

MEJORAMIENTO Y HOMOLOGACIÓN DE LOS PROCESOS Y PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN, VALIDACIÓN Y PRODUCCIÓN DE SERVICIOS EN CACAO Y CAFÉ

Estación Experimental Tropical Pichilingue
Programa Nacional Cacao y Café
Publicación Miscelánea No. 433



Rey Loor Solórzano, PH.D.
Teresa Casanova Mendoza, Mgs.
Luis Plaza Avellán, Ing. Agr

Estación Experimental Tropical Pichilingue

Protocolo 6

Calidad integral del grano y derivados

Jiménez, J.¹; Rodríguez, G.¹; Saltos, R.¹; Brito, B.²; Espín, H.²; Samaniego, I.²

6.1. Análisis físico

a. Contenido de humedad en la almendra seca

Es el porcentaje de humedad que se encuentra en las almendras de cacao después del secado. La medición se realiza utilizando un determinador de humedad (Foto 29a). Las almendras están listas para el almacenamiento cuando éstas tengan una humedad inferior al 7% (Foto 29b).

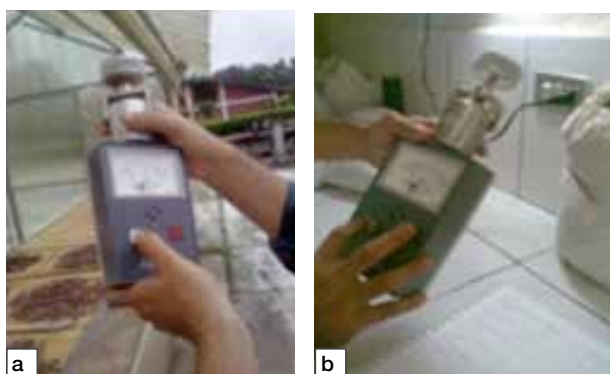


Foto 29. Determinación del contenido de humedad de las almendras de cacao.

b. Porcentaje de fermentación

Es el grado de fermentación que adquirieron las almendras durante el beneficio. Una forma de evaluar el porcentaje de fermentación es mediante la técnica de la prueba de corte en 100 almendras tomadas al azar; las mismas se pesarán y posteriormente se realizará el corte longitudinal. Según las características físicas internas del grano se determinará el porcentaje de fermentación (Foto 30). En este mismo proceso, se realizará la clasificación y conteo (basados en la Norma INEN 176), de acuerdo al siguiente detalle:



Foto 30. Clasificación de almendras fermentadas.

c. Porcentaje de cascarilla o Testa (%)

Es el contenido de cascarilla que posee la almendra de cacao una vez seca. Para determinar este porcentaje se pesarán 30 g de almendras (Foto 31a), se sacará la cascarilla (Foto 31b) y se pesará por separado los cotiledones y la cascarilla. La diferencia se dividirá para el peso de las almendras completas y se multiplicará por 100. Los rangos de referencia comercial son: mínimo 10% y máximo 15%.



Foto 31. Pesaje (a) y sacado de cascarilla de almendras de cacao (b).

1 Programa Nacional Cacao y Café EE-Tropical Pichilingue
2 Departamento de Nutrición y Calidad EE-Santa Catalina



Fórmula:

$$\% \text{ Cascarilla} = \frac{P1-P2}{P1} \times 100$$

P1 = Peso de las almendras

P2 = Peso de los cotiledones sin cascarilla

d. Índice de frecuencia del peso de las almendras

Se pesan individualmente 300 almendras para clasificarlas de acuerdo al peso y tamaño y ubicarlas dentro de las categorías de exportación para el cacao Nacional. Referencia Norma INEN 176 (Foto 32). La variedad CCN 51 no se clasifica.

ASE R = 1,0 – 1,19 g

ASS R = 1,20 – 1,29 g

ASSS R = 1,30 g.....



Foto 32. Pesaje de almendras de cacao.

e. pH del cotiledón

Es el valor de la acidez residual del cacao. Su evaluación se realizará en los cotiledones transformados en cacao en polvo, para lo cual se toma 10 g, se mezcla con agua destilada en proporciones de 10 a 1 (Foto 33a). De la solución se toman 10 ml. Las lecturas se realizan con un potenciómetro (Foto 33b).

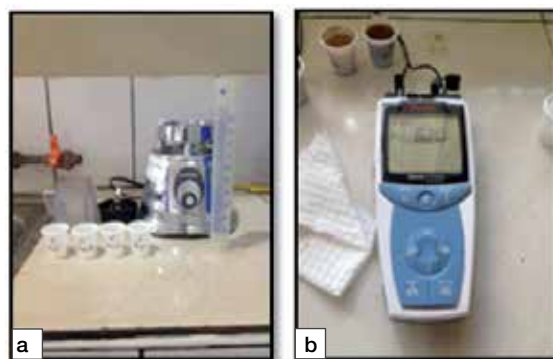


Foto 33. Determinación del pH del cotiledón.

BIBLIOGRAFÍA

- Amores, F.; Palacios, A.; Jiménez, J.; Zhang, D. 2009. Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el Nororiente de la provincia de Esmeraldas. Boletín Técnico No. 135. Quevedo, Ecuador. INIAP. Estación Experimental Tropical Pichilingue. 50 p.
- INEN. 2006. Cacao en grano. Requisitos. Técnica Ecuatoriana (NTE) 176. Cuarta revisión. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Norma. Quito, Ecuador. 1-3 p.
- Jiménez, J.; Amores, F.; Solórzano, E. 2014. Componentes de identidad para reconocer las diferencias del cacao que se produce en varias regiones del Ecuador. Boletín Técnico No. 164. Quevedo, Ecuador. INIAP. Estación Experimental Tropical Pichilingue. 12-20 p.

6.2. Análisis químico

1. Polifenoles

a. Principio del método

Los polifenoles totales del polvo de cacao son extraídos con una solución acuosa de metanol al 70%, mediante agitación magnética continua por 45 minutos. El extracto obtenido se filtra, se toma una alícuota del mismo y se realiza una reacción colorimétrica con el reactivo de

Folin & Ciocalteu, obteniendo una coloración azul, la misma que es cuantificada en un Espectrofotómetro UV-VIS, a una longitud de onda de 760 nm.

b. Reactivos

- Metanol grado reactivo al 99.5 %.
- Estándar Ácido Gálico Monohidratado 97,5 – 102,5%
- Reactivo de Folin & Ciocalteu,
- Carbonato de Sodio 99.5%,
- Agua destilada.
- Éter de Petróleo (Rango de ebullición de 40 –60 °C)

c. Preparación de reactivos

- Solución carbonato de Sodio al 20%: Transferir cuantitativamente 20 g de Carbonato de Sodio en un balón volumétrico de 100mL, disolver y completar a volumen con agua bidestilada.
- Solución Acuosa de Metanol: Transferir cuantitativamente 700 mL de metanol en un balón volumétrico de 1000 mL, completar a volumen con agua bidestilada. (densidad de la solución 0.872 g/mL)
- Solución Estándar Primario de Ácido Gálico (200 ppm): Transferir cuantitativamente 0.020 g de ácido gálico, en un balón volumétrico de 100 mL, disolver y completar a volumen con agua destilada.
- Soluciones Estándar para curva de calibración: A partir de la solución estándar primario de 200 ppm, se realiza la curva de calibración desde 5 a 140 ppm mediante diluciones.

d. Procedimiento

Extracción de la muestra

- En un Erlenmeyer de 125 mL se pesa 1 g de muestra desengrasada.

- Se adiciona 75 mL de solución acuosa de metanol al 70% y se coloca en un agitador magnético.
- Se lleva la muestra a la plancha de agitación y se agita por 45 minutos a temperatura ambiente.
- Se filtra el extracto a través de papel Whatman N° 4, en un balón volumétrico de 100 mL, se lava el filtrado y se afora con solución acuosa de metanol al 70%.

Cuantificación en el Espectrofotómetro UV-VISIBLE

- Transferir cuantitativamente 1 mL del extracto a un tubo de ensayo, añadir 9 mL de agua destilada (dilución A).
- Tomar 1 mL de la dilución A, añadir 6 mL de agua destilada y 1 mL de reactivo de Folin & Ciocalteu, luego de tres minutos añadir 2 mL de la solución de Carbonato de Sodio al 20%, inmediatamente agitar en vortex y calentar en baño maría a 40°C por 2 minutos (este procedimiento se realiza tanto para las muestras como para los estándares).
- Pasar la solución a una cubeta de vidrio y cuantificar en el Espectrofotómetro UV-VIS bajo las siguientes condiciones:
 - Longitud de Onda: 760 nm.
 - Temperatura: ambiente
 - Slit: 0.2 nm

e. Cálculos y expresión de los resultados

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{mg}{g} \text{ Acido Gálico} = \frac{a*b*d*f}{P}$$

Donde:

a = Concentración de ácido gálico obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L)
b = Volumen total de extracto (100 mL)



d = Factor de dilución (10)
f = Factor para transformar unidades (f = 0.001)
p = Peso de la muestra (g)

2. Determinación de alcaloides

a. Principio del método

El polvo de cacao es desengrasado mediante extracción soxhlet por doce horas con éter de petróleo; los alcaloides de cacao, Teobromina y Cafeína, son extraídos del polvo de cacao desengrasado con agua bidestilada en ebullición; el extracto obtenido es filtrado en un balón volumétrico y se afora con agua bidestilada a 100 mL; una alícuota del extracto se pasa por membrana Millipore de 0,22 μm y es analizado por HPLC, utilizando columna cromatográfica ODS II, con detector UV - VIS (273 nm).

b. Reactivos

- Agua bidestilada
- Metanol grado HPLC
- Cafeína Anhidra 99.9 %
- Teobromina Anhidra 99.9 %
- Teofilina Anhidra 99.9 %
- Éter de Petróleo (rango de ebullición de 40 a 60 °C)

c. Preparación de reactivos

- Solución Estándar Interno: Transferir cuantitativamente 100 mg de teofilina al 99.9 %, en un balón volumétrico de 200mL, completar a volumen con agua bidestilada.
- Solución Estándar Madre: Transferir cuantitativamente 20 mg de cafeína anhidra al 99.9 % y 20 mg de teobromina al 99,9%, en un balón volumétrico de 200 mL y completar a volumen con agua bidestilada.
- Solución Estándar 100 ppm: Transferir cuantitativamente 10 mg de cafeína anhidra al 99.9 % y 10 mg de teobromina al 99,9%, en un balón volumétrico de 100 mL, añadir

10 mL de estándar interno y completar a volumen con agua bidestilada.

- Solución Carrez 1: Transferir cuantitativamente 15 g de hexacianoferrato de potasio trihidratado en un balón volumétrico de 100 mL y completar a volumen con agua bidestilada.
- Solución Carrez 2: Transferir cuantitativamente 30g de sulfato de zinc dihidratado en un balón volumétrico de 100 mL, y completar a volumen con agua bidestilada.
- Solución Fase Móvil; Metanol: Agua. 25:75 (v/v). Mezclar 250 mL de Metanol grado HPLC + 750 ml de agua. Homogenizar y filtrar a través de membrana millipore de 0,22 μm , desgasificar la solución en un baño ultrasonido por 10 minutos.
- Soluciones Estándar para curva de calibración: A partir de la solución estándar madre se realiza la curva de 5 a 100 ppm.

d. Procedimiento

Extracción de la Muestra.

- En un Erlenmeyer de 250 mL se pesa 0.3 g de muestra desengrasada.
- Se adiciona 90 mL de agua bidestilada y 10 mL de estándar interno.
- Se conduce la muestra a la plancha de calentamiento y se hierve por 30 minutos aproximadamente hasta que el volumen se reduzca a la mitad (50 mL).
- Inmediatamente después de sacar el Erlenmeyer con el extracto de la plancha de calentamiento, se añade 1 mL de solución Carrez 1 y Carrez 2.
- Se filtra el extracto a través de papel Whatman N° 4 en un balón volumétrico de 100 mL, se lava el filtrado y se afora con agua bidestilada.
- Se toma una alícuota del filtrado, se pasa por membrana millipore de 0,22 μm y se coloca en un vial para inyección en HPLC.

- El extracto restante se tapa y almacena en refrigeración.

Quantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

- Se inyecta 20 µL en el HPLC bajo las siguientes condiciones:
 - Columna: STR ODS II; 150 mm x 4,6 mm ID.
 - Temperatura de Columna: ambiente
 - Detector UV-VIS: Longitud de Onda 273 nm
 - Fase móvil: Metanol:agua (25:75 v/v)
 - Flujo: 1mL /minuto
 - Volumen de Inyección: 20 µL
 - Tiempo de Cromatografía 15 minutos

e. Cálculos y expresión de los resultados

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Alcaloide} = \frac{a*b*f}{p} * 100$$

Donde:

- a = Concentración de alcaloide obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L)
- b = Volumen total de extracto (100 mL)
- f = Factor para transformar unidades (f = 0.000001)
- p = Peso de la muestra g.

3. Grasa

a. Principio del método

La materia grasa del polvo de cacao se extrae con éter de petróleo mediante extracción continua en soxhlet por 12 horas, se recupera el solvente del extracto etéreo y a continuación se seca la grasa en una estufa por dos horas, la grasa seca se pasa a un desecador a enfriar y se pesa.

b. Reactivos

- Agua destilada
- Éter de Petróleo (rango de ebullición de 40 a 60 °C)

c. Procedimiento

- Se coloca en la estufa a 105 °C un balón de destilación con dos núcleos de ebullición durante dos horas.
- Se saca el balón de destilación a un desecador, se deja enfriar y se pesa.
- Se dobla el papel filtro de 16 cm formando un sobre y se introduce en el dedal de extracción.
- Se pesa 5 gramos de polvo de cacao en el dedal de extracción.
- Se cierra el sobre de papel filtro, se cubre el dedal de extracción con algodón y se coloca dentro del extractor soxhlet.
- Se mide en una probeta 180 mL de éter de petróleo y se pasa al balón de destilación.
- Se une el soxhlet con el balón de destilación y se conecta al refrigerante.
- Se coloca el equipo completo sobre el dispositivo de calentamiento, se abre el paso de agua para el refrigerante, se extrae por ocho horas.
- Se saca el cartucho del soxhlet, se recupera el solvente y se saca el balón con grasa a una estufa a 105°C por dos horas.
- Se saca los balones de la estufa a un desecador, se deja que se enfríe y se pesa.

Observaciones:

- Para el pesado de la muestra se debe tomar en consideración tres cifras decimales.
- El polvo de cacao se obtendrá siguiendo el método de preparación de muestras señalado en el numeral 4. Preparación de muestras para análisis químico de cacao.



d. Cálculos y expresión de los resultados

La cuantificación se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasas} = \frac{P1-P2}{P} * 100$$

Donde:

P1 = Peso del balón con grasa (g)

P2= Peso del balón vacío tarado (g)

P = Peso de la muestra (g)

4. Preparación de muestras para análisis químico de cacao

a. Campo de aplicación

Polvo de almendras de cacao secas, fermentadas, no fermentadas y licor de cacao

b. Reactivos

- Nitrógeno líquido
- Éter de petróleo p.a. (rango de ebullición de 40 a 60 °C)

c. Equipos y materiales

- Molino de café , Mr. Coffee, IDS-S
- Molino Retch Z200
- Tamiz de malla proporcional a 42 y 100 mesh
- Bisturi
- Brochas
- Espátula plástica
- Recipientes plásticos para almacenamiento de muestras
- Marcador permanente
- Cinta adhesiva para rotulado
- Congelador
- Equipo Automático, Sieve Shaker model S-2
- Balones de destilación de 250 mL
- Equipo de extracción Soxhlet

- Dedales de celulosa 33 mm x 88 mm libre de grasa
- Papel filtro cualitativo

d. Procedimiento

d.1. Descascarillado y molienda

- a) Utilizando un bisturí, remover manualmente las cáscaras de las almendras de cacao. Se puede también utilizar un equipo descascarillador que facilita el proceso.
- b) Tomar un frasco de plástico limpio y rotular con el código de laboratorio correspondiente a la muestra.
- c) Pasar las almendras peladas a un recipiente plástico, tapar y con cuidado insertar el mismo en el termo de Nitrógeno líquido por aproximadamente 5 minutos.
- d) Sacar el recipiente del termo de Nitrógeno líquido, abrir con cuidado la tapa del mismo y pasar las almendras congeladas al molino; moler por 2 minutos aproximadamente.
- e) Pasar el polvo de cacao obtenido de la molienda al equipo de agitación automático para tamizar y separar partículas de 0.38 y 0.149 mm.
- f) Recolectar en un frasco de plástico el polvo de cacao tamizado con el tamaño de partícula requerido. El residuo que no pasa por el tamiz, vuelva a moler siguiendo los pasos c, d y e, hasta finalizar toda la muestra
- g) Una vez concluida la molienda y tamizaje, cerrar herméticamente el frasco que contiene la muestra molida y tamizada, colocar en el congelador a -18°C, hasta el momento de realizar los análisis, en caso de que éstos no se realicen de manera inmediata

Observaciones:

- Utilizar guantes, mascarilla y franela para manipular el recipiente con las almendras durante el proceso de congelación utilizando nitrógeno líquido.

d.2. Desengrasado de la muestra por el método Soxhlet

Se parte de la muestra molida y tamizada, aplicando el siguiente procedimiento:

- a) Doblar el papel filtro de 16 cm formando un sobre e introducir en el dedal de extracción.
- b) Pesar 10 gramos de polvo de cacao y transfiera al dedal de extracción
- c) Cerrar el sobre de papel filtro, cubrir el dedal de extracción con algodón y colocar dentro del extractor Soxhlet de capacidad 250 ml
- d) Medir en una probeta graduada 180 mL de éter de petróleo y transferir al balón de destilación.
- e) Unir el Soxhlet con el balón de destilación y conectar al refrigerante.
- f) Colocar el equipo completo sobre el dispositivo de calentamiento, abrir el paso de agua para el refrigerante y extraer por ocho horas.
- g) Retirar el polvo desengrasado del dedal de extracción y colocar en una caja petri de 125 mm de diámetro en un desecador por lo menos durante 24 horas.
- h) Transferir el polvo desengrasado en viales de vidrio provistos de tapa rosca hermética y almacenar a -18°C si en caso los análisis no se realizan de manera inmediata.

Observaciones:

- Para la operación de pesado de la muestra se debe tomar en consideración tres cifras decimales.

5. Determinación del contenido de purinas

Se realiza mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). En un frasco de 500 ml se agrega 2 g de muestra, se adiciona 270 l de cloroformo y 10 ml de solución de amoniaco al 10%. La humedad se evita agregando 12 g de Sulfato de Sodio Anhidro, se agita y se deja reposar toda la noche. Se filtra al vacío y se lava con 100 ml de cloroformo. Se separa

el disolvente por destilación con roto vapor. Se retira las trazas finales del mismo en horno a 100°C . Las lecturas del contenido de la teobromina y la cafeína se realizan directamente con el HPLC.

BIBLIOGRAFÍA

- Amores, F.; Butler D.; Ramos, Sukha, D.; G.; Espín, S.; Gómez, A.; Zambrano A.; Jiménez, J.; Hollywood N.; Van Loo R. and Seguíne E. 2007. Project to establish the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate between fine or flavour and bulk cocoa. Quevedo, Ecuador. Completion report. Prepared by INIAP.
- Amores, F.; Palacios, A.; Jiménez, J.; Zhang, D. 2009. Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el Nororiente de la provincia de Esmeraldas. Boletín Técnico No. 135. Quevedo, Ecuador. INIAP. Estación Experimental Tropical Pichilingue. 51–53 p.
- Samaniego, I.; Espín, S. 2015. Manual de Métodos de Análisis Químico de Cacao. Quito, Ecuador. INIAP. Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos. LSAIA.

6.3. Perfil sensorial

La evaluación sensorial es la identificación del perfil de sabores en un determinado genotipo. Se realiza en muestras de licor de cacao por panelistas o catadores con la debida experiencia.

1. Preparación de licor de cacao

El licor de cacao es la transformación de las almendras de cacao tostadas y peladas en una solución semilíquida. Para dicho propósito, se pesan 200g de cacao, la torrefacción se realiza en una estufa con circulación de aire en su interior. Las almendras se colocan sobre una bandeja de acero inoxidable provista de orificios en el fondo, para el ingreso y circulación de



aire al contorno de los granos. Las bandejas conjuntamente con las almendras se introducen en la estufa. La combinación de los factores temperatura y el tiempo de tostado (Foto 34a) son ejecutados en función del porcentaje de cascarilla y el tamaño del grano.

Se utilizan regímenes de temperatura de 110°C por 12 minutos para almendras pequeñas y para almendras de tamaño grande 115 ° C por 15 minutos. Transcurrido el tiempo indicado y una vez enfriadas las almendras (Foto 34b),



Foto 34. Preparación de licor de cacao.

se procede a la trituración de las almendras y limpieza de la cascarilla utilizando el equipo catador (Foto 34c). Los nibs sin la cascarilla son utilizados para la obtención de diferentes subproductos a base de cacao.

Para la molienda de los nibs y el conchado de la pasta de cacao se utiliza un molino mortero RM 200 (Foto 35d), con el cual la textura alcanza entre los 40 - 80 μ (Foto 35e). Luego, la pasta se coloca en moldes para la solidificación (Foto 35f); se retira la pasta solidificada de los moldes para empacar en papel aluminio y almacenarlos hasta obtener un número de muestras suficiente y luego se realizan las cataciones.



Foto 35. Molienda (d), conchado (e) y colocación en moldes (f) de la pasta de cacao.

2. Evaluación sensorial de licor de cacao

La calificación para todos los sabores se basa en la escala hedónica internacional para evaluar alimentos Liria, M. (2007). La misma se detalla de la siguiente manera:

- 0 = ausente
- 1– 2 = intensidad baja
- 3– 5 = intensidad media
- 6–8 = intensidad alta
- 9–10 = intensidad muy alta



Foto 36. Evaluación sensorial de licor de cacao.

A continuación se describen los criterios de los sabores que más se destacan en el análisis sensorial del cacao.

Sabores	Criterios
Cacao	Se describe como el sabor típico de una barra de chocolate sin azúcar y sin saborizantes.
Floral	Son aquellos licores con sabor a flores, casi perfumado. Ejemplo: Lila, violetas, flores de cítricos.
Frutal	Se caracteriza por contener sabor a fruta madura, esto describe una nota de aroma a dulce agradable.
Nuez	Son aquellos sabores típicos de los frutos secos con ligeros notas dulces: nueces, macadamia, almendras etc.
Amargo	Se describe como sensación fuerte relacionado con los compuestos no volátiles específicamente con la cafeína y la quinina.
Astringente	Se describe una sensación fuerte y áspera, generalmente debido a la falta de maduración del fruto o debido a sus propias características.
Ácido	Sensaciones activadas por la presencia de ácidos volátiles. En cacao una insuficiente fermentación produce este sabor.

Fuente: Liria, M., 2007.

BIBLIOGRAFÍA

- Baño, S. 2010. Evaluación de 61 progenies híbridas de cacao en base a características organolépticas. Tesis Ing. Agr. Quevedo, Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 73 p.

- Cedeño, P. 2010. Determinación de perfiles organolépticos en ocho grupos de cacao mediante la degustación de licor de cacao y chocolates oscuros elaborados artesanalmente. Calceta, Ecuador. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. 45 p.
- Liria, M. 2007. Guía para la evaluación sensorial de alimentos. Lima, Perú. Nutri-salud. 149 p.

6.4. Perfil espectrométrico

a. Espectrometría del Infrarrojo Cercano (NIRS)

Las lecturas espectrométricas del infrarrojo cercano se realizan en muestras de 3 g de cacao en polvo (Foto 37a), preparadas a partir de granos secos sin tostar y molidos. Para obtener estas lecturas se utiliza un espectrofotómetro Foss 6500 (Foto 37b), que barre un intervalo de longitud de onda desde 400 a 2500 nm. Cada 2 nm se produce una lectura y con el conjunto de estas lecturas se forma el perfil espectral de cada muestra (CIRAD, 2012).



Foto 37. Lectura espectrométrica de infrarrojo cercano (NIRS) de muestras de cacao en polvo (a), utilizando un espectrofotómetro Foss 6500 (b).

b. Espectrometría de luz Visible (DIGIEYE)

Las lecturas espectrales con la técnica de luz visible se realizan en 50 almendras cortadas longitudinalmente por la mitad (Foto 38a), sobre éstas se captura la imagen con el DigiEye, sistema de medición del color de una imagen. La longitud de onda cubre un intervalo de



400 a 700 nm, con espacios de cada 10 nm produce una lectura que refleja la ubicación de la muestra sobre el eje tridimensional L^* , b^* a^* (Foto 38b), formando el perfil espectral, que al ser comparado con un modelo estándar emite valores correspondientes a la diferencia de luminosidad y sus componentes cromáticos, saturación, tono y ángulo (Foto 38c), y de esta manera determina su origen genético. (Rodríguez, 2011).

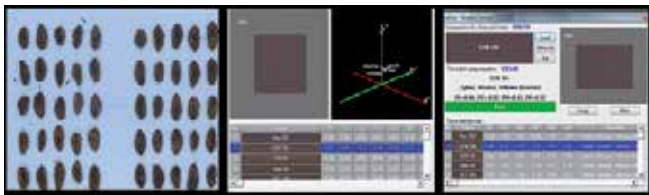


Foto 38. Lectura espectrométrica de almendras de cacao, utilizando la técnica de luz visible (equipo DIGIEYE).

BIBLIOGRAFÍA

- CIRAD. 2012. Discrimination of cocoa genotypes using near infrared spectroscopy. Application to CCN51 and Nacional cocoa from Ecuador. Montpellier, France. Final report. Convenio de Cooperación INIAP-CIRAD. Fase II. 54 p.
- Davrieux, F.; Jiménez, J.C.; Assemat, S.; Hue, C.; Kapitan, A.; Amores, F. 2013. Ecuador Nacional fine cocoa authentication using Nirs spectra and multivariate classification methods. CIRAD/Qualisud. Montpellier, France. INIAP/Estación Experimental Tropical Pichilingue. 8 p.
- Rodríguez, G. 2011. Estudio de la aplicación de una metodología espectrofotométrica para detectar mezclas de almendras de cacao de las variedades Nacional y CCN 51 en 15 zonas. Tesis Ing. Agroind. Quevedo, Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 211 p.