la variedad, la altitud y de su interacción ($p < 0.0001$ en todos los casos; Tabla 8). Las medias de TPC correspondientes a cada variedad, altitud y combinación de factores se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8

Significancia estadística de la variedad, la altitud y su interacción en la determinación TPC Y AOA DPPH del licor de cacao.

Fuente de variabilidad	TPC (mg GAE/g)	AOA DPPH (mg TE/g)
A: Variedad	<0.0001	0.0027
B: Altitud	<0.0001	0.0153
A × B	0.0001	0.0313
C.V. (%)	1.85	1.01

En términos generales, la variedad CCN51 presentó valores superiores de TPC en comparación con Criollo, mientras que las muestras provenientes de 1096 m s.n.m. mostraron valores más altos que aquellas de 404 m s.n.m. El mayor valor de TPC se registró en la combinación CCN51–1096 m, mientras que los valores más bajos correspondieron a Criollo–404 m (Tabla 9).

Tabla 9

Efectos principales y de interacción de la variedad y la altitud sobre TPC (mg GAE/g b.h.), AOA DPPH (mg TE/g b.h) del licor de cacao.

Variedad	Altitud	TPC (mg GAE/g)	AOA DPPH (mg TE/g)
Criollo	—	46.97 ± 8.67 ^b	37.33 ± 0.24 ^b
CCN51	—	60.77 ± 4.22 ^a	38.27 ± 0.81 ^a
MSD		1.33	0.51
—	1096	59.67 ± 5.28 ^a	38.14 ± 0.86 ^a
—	404	48.07 ± 9.93 ^b	37.46 ± 0.48 ^b
MSD		1.33	0.51
Criollo	1096	54.88 ± 0.23 ^b	37.38 ± 0.12 ^b
Criollo	404	39.07 ± 0.66 ^c	37.27 ± 0.35 ^b
CCN51	1096	64.46 ± 0.88 ^a	38.90 ± 0.32 ^a
CCN51	404	57.07 ± 1.64 ^b	37.64 ± 0.58 ^b
MSD		2.60	0.99

Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Tukey HSD (p -valor<0.05). MSD: diferencia mínima significativa.

La capacidad antioxidante determinada por el método DPPH (AOA–DPPH) presentó efectos significativos de la variedad ($p = 0.0027$), la altitud ($p = 0.0153$) y de la interacción variedad $\times$ altitud ($p = 0.0313$; Tabla 7). Las medias de AOA–DPPH para cada factor y combinación se muestran en la Tabla 9.

Los valores medios de AOA–DPPH fueron mayores en la variedad CCN51 respecto a Criollo, así como en las muestras de 1096 m s.n.m. en comparación con 404 m s.n.m. El valor más alto de capacidad antioxidante se observó en la combinación CCN51–1096 m, mientras que el resto de tratamientos presentó valores similares entre sí (Tabla 9).

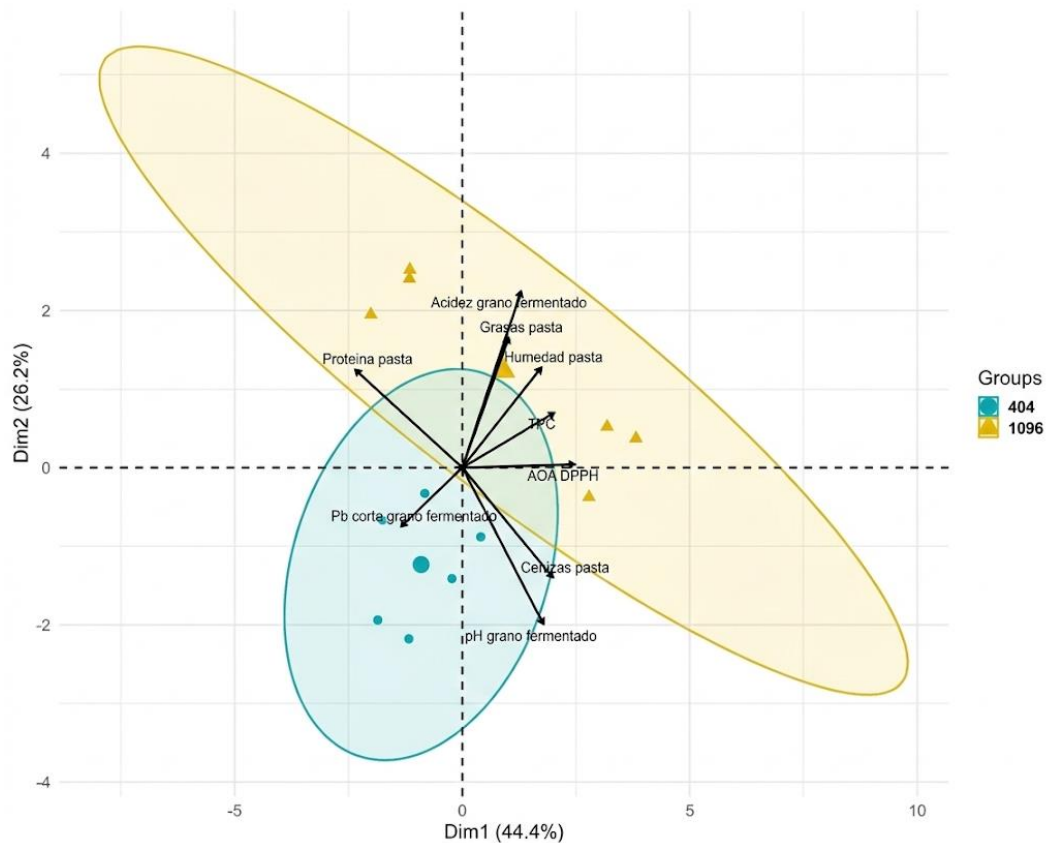
3.4 Análisis de Componentes principales

Los dos primeros componentes principales explicaron conjuntamente el 70.6% de la variabilidad total de las variables fisicoquímicas evaluadas, donde el primer componente (Dim1) explicó el 44.4% y el segundo componente (Dim2) el 26.2% de la varianza total. Este nivel de varianza acumulada permitió una representación bidimensional adecuada de la estructura multivariada de los datos.

El biplot del PCA considerando la altitud geográfica como factor de agrupación mostró una distribución diferenciada de las muestras a lo largo del primer componente principal (Dim1), evidenciando una separación entre los grupos correspondientes a 1096 m s.n.m. y 404 m s.n.m. (Figura 7). Las muestras se distribuyeron en regiones opuestas del espacio multivariado, con una dispersión distinta entre ambos grupos. Las elipses de confianza al 95% mostraron una diferenciación consistente entre las altitudes evaluadas.

Figura 7

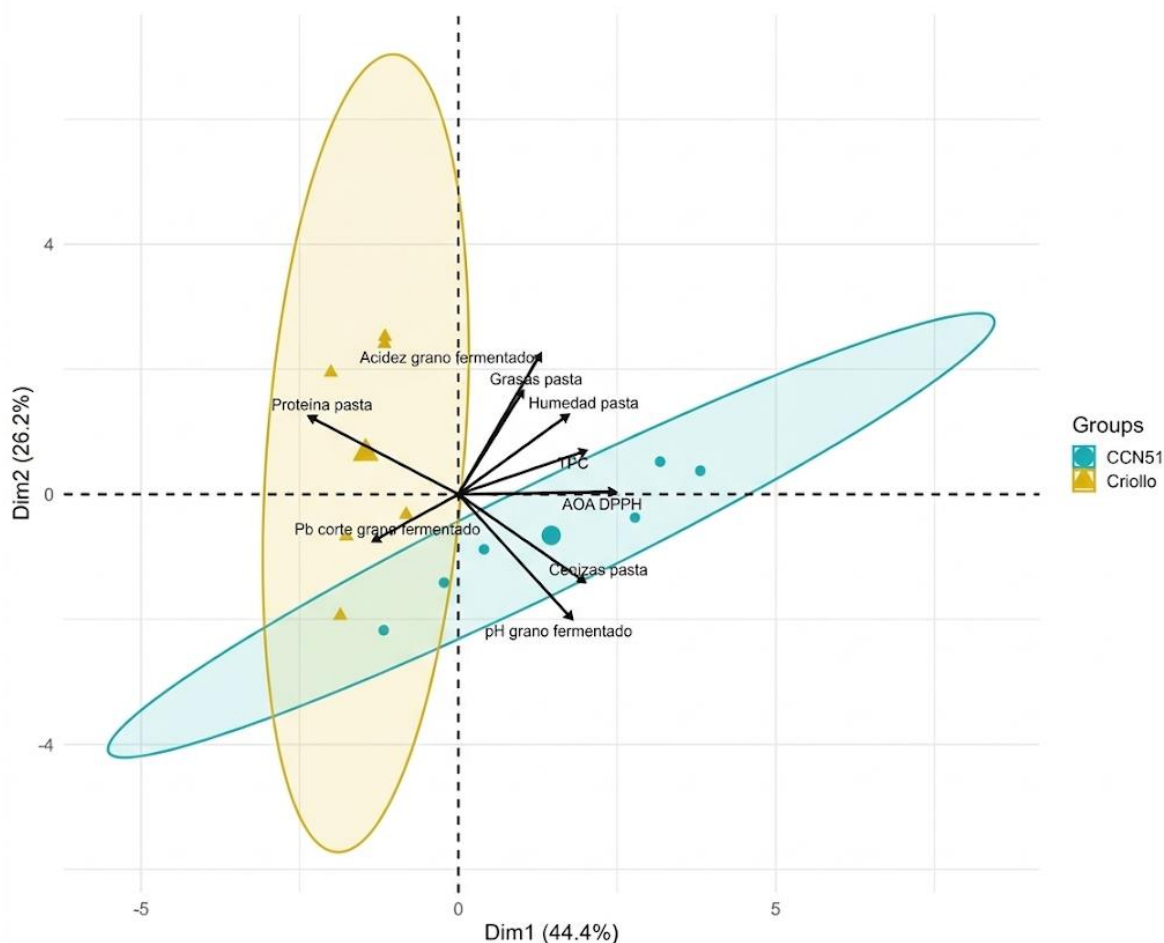
Análisis de Componentes Principales (PCA) de las variables fisicoquímicas del cacao en función de la altitud.



De manera similar, el biplot del PCA considerando la variedad de cacao como factor de agrupación evidenció una separación de las muestras a lo largo del primer componente principal (Dim1), diferenciando los grupos correspondientes a las variedades CCN51 y Criollo (Figura 8). La distribución de las muestras mostró una agrupación diferenciada entre variedades, con cierto solapamiento entre los grupos. Las elipses de confianza al 95% reflejaron una separación parcial entre ambas variedades.

Figura 8

Análisis de Componentes Principales (PCA) de las variables fisicoquímicas del cacao en función de la variedad.



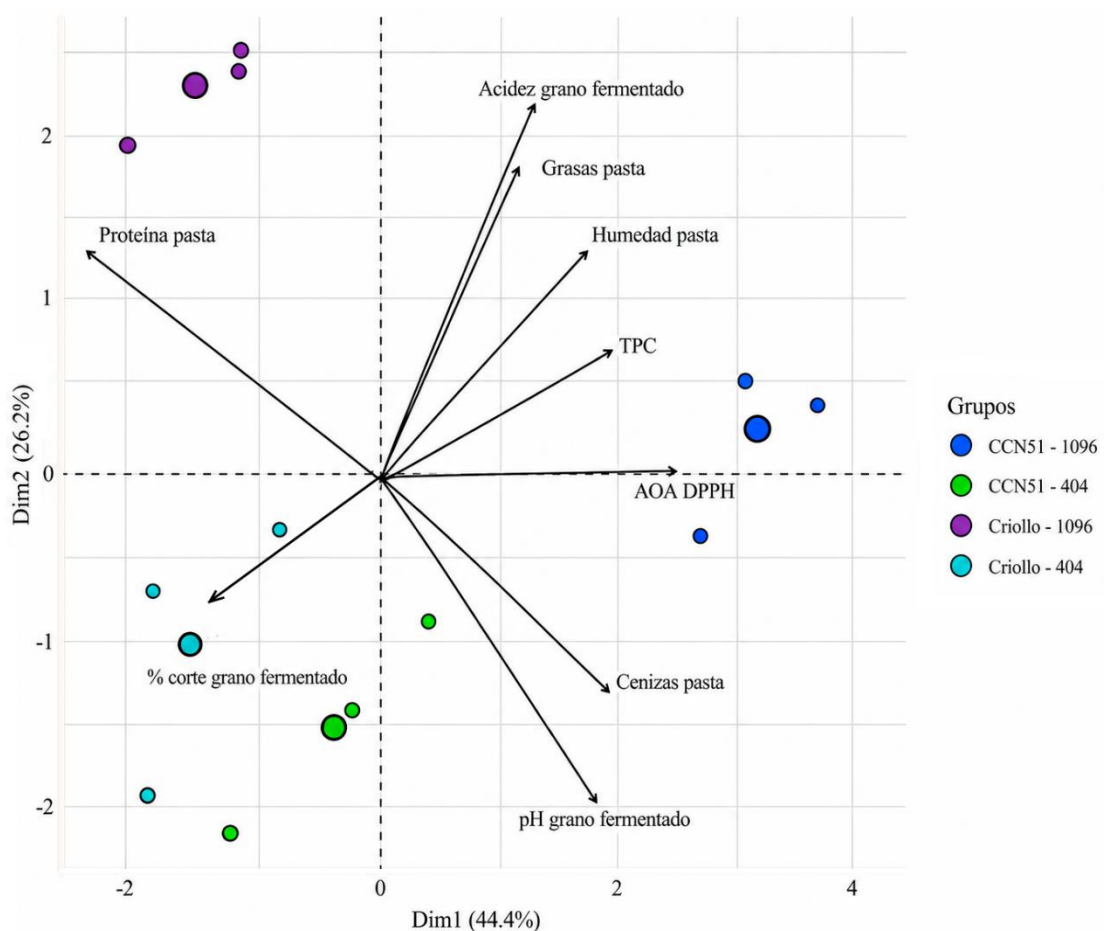
Los vectores de las variables fisicoquímicas se proyectaron de forma diferenciada sobre los dos primeros componentes principales, contribuyendo a la estructuración del espacio multivariado observado en ambos análisis. La orientación y magnitud de los vectores indicaron la contribución relativa de cada variable a los componentes principales considerados.

Los dos primeros componentes principales explicaron conjuntamente el 70.6 % de la variabilidad total de las variables evaluadas, con una contribución de 44.4 % para Dim1 y 26.2 % para Dim2. El biplot del PCA considerando los tratamientos definidos por la interacción variedad $\times$ altitud mostró una distribución diferenciada de las muestras en el espacio multivariado (Figura 9). Las muestras correspondientes a CCN51–1096 m s.n.m. se ubicaron principalmente hacia el lado positivo de Dim1, próximas a los vectores de TPC, AOA–DPPH, humedad, grasas y acidez del grano

fermentado. En contraste, las muestras Criollo–1096 m s.n.m. se distribuyeron hacia el cuadrante superior izquierdo, asociadas principalmente con el vector de proteína en pasta. Las muestras CCN51–404 m s.n.m. y Criollo–404 m s.n.m. se ubicaron mayormente en la zona inferior del biplot, con proximidad relativa a los vectores de pH, cenizas y porcentaje de corte del grano fermentado.

Figura 9

Biplot del Análisis de Componentes Principales (PCA) de las variables fisicoquímicas y funcionales del cacao según los tratamientos variedad $\times$ altitud.



Nota. Dim1 y Dim2 explican el 44.4 % y 26.2 % de la variabilidad total, respectivamente. Los puntos representan las repeticiones experimentales de cada tratamiento y los vectores indican la dirección de asociación de las variables evaluadas. Las cifras 404 y 1096 hacen referencia a los metros sobre el nivel del mar (m. s.n.m.).

IV. DISCUSIONES

4.1. Características fisicoquímicas del grano fermentado

pH y acidez titulable del grano fermentado

El comportamiento del pH en el cotiledón, diferenciado significativamente por el genotipo ($p < 0.0001$) y la interacción con la altitud, sitúa a la variedad Criollo en un rango de mayor acidez activa (pH 4.39) en comparación con el clon CCN51 (pH 4.77). Este descenso del pH es consistente con la difusión de ácidos orgánicos, principalmente acético y láctico, generados por el metabolismo microbiano de la pulpa durante la fase anaeróbica y aeróbica (Balcázar-Zumaeta et al., 2023; Quispe-Sanchez et al., 2023). Dicha acidificación es el mecanismo crítico que induce la muerte del embrión y desencadena la actividad de enzimas endógenas, como la aspartato endoproteasa y la carboxipeptidasa, cuyos rangos óptimos de operación oscilan entre pH 3.5 y 5.8, respectivamente, facilitando la proteólisis y la generación de precursores de aroma (Guillen-Guerrero y de la Rosa-Millan, 2025). Aunque valores de pH inferiores a 4.5, como los observados en la variedad Criollo, se asocian frecuentemente con riesgos de sobre fermentación o una acidez residual que puede deteriorar la calidad sensorial (González et al., 2024), investigaciones recientes en la Amazonía colombiana reportan rangos finales similares (4.33–4.63) en granos fermentados considerados aptos para mercados especiales (González et al., 2024). Esto sugiere que el genotipo Criollo posee una cinética de acidificación intrínseca distinta, posiblemente vinculada a una menor capacidad amortiguadora o a diferencias en la disponibilidad de sustratos fermentables en su mucílago respecto al CCN51.

Por otro lado, la acidez titulable se mostró independiente del genotipo y respondió exclusivamente al gradiente altitudinal, registrándose una mayor acumulación de ácidos totales en los cultivos de altura (1096 m s.n.m.). Este fenómeno evidencia un desacoplamiento bioquímico respecto al pH, discrepando de la correlación inversa lineal estricta reportada en estudios clásicos (Cortez et al., 2023; Polanía-Hincapié et al., 2023). La mayor acidez en altura puede atribuirse a condiciones ambientales, tales como temperaturas más bajas y mayor humedad relativa, que limitan la volatilización del ácido acético durante las etapas finales de la fermentación y el inicio del secado (Álvarez et al., 2022; González et al., 2024; Wexler et al., 2025). Mientras que el pH regula la actividad enzimática y la formación de precursores de aroma (Mori et al., 2022; Yang

et al., 2024), la acidez titulable representa la carga ácida total que impacta directamente la percepción sensorial de astringencia y el perfil de sabor final (Yang et al., 2024). La retención de acidez observada en zonas altas sugiere la necesidad de implementar protocolos de postcosecha adaptados, como el pre-secado solar o tiempos de maduración extendidos, estrategias que han demostrado eficacia para mitigar el impacto negativo de una carga ácida elevada sin comprometer la calidad global del grano (Tejeda et al., 2023).

Prueba de corte (PC) del grano fermentado

El análisis de PC no evidenció diferencias estadísticas significativas entre los factores evaluados; sin embargo, la tendencia hacia valores superiores en el clon CCN51 respecto a la variedad Criollo sugiere una cinética de fermentación más eficiente en el híbrido bajo las condiciones estudiadas (Burbano-Cachiguango et al., 2023; Sanchez-Capa et al., 2022). Este comportamiento, caracterizado por el viraje cromático de violeta a marrón debido a la hidrólisis de antocianinas y la oxidación de polifenoles a quinonas (González et al., 2024; Horta Tellez et al., 2019), concuerda con reportes recientes que sitúan al CCN51 como un material de alto potencial fermentativo capaz de superar el 85% de granos bien fermentados cuando se optimizan las condiciones del proceso (Sanchez-Capa et al., 2022). A diferencia de investigaciones que no reportan influencia varietal significativa en la proporción de granos marrones entre variedades Criollo, Forastero y Trinitario (Surprise, Moussoyi Moundanga et al., 2024), los resultados actuales indican que la genética puede modular la velocidad de muerte del embrión y la difusión de metabolitos, aunque el manejo poscosecha mantiene un peso preponderante en la calidad física final. El ligero incremento observado en zonas de mayor altitud (1096 m) podría asociarse a una extensión natural de la fase fermentativa necesaria para alcanzar temperaturas termofílicas en ambientes más frescos, favoreciendo así la degradación de pigmentos y la reducción de defectos como granos pizarrosos, los cuales son indicativos de inmadurez o fermentación insuficiente. Es crucial destacar que los valores de °Pc obtenidos para CCN51 cumplen con los estándares internacionales para su clasificación como cacao de calidad superior (Burbano-Cachiguango et al., 2023), desafiando la percepción tradicional que asocia la calidad física exclusivamente a genotipos nativos, siempre que se garantice una degradación adecuada de la carga polifenólica a través de una fermentación controlada y homogénea (Balcázar-Zumaeta et al., 2023).

4.2. Características Proximales del licor de cacao

La humedad del licor de cacao no presentó variaciones significativas ($p>0.05$) atribuibles a la variedad o al gradiente altitudinal, manteniendo valores promedio consistentes con los estándares industriales para asegurar la estabilidad microbiológica y prevenir la lipólisis (Surprise, Moussoyi Moundanga et al., 2024). Este comportamiento homogéneo sugiere que el proceso de tostado estandarizado nivela las diferencias higroscópicas iniciales del grano, aunque se observó una ligera tendencia a mayor retención de humedad en el clon CCN51 a 1096 m s.n.m., posiblemente vinculada a una matriz estructural más densa que dificulta la difusión del agua libre durante el tratamiento térmico (Guillen-Guerrero y de la Rosa-Millan, 2025).

En contraste, el contenido de cenizas reveló una interacción significativa entre el genotipo y el ambiente ($p=0.0007$), donde el CCN51 cultivado a mayor altitud exhibió la mayor mineralización. Este hallazgo discrepa de reportes previos que asocian la reducción de cenizas con la lixiviación de minerales solubles durante la fermentación (Álvarez et al., 2022; Hernández et al., 2019); la estabilidad mineral observada en altura podría indicar una menor tasa de pérdida de exudados o una mayor eficiencia en la bioacumulación de nutrientes inorgánicos en suelos de montaña (Surprise, Moussoyi Moundanga et al., 2024).

El perfil lipídico emergió como el componente más sensible a las condiciones edafoclimáticas ($p<0.0001$). Si bien la variedad Criollo mantuvo un contenido graso superior promedio consistente con su perfil de calidad (Surprise, Moussoyi Moundanga et al., 2024), el clon CCN51 demostró una notable plasticidad metabólica a 1096 m, maximizando su biosíntesis de lípidos (57.03%). Este incremento contradice la estabilidad lipídica reportada en otros estudios (Álvarez et al., 2022; De Barros Kobi et al., 2024), sugiriendo que el estrés abiótico en zonas altas, como las temperaturas más bajas, podría desencadenar mecanismos de adaptación que favorecen la acumulación de ácidos grasos saturados e insaturados como reserva energética.

Por su parte, la fracción proteica se comportó como un rasgo altamente heredable y dependiente del genotipo ($p<0.0001$), con el Criollo superando consistentemente al CCN51. Esta diferencia es crítica para el desarrollo del *flavor*, dado que la proteólisis de las globulinas (vicilina) genera los aminoácidos hidrofóbicos y péptidos necesarios para la reacción de Maillard (Álvarez et al., 2022; Horta Tellez et al., 2019). La menor

densidad proteica en CCN51 podría limitar la disponibilidad de estos precursores, requiriendo protocolos de fermentación optimizados para maximizar la degradación proteica sin comprometer la calidad (Sanchez-Capa et al., 2022). Finalmente, el incremento relativo de carbohidratos tras el tostado, derivado de la pérdida de humedad y volatilización de ácidos, es fundamental para la formación de compuestos de aroma como pirazinas y aldehídos de Strecker (Surprise, Moussoyi Moundanga et al., 2024).

4.3. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante del licor de cacao

El contenido de TPC y AOA del licor de cacao exhibieron una dependencia significativa y sinérgica entre el genotipo y el gradiente altitudinal ($p < 0.0001$), evidenciando la plasticidad metabólica del cultivo frente a las condiciones del *terroir*. El clon CCN51 superó consistentemente a la variedad Criollo en contenido fenólico promedio (60.77 vs. 46.97 mg GAE/g), corroborando investigaciones previas que caracterizan a este genotipo de alto rendimiento por su robustez fitoquímica y mayor reserva de antioxidantes en comparación con variedades nativas o finas (Mayra et al., 2024; Polanía-Hincapié et al., 2023). La interacción genotipo-ambiente reveló que el CCN51 cultivado a 1096 m maximiza la retención de polifenoles (64.46 mg GAE/g b.h.) y la capacidad antioxidante (38.90 mg TE/g b.h.), mientras que el Criollo experimenta pérdidas drásticas a menores altitudes (404 m), sugiriendo una mayor susceptibilidad de este último a la degradación oxidativa y lixiviación térmica características de procesos fermentativos en ambientes más cálidos.

Aunque la literatura establece que la fermentación induce una reducción sustancial (hasta un 80%) de los polifenoles y la capacidad antioxidante debido a la oxidación enzimática por polifenoloxidasas y la difusión de metabolitos (Álvarez et al., 2022; Mayra et al., 2024; Sandhya et al., 2016), la estabilidad observada en las muestras de altura indica que las temperaturas ambientales más frescas podrían mitigar la cinética de polimerización de los flavanoles (Burbano-Cachiguango et al., 2023; Cempaka et al., 2023). Existe una correlación positiva directa entre el TPC y la actividad captadora de radicales libres (DPPH), lo que confirma que la funcionalidad bioactiva del licor reside primariamente en su fracción fenólica (Mayra et al., 2024; Polanía-Hincapié et al., 2023; Utami et al., 2016). Estos hallazgos posicionan al CCN51 de altura no solo como un genotipo productivo, sino como una matriz promisorio para el desarrollo de derivados

con alto valor funcional, siempre que se controle la astringencia residual asociada a su alta carga fenólica (González et al., 2024; Mayra et al., 2024; Palabiyik et al., 2023).

4.4. Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales (PCA) integró las variables fisicoquímicas para discernir patrones de variabilidad impulsados por factores pre-cosecha. Los dos primeros componentes (PC1 y PC2) explicaron el 70.6% de la varianza total (44.4% y 26.2%, respectivamente), variabilidad consistente con la representatividad estadística reportada por (Sari et al., 2024) en la caracterización multivariada de genotipos de cacao. Este porcentaje es también comparable con el 66.2% acumulado por Castillejos-Mijangos et al. (2023) en granos fermentados de tres variedades, confirmando que el rango obtenido en la presente investigación es estadísticamente representativo para propósitos discriminatorios en estudios fisicoquímicos de cacao.

El biplot estructurado por altitud geográfica (Figura 7) reveló una separación nítida a lo largo de Dim1 entre las muestras de 1096 m s.n.m. y 404 m s.n.m., con elipses de confianza al 95% sin solapamiento, confirmando que las condiciones edafoclimáticas de altura ejercen una presión selectiva sobre la composición química del grano (Tunjung Sari et al., 2025). Este hallazgo concuerda con lo reportado por (Oliva-Cruz et al. (2022)), quienes asocian las mayores altitudes con un desarrollo de grano más lento que favorece perfiles bioquímicos diferenciados. Sin embargo, la dirección de los vectores TPC y AOA DPPH en la Figura 7, orientados hacia las muestras de 404 m s.n.m., indica que la mayor bioactividad antioxidante se concentró en la altitud inferior, patrón aparentemente contraintuitivo respecto a la tendencia que asocia mayor altitud con mayor síntesis de metabolitos secundarios. Carrillo et al. (2014), en un estudio con dieciocho fincas cacaoteras en once zonas de Colombia, encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en TPC, flavan-3-oles, epicatequina, catequina y capacidad antioxidante entre zonas, y concluyeron que, contrariamente a la relación proporcional comúnmente asumida, a menor altitud se observaron mayores contenidos de polifenoles y mayor capacidad antioxidante. Este fenómeno se explica porque a altitudes más bajas las temperaturas diurnas más elevadas aceleran el flujo metabólico de la vía del ácido shikímico, incrementando la biosíntesis de flavanoles como epicatequina y procianidinas, compuestos responsables directos de la actividad DPPH mediante los mecanismos de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) y transferencia de un solo electrón (SET) (Razola-Díaz et al., 2023).

El vector de grasas apunta consistentemente hacia el cuadrante de los individuos a 1096 m s.n.m., sugiriendo mayor contenido lipídico en la pasta proveniente de mayor altitud. [Oracz et al. \(2015\)](#), citados en [Castillejos-Mijangos et al. \(2023\)](#), señalaron que los polifenoles, epicatequina y flavanoles del cacao son fuertemente dependientes del origen geográfico, los cultivares, factores ambientales como la altitud, el grado de madurez y las operaciones de procesamiento; las condiciones de menor temperatura y mayor humedad relativa a mayor altitud favorecerían un metabolismo lipídico diferencial durante el llenado del grano, explicando el desplazamiento observado en Dim1 para las muestras a 1096 m. El pH del grano fermentado aparece como vector de carga importante en Dim2, orientado hacia el cuadrante de mayor coordenada negativa, predominantemente poblado por individuos de baja altitud. [Castillejos-Mijangos et al. \(2023\)](#), reportaron que el PC2 en cacao correlaciona positivamente con acidez y negativamente con humedad y pH, relación que la presente investigación reproduce en su biplot de altitud. La menor altitud implica temperaturas de fermentación más elevadas que aceleran la actividad de bacterias acéticas, incrementando la producción de ácido acético y reduciendo el pH final del grano ([Quintana-Fuentes et al., 2025](#)).

Simultáneamente, la discriminación por variedad (Figura 8) evidenció una agrupación específica para CCN51 y Criollo sobre Dim1, aunque con un ligero solapamiento que sugiere una base metabólica compartida en ciertos precursores fisicoquímicos. La separación entre los grupos indica que las variables con mayor peso en esta dimensión (TPC, AOA DPPH, humedad, grasas y cenizas de pasta) constituyen los principales ejes de diferenciación entre variedades. [Castillejos-Mijangos et al. \(2023\)](#), aplicaron PCA a granos fermentados de tres variedades y encontraron que el PC1 estuvo dominado por compuestos fenólicos, ABTS y DPPH, los cuales correlacionaron positivamente entre sí, mientras que el PC2 correlacionó positivamente con acidez y negativamente con humedad y pH; patrón análogo al observado en la Figura 8, donde TPC y AOA DPPH se orientan hacia el cuadrante de CCN51 y la acidez del grano fermentado y la proteína de pasta se proyectan hacia el cuadrante Criollo. Que CCN51 presente vectores más largos y orientados hacia Dim1 positivo para TPC y AOA DPPH sugiere que esta variedad acumuló mayor contenido de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante en la pasta. [Castillejos-Mijangos et al. \(2023\)](#), confirmaron una correlación positiva entre contenido fenólico y capacidad antioxidante por DPPH ($r = 0.909$, $p \leq 0.05$) y ABTS ($r = 0.945$, $p \leq 0.05$) en cacao, lo que explica

la estrecha covarianza entre ambos vectores en el biplot; mecanísticamente, los flavanoles del cacao donan átomos de hidrógeno al radical DPPH mediante los mecanismos HAT y SET, generando radicales estables de menor reactividad (Razola-Díaz et al., 2023). Asimismo, Razola-Díaz et al. (2023) reportaron correlaciones altamente significativas ($p < 0.05$) entre la actividad antioxidante y el contenido de procianidinas ($r > 0.9$) en cacaos de distintos orígenes, respaldando la covarianza observada entre TPC y AOA DPPH.

Por su parte, el grupo Criollo se desplaza hacia Dim2 positivo, asociado a mayor acidez del grano fermentado y mayor contenido proteico de pasta Quintana-Fuentes et al. (2025), señalaron que el genotipo determina el tiempo óptimo de fermentación y, con ello, el grado de acidificación del grano: Criollo fermenta óptimamente en aproximadamente cuatro días, lo que deja mayor concentración de ácido acético residual y eleva la acidez medible, desplazando a estos individuos hacia el cuadrante de mayor acidez en el biplot. La mayor dispersión observada en el grupo Criollo refuerza la naturaleza heterogénea de los materiales nativos frente a la extraordinaria estabilidad adaptativa del clon CCN51, tendencia documentada por (Jaimez et al. (2022)). La separación visual entre las elipses de confianza de ambas variedades, aunque parcialmente solapadas, confirma que el perfil fisicoquímico integral discrimina a CCN51 y Criollo mejor que cualquier variable aislada, en concordancia con Castillejos-Mijangos et al. (2023), quienes concluyeron que el análisis multivariado fue necesario para separar variedades dado que el análisis univariado resultó insuficiente.

La magnitud y dirección de los vectores en ambos biplots confirman que la interacción genotipo-ambiente define la arquitectura multivariada de la calidad del cacao, posicionando a la altitud como un factor de mayor peso relativo que la variedad en la configuración del espacio químico evaluado. En conjunto, los resultados del PCA demuestran que tanto la variedad genética como la altitud de cultivo son factores independientes que estructuran la variabilidad fisicoquímica del cacao estudiado, y que su efecto se manifiesta de forma diferencial sobre las variables de bioactividad (TPC, AOA DPPH) frente a las de composición proximal (grasas, proteínas, cenizas, humedad) y fermentación (pH, acidez, porcentaje de corte).

El biplot de la Figura 9, al proyectar simultáneamente los cuatro tratamientos del diseño factorial, aporta información que los biplots por factor individual (Figuras 7 y 8) no pueden suministrar: la distribución espacial de los grupos revela que el

posicionamiento de CCN51–1096 m s.n.m. en el extremo positivo de Dim1, distante de los tres grupos restantes, no resulta predecible como suma de los efectos marginales de CCN51 sobre Dim1 (Figura 8) y de 1096 m s.n.m. sobre Dim1 (Figura 7), sino que emerge del efecto sinérgico de la combinación específica genotipo-altitud. Este fenómeno de emergencia es coherente con la significancia estadística de la interacción variedad $\times$ altitud para TPC ($p = 0.0001$) y AOA DPPH ($p = 0.0313$), y revela que la superioridad funcional de CCN51–1096 m s.n.m. (TPC = 64.46 ± 0.88 mg GAE/g; AOA DPPH = 38.90 ± 0.32 mg TE/g) no es atribuible exclusivamente a ninguno de los dos factores por separado. En el contexto del poscosecha amazónico, [Cortez et al. \(2024\)](#) concluyeron en sus resultados que el contenido de compuestos bioactivos del licor de cacao difiere según el genotipo y el procesamiento, y que sus concentraciones pueden ser aprovechadas por la industria de bioactivos; en ese marco, la Figura 9 opera como herramienta de trazabilidad multivariada que permite identificar la combinación CCN51–1096 m s.n.m. como la de mayor potencial funcional en la región nor-oriente del Perú, en concordancia con la propuesta de [Sari et al. \(2024\)](#), quienes concluyeron que la integración de marcadores intrínsecos —entre ellos TPC y actividad antioxidante— en los sistemas de clasificación mejora la trazabilidad y diferenciación del cacao de especialidad.

No obstante, la interpretación del biplot de la Figura 9 está sujeta a limitaciones metodológicas que deben considerarse. El número de repeticiones por tratamiento ($n = 3$) redujo el poder estadístico del análisis multivariado y comprometió la estabilidad de las elipses de confianza al 95%, que con muestras pequeñas son sensibles a valores atípicos individuales. La fermentación espontánea —sin control del inóculo microbiano— introdujo variabilidad no cuantificada en la composición del consorcio microbiano entre localidades, impidiendo desacoplar el efecto del gradiente altitudinal del efecto de la microbiota local sobre los perfiles fisicoquímicos observados. Finalmente, la inclusión de un único sitio por altitud restringe la extrapolación de los patrones multivariados a otras zonas productoras del nor-oriente peruano. Investigaciones futuras que amplíen el diseño a múltiples sitios por altitud e incorporen la caracterización metagenómica de la microbiota fermentativa permitirán cuantificar la contribución independiente del ambiente edafoclimático y del consorcio microbiano sobre la arquitectura multivariada de calidad del licor de cacao.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La fermentación del grano de cacao de las variedades CCN51 y Criollo cultivadas a diferentes altitudes produjo cambios significativos en sus características fisicoquímicas, observándose efectos de la variedad, la altitud y su interacción sobre el pH y la acidez titulable. El grano de cacao Criollo presentó valores de pH más bajos que CCN51, mientras que la acidez titulable estuvo determinada principalmente por la altitud, con valores superiores en los granos fermentados a 1096 m s.n.m.

Las características proximales del licor de cacao evidenciaron que el contenido de humedad no fue influenciado por la variedad ni por la altitud. En contraste, el contenido de cenizas, grasas y proteínas estuvo condicionado por la variedad, y presentó además una interacción significativa variedad $\times$ altitud. El cacao Criollo presentó mayor contenido proteico, mientras que el clon CCN51 mostró mayor contenido de grasa, particularmente cuando fue cultivado a mayor altitud.

El contenido de TPC y la capacidad antioxidante del licor de cacao estuvieron significativamente influenciados por la variedad, la altitud y su interacción. En ambos casos, el clon CCN51 cultivado a 1096 m s.n.m. presentó los valores más altos, superando consistentemente a la variedad Criollo en las dos altitudes evaluadas. Estos resultados evidencian un comportamiento concordante entre la fracción fenólica y la capacidad antioxidante del licor de cacao.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda profundizar en el estudio del efecto de la altitud sobre la dinámica microbiana durante la fermentación del cacao, particularmente en el clon CCN51, con el fin de establecer la relación entre la microbiota fermentativa, la cinética de acidificación y la formación de compuestos fenólicos y antioxidantes bajo condiciones de mayor altitud.

Se sugiere evaluar el perfil individual de compuestos fenólicos mediante técnicas cromatográficas avanzadas, como HPLC o UHPLC, para identificar qué fracciones fenólicas específicas son responsables del incremento del contenido fenólico total y de la capacidad antioxidante observados en el licor de cacao, especialmente en el clon CCN51 cultivado a 1096 m s.n.m.

Se recomienda ampliar el gradiente altitudinal evaluado e incluir un mayor número de zonas agroecológicas, con el propósito de modelar de manera más precisa la influencia del ambiente sobre la calidad fisicoquímica y funcional del cacao, y así generar información aplicable a la zonificación productiva y a la toma de decisiones en campo.

Se sugiere complementar los análisis realizados con evaluaciones sensoriales del licor y del chocolate elaborado, a fin de establecer la relación entre los parámetros fisicoquímicos, funcionales y las características sensoriales percibidas, lo que permitiría una valoración integral de la calidad del cacao en función de la variedad y la altitud.

Desde un enfoque aplicado, se recomienda considerar al clon CCN51 cultivado en zonas de mayor altitud como una alternativa estratégica para la producción de licores de cacao con mayor contenido de compuestos bioactivos, siempre que se implementen protocolos de fermentación controlados que aseguren la estabilidad fisicoquímica y funcional del producto final.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmoiz, E. F., Karim, R., Farid, R., Fatima Ezzahra, A., Abderrahim, A., Abdelkarim, F.-M., y Bouchra, B. (2025). Unveiling regional and altitudinal lipidomic analyte signatures of the argan tree (*Argania spinosa* L.) for environmental adaptation. *Journal of Plant Physiology*, 311, 154523.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2025.154523>
- Álvarez, C. O., Pérez, E. E., y Del Carmen Lares, M. (2022). Beneficiation of Venezuelan Criollo Cocoa: Variations in Proximal Composition, Methylxanthines and Polyphenols. *Revista Iberoamericana de Viticultura Agroindustria y Ruralidad*, 9(27), 113-128. Scopus. <https://doi.org/10.35588/rivar.v9i27.5625>
- Andrade, J. A., Rivera-García, J., Chire-Fajardo, G. C., y Ureña-Peralta, M. O. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*, 10(4), 1-12.
<https://doi.org/10.29019/enfoque.v10n4.462>
- AOAC. (2016). Method 970.21-Acidity (Titratable) of Cocoa Products; pH of Cocoa Products. En *Official Methods of Analysis of AOAC International* (20th edition). AOAC International. Book Section.
- AOAC. (2019a). Method 920.39—Fat in Cocoa Products (Soxhlet Extraction). En *Official Methods of Analysis of AOAC International* (21st edition). AOAC International. Book Section.
- AOAC. (2019b). Method 923.03—Ash of Flour or Cocoa Products. En *Official Methods of Analysis of AOAC International* (21st edition). AOAC International. Book Section.
- AOAC. (2019c). Method 926.01—Moisture Content. En *Official Methods of Analysis of AOAC International* (21st edition). AOAC International. Book Section.

AOAC. (2019d). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (21st edition).

AOAC International. Book.

Association of Official Analytical Chemists. (2019). Method 990.03. Protein (Crude) in Animal Feed—Combustion Method. En *Official Methods of Analysis of AOAC International* (21st edition). AOAC International.

Balcázar-Zumaeta, C. R., Pajuelo-Muñoz, A. J., Trigoso-Rojas, D. F., Iliquin-Chavez, A. F., Fernández-Romero, E., Yoplac, I., Muñoz-Astecker, L. D., Rodríguez-Hamamura, N., Maza Mejía, I. M., Cayo-Colca, I. S., Chagas-Junior, G. C. A., Maicelo-Quintana, J. L., y Castro-Alayo, E. M. (2023). Reduction in the Cocoa Spontaneous and Starter Culture Fermentation Time Based on the Antioxidant Profile Characterization. *Foods*, 12(17). Scopus.

<https://doi.org/10.3390/foods12173291>

Botanical-online. (2022). *Toxicidad de la adelfa (Nerium oleander)* [Página web].

Botanical-online. Botanical-online. <https://www.botanical-online.com/plantas-medicinales/adelfa-toxicidad>

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Burbano-Cachiguango, R. A., Abreu-Naranjo, R., Caicedo-Vargas, C. E., Ramírez-Romero, C. A., Calero-Cárdenas, A. S., Llumiquinga-Marcillo, E. M., y Ruiz-Urigüen, M. (2023). Effect of a semi-automated fermentation system on the physical and chemical characteristics of *Theobroma cacao* L. grown in the northern Ecuadorian Amazon. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(1), 337-345. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01620-x>

- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., y Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273-280.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- Castillejos-Mijangos, L. A., Meza-Márquez, O. G., Osorio-Revilla, G., Jiménez-Martínez, C., y Gallardo-Velázquez, T. (2023). Identification of Variety and Prediction of Chemical Composition in Cocoa Beans (Theobroma cacao L.) by FT-MIR Spectroscopy and Chemometrics. *Foods*, 12(22), 4144.
<https://doi.org/10.3390/foods12224144>
- Cempaka, L., Ardiansyah, Asiah, N., y David, W. (2023). *Effect of Fermentation on the bioactive compound of cocoa Beans: A systematic review and meta-analysis approach*. <https://doi.org/10.17170/KOBRA-202210056941>
- Chapa-Gonza, S. R., Rondinel-Mendoza, N. V., Mansilla-Córdova, P. J., Sanchez-Aguilar, W. D., Alviárez-Gutierrez, E., Silva-Zuta, M. Z., Guerrero-Abad, J. C., y Caetano, A. C. (2025). Volatile organic compound profile of roasted and unroasted fine aroma cocoa genotypes from Peru. *European Food Research and Technology*, 251(11), 3905-3915. <https://doi.org/10.1007/s00217-025-04844-5>
- Cortez, D., Flores, M., Calampa, Ll., Oliva-Cruz, M., Goñas, M., Meléndez-Mori, J. B., y Chavez, S. G. (2024). From the seed to the cocoa liquor: Traceability of bioactive compounds during the postharvest process of cocoa in Amazonas-Peru. *Microchemical Journal*, 201, 110607.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110607>
- Cortez, D., Quispe-Sanchez, L., Mestanza, M., Oliva-Cruz, M., Yoplac, I., Torres, C., y Chavez, S. G. (2023). Changes in bioactive compounds during fermentation of

- cocoa (*Theobroma cacao*) harvested in Amazonas-Peru. *Current Research in Food Science*, 6, 100494. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100494>
- De Barros Kobi, H., Bragança Alves Fernandes, R., Lorrane Rodrigues Borges, L., Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal, M., Cesar Lima Marrocos, P., Viana Freitas, V., Sampaio Da Silveira De Souza, M., Abranches Dias Castro, G., Antonio Fernandes, S., Da Costa Ribeiro Ferraz, K., y Cesar Stringheta, P. (2024). Metabolic profile of fatty acids, phenolic compounds, and methylxanthines of cocoa kernels (*Theobroma cacao* L.) from different cultivars produced in cabruca and full sun farming systems. *Food Research International*, 197, 115198. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115198>
- Ecuador Forestal. (2012). *Ficha técnica No. 4: Laurel (Cordia alliodora)*. Ecuador Forestal. Ecuador Forestal. <https://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-4-laurel/>
- Erazo, C. Y., Bravo, K. J., Tuárez García, D. A., Fernández, Á. O., Torres, Y. G., y Vera, J. F. (2021). Efecto de la fermentación de cacao (*theobroma cacao* L.), variedad nacional y trinitario, en cajas de maderas no convencionales sobre la calidad física y sensorial del licor de cacao. *Revista de Investigación Talentos*, 8(2), 42-55. <https://doi.org/10.33789/talentos.8.2.153>
- Fang, Y., Li, R., Chu, Z., Zhu, K., Gu, F., y Zhang, Y. (2020). Chemical and flavor profile changes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) during primary fermentation. *Food Science and Nutrition*, 8(8), 4121-4133. Scopus. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1701>
- Folin, O., y Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane Determinations In Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627-650. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84277-6)

González, A. F. R., García, G. A. G., Polanía-Hincapié, P. A., López, L. J., y Suárez, J. C.

(2024). Fermentation and its effect on the physicochemical and sensory attributes of cocoa beans in the Colombian Amazon. *PLOS ONE*, 19(10), e0306680.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0306680>

Guillen-Guerrero, K. M., y de la Rosa-Millan, J. (2025). Effects of Fermentation

Temperature on the Physicochemical Properties, Bioactive Compounds, and In Vitro Digestive Profile of Cacao (*Theobroma cacao*) Seeds. *Fermentation*, 11(4).

Scopus. <https://doi.org/10.3390/fermentation11040167>

Hernández, M. P. L., Núñez, J. C., Gómez, M. S. H., y Tovar, M. D. L. (2019).

Physicochemical and microbiological dynamics of the fermentation of the CCN51 cocoa material in three maturity stages. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(3).

Scopus. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019010>

Horta Tellez, H. B., García Muñoz, M. C., Ceron Salazar, I. X., y Sandoval Aldana, A. P.

(2019). Evaluation of the fermentation process and final quality of five cacao clones from the department of Huila, Colombia. *DYNA*, 86(210), 233-239.

<https://doi.org/10.15446/dyna.v86n210.75814>

Instituto Nacional de Calidad. (2018). *NTP-ISO 2451:2018 Granos de cacao*.

Especificaciones y requisitos de calidad (Norma Técnica Peruana NTP-ISO

2451:2018; 1.^a ed.). INACAL.

Jaimez, R. E., Barragan, L., Fernández-Niño, M., Wessjohann, L. A., Cedeño-Garcia, G.,

Sotomayor Cantos, I., y Arteaga, F. (2022a). *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51:

A comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. *PeerJ*, 10, e12676.

<https://doi.org/10.7717/peerj.12676>

- Jaimez, R. E., Barragan, L., Fernández-Niño, M., Wessjohann, L. A., Cedeño-Garcia, G., Sotomayor Cantos, I., y Arteaga, F. (2022b). *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: A comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. *PeerJ*, 10, e12676.
<https://doi.org/10.7717/peerj.12676>
- Mayra, O. C., Manosalvas-Quiroz, L.-A., Mosquera, N. P., y Samaniego, I. (2024). Effect of fermentation parameters on the antioxidant activity of Ecuadorian cocoa (*Theobroma cacao* L.). *AIMS Agriculture and Food*, 9(3), 872-886.
<https://doi.org/10.3934/agrfood.2024047>
- MEFCCA. (15/02026). *Cartilla: Fermentado y secado de cacao* [Cartilla técnica]. Gobierno de Nicaragua.
<https://www.economiafamiliar.gob.ni/backend/vistas/doc/cartilla/documento6905430.pdf>
- Mendoza, E. (2020). *Influencia de la madera blanca (Pino, Laurel, Guayacan, blanco) En la calidad de fermentacion de cacao(Theobroma cacaoL.) de origen forastero y nacional* [Tesis, Universidad Tecnica Estatal de Quevedo].
<https://repositorio.uteq.edu.ec/items/5f5a9510-f3d6-4d69-95bc-8b347681ba6a>
- Mori, D., Barrena, M., Oliva, S., y Chavez, S. (2022). Response surface optimization of the cacao criollo fermentation process in the province of Utcubamba, Amazonas-Peru. *Revista de La Facultad de Agronomía, Universidad Del Zulia*, 39(1), e223917.
[https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v39.n1.17](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v39.n1.17)
- Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Giordano, M., Suarez-Quiroz, M. L., Gonzalez-Ríos, O., y Cocolin, L. (2021). Influence of Taxonomic and Functional Content of Microbial Communities on the Quality of Fermented Cocoa Pulp-Bean Mass. *Applied and*

Environmental Microbiology, 87(14), e00425-21.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00425-21>

Nascimento, M. B., Amorim, L. R., Nonato, M. A. S., Roselino, M. N., Santana, L. R. R.,

Ferreira, A. C. R., Rodrigues, F. M., Mesquita, P. R. R., y Soares, S. E. (2024).

Optimization of HS-SPME/GC-MS Method for Determining Volatile Organic

Compounds and Sensory Profile in Cocoa Honey from Different Cocoa Varieties

(*Theobroma cacao* L.). *Molecules*, 29(13), 3194.

<https://doi.org/10.3390/molecules29133194>

Oliva-Cruz, M., Goñas, M., Bobadilla, L. G., Rubio, K. B., Escobedo-Ocampo, P., García

Rosero, L. M., Rojas Briceño, N. B., y Maicelo-Quintana, J. L. (2022). Genetic

Groups of Fine-Aroma Native Cacao Based on Morphological and Sensory

Descriptors in Northeast Peru. *Frontiers in Plant Science*, 13, 896332.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.896332>

Oracz, J., Zyzelewicz, D., y Nebesny, E. (2015). The Content of Polyphenolic Compounds

in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region,

and Processing Operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and*

Nutrition, 55(9), 1176-1192. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.686934>

Ortega, J. A. A., García, E. A., y Meléndez, C. T. R. (2021). Proximal chemical evaluation,

antioxidant content and fatty acids in fermented and dried cocoa beans, roasted

cocoa beans and cocoa pulp bar (*Theobroma cacao* l. Criollo cultivar). *Revista*

Chilena de Nutricion, 48(4), 500-506. Scopus. [https://doi.org/10.4067/S0717-](https://doi.org/10.4067/S0717-75182021000400500)

[75182021000400500](https://doi.org/10.4067/S0717-75182021000400500)

Palabiyik, I., Kopuk, B., Konar, N., y Toker, O. S. (2023). Investigation of cold plasma

technique as an alternative to conventional alkalization of cocoa powders.

Innovative Food Science and Emerging Technologies, 88. Scopus.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103440>

- Polanía-Hincapié, P. A., Suárez, J. C., Hernández, H. E., Ramón-Triana, V. Y., Cuéllar-Álvarez, L. N., y Casanoves, F. (2023). Influence of Fermentation Time on the Chemical and Functional Composition of Different Cocoa Clones from Southern Colombia. *Fermentation*, 9(11), 982. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110982>
- Quintana-Fuentes, L. F., García-Jerez, A., Rodríguez-Negrette, A. C., Hoyos-Merlano, N. T., y Alvis-Bermúdez, A. (2025). Impact of Spontaneous Fermentation on the Physicochemical and Sensory Qualities of Cacao. *Fermentation*, 11(7), 377. <https://doi.org/10.3390/fermentation11070377>
- Quispe-Sanchez, L., Caetano, A. C., Baca, D., Oliva-Cruz, M., Díaz-Valderrama, J. R., y Chavez, S. G. (2023). Fatty acid profile and rheological properties of cocoa paste from north-eastern Peru. *Journal of Food Composition and Analysis*, 123, 105580. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105580>
- Razola-Díaz, M. D. C., Aznar-Ramos, M. J., Verardo, V., Melgar-Locatelli, S., Castilla-Ortega, E., y Rodríguez-Pérez, C. (2023). Exploring the Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Different Cocoa Powders. *Antioxidants*, 12(3), 716. <https://doi.org/10.3390/antiox12030716>
- Ruiz-Santiago, F. L., Márquez-Rocha, F. J., García-Alamilla, P., Carrera-Lanestosa, A., Ramírez-López, C., Ocaranza-Sánchez, E., y Jiménez-Rodríguez, D. J. (2024). Physicochemical and Biochemical Changes in Cocoa during the Fermentation Step. *Fermentation*, 10(8). Scopus. <https://doi.org/10.3390/fermentation10080405>
- Samaniego, I., Espín, S., Quiroz, J., Rosales, C., Carrillo, W., Mena, P., y García-Viguera, C. (2021). Effect of the growing area on the fat content and the fatty acid

- composition of Ecuadorian cocoa beans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(7), 901-911. <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1884204>
- Sanchez-Capa, M., Viteri-Sanchez, S., Burbano-Cachiguango, A., Abril-Donoso, M., Vargas-Tierras, T., Suarez-Cedillo, S., y Mestanza-Ramón, C. (2022). New Characteristics in the Fermentation Process of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) “Super Árbol” in La Joya de los Sachas, Ecuador. *Sustainability*, 14(13), 7564. <https://doi.org/10.3390/su14137564>
- Sandhya, M. V. S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaik, J., Rao, L. J., Janardhan, P., y Murthy, P. S. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT*, 65, 731-738. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.002>
- Sari, A. B. T., Andriana, Y., Abdurrahman, M. F., Kurnianto, D., Sefrienda, A. R., Setiyoningrum, F., Wibowo, D. S., y Minh, T. N. (2024). Differentiation of Indonesian specialty cocoa (*Theobroma cacao*) varieties and origins using phenolic contents, antioxidant activities, and spectrometric fingerprints for traceability. *Food Bioscience*, 62, 105434. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105434>
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- SMART. (2023). *Especies forestales maderables del departamento San Martín: Cordia alliodora* [Ficha técnica]. SMART-CIFOR-ICRAF. <https://smart.cifor-icraf.org/wp-content/uploads/2023/12/Cordia-alliodora.pdf>
- Subroto, E., Djali, M., Indiarto, R., Lembong, E., y Baiti, N. (2023). Microbiological Activity Affects Post-Harvest Quality of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Beans. *Horticulturae*, 9(7), 805. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9070805>

- Surprise, Moussoyi Moundanga, Petit, J., Ndangui, C. B., Scher, J., y Nzikou, J.-M. (2024). Impact of cocoa variety on merchant quality and physicochemical characteristics of raw cocoa beans and roasted cocoa mass. *Discover Food*, 4(1), 115. <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00188-3>
- Tejeda, J. F., Arango-Angarita, J., y Cuervo, J. L. (2023). Effect of Solar Pre-Drying and Yeast Starter Inoculation Treatments on the Chemical Composition of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Beans from Southwestern Colombia. *Foods*, 12(24). Scopus. <https://doi.org/10.3390/foods12244455>
- Tsegay, G., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B. S., Ele, E., Mohammed, A. M., y Mamo, H. (2020). Effect of altitude of coffee plants on the composition of fatty acids of green coffee beans. *BMC Chemistry*, 14(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13065-020-00688-0>
- Tunjung Sari, A. B., Efraim, P., Song, X., Rothkopf, I., Schweiggert-Weisz, U., Schieber, A., y Gola, S. (2025). Effects of processing methods of unfermented cocoa beans from Indonesia on the chemical and physical characteristics of butter and cake. *Journal of Agriculture and Food Research*, 19. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101563>
- UNICEN. (2025). *Las especies tóxicas con nombre vulgar “laurel”* [Página institucional]. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Secretaría de Extensión – UNICEN. <https://extension.unicen.edu.ar/las-especies-toxicas-con-nombre-vulgar-laurel/>
- Utami, R. R., Armunanto, R., y Rahardjo, S. (2016). Effects of cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) fermentation on phenolic content, antioxidant activity and functional group of cocoa bean shell. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15(10), 948-953. Scopus. <https://doi.org/10.3923/pjn.2016.948.953>

Vásquez Cortez, L. H., Cevallos Castillo, C. A., Uvidia Vélez, M. V., Segobia Muñoz, S.

A., y Plua Montiel, J. A. (2025). Evaluation of Fermentation Methods for Nacional and CCN51 Cacao Introducing Microorganisms in Jute, Rohan Boxes for

Organoleptic Improvement. *Revista Luna Azul*, (60), 168-181. Scopus.

<https://doi.org/10.17151/luaz.2025.60.10>

Wexler, L., Cubero-Castillo, E., Vega-Aguilar, C. A., Alvarado-Marengo, P., y Hernández-

Gómez, L. (2025). Fermentation time effect on the quality of ancestral cocoa cultivars from Upala, Costa Rica, using physicochemical and sensory

characteristics. *CyTA - Journal of Food*, 23(1), 2486226.

<https://doi.org/10.1080/19476337.2025.2486226>

Wexler-Goering, L., y Alvarado-Marengo, P. (2024). Cacao fino y de aroma: Compuestos

claves de aroma y comportamiento durante el proceso. *Agronomía Mesoamericana*,

59679. <https://doi.org/10.15517/am.2024.59679>

Yang, D., Wu, B., Qin, X., Zhao, X., Zhu, Z., Yan, L., Zhang, F., Wu, G., y Li, F. (2024).

Quality differences and profiling of volatile components between fermented and unfermented cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) of Criollo, Forastero and Trinitario

in China. *Beverage Plant Research*, 4(1), 0-0. [https://doi.org/10.48130/bpr-0024-](https://doi.org/10.48130/bpr-0024-0002)

0002

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por concederme vida y salud, así como por bendecirme con una familia maravillosa, cuyo apoyo constante y motivación han sido fundamentales para culminar esta meta académica en mi formación como Ingeniera de Industrias Alimentarias.

Asimismo, expreso un reconocimiento personal por la fortaleza, constancia y perseverancia demostradas a lo largo de este proceso, manteniendo la convicción de que los objetivos propuestos pueden alcanzarse con esfuerzo y disciplina.

Agradezco de manera especial al Mg. Hans Himbler Minchán Velayarce, asesor de la presente investigación, por su dedicación, paciencia, consejos y orientación académica permanente, cuyo acompañamiento fue determinante para el desarrollo y culminación satisfactoria de esta tesis.

A la Universidad Nacional de Jaén, mi casa superior de estudios, por el soporte institucional brindado. De manera particular, agradezco el apoyo del Mg. Adán Díaz Ruiz, Mg. Ralph Rivera Botonares, Ing. Manuelito Bellasmin y Ing. Pool Díaz Ruiz, quienes contribuyeron con su apoyo técnico y logístico durante las distintas etapas del estudio.

Agradezco a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM) por el soporte brindado durante el desarrollo de la presente investigación. De manera especial, al Dr. Yves Julián Yoplac Tafur por su valiosa contribución científica y por facilitar la ejecución experimental en el Laboratorio de Nutrición Animal y Bromatología de Alimentos, lo cual fue fundamental para el desarrollo del trabajo. A la Dra. Laydy Mitsu Mena Chacón por su apoyo especializado en el análisis estadístico, que permitió fortalecer la consistencia y validez de los resultados obtenidos.

De manera especial, agradezco a mis compañeras Diana Liceth Medina Altamirano y Fiorela Castillo Pintado, por los momentos compartidos, los desafíos superados y el apoyo mutuo a lo largo de este proceso académico, que permitió alcanzar conjuntamente los objetivos propuestos.

DEDICATORIA

“Dedico el presente trabajo a Dios, por guiarme y darme fortaleza a lo largo de este proceso; a mi familia, por su apoyo constante e incondicional; a mí misma, por la paciencia, perseverancia y esfuerzo demostrados para alcanzar esta meta; y al Contador Matthias Segovia, por sus buenos deseos y palabras de aliento que contribuyeron a que este proyecto se haga realidad”

Lucero

VII. ANEXOS

Anexo 1

Sistema de Monitoreo Multiparamétrico utilizado en la fermentación

El sistema de monitoreo desarrollado para esta investigación permitió el registro continuo y automatizado de variables fisicoquímicas críticas durante la fermentación del cacao en ambas localidades experimentales. El diseño del sistema priorizó la robustez operativa bajo condiciones de campo, minimizando intervención manual y garantizando integridad de los datos.

Componentes principales del sistema

El sistema estuvo basado en la plataforma Arduino Mega 2560 Pro como unidad de control central, seleccionada por su capacidad de procesamiento, número de pines de entrada/salida y compatibilidad con múltiples protocolos de comunicación. Se instalaron tres unidades independientes, una por cada fermentador, para evitar interferencia entre mediciones y facilitar identificación de fallos individuales. Cada unidad integró diez sensores de temperatura DS18B20 y diez sensores capacitivos de humedad V1.2 para monitoreo de la masa, distribuidos estratégicamente en diferentes profundidades. Los sensores DS18B20 se seleccionaron por su encapsulado resistente al agua, rango de operación amplio y comunicación digital que minimiza errores por ruido eléctrico.

Los sensores de temperatura y humedad se montaron dentro de sondas cilíndricas de acero inoxidable fabricadas específicamente para este estudio, con sellado hermético mediante resina epoxi resistente a temperatura. Las sondas se insertaron verticalmente en la masa fermentativa a través de orificios preperforados en la cubierta de polietileno, permitiendo mediciones a 10, 20 y 30 cm de profundidad desde la superficie. Esta configuración espacial permitió caracterizar gradientes térmicos e higroscópicos típicos de fermentaciones en cajón de madera, donde la zona superficial presenta mayor intercambio con el ambiente y la zona profunda mantiene temperaturas más elevadas.

Para el monitoreo ambiental se utilizaron cuatro sensores DHT22, que combinan medición de temperatura y humedad relativa en un solo encapsulado, complementados con cuatro sensores BME280 que adicionalmente registraron presión barométrica. Los sensores ambientales se ubicaron en gabinetes ventilados de PVC a 1.5 m de altura y 0.5 m de distancia horizontal del fermentador para evitar influencia directa del calor generado por la masa fermentativa.

Calibración de sensores

Los sensores de temperatura DS18B20 se verificaron contra un termómetro digital certificado en baño térmico controlado a 25, 40 y 55 °C, confirmando desviaciones menores a 0.3 °C. Los sensores capacitivos de humedad se calibraron mediante método gravimétrico utilizando muestras de cacao con contenido de humedad conocido, estableciendo curvas de calibración con coeficientes de determinación superiores a 0.95.

Sistema de alimentación eléctrica y autonomía

La disponibilidad de infraestructura eléctrica determinó configuraciones diferenciadas por localidad. En Bellavista se utilizó alimentación desde red eléctrica convencional con conversión y regulación a voltaje de operación del sistema. En El Naranjal, la ausencia de electricidad requirió implementación de sistema autónomo solar fotovoltaico dimensionado para garantizar operación continua. El panel solar policristalino de 50W se montó con orientación norte e inclinación de 15° para maximizar captación de radiación solar en la zona ecuatorial. El controlador de carga tipo PWM reguló voltaje y protegió la batería contra sobrecarga y descarga profunda. La batería de ciclo profundo de 12V-18Ah proporcionó autonomía calculada superior a 72 horas considerando consumo promedio del sistema y periodos sin radiación solar efectiva, verificado experimentalmente durante días nublados consecutivos.

Almacenamiento y estructura de datos

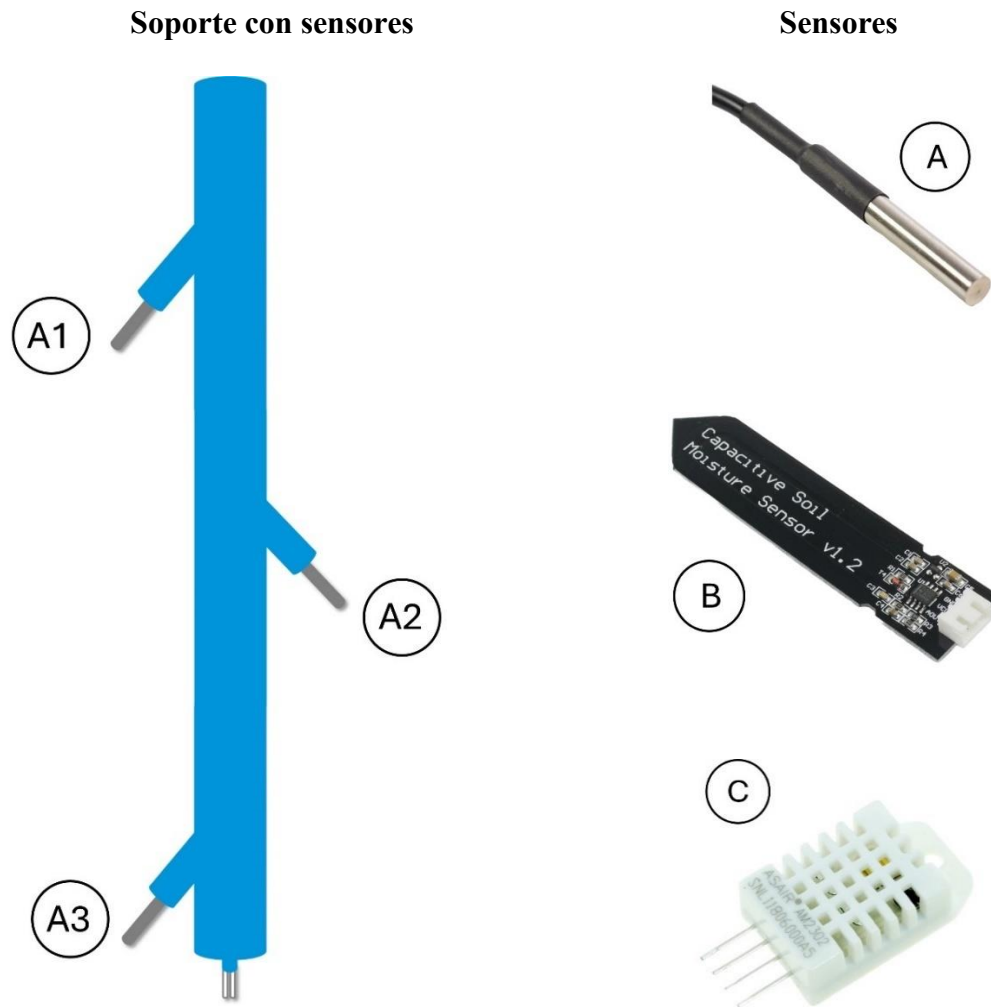
Los datos se almacenaron localmente en tarjetas MicroSD mediante módulos lectores integrados al sistema. La sincronización temporal se garantizó mediante módulos de reloj de tiempo real DS3231 con batería de respaldo, manteniendo hora correcta incluso durante interrupciones de alimentación. El sistema generó archivos de texto en formato CSV con estructura tabular que incluyó marca temporal (fecha y hora) seguida de valores numéricos de todas las variables monitoreadas. La frecuencia de muestreo de una lectura por hora se determinó mediante análisis preliminar de la cinética térmica de fermentación, confirmando que este intervalo captura adecuadamente la dinámica del proceso sin generar archivos excesivamente grandes que dificulten manipulación posterior.

Operación en campo y mantenimiento

El sistema operó de manera autónoma durante todo el periodo fermentativo sin requerir intervención manual más allá de la verificación visual diaria del estado de funcionamiento mediante indicadores LED integrados. Al finalizar cada fermentación, las tarjetas MicroSD se extrajeron para descarga de datos en computadora personal mediante lector USB estándar. Los archivos CSV se procesaron posteriormente mediante software estadístico para análisis de tendencias temporales, cálculo de promedios, máximos, mínimos y desviaciones estándar de cada variable monitoreada.

Anexo 2

Sistema de sensores utilizados para el monitoreo multiparamétrico durante la fermentación del cacao



Nota: A: soporte sondas porta-sensores de acero inoxidable AISI 304 para temperatura de la masa en la fermentación (A1, A2, A3 corresponde a la ubicación superior, media e inferior de la masa, correspondientemente). B sensor capacitivo V1.2 (DFROBOT, China) para determinar la humedad de la masa en la fermentación. C sensor DHT22/AM2302 (Aosong, China) y BME280 (Bosch Sensortec, Alemania) para la temperatura y humedad ambientales.

Anexo 3

Sistema de fermentación de cacao instrumentado con sensores para monitoreo en campo



A



B



C

Nota: (A) Cajón fermentador de madera durante la etapa de carga y acondicionamiento del grano de cacao. (B) Sistema de adquisición de datos alimentado por energía solar para el registro continuo de variables ambientales y de proceso. (C) Disposición de las sondas de temperatura y humedad insertadas en la masa de cacao durante la fermentación.

Anexo 4

Recolección, selección y quebrado de mazorcas de cacao previo a la fermentación



A



B



C



D

Nota: (A) Recolección manual de mazorcas maduras de cacao en campo. (B) Mazorca de cacao CCN51 seleccionada previo al quebrado. (C) Mazorca de cacao Criollo seleccionada previo al quebrado. (D) Quebrado manual de las mazorcas y exposición de los granos recubiertos de mucílago para su posterior fermentación.

Anexo 5

Diferenciación crítica entre especies denominadas “laurel ornamental” y “laurel amazónico” y su uso en fermentación de cacao.

LAUREL TÓXICO / ORNAMENTAL

Nerium oleander L.
(Apocynaceae)



ARBUSTO ORNAMENTAL
Altura: 2.5 – 4 m (máx. 8 m)
Porte compacto

HOJAS
Oblongas, coriáceas, en verticilos de 3 (12 – 20 cm), brillantes, verde oscuro

FLORES
Grandes (3 – 5 cm), vistosas, rosadas, blancas o rojas. Contienen toxinas

FRUTOS
Vainas largas (10 – 20 cm) con semillas plumosas NO comestibles

LÁTEX / SAVIA
Produce látex blanco. La savia provoca irritación cutánea severa al contacto

CORTEZA
Lisa, grisácea, sin fisuras. Interna con látex tóxico

TOXICIDAD EXTREMA
Contiene glucósidos cardiotónicos: oleandrina, neriosido, oleandrigénina, digitoxigenina, entre otros. Inhibe la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa → arritmias → fallo cardíaco → muerte.
TODA LA PLANTA ES TÓXICA: hojas, flores, tallos, raíces, savia, néctar y madera.

NO ES MADERABLE
Tronco delgado (5 – 15 cm de diámetro). No produce tablas útiles. Uso solo ornamental.

PROHIBIDO EN CONTACTO CON ALIMENTOS
NO USAR EN CAJONES FERMENTADORES DE CACAO

VS

COMPARACIÓN CLAVE

<i>Nerium oleander</i> (Apocynaceae)	CRITERIO	<i>Cordia alliodora</i> (Boraginaceae)
Apocynaceae	IDENTIDAD TAXONÓMICA	Boraginaceae
Arbusto ornamental	TIPO DE PLANTA	Árbol forestal
2.5 – 4 m	ALTURA	8 – 40 m
Sí (tóxico)	LÁTEX	No
Muy tóxica	TOXICIDAD	No reportada
No	¿MADERABLE?	Sí
Baja	RESISTENCIA A HUMEDAD / HONGOS	Muy alta
No Sí (sustancias tóxicas)	ALTERA EL CACAO	Sí (madera neutra)

LAUREL AMAZÓNICO (Cajones fermentadores)

***Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken**
(Boraginaceae)



ÁRBOL FORESTAL
Altura: 8 – 40 m
Fuste recto y cilíndrico

HOJAS
Simples, alternas, ásperas, oblongas a ovadas (8 – 18 cm x 3 – 9 cm)

FLORES
Pequeñas (<1 cm), blancas, agrupadas en panículas. Melíferas

FRUTOS
Nuececillas cilíndricas de 5 mm. Comestibles para aves y mamíferos

NÓDULOS CARACTERÍSTICOS
Ramitas con nudos engrosados ("formicarios") que alojan hormigas mutualistas

MADERA DE ALTA CALIDAD

- Densidad básica: 0.31 – 0.50 g/cm³ (liviana-moderada)
- Albura: amarillento a marrón claro
- Duramen: marrón dorado a café aceitinado con vetas
- Grano recto. Textura fina y homogénea
- Muy resistente a hongos, pudrición y comején
- Ideal para contacto con líquidos ácidos (mucilago de cacao)

USO VALIDADO EN CAJONES FERMENTADORES

- Madera sin resinas ni sustancias extrañas.
- No interfiere en la calidad del grano.
- Ampliamente utilizada en la fermentación de cacao.

EN LA FERMENTACIÓN DE CACAO



MADERA ADECUADA
Permite condiciones óptimas de temperatura, aireación y drenaje.

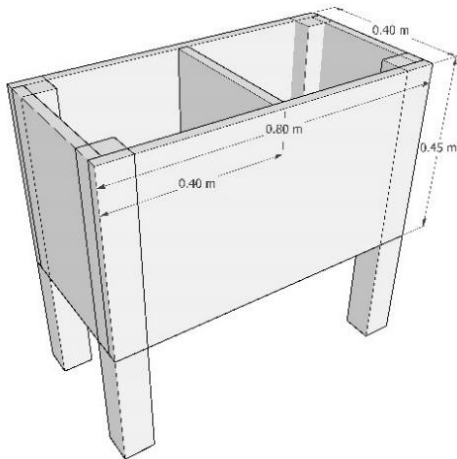
FERMENTACIÓN CONTROLADA
Desarrollo microbiano adecuado y reducción de amargor/astringencia.

CALIDAD DEL GRANO MEJORADA
Mejor aroma, sabor, color y aceptación comercial.

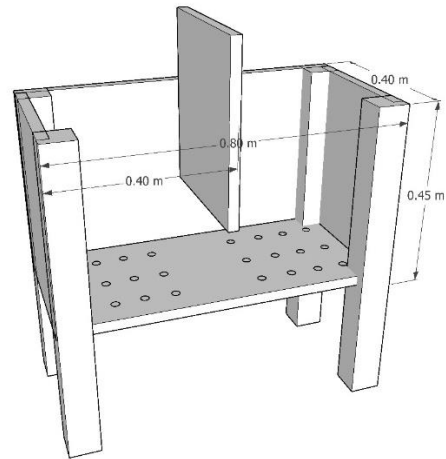
CACAO DE ALTA CALIDAD
Mayor valor agregado y sostenibilidad del proceso.

Anexo 6

Diseño y dimensiones de los cajones fermentadores utilizados en el estudio



A



B



C

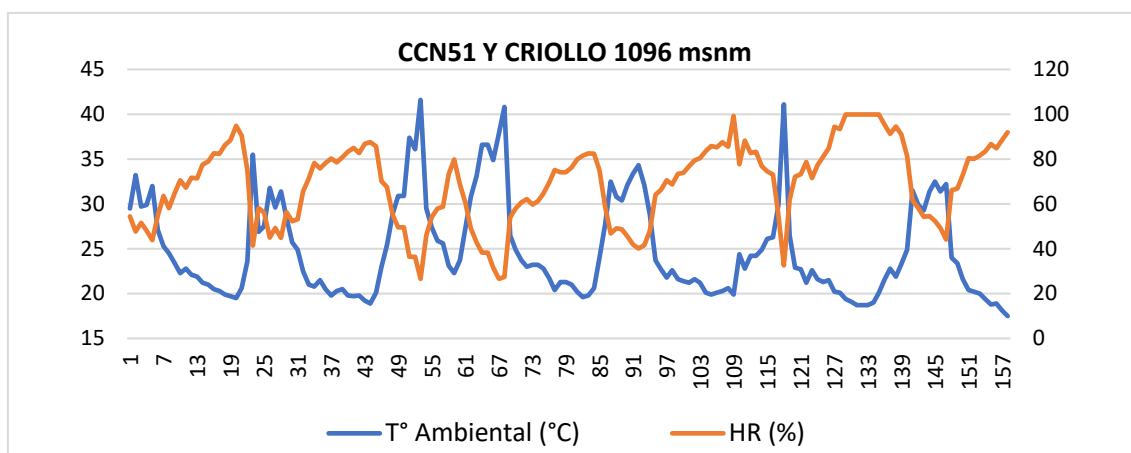


D

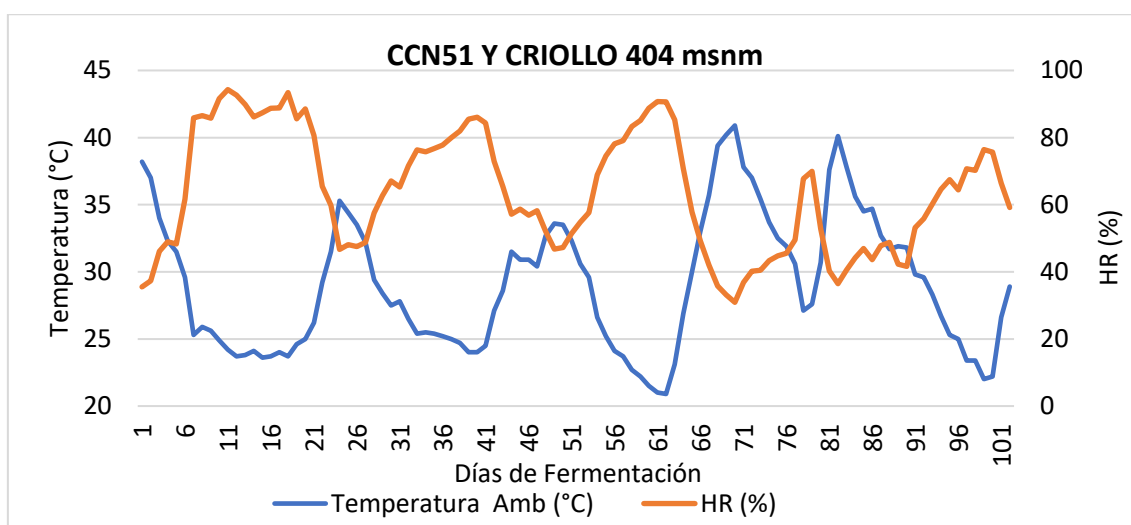
Nota: (A) Vista tridimensional del cajón fermentador de madera con dimensiones generales. (B) Vista interna del cajón mostrando el sistema de drenaje en la base. (C) Cajón fermentador construido y utilizado en el estudio. (D) Detalle interno del cajón fermentador con fondo perforado, tabique de separación y sistema de monitoreo instalado para el registro de variables durante la fermentación.

Anexo7

Registro de Temperatura y humedad ambiental durante la fermentación.



A

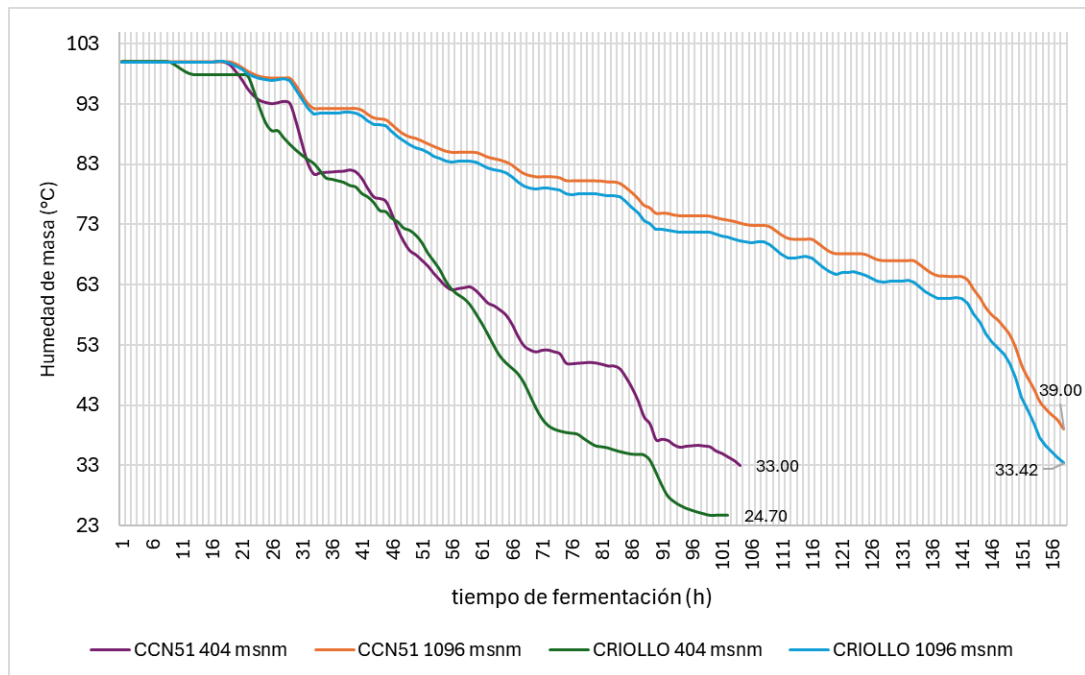


B

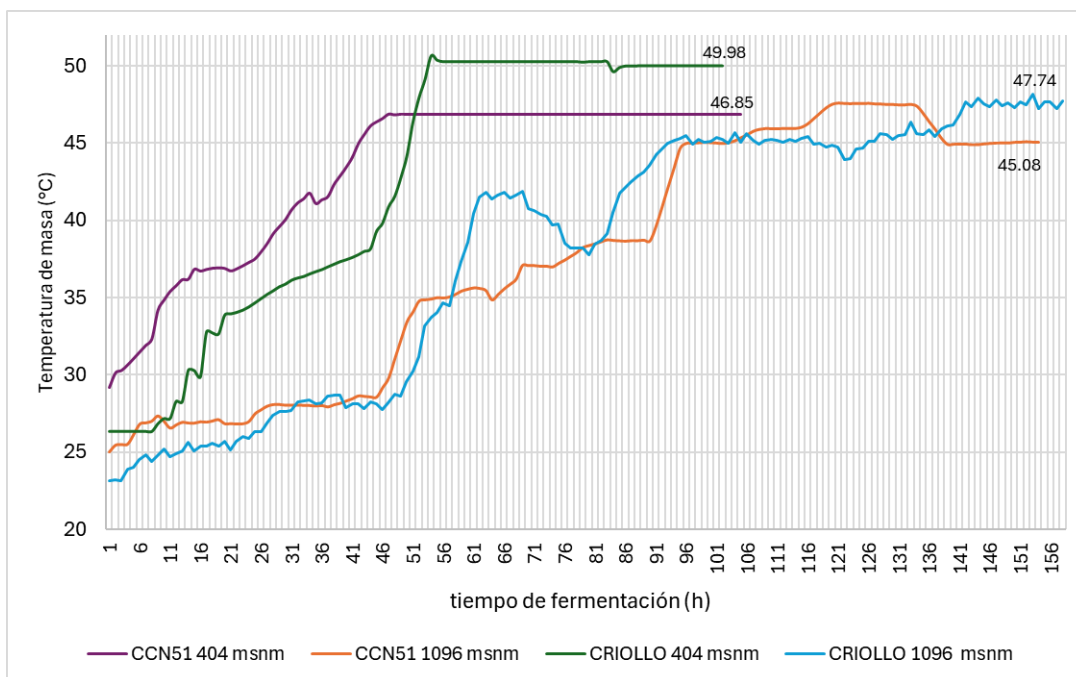
Nota: (A) Registro continuo de la temperatura ambiental y humedad relativa durante la fermentación del cacao (variedades CCN51 y Criollo) a 1096 m s.n.m. (B) Registro continuo de la temperatura ambiental y humedad relativa durante la fermentación del cacao (variedades CCN51 y Criollo) a 404 m s.n.m.

Anexo 8

Evolución de la humedad y la temperatura de la masa de cacao durante la fermentación



A



B

Nota: (A) Variación de la humedad de la masa de cacao durante la fermentación para las variedades CCN51 y Criollo cultivadas a 404 y 1096 m s.n.m. (B) Variación de la temperatura de la masa de cacao durante la fermentación para las variedades CCN51 y Criollo cultivadas a 404 y 1096 m s.n.m. Los registros se realizaron de forma continua a lo largo del tiempo de fermentación.

Anexo 9

Etapas post-fermentativas para la obtención de licor de cacao



A



B



C



D



E



F

Nota: (A) Granos de cacao fermentados sometidos a secado. (B) Tostado de granos de cacao en tostador de laboratorio de Sol y Café. (C) Descascarillado y selección manual de nibs de cacao. (D) Molienda inicial de nibs de cacao. (E) Refinado del licor de cacao hasta la obtención de licor. (F) Licor de cacao envasado correspondiente a las variedades CCN51 y Criollo.

Anexo 10

Determinación del pH del grano de cacao durante la fermentación



A



B

Nota: (A) Medición directa del pH del grano de cacao fermentado mediante pH-metro portátil. (B) Determinación del pH del grano de cacao fermentado empleando pH-metro digital de mesa, previo acondicionamiento de la muestra según el método AOAC 970.21.

Anexo 11

Determinación de la acidez titulable del grano de cacao fermentado



A



B

Nota: (A) Preparación y acondicionamiento de muestras de grano de cacao fermentado para el análisis de acidez titulable. (B) Valoración ácido–base del extracto del grano fermentado mediante titulación con hidróxido de sodio, empleando fenolftaleína como indicador, de acuerdo con el método AOAC 970.21.

Anexo 12

Determinación del contenido de humedad en el licor de cacao



A



B

Nota. A) Preparación y pesaje de las muestras de licor de cacao previo al análisis de humedad. B) Determinación del contenido de humedad mediante analizador de humedad por método termogravimétrico.

Anexo 13

Determinación del contenido de cenizas del licor de cacao



A



B

Nota: (A) Incineración de muestras de licor de cacao en mufla para la determinación de cenizas totales. (B) Cenizas obtenidas tras el proceso de incineración y enfriamiento en desecador, previo a la cuantificación gravimétrica, de acuerdo con el método AOAC 923.03.

Anexo 14

Determinación del contenido de proteínas en el licor de cacao



Nota: Determinador elemental de proteínas por combustión tipo Dumas (LECO), utilizado para la cuantificación del contenido de nitrógeno total en muestras de licor de cacao.

Anexo 15

Determinación del contenido de grasas en el licor de cacao.



A

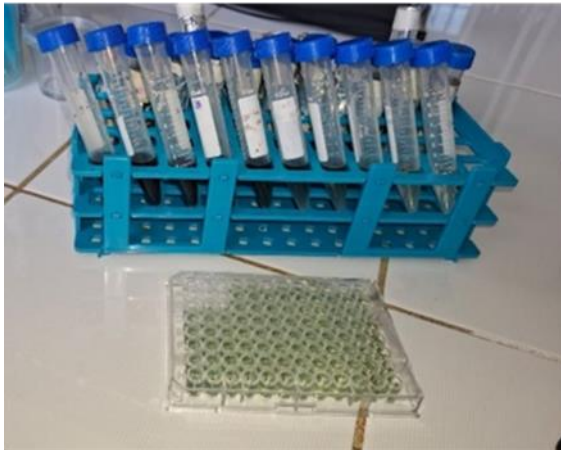


B

Nota: (A) Sistema de extracción Soxhlet empleado para la determinación de grasa en licor de cacao, mostrando el montaje completo con matraces, extractores y condensadores. (B) Detalle del proceso de extracción durante la operación, evidenciando la recuperación del extracto lipídico en los matraces de fondo redondo.

Anexo16

Determinación de los TPC Folin- Ciocaltiu



A

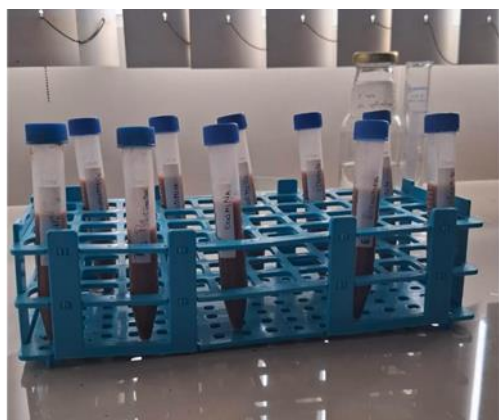


B

Nota: (A) Preparación de extractos y reactivos para la determinación de los TPC. (B) Registro de la absorbancia de las muestras en lector de microplacas, utilizado para el cálculo de los TPC expresada como equivalentes del ácido gálico de acuerdo con el método Folin Ciocaltiu.

Anexo 17

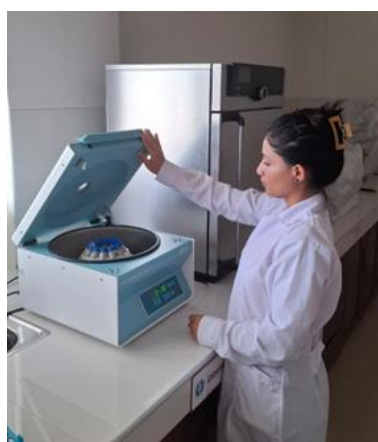
Determinación del contenido de capacidad antioxidante en el licor de cacao



A



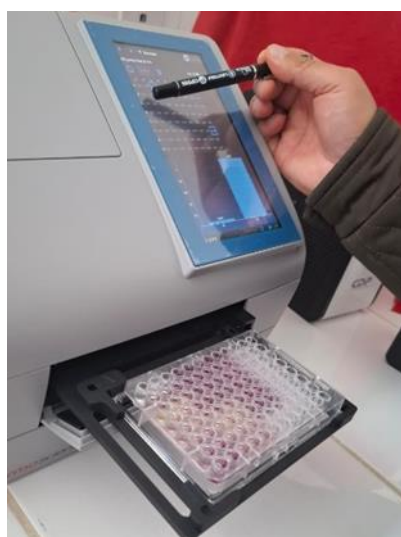
B



C



D



E



F

Nota: (A) Preparación de extractos metanólicos del licor de cacao. (B) Homogeneización de las muestras durante el proceso de extracción. (C) Separación del sobrenadante mediante centrifugación. (D) Preparación de reactivos y alícuotas para el ensayo colorimétrico. (E) Lectura de absorbancia de las muestras en espectrofotómetro UV-Vis. (F) Registro de la señal espectrofotométrica utilizada para la cuantificación de capacidad antioxidante, de acuerdo con el método DPPH.