

# PIGMENTOS DE (*JUSTICIA SPICIGERA*) EN CHOCOLATE CON DOS VARIEDADES DE THEOBROMA: THEOBROMA BICOLOR Y THEOBROMA CACAO DE LA VARIEDAD TRINITARIO

## PIGMENTS FROM (*JUSTICIA SPICIGERA*) IN CHOCOLATE WITH TWO VARIETIES OF THEOBROMA: THEOBROMA BICOLOR AND THEOBROMA CACAO OF THE TRINITARIO VARIETY

Luis Humberto Vásquez Cortez<sup>1</sup>, Sanyi Lorena Rodríguez Cevallos<sup>2</sup>, Juan Andrés Villamarín Barreiro<sup>3</sup>, Jaime Fabián Vera Chang<sup>4</sup>

{lvazquezc@utb.edu.ec<sup>1</sup>, srodriguez4@uteq.edu.ec<sup>2</sup>, jvillamarinb@utb.edu.ec<sup>3</sup>, jverac@uteq.edu.ec<sup>4</sup>}

Fecha de recepción: 19/10/2024 / Fecha de aceptación: 05/01/2025 / Fecha de publicación: 06/01/2025

**RESUMEN:** La presente investigación tuvo como objetivo la utilización de pigmentos de (*justicia spicigera*) en chocolate con dos variedades de *Theobroma*: *theobroma bicolor* y *Theobroma cacao* de la variedad trinitario. Para evaluar los efectos de esta adición, se utilizó un Diseño Completamente al Azar con un arreglo bifactorial, compuesto por 6 tratamientos y 4 réplicas, sumando un total de 24 unidades experimentales. Los factores considerados fueron el tipo de *Theobroma* (Factor A) y la concentración de pigmentos de *Justicia spicigera* (0%, 5% y 10%) (Factor B). Se analizaron variables iniciales como pH, grados de temperatura, grados Brix. La capacidad antioxidante se evaluó mediante los métodos ABTS y DPPH, mostrando una mayor capacidad de eliminación de radicales libres en los tratamientos con pigmentos de *Justicia spicigera*, con valores de 245.83 y 184.24  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/g de chocolate adicionando la *Justicia Spicigera*. Además, en la presente investigación se aplicó una prueba sensorial con 25 catadores entrenados, quienes evaluaron atributos como acidez, aroma, amargor, notas de cacao, nuez, frutos secos, floral, intensidad y color. La adición del pigmento de *Justicia spicigera* mejoró significativamente las propiedades sensoriales y la aceptabilidad general del chocolate, abriendo la posibilidad de desarrollar productos innovadores y no convencionales. Se

<sup>1</sup>Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Agroindustria, Babahoyo, Ecuador, <https://orcid.org/0000-0003-1850-0217>.

<sup>2</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad Ciencias de la Industria y Producción, Carrera Ingeniería en Alimentos, Quevedo, Ecuador, <https://orcid.org/0009-0003-4684-9587>.

<sup>3</sup>Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Agroindustria, Babahoyo, Ecuador, <https://orcid.org/0000-0001-5615-0209>.

<sup>4</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencia de la Industria y Producción, Ingeniería en Alimentos, Quevedo, Ecuador, <https://orcid.org/0000-0001-6127-2307>.

destacó también el impacto económico positivo que esta innovación podría tener para los productores de cacao.

*Palabras clave: Chocolate, fermentación, postcosecha, sensorial, variedad*

**ABSTRACT:** The present investigation aimed at the use of pigments of (*Justicia spicigera*) in chocolate with two varieties of Theobroma: *Theobroma bicolor* and *Theobroma cacao* of the Trinitario variety. To evaluate the effects of this addition, a Completely Randomized Design with a bifactorial arrangement was used, composed of 6 treatments and 4 replicas, totaling 24 experimental units. The factors considered were the type of Theobroma (Factor A) and the concentration of pigments of *Justicia spicigera* (0%, 5% and 10%) (Factor B). Initial variables such as pH, temperature degrees, Brix degrees were analyzed. The antioxidant capacity was evaluated by the ABTS and DPPH methods, showing a greater capacity to eliminate free radicals in the treatments with pigments of *Justicia spicigera*, with values of 245.83 and 184.24  $\mu\text{mol}$  equivalents of Trolox/g of chocolate adding *Justicia Specigera*. In addition, in the present research, a sensory test was applied with 25 trained tasters, who evaluated attributes such as acidity, aroma, bitterness, notes of cocoa, nuts, dried fruit, floral, intensity and color. The addition of the pigment from *Justicia spicigera* significantly improved the sensory properties and the general acceptability of chocolate, opening the possibility of developing innovative and unconventional products. The positive economic impact that this innovation could have for cocoa producers was also highlighted.

*Keywords: Chocolate, fermentation, post-harvest, sensory, variety*

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es reconocido a nivel mundial como el principal ingrediente para la producción de chocolate. Este fruto, que pertenece a la clase *Magnoliopsida*, al orden *Malvales*, a la familia *Malvaceae*, y al género *Theobroma*, destaca por su especie cacao. Ecuador es uno de los países donde este cultivo es ampliamente promovido debido a la calidad excepcional y las propiedades sensoriales que lo diferencian en el mercado global (1).

El árbol de cacao es el único capaz de producir las valiosas almendras de cacao, las cuales son altamente demandadas por los chocolateros para la elaboración de chocolate. Este puede clasificarse como fino de aroma, destacándose por sus notas sensoriales florales y afrutadas, o como cacao estándar, que se caracteriza por un aroma más intenso y un amargor más marcado (2).

El cacao desempeña un papel clave en el desarrollo económico de Ecuador, junto con el banano y la industria petrolera. Históricamente, Ecuador fue el mayor exportador de cacao

a nivel global, y aunque actualmente ocupa el tercer lugar en exportación mundial de este producto, sigue incrementando su participación en el mercado internacional (3).

Tradicionalmente, se ha considerado que el origen del cacao (*Theobroma cacao* L.) se encontraba en Mesoamérica, en regiones que incluyen México, Guatemala y Honduras, con usos que datan de hace aproximadamente 2000 años a.C. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que al menos una variedad de cacao tiene su origen en la región de la Alta Amazonía, específicamente en el cantón de la provincia de Zamora Chinchipe, Ecuador. El cacao ha sido utilizado por las comunidades locales desde tiempos ancestrales, hace más de 5000 años, incluso antes de la llegada de los españoles (4).

La producción de cacao en Ecuador está en manos de pequeños y medianos agricultores, lo que proporciona empleo directo e indirecto a más de 600,000 ecuatorianos, quienes dependen en gran medida de los ingresos derivados de este cultivo. Actualmente, la producción de cacao se realiza bajo estándares de calidad cada vez más altos para satisfacer la demanda global de cacao sostenible. Además, se busca cumplir con requisitos sociales y ambientales, los cuales son cada vez más estrictos en el mercado internacional (5).

Ecuador cuenta con una notable biodiversidad que favorece la producción de cacao. La variedad Nacional, también conocida como Fino de Aroma, es ampliamente valorada por los fabricantes de chocolate a nivel mundial. Además, en el país se cultiva la variedad clonada CCN-51, apreciada por su resistencia y viabilidad en monocultivos. Las almendras de cacao (*Theobroma cacao* L.) son una fuente rica en energía, vitaminas, minerales y antioxidantes, lo que las convierte en un alimento funcional clave en la prevención de enfermedades cardiovasculares (6).

Es esencial asegurarse de que las mazorcas de cacao hayan alcanzado un nivel óptimo de madurez antes de la cosecha. Si se realiza una cosecha prematura o tardía, junto con una fermentación incorrecta, esto puede ocasionar grandes pérdidas para los agricultores y dañar la reputación del cacao. Además, dificulta su venta y comercialización en los centros de acopio, ya que el producto no cumpliría con los estándares mínimos de calidad requeridos.

Durante el proceso de fermentación, ocurren varias reacciones bioquímicas en las almendras de cacao que son cruciales para definir las características del producto final. La duración de este proceso depende de la variedad de cacao; por ejemplo, en el caso del cacao CCN-51, se necesitan 6 días de fermentación, durante los cuales se atraviesan las fases alcohólica, acética y oxidativa. Es importante que la temperatura no exceda los 50 °C para evitar daños en el grano, mientras que, si no alcanza los 40 °C, las almendras no desarrollarán sus propiedades sensoriales óptimas. Después de la fermentación, es fundamental realizar un secado adecuado al sol para reducir el nivel de humedad entre el 6 % y el 8 % (7).

En la provincia de Pastaza, se encuentran cultivos de cacao que alcanzan alturas que oscilan entre los 4 y 10 metros. Los frutos de esta variedad de cacao crecen directamente en las ramas. En lo que respecta a su corteza externa, el Mocambo presenta una superficie agrietada de color beige grisáceo. El fruto tiene una forma elipsoidal, y su cáscara es sólida y resistente, desprendiéndose del árbol y cayendo al suelo una vez que ha alcanzado su madurez óptima.

El *Theobroma bicolor*, un pariente ancestral y silvestre del *Theobroma cacao* L., cuenta con óptimos valores nutritivos que lo hacen ideal para la alimentación, ofreciendo una valiosa oportunidad para el desarrollo de productos no tradicionales en el ámbito de la agroindustria. Sin embargo, este árbol se encuentra en peligro de extinción, en gran parte debido a la falta de información técnica sobre su cultivo y aprovechamiento, lo que ha limitado su conservación y uso sostenible.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

El presente estudio se llevó a cabo en la Finca "La María", ubicada en Km. 7 vía a El Empalme - Entrada al cantón Mocache. Mocache, Los Ríos, donde se recolectaron las mazorcas de *Theobroma bicolor* Hump & Bonpl. Las coordenadas de la finca son Longitud -0.971058 y Latitud -79.692512. Paralelamente, se obtuvo la (*Justicia spicigera*) en la ciudad de Mocache, en la provincia de Los Ríos, con coordenadas Longitud -1.027092 y Latitud -79.467535.

La recepción de la materia prima las mazorcas de *Theobroma cacao* de la variedad Trinitaria fueron cosechadas en el Recinto El naranjo "Bajo perdido" Finca Ramírez, ubicada en la Ciudad de Mocache Provincia de "Los Ríos"; con Longitud -1.183475, y Latitud -79.502881.

### Diseño de la investigación

En el presente estudio se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un modelo de dos factores "Bifactorial" conformado por 6 tratamientos por 4 repeticiones dando un total de 24 objetos de estudio, El primer factor del estudio consistió en las dos variedades de *Theobroma* (*Theobroma cacao* L.) de la variedad Trinitaria y (*Theobroma bicolor* Hump & Bonpl). El segundo factor fue la aplicación del pigmento natural de *Justicia spicigera* en tres niveles: 0%, 3% y 6%. Para evaluar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

**Tabla 1. Factores y niveles de estudio.**

Factor A Variedad de Cacao		Factor B Extracto de <i>Justicia spicigera</i>	
a0	Trinitario	<b>b0</b>	0%
		<b>b1</b>	5%
		<b>b2</b>	10%
a1	<i>Theobroma bicolor</i> Hump & Bonpl)	<b>b0</b>	0%
		<b>b1</b>	5%
		<b>b2</b>	10%

### Arreglo de tratamientos

**Tabla 2. Arreglo de los tratamientos.**

Número	Código	Descripción
1	T1 a <sub>0</sub> b <sub>0</sub>	Cacao Trinitario Testigo sin aplicación 0%
2	T2 a <sub>1</sub> b <sub>0</sub>	Cacao Trinitario aplicando pigmentos de <i>Justicia spicigera</i> al 5%
3	T3 a <sub>2</sub> b <sub>0</sub>	Cacao Trinitario aplicando pigmentos de <i>Justicia spicigera</i> al 10%
4	T4 a <sub>0</sub> b <sub>1</sub>	( <i>Theobroma bicolor</i> Hump & Bonpl) Testigo sin aplicación
5	T5 a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	( <i>Theobroma bicolor</i> Hump & Bonpl). aplicando pigmentos de <i>Justicia spicigera</i> al 5%
6	T6 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	( <i>Theobroma bicolor</i> Hump & Bonpl). aplicando pigmentos de <i>Justicia spicigera</i> al 10%

### Tablas de ANDEVA

Para el análisis de varianza (ANDEVA), se utilizó el software libre InfoStat, con el objetivo de comparar las medias obtenidas en los tratamientos. Posteriormente, se aplicó una prueba de rangos múltiples de Tukey con una probabilidad de  $p \leq 0.05$  para determinar las diferencias significativas entre los grupos. La interpretación de los datos experimentales y estadísticos se llevó a cabo siguiendo el esquema de ANDEVA, conforme al diseño experimental planteado.

**Tabla 3. Análisis de varianza de la Investigación.**

F. V		G. I
Tratamiento	axb-1	5
Factor A	(a-1)	1
Factor B	(b-1)	2
Int. AxB	(a-1)(b-1)	2
E. Experimental	axb (r-1)	18
Total	axbxr-1	23

### Modelo Matemático

Ecuación 1. Modelo matemático.

Ecuación 1. Modelo matemático.

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + Q_j + (a \cdot Q)_{ij} + E_{ijk}$$

$\mu$ = Es el efecto de la media.

$a_i$ = Es un efecto de nivel “i-ésimo” del factor A.

$\beta_j$ = Es un efecto del nivel “jota-ésimo” del factor B.

$(a \cdot \beta)_{ij}$ = Es un efecto debido a la interacción del “i-ésimo” nivel del factor A con el “jota-ésimo” nivel del factor B.

$E_{ijk}$ = Es un efecto aleatorio (8).

### Instrumentos de Investigación

#### Análisis Físicoquímicos

**pH:** Medición del nivel de acidez o alcalinidad del cacao y de los productos derivados.

**°Brix:** Determinación del contenido de sólidos solubles, principalmente azúcares, en las muestras de cacao.

**Temperatura:** Registro de la temperatura durante las diferentes etapas del proceso.

**Humedad:** Evaluación del contenido de humedad presente en las almendras de cacao y productos.

#### Análisis organoléptico

**Sabor:** Evaluación sensorial del gusto de los productos elaborados a partir de cacao.

**Color:** Análisis visual del color de las muestras de cacao y productos.

**Olor:** Determinación de las propiedades aromáticas del cacao.

**Aceptabilidad:** Medición de la preferencia y aceptación general de los productos por parte de los panelistas.

**Astringencia:** Evaluación del nivel de astringencia presente en el cacao, relacionado con la sensación bucal.

#### Variables estudiadas

##### Recepción de la materia prima

En la etapa de recepción de las mazorcas de cacao, se llevó a cabo una clasificación

cuidadosa según la variedad: *Theobroma cacao* L. y *Theobroma bicolor* Hump & Bonpl. Las mazorcas fueron cosechadas en la finca "Las Juanas" y sometidas a un proceso de selección para garantizar que estuvieran libres de enfermedades, en particular de Monilla, con el fin de asegurar la calidad óptima de la materia prima para las siguientes etapas de producción.

### **Ejecución de la postcosecha**

La masa fresca de cacao se colocó en una caja micro-fermentadora con una capacidad de 24 celdas, las cuales fueron necesarias para llevar a cabo el presente estudio. Las dimensiones de la caja eran de 125 x 75 x 10 cm, y cada celda tenía una capacidad de 2 kg. Para este experimento, se utilizaron bolsas de polietileno en la mayoría de las celdas, a excepción de los testigos, los cuales fueron fermentados directamente en la caja. En total, se emplearon 48 kg de masa fresca de cacao, distribuidos de acuerdo al diseño de los tratamientos. La fase de fermentación se llevó a cabo durante 4 días para ambas variedades de cacao. Las variables para estudiar fueron: temperatura, grados Brix y pH.

### **Extracción de los granos de cacao**

Una vez que se obtuvieron las mazorcas necesarias, se procedió a realizar el proceso de despulpado, que implica separar el grano de cacao de la parte carnosa "Placenta" que lo rodea el fruto. Posteriormente se realizó un corte longitudinal o transversal para la extracción de las almendras de cacao. A la vez despulpadas las almendras de cacao se separaron en tachos limpios. Las cuales se colocaron en las celdas de las micro fermentadoras que cada celda puede abastecer hasta 2 kg de masa fresca de cacao.

### **pH**

Durante el proceso de fermentación, se midió la variable pH utilizando 10 gramos de almendras de cacao. Las almendras fueron trituradas y mezcladas con 10 ml de agua destilada. Para la medición del pH se utilizó un potenciómetro, siguiendo el método descrito por Abreu et al. (2017).

### **Grados Brix**

Para la medición de esta variable se necesitó un Brixometro, se procedió a tomar 10 g de almendras de cacao al azar posteriormente se maceró en 10 mL de agua destilada tibia, se debe colocar de 1 - 3 gotas de la solución obtenida, el equipo con marca OPTi+ antes de la aplicación de las gotas de la muestra se calibro dejándolo en 0.00, para asegurar la toma correcta de la muestra de los diferentes tratamientos y sus repeticiones (9).

### **Temperatura**

La toma de temperatura es vital para que exista una actividad fermentativa adecuada lo cual se controló que no sea superior a 50 °C ni estar por debajo del valor de 45 °C, para su medición se requirió de un termómetro para la toma de esta variable (10).

### **Secado de las almendras**

Los granos de cacao fermentados se secaron al sol de manera directa durante 6 días sobre una superficie de madera. Posteriormente, se procedió con el descascarillado, logrando que los granos de cacao alcanzaran un contenido de humedad promedio del 7%.

### **Almacenamiento de los granos**

El almacenamiento de las almendras de cacao se realizó en bolsas de papel en un ambiente fresco, libre de exceso de humedad, para preservar su calidad.

### **Determinación de la capacidad antioxidante de las muestras de cacao**

Método ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico))

El método ABTS se basa en la capacidad de los antioxidantes presentes en las muestras de cacao para reducir el radical catiónico ABTS<sup>+</sup>. El procedimiento incluye los siguientes pasos:

**Preparación del radical ABTS<sup>+</sup>:** Se generó mediante la reacción del ABTS con persulfato de potasio. La mezcla se dejó reposar durante 12-16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente para la estabilización del radical.

**Medición de la capacidad antioxidante:** Se diluyó la solución de ABTS<sup>+</sup> con etanol o agua hasta obtener una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 734 nm. Posteriormente, se mezclaron 1 ml de la solución de cacao con 2 ml de la solución ABTS<sup>+</sup>.

**Lectura:** Después de 6 minutos de reacción, se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en unidades de capacidad antioxidante equivalentes a Trolox (TEAC).

### **Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)**

El método DPPH mide la capacidad antioxidante de las muestras a través de la reducción del radical DPPH, que cambia de color púrpura a amarillo cuando se neutraliza por un antioxidante.

**Preparación del radical DPPH:** Se preparó una solución de DPPH disolviendo el reactivo en metanol hasta obtener una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 517 nm.

**Medición de la capacidad antioxidante:** Se mezclaron 1 ml de la solución de cacao con 3 ml de la solución DPPH.

**Lectura:** Después de 30 minutos de incubación en la oscuridad a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 517 nm. Los resultados también se expresaron en unidades equivalentes de Trolox (TEAC).



**Tabla 1. Formulación A al 95% de Theobroma (*Theobroma bicolor* Hump & Bonpl).**

Ingrediente	Cantidad (gr)	%
Cacao	1000g	95%
Pigmento	50g	5%

**Tabla 2. Formulación B al 90% de Theobroma (*Theobroma bicolor* Hump & Bonpl).**

Ingrediente	Cantidad (g)	%
Cacao	1000g	90%
Extracto	100g	10%

**Tabla 3. Formulación A al 95% de Theobroma Variedad Trinitario.**

Ingrediente	Cantidad (g)	%
Cacao	1000g	95%
Extracto	50g	5%

**Tabla 4. Formulación B al 90% de cacao *Theobroma cacao* L.**

Ingrediente	Cantidad (g)	%
Cacao	1000g	90%
Extracto	100g	10%

## RESULTADOS

### Variables temperaturas

En la Tabla 8 se presentan las temperaturas registradas en las almendras de *Theobroma cacao* y *Theobroma bicolor* durante los 6 días de fermentación. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en las temperaturas del primer y cuarto día, en comparación con los otros días de fermentación, donde no se encontraron diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). En el primer día, *Theobroma bicolor* presentó una temperatura más alta en comparación con *Theobroma cacao* L., mostrando un incremento gradual de la temperatura a lo largo del proceso sin exceder los 50°C. La temperatura más alta alcanzada fue en *Theobroma cacao*.

**Tabla 8. Temperatura en la etapa fermentativa del (*Theobroma cacao* y *Theobroma bicolor*).**

**Variable de temperaturas**

Factor		Variable					
Variedad	Pigmentos de Justicia	Temp1	Temp2	Temp3	Temp4	Temp5	Temp6
Cacao Trinitario	0	23,33	33,66	35,66	37,33	39,00	42,33
Cacao Trinitario	5	21,50	35,66	38,66	41,00	43,33	46,33
Cacao Trinitario	10	21,00	36,33	39,00	42,66	45,00	48,66
<i>Theobroma bicolor</i>	0	25,00	33,66	36,33	37,00	38,66	43,00
<i>Theobroma bicolor</i>	5	25,56	35,33	38,33	40,66	43,66	47,33
<i>Theobroma bicolor</i>	10	25,33	35,66	38,00	42,00	44,33	48,66
	<b>EEM ±</b>	0,30	0,19	0,16	0,14	0,16	0,29
<b>Probabilidad</b>	<b>Variedad</b>	<0,0001 *	0,2442	0,3370	0,0395 *	0,3370	0,2062
	<b>Pigmento de Justicia</b>	0,7290	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *
	<b>Variedad*Extracto de Justicia</b>	0,8183	0,6186	0,0302 *	0,7230	0,2153	0,6186
	<b>CV</b>	3,91	1,65	1,25	1,02	1,11	1,91

En la (Tabla N°9) se muestra que existe un incremento de manera ascendente lineal creciente, lo cual en la temperatura inicial (Temp0) presentó diferencia estadística significativa según la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) el cacao Nacional su temperatura fue mayor; en (Temp1) tuvo un comportamiento significativo en cuestión a mayor inducción de extracto de Pigmentos de Justicia, de manera que en (Temp2) mantuvo la misma instancia por el uso del extracto en cacao Trinitario una temperatura mayor; no obstante los dos últimos días de estudio (Temp4 y Temp5) hubo una diferencia estadística altamente significativa por el uso del pigmento a mayor aplicación del 4.0% en cacao Trinitario en la etapa postcosecha.

Tabla 9. Efecto de la interacción de pigmentos *Justicia Spicigera* en los aspectos sobre las variables temperatura.

Variedad	Factor	Variable					
	Pigmento de <i>Justicia Spicigera</i>	Temp0	Temp1	Temp2	Temp3	Temp4	Temp5
Cacao Trinitario	0	32,38	33,40	34,56	36,30	38,00	40,33
Cacao Trinitario	5	32,53	34,63	37,56	40,00	42,31	46,33
Cacao Trinitario	10	30,19	35,43	38,00	40,66	44,00	46,66
<i>Theobroma bicolor</i>	0	28,24	32,65	35,33	36,00	37,62	40,33
<i>Theobroma bicolor</i>	5	28,37	34,30	37,32	39,64	42,64	46,33
<i>Theobroma bicolor</i>	10	28,48	34,31	37,00	41,00	43,30	46,00
	EEM ±	0,16	0,17	0,17	0,16	0,17	0,20
Probabilidad	Variedad <i>Theobroma</i>	<0,0001 *	0,1290	0,3372	0,0398 *	0,3490	0,7350
	Pigmento de <i>Justicia Spicigera</i>	0,6590	0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *
	Variedad <i>Theobroma</i> *Pigmento de <i>Justicia Spicigera</i>	0,4747	0,4444	0,0200 *	0,8230	0,2165	0,0040 *
	CV	1,48	1,77	1,36	1,15	1,17	1,55

## Grados Brix

En la Tabla 10, se muestran los valores obtenidos de sólidos solubles durante el proceso fermentativo de las almendras de *Theobroma cacao* variedad Trinitario y *Theobroma bicolor*. Esta variable fue crucial en el análisis durante los días de estudio, donde se registraron diferencias estadísticas significativas en los días 3 y 4, según la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ ). No obstante, en los otros días no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

En el inicio del estudio, la variedad Trinitario mostró un mayor dulzor en comparación con *Theobroma bicolor*. Sin embargo, al finalizar el estudio, *Theobroma bicolor* presentó un nivel de dulzor superior al de la variedad Trinitario. Respecto al efecto del pigmento de

*Justicia spicigera*, se identificaron diferencias significativas en los días 2 y 3, mientras que en los días restantes no se evidenciaron diferencias significativas en el comportamiento de los sólidos solubles.

**Tabla 10. Efecto de la interacción de pigmentos de *Justicia Spicigera* en los aspectos sobre las variables sólidos solubles.**

Variedad	Pigmentos de <i>Justicia Spicigera</i>	Variable					
		Brix0	Brix1	Brix2	Brix3	Brix4	Brix5
Cacao Trinitario	0	29,50	23,66	19,30	16,30	15,00	12,57
Cacao Trinitario	5	29,83	19,33	17,33	13,00	12,00	10,00
Cacao Trinitario	10	29,66	19,33	15,66	12,23	10,00	5,00
<i>Theobroma bicolor</i>	0	37,25	23,33	20,00	15,28	13,00	11,23
<i>Theobroma bicolor</i>	5	37,46	20,66	18,00	13,24	11,66	8,56
<i>Theobroma bicolor</i>	10	37,46	17,66	16,66	10,59	9,00	6,56
	EEM ±	0,22	0,20	0,24	0,17	0,17	0,27
Probabilidad	Variedad <i>Theobroma</i>	<0,0001 *	0,5902	0,1113 *	0,01894 *	0,0002 *	0,4014
	Pigmento de <i>Justicia Spicigera</i>	0,3022	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *
	Variedad <i>Theobroma</i> *Pigmento de <i>Justicia Spicigera</i>	0,3361	0,0120 *	0,7522	0,0056 *	0,0201 *	0,0155 *
	CV	1,62	2,58	2,30	2,62	2,68	7,34

## pH

Como se observa en la Tabla 11, los valores promedio de pH de las almendras de cacao Mocambo (*Theobroma bicolor* Hump & Bonpl. L.) y *Theobroma cacao* L. variedad de cacao durante los días de fermentación mostraron diferencias estadísticas significativas. En el primer día de evaluación, el pH inicial fue mayor en *Theobroma cacao* L., según la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en el último día del estudio, se presentó un escenario diferente, donde *Theobroma bicolor* mostró un pH mayor que *Theobroma cacao* L., indicando una variación en el comportamiento de ambas variedades durante el proceso fermentativo.

Tabla 11. Efecto de la interacción del pigmento de Justicia Spicigera en los aspectos sobre las variables de pH en el periodo fermentativo.

Variedad	Pigmento de Justicia Spicigera	Variable					
		pH0	pH1	pH2	pH3	pH4	pH5
Trinitario	0	3,29	4,13	4,20	4,46	4,56	4,90
Trinitario	5	3,79	4,18	4,22	4,45	4,55	4,95
Trinitario	10	3,78	4,10	4,23	4,40	4,48	5,45
Theobroma bicolor	0	3,82	4,12	4,24	4,43	4,53	5,16
Theobroma bicolor	5	3,64	4,16	4,22	4,42	4,54	5,41
Theobroma bicolor	10	3,55	4,13	4,25	4,45	4,62	5,47
	EEM ±	0,02	0,01	0,0024	0,02	0,02	0,02
Probabilidad	Variedad	0,0001*	0,9495	0,05332	0,4562	0,2352	<0,0001*
	Pigmento de Justicia Spicigera	0,0672	0,0447	<0,0001*	0,4532	0,8233	<0,0001*
	Variedad*Pigmento de Justicia	0,0048	0,4124	0,6212	0,3252	0,0551	0,0002
	CV	1,78	0,67	0,16	1,60	1,37	1,20

### Variables físicas (prueba de corte)

Según el análisis estadístico presentado en la Tabla 12, se observó una diferencia estadística significativa en la variable de Índice de mazorca, de acuerdo con la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ ). La variedad *Theobroma cacao* L. mostró un valor más alto en comparación con *Theobroma bicolor*. De manera similar, en el Índice de semilla, se evidenció una diferencia estadística significativa, también de acuerdo con Tukey ( $p < 0.05$ ), donde *Theobroma bicolor* presentó el valor más alto. En contraste, las otras variables no mostraron diferencias estadísticas significativas en su comportamiento.

### Análisis sensorial

En la Tabla 12, los resultados de la evaluación sensorial realizada por 25 catadores seminternados mostraron diferencias estadísticas significativas en características como aroma, amargor, sabor a cacao, nuez, frutos secos, floral e intensidad, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), según la variedad de cacao. Otras variables no presentaron diferencias significativas.

La adición de extracto de Justicia spicigera fue bien recibida por los catadores, mostrando diferencias significativas en todas las variables sensoriales evaluadas. Además, la interacción entre las variedades de cacao y el extracto también presentó un

comportamiento significativo en la mayoría de las variables, excepto en el amargor, donde no se detectó una diferencia relevante. En general, la adición del extracto mejoró las propiedades sensoriales del producto.

**Tabla 12. Efecto de la interacción del pigmento de Justicia Spicigera en los aspectos sobre las variables sensoriales.**

Factor		Variable								
Variedad	Extracto de Justicia	Aroma	Acidez	Amargor	Cacao	Nuez	FrutosSecos	Floral	Intensidad	Color
Trinitario	0	3,15	0,57	2,32	3,72	3,04	2,88	4,00	4,00	3,72
Trinitario	5	2,45	0,03	2,34	3,40	3,12	2,92	4,00	4,00	3,64
Trinitario	10	4,00	0,00	3,92	3,84	3,00	1,84	4,00	4,00	3,80
<i>Theobroma bicolor</i>	0	3,68	0,00	3,56	4,92	4,72	3,20	3,88	3,28	4,44
<i>Theobroma bicolor</i>	5	4,00	0,06	3,84	4,88	4,00	3,48	3,52	4,00	4,72
<i>Theobroma bicolor</i>	10	5,00	0,28	4,92	3,60	4,92	5,00	4,40	3,20	5,00
<b>EEM ±</b>		0,03	0,03	0,04	0,04	0,02	0,04	0,03	0,02	0,05
<b>Probabilidad</b>	<b>Variedad</b>	<0,0001 *	0,3496	0,2684	0,0147 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	>0,9999
	<b>Pigmentos de Justicia</b>	<0,0001 *	0,0079 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	0,0057 *
	<b>Variedad*Pigmentos</b>	0,0002 *	<0,0001 *	0,2941	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	0,0472 *
	<b>CV</b>	6,52	120,50	10,64	10,26	5,47	10,44	6,39	6,83	11,60

En la Tabla 13 se describen los resultados de la capacidad antioxidante de las almendras de *Theobroma cacao* L. y *Theobroma bicolor* mediante la aplicación de extracto de *Justicia spicigera*. Según la evaluación de la capacidad antioxidante utilizando el método ABTS, la adición de este extracto en diferentes dosis durante el refinado (0%, 5% y 10%) permitió mejorar significativamente la capacidad de neutralización de radicales libres presentes en la muestra, alcanzando valores de 245.50 y 180.20  $\mu\text{mol}$  Equivalente a Trolox/g de cacao en "Chocolate" para las variedades *Theobroma cacao* L. y *Theobroma bicolor*, respectivamente.

Por otro lado, la capacidad antioxidante medida mediante el método DPPH mostró una diferencia estadísticamente significativa, según la prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ ) entre las dos variedades de *Theobroma* y los tratamientos aplicados. El tratamiento con la adición de un 10% de extracto de *Justicia spicigera* en el refinado del chocolate de *Theobroma cacao* L. fue estadísticamente superior, alcanzando un promedio de 30.25  $\mu\text{mol}$  Equivalente a Trolox/g de cacao. Este valor fue proporcional al contenido fenólico reportado para el mismo tratamiento, lo que confirma la efectividad de la adición del extracto en la mejora de las propiedades antioxidantes del producto final.

## Capacidad antioxidante de los tratamientos de estudio

*Tabla 13. Capacidad antioxidante de los tratamientos de estudio.*

Factor		Variables			
Variedad	Pigmentos de <i>Justicia Spicigera</i>	(ABTS) $\mu\text{mol}$ Equivalente a Trolox / g de cacao		(DPPH) $\mu\text{mol}$ Equivalente a Trolox / g de cacao	
Trinitario	0	185,30		15,50	
Trinitario	5	195,80		28,60	
Trinitario	10	245,50		30,25	
<i>Theobroma bicolor</i>	0	180,20		14,20	
<i>Theobroma bicolor</i>	5	165,70		25,10	
<i>Theobroma bicolor</i>	10	170,85		29,50	
EEM $\pm$		6,10			
Probabilidad	Variedad	<0,0001	*	<0,0001	*
	Extracto de Justicia	<0,0001	*	<0,0001	*
	Variedad*Métodos de fermentación	0,0001	*	<0,0001	*
	CV	14,29		2,61	



## DISCUSIÓN

Según (11), sugiere que el aumento de la temperatura debe ser gradual para garantizar la realización de los procesos químicos y la inactivación del embrión de cacao. Es crucial mantener una temperatura adecuada que no exceda los 50°C, ya que temperaturas más elevadas podrían afectar la calidad del grano de cacao y dar lugar a una "sobre fermentación" en el licor. Por otro lado, temperaturas por debajo de 40°C no cumplirían con los requisitos necesarios para lograr una fermentación apropiada, lo que podría afectar negativamente los parámetros de calidad. En relevancia según (7) en su investigación en cacao Nacional en cajas microofermentadoras Rohan que una temperatura inicial adecuada es 28°C por lo tanto no debe ser superior a 50°C, guardando relación con la presente investigación.

(12) En la fase de postcosecha, se observa una disminución progresiva de los sólidos solubles (°Brix) con el tiempo. Esto se atribuye a la actividad de los microorganismos durante la fermentación, ya que consumen los azúcares, contribuyendo así a mantener un proceso de fermentación apropiado y preservar la calidad de la almendra de cacao. Los autores (13) en su estudio indican que un pH adecuado debe estar en un rango inicia de 3.0 y llegar a 5,5 para que se desarrolle los precursores de sabores.

(13) indica que las cajas micro fermentadores en cajas de maderas blancas tipo Rohan permite al desarrollo de precursores de aroma, lo que evita que se contamine los granos de cacao, (14) al realizar su investigación en la fermentación de cacao en cajas de madera blancas encontró que en la evaluación de las propiedades sensoriales del licor de cacao elaborado artesanalmente los cuales encontraron los valores a cacao los cuales son similares al presente estudio y a su vez a desarrollar notas sensoriales adecuadas, además el color marrón se debe al proceso oxidativo.

Según (15) el tipo de fermentación aplicado en la postcosecha de las almendras de cacao determinará la calidad sensorial desarrollando aroma, sabor, color resultante del licor de cacao, empezando por una fermentación microbiológica donde tiene una activad de transformación de procesos químicos para obtener un licor de cacao.

Con respecto a lo encontrado por (16), en los estudios elaborados asegura que los valores tienden a variar por las condiciones ambientales o la influencia del secado lo cual puede quedar atrapados una mayor cantidad de ácidos volátiles.

La investigación realizada por (17) al evaluar el efecto del procesamiento de cacao negro en el contenido y actividad antioxidantes de compuestos fenólicos, obtuvieron como resultado que chocolate negro tuvieron el mayor contenido (112,39mg GAE/g muestra seca); en comparación del estudio realizado por (18) desarrollo de chocolate oscuro con nibs de cacao fermentado y no fermentado: polifenoles totales, antocianinas , capacidad antioxidante y evaluación sensorial al efectuar una comparación de la capacidad antioxidante de un chocolate amargo con nibs fermentados y no fermentados obtuvo como resultados una mayor capacidad antioxidante

mediante la utilización del método de ABTS comparados con el método de DPPH, describiendo una mayor capacidad en el cacao sin nibs con 0,075 mg/ml con nibs fermentados un promedio de 0.072 mg/ml.

La capacidad antioxidante está asociada a la presencia de compuestos fenólicos que ejercen su acción a través del rompimiento de la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno y estos antioxidantes reaccionan con los radicales utilizados como estándar

## CONCLUSIONES

La presente investigación se inició con el objetivo la utilización de pigmentos de (*Justicia spicigera*) en chocolate con dos variedades de theobroma: theobroma bicolor y theobroma cacao de la variedad trinitario, con el fin de determinar la aceptabilidad del producto final, esto se observó en el panel de catadores entrenados, donde la variedad que mostró mayor aceptabilidad fue aquella que incluía un 10% de pigmentos de *Justicia spicigera*. La utilización de este extracto, una materia prima poco común en la industria chocolatera resultó ser factible.

Los resultados de la comparación de la capacidad antioxidante entre los diferentes tratamientos mostraron una mejora significativa en los granos fermentados en sacos. Los valores obtenidos mediante el método ABTS alcanzaron los 245.50  $\mu\text{mol}$  Equivalente a Trolox/g de cacao (con la adición del 10% de extracto de *Justicia spicigera*), mientras que el método DPPH mostró una superioridad en el tratamiento que incluyó un 10% del extracto, con un total de 30.25  $\mu\text{mol}$  Equivalente a Trolox/g de cacao. Los análisis físicos entre las dos variedades de *Theobroma* fueron relativamente similares, lo que refuerza el potencial de aprovechar ambas variedades para la elaboración de productos no tradicionales y funcionales.

Se recomienda realizar nuevas investigaciones enfocadas en analizar el perfil nutricional del licor de cacao, considerando su inclusión en la dieta humana. Además, sería relevante explorar el uso de microorganismos eficientes o extractos de frutas, junto con la adición de *Justicia spicigera* en etapas como el conchado, para evaluar tanto los aspectos químicos como las propiedades organolépticas de los productos finales. Esto podría abrir nuevas oportunidades en la creación de productos alimenticios más saludables y atractivos para el mercado.

## CONTRIBUCIONES DE AUTOR

Conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, supervisión, validación, redacción -borrador original, redacción -revisión y edición: Vásquez-Cortez, L. H\*., Rodríguez-Cevallos S. L, Villamarín-Barreiro J. Á, Jaime-Fabián V. C.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios Padre y al equipo de investigación, este proyecto se ejecutado a partir del Proyecto Salvemos al Cacao *Theobroma bicolor* y mitigación de cadmio y mejoramiento de Postcosecha.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Souza P, Moreira L, Sarmento D, Costa F. Cacao—Theobroma cacao. Exot Fruits. 2018;9(2):69–76.
2. Llerena W, Samaniego I, Vallejo C, Arreaga A, Zhunio B, Coronel Z, et al. Profile of Bioactive Components of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) By-Products from Ecuador and Evaluation of Their Antioxidant Activity. Foods. 2023;12(13):1–18.
3. Abad A, Acuña C, Naranjo E. El cacao en la costa ecuatoriana: estudio de su dimensión cultural y económica. Estud la gestión Rev Int Adm. 2020;7:59–83.
4. Saravia S, Rodríguez A, Saravia J. Determinants of certified organic cocoa production: evidence from the province of Guayas, Ecuador. Org Agric. 2019;10:23–34.
5. Tennhardt L, Lazzarini G, Weissshaidinger R, Schader C. Do environmentally-friendly cocoa farms yield social and economic co-benefits? Ecol Econ. 2022;197(107428):1–38.
6. Perea JA, Cadena-Cala T, Herrera-Ardila J. Artículos Originales El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento The cocoa and its products as antioxidant source: Processing effect. 2019;
7. Vásquez L, Vera J, Erazo C, Intriago F. Induction of rhizobium japonicum in the fermentative mass of two varieties of cacao ( *Theobroma Cacao* L .) as a strategy for the decrease of cadmium. Int J od Heal Sci. 2022;6(3):11354–71.
8. Vera F, Vera J. Resumen de principios de diseños experimentales. 1st ed. Compás G, editor. Guayaquil Ecuador; 2018.
9. Abreu G, Araujo Q, Valle R. Influencia de factores agroambientales sobre la calidad del clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) PH-16 en la región cacaotera de Bahia, Brasil. Ecosistemas y Recur Agropecu. 2017;4(12):1–18.
10. Morales W, Vallejo C, Sinche P, Torres Y, Vera J, Anzules E. Mejoramiento de las características físico-químicas y sensoriales del cacao CCN51 a través de la adición de una enzima y levadura durante el proceso de fermentación. Rev Amaz Cienc y Tecnol. 2012;5(2):169–81.
11. Vera J, Benavides J, Vásquez L, Alvarado K, Reyes J, Intriago F, et al. Effects of two fermentative methods on cacao (*Theobroma cacao* L.) Trinitario, induced with *Rhizobium japonicum* to reduce cadmium. Rev Colomb Investig Agroindustriales. 2023;10(1):95–106.
12. Intriago F, Vera J, Vásquez L, Alvarado K. Inducción anaeróbica de *Bradyrhizobium japonicum* en la postcosecha de híbridos experimentales de cacao y su mejoramiento en la calidad fermentativa. J Sci Res UTB. 2022;7(2):19–23.
13. Alvarado K, Vera J, Tuarez D, Intriago F. Fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) con adición de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y enzima (PPO's) en la disminución de metales pesados. Centrosur. 2022;2014:1–24.

14. Erazo C, Bravo K, Tuárez D, Fernández Á, Torres Y, Vera J. 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. *Rev Investig Talent*. 2021;8(2):42–55.
15. Vásquez L, Vera J, Alvarado K, Ochoa K, Intriago F, Naga M, et al. Calidad sensorial de cuatro cruces experimentales de cacao adicionando pasta de frutas deshidratadas. *Rev Multidisciplinaria Desarro Agropecu Tecnológico, Empres y Humanista [Internet]*. 2023;5(1):1–9. Available from: <https://dateh.es/index.php/main/article/view/112>
16. Bravo K, Tuárez D. Micro fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) en cajas de madera no convencionales: impacto en la calidad del licor. 1st ed. Zambrano C, editor. Vol. 1. Quevedo-Ecuador: Universidad Técnica de Manabí; 2023.
17. Santacruz S, Mantuano A. Efecto del procesamiento de cacao en el contenido y actividad antioxidantes de compuestos fenólicos. *Espamciencia*. 2021;12(1):41–5.
18. Delgado J, Mandujano J, Reátegui D, Ordoñez E. Desarrollo de chocolate oscuro con nibs de cacao fermentado y no fermentado: polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante y evaluación sensorial. *Sci Agropecu*. 2018;9(4):543–50.