

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DEL CONTENIDO DE (-)- EPICATEQUINA,
PROCIANIDINA B1 Y B2 EN ACCESIONES DE *Theobroma cacao* L. (CACAO),
ANTES Y DESPUES DEL BENEFICIADO, DEL CULTIVAR SAN JOSE DEL
REAL DE LA CARRERA, EN USULUTAN, EL SALVADOR.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
CLAUDIA MARGARITA ALVARENGA ORELLANA
ROSSANA BEATRIZ ARGUETA CONTRERAS

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE 2017

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

COORDINACION GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORA DE AREA DE QUIMICA AGRICOLA.

MAE. María Elisa Vivar de Figueroa.

ASESORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES.

MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez.

DOCENTES DIRECTORES:

Dra. Vianney Castañeda de Abrego.

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

A nuestros docentes directores, Dra. Vianney Catañeda de Abrego y Msc. Amy Elieth Morán Rodríguez por su tiempo e invaluable orientación, paciencia y dedicación para la realización de nuestro trabajo de graduación.

A la coordinadora general de trabajos de graduación MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez, y a las docentes asesoras de área MAE. María Elisa Vivar de Figueroa y Msc. Sonia Maricela Lemus Martínez por sus observaciones y orientación en esta tesis.

Al cultivar San José del Real de la Carrera, por el apoyo y colaboración de todo el personal involucrado en la realización de esta tesis.

A CENSALUD, por brindarnos el espacio, el tiempo y los instrumentos necesarios para efectuar los análisis de nuestra tesis.

A todo el personal de CENSALUD, por brindarnos su colaboración en el desarrollo de esta tesis.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron para la realización del presente trabajo de graduación.

MUCHAS GRACIAS.

Claudia Margarita Alvarenga Orellana
Rossana Beatriz Argueta Contreras

DEDICATORIAS

A Dios todopoderoso, quien me regala la vida, sabiduría e inteligencia para emprender cada reto de vida y permitirme culminar mi carrera.

A mis padres, Moisés Eugenio Alvarenga Luna y Rosa Margarita Orellana de Alvarenga por su apoyo incondicional, consejos, paciencia y colaboración financiera los cuales contribuyeron a terminar mi carrera.

A mi esposo Josué Jeremías Lazo Paz por su amor, paciencia y apoyo incondicional para terminar mi carrera, a mi hijo Jonathan Josué Lazo Alvarenga por ser mi motor para salir a delante y alcanzar mis sueños. A mi cuñada Ruth Elizabeth Lazo que me apoyo durante la parte experimental para la realización del trabajo de graduación y a la familia Lazo por su apoyo.

A cada uno de mis hermanos Moisés Otoniel y José Israel, por su cariño y consejos y apoyo. Y a mi abuela Margarita Hernández que dedico sus oraciones a Dios todo poderoso para que me permitiera culminar mi trabajo de graduación.

A mi facultad por formarme en esta profesión y por la experiencia y conocimiento que adquirí durante mis años de estudiante. Y a todos los docentes, por su dedicación, esfuerzo para forjar profesionales con muchas capacidades, ética y valores.

Muchas gracias.

Claudia Margarita Alvarenga Orellana

DEDICATORIAS

A Dios Todopoderoso y a la Virgen de Guadalupe, quien me ha regalado a mí familia, quien me regala cada amanecer y por sobre todo quien me regala el entendimiento para realizar cada reto de vida y por darme la fortaleza y permitirme culminar mi carrera.

A mis padres, Deyssi del Carmen Contreras y José Antonio Argueta por su amor y su apoyo incondicional, por sus sacrificios y esfuerzos constantes, por sus consejos durante mi vida estudiantil y vida, porque gracias a ellos he llegado a culminar la más grande de mis metas.

A cada uno de mis hermanos Evelyn Argueta y José Argueta, quienes en todo momento me dieron su apoyo y me extendieron su mano para compartir momentos buenos, malos y difíciles durante el desarrollo de esta investigación.

A mi esposo Javier Fuentes Cornejo por su cariño, comprensión y por su paciencia, quien ha sido apoyo incondicional y financiera para llevar a feliz término esta tesis y a mis hijos Javier Fuentes Argueta y Diego Fuentes Argueta por ser ante toda la parte más importante de mi vida, de superación y el principal estímulo de lucha por ser cada día mejor.

A mi facultad por formarme en esta profesión y por la experiencia y conocimiento que adquirí durante mis años de estudiante. Y a todas las personas que de una u otra me formaron, me apoyaron y me animaron durante mis estudios.

Muchas gracias.

Rossana Beatriz Argueta Contreras

INDICE GENERAL

CONTENIDO	N° Pág.
Resumen	
CAPITULO I	
1.0 Introducción	xxii
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	25
2.1 Objetivo general	25
2.2 Objetivos específicos	25
CAPITULO III	
3.0 Marco Teórico	27
3.1 Generalidades del cacao	27
3.1.1 Botánica del cacao	27
3.1.2 Tipos de cacao	28
3.1.2.1 Cacao forastero	28
3.1.2.2 Cacao criollo	29
3.1.2.3 Cacao trinitario	30
3.2 Beneficiado del cacao	31
3.2.1 Cosecha de las mazorcas	31
3.2.2 Apertura de mazorcas	32
3.2.3 Desgranado	32
3.2.4 Fermentación	32
3.2.5 Secado	35
3.2.6 Tostado	36
3.3 Polifenoles	36

3.3.1	Química y biosíntesis	36
3.4	Cacao como fuentes de polifenoles	38
3.4.1	Procesos que afectan al contenido de polifenoles	40
3.4.2	Biodisponibilidad de los polifenoles en cacao	42
3.4.2.1	La degradación gástrica de los polifenoles	43
3.4.2.2	Absorción intestinal de polifenoles	43
3.5	Fundamentos teóricos para las determinaciones físicoquímicas	45
3.5.1	Durante la fermentación	45
3.5.1.1	pH	45
3.5.1.2	Temperatura	46
3.5.1.3	Índice de fermentación	46
3.5.1.4	Prueba de corte	47
3.5.2	Determinaciones físicoquímicas en semillas secas fermentadas y no fermentadas	48
3.5.2.1	Contenido de humedad	49
3.5.2.2	Determinación de estimado de polifenoles totales	49
3.5.2.3	Determinación cualitativa de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 por cromatografía de capa delgada.	50
3.5.2.4	Determinación cuantitativa de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 por espectrofotometría ultravioleta visible	51

CAPITULO IV

4.0	Diseño metodológico	54
4.1	Tipo de estudio	54
4.2	Investigación bibliográfica	54

4.3 Investigación de campo	54
4.3.1 Recolección de las muestras	55
4.4 Parte experimental	56
4.4.1 Tratamiento de las semillas de cacao no fermentadas	56
4.4.2 Desengrasado por el método Soxhlet	57
4.4.3 Tratamiento de las semillas de cacao fermentadas	57
4.4.4 Parámetros fisicoquímicos durante el proceso de fermentación	58
4.4.4.1 Medición de temperatura y de pH	58
4.4.4.2 Determinación índice de fermentación	58
4.4.5 Determinaciones fisicoquímicas en semillas secas fermentadas y no fermentadas	59
4.4.5.1 Determinación de contenido de humedad	59
4.4.5.2 Determinación de contenido estimado de polifenoles.	60
4.4.5.3 Identificación de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 por cromatografía capa fina.	62
4.4.5.4 Cuantificación de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 por Espectrofotómetro Ultravioleta Visible.	64

CAPITULO V

5.0 Resultados y discusión de resultados	67
5.1 Clasificación de las muestras	67
5.1.1 Determinación del peso del mucílago	72
5.2 Fermentación	73
5.2.1 Medición de pH	73
5.2.2 Medición de temperatura	76

5.2.3	Determinación del índice de fermentación	78
5.2.4	Prueba de corte	81
5.3	Determinaciones fisicoquímicas en semillas secas fermentadas y no fermentadas	82
5.3.1	Determinación de contenido de humedad	83
5.3.1.1	Contenido de materia seca	85
5.3.2	Determinación de estimado de polifenoles totales	86
5.3.3	Identificación de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 por cromatografía capa delgada.	90
5.3.4	Cuantificación de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 por Espectrofotómetro Ultravioleta Visible	95
5.3.5	Comparación entre la determinación de polifenoles totales y procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina.	104
CAPITULO VI		
6.0	Conclusiones	109
CAPITULO VII		
7.0	Recomendaciones	112
	Bibliografía	
	Glosario	
	Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1.	<i>Theobroma cacao</i> L.	27
2.	Cacao forastero y su semilla.	29
3.	Cacao criollo y su semilla.	30
4.	Cacao trinitario y su semilla.	30
5.	Estructura química de polifenoles en cacaos estudiados: (a) (-)- Epicatequina; (b) procianidina B1 y (c) Procianidina B2.	39
6.	pH en semillas fermentadas de cacao forastero.	74
7.	pH en semillas fermentadas de cacao trinitario.	75
8.	Temperatura en semillas fermentadas de cacao forastero (a) y cacao trinitario (b).	77
9.	Índice de fermentación en semillas fermentadas de cacao forastero (A) y trinitario (B).	80
10.	Contenido de humedad en semillas secas de cacao no fermentadas y fermentadas en los tipos forastero y trinitario.	84
11.	Contenido de materia seca en semillas de cacao no fermentadas y fermentadas en los tipos forastero y trinitario.	85
12.	Absorbancia vs concentración de catequina.	86
13.	Promedios de contenido estimado de polifenoles en semillas de cacao no fermentadas y fermentadas en base húmeda.	88

14	Promedios de contenido estimado de polifenoles en semillas de cacao no fermentadas y fermentadas en base seca.	89
15.	Cromatogramas obtenidos de los estándares	91
16.	Identificación de color para cada estándar	91
17.	Cromatogramas de trece accesiones de semillas no fermentadas de <i>Theobroma cacao</i> L. (cacao) con el reactivo revelador 4-dimetilaminocinamaldehido	92
18.	Cromatogramas de trece accesiones de semillas fermentadas de <i>Theobroma cacao</i> L. (cacao) con el reactivo revelador 4-dimetilaminocinamaldehido.	93
19.	Absorbancia vs concentración de procianidina B1.	95
20.	Contenido de procianidina B1 en muestras no fermentadas y fermentadas.	96
21.	Absorbancia vs concentración de procianidina B2.	98
22.	Contenido de procianidina B2 en muestras no fermentadas y fermentadas.	99
23.	Absorbancia vs concentración de (-)-epicatequina.	100
24.	Contenido de (-)- epicatequina en muestras no fermentadas y fermentadas.	101
25.	Contenido estimado de polifenoles totales vs estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina en cacao trinitario no fermentado.	105
26.	Contenido estimado de polifenoles totales vs estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina en cacao forastero no fermentado.	105
27.	Contenido estimado de polifenoles totales vs estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina en cacao trinitario fermentado	106

28.	Contenido estimado de polifenoles totales vs estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina en cacao forastero fermentado.	107
29	Estructuras químicas de las principales catequinas en cacao y sus respectivos enantiómeros.	129

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Pág. N°
1.	Diferencia entre cacao seco bien fermentado y mal fermentado.	48
2.	Determinaciones fisicoquímicas en semillas de <i>Theobroma cacao</i> L. (cacao) fermentadas y no fermentadas	49
3.	Colores indicativos de longitudes de onda.	52
4.	Características descriptivas de las mazorcas de cacao según su tipo.	55
5.	Clasificación del cacao según los descriptores morfológicos.	67
6.	Inspección visual en semillas de cacao fermentadas.	81

INDICES DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1.	Mazorcas cosechadas para los procesos de semillas fermentadas y no fermentadas.	71
2.	Peso de mucílago-semilla de las muestras de cacao utilizadas para el análisis en semillas no fermentadas y fermentadas.	72
3.	Promedios de pH en semillas fermentadas de las accesiones de cacao.	74
4.	Promedio de temperatura (°C) en semillas fermentadas de las accesiones de cacao.	76
5.	Promedio de índice de fermentación en semillas fermentadas de las accesiones de cacao.	79
6.	Promedios de contenido de humedad obtenidos en el proceso en semillas fermentadas y no fermentadas.	83
7.	Concentración (μg) de Catequina y su lectura en absorbancia.	86
8.	Promedios de Contenido estimado de polifenoles totales en semillas de cacao fermentadas y no fermentadas.	88
9.	Promedio de Rf de las muestras no fermentadas y con fermentación.	94
10.	Concentración (μg) real de procianidina B1 y absorbancia.	95
11.	Concentración (μg) real de procianidina B2 y absorbancia.	97
12.	Concentración (μg) real de (-)-epicatequina y absorbancia.	100

13.	Valor (%) de pérdida o ganancia obtenida después fermentación en cacao trinitario.	102
14.	Valor (%) de pérdida o ganancia obtenida después del proceso de fermentación en cacao forastero.	103
15.	Estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina presentes en polifenoles totales no fermentado.	104
16.	Estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina presentes en polifenoles totales con fermentación.	106

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Ubicación del Cultivar San José del Real de La Carrera en Usulután.
2. Procedimientos de análisis.
3. Extracción de la materia grasa en las muestras de cacao.
4. Prueba de corte y criterios para la inspección visual de las semillas fermentadas.
5. Características físicas de los frutos de cacao analizados para la clasificación de las muestras.
6. Resultados de los parámetros fisicoquímicos durante la fermentación.
7. Resultados y cálculos de la determinación del contenido humedad, estimado de polifenoles totales y cuantificación de (-)- epicatequina y procianidina B1 y B2.
8. Preparación de reactivos.
9. Listado de material, equipo y reactivos.
10. Carta de clasificación de muestras recolectadas.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- DMACA	4-dimetilaminocinamaldehido
- λ	Longitud de onda
- nm	Nanómetro
- °C	Grado Celsius
- g	Gramos
- pH	Potencia hidrogeno
- mL	Mililitro
- seg	Segundos
- μg	Microgramo
- rpm	Revoluciones por minuto
- v/v/v	Volumen/volumen/volumen
- v/v	Volumen/volumen

RESUMEN

Actualmente el valor del cacao a nivel internacional viene alcanzando en virtud de una mayor demanda debido a cambios de consumo y al descubrimiento de sus virtudes para la salud (polifenoles), por esas razones, se hace imprescindible determinar la calidad del cacao en el país, identificando los principales polifenoles, para cumplir con la demanda de calidad del mercado nacional e internacional.

En el presente trabajo se determinó el contenido de (-)- epicatequina, procianidina B1 y B2 en accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao), antes y después del beneficiado, del Cultivar San José del Real de La Carrera, en Usulután, El Salvador. Para ello se recolectaron entre 2 a 6 mazorcas de trece accesiones de cacao, en tipo forastero y trinitario. Las determinaciones fisicoquímicas principales que se realizaron en semillas secas fermentadas y no fermentadas fueron, el contenido de humedad (método gravimétrico) teniendo un promedio de 4.86% en semillas no fermentadas y 4.61% fermentadas, se encuentran en el porcentaje máximo de humedad de cacao de 7.5 a 8.0%. Estimado de polifenoles totales (método de Folin-Ciocalteu), las muestras están dentro de las especificaciones que establecen un rango de 5 a 8.5 %, teniendo un promedio en semillas no fermentadas 6.20% y 6.19% fermentadas. Para la cuantificación de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 (Espectrofotometría Ultravioleta Visible a partir de cromatografía de capa delgada), se obtuvieron valores mayores en semillas fermentadas que en no fermentadas.

Por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos en la cuantificación se recomienda implementar métodos como densitometría, cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta eficacia para obtener una exacta identificación y cuantificación.

Esta evaluación se llevó a cabo en durante el segundo semestre del año 2015, en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO I
INTRODUCCION

INTRODUCCION

El árbol de cacao es conocido por sus semillas, son la principal materia prima en la elaboración del chocolate. Sin embargo, el grano de cacao contiene una gran cantidad de fitoquímicos, compuestos fisiológicamente activos que se encuentran en las plantas, son un grupo de compuestos llamados polifenoles y que han demostrado tener propiedades antioxidantes. Los polifenoles más abundantes en los granos de cacao son los flavonoides, estos se encuentran en una variedad de alimentos. Los flavonoides que se encuentra en alta concentración en el cacao son los llamados flavanoles, entre estos están catequinas, antocianidinas y procianidinas.

En el Cultivar San José del Real la Carrera ubicada en el departamento de Usulután, es la principal productora a nivel nacional de cacao, tiene el lugar de mayor extensión de cultivo, donde se han identificado cacaotales tipo criollo, trinitario y forastero. Hoy en día, se está impulsando investigaciones en los cacaotales con el objetivo de competir en el mercado nacional e internacional y convertir éste en un producto de calidad para lograr una mayor aceptación, que cumpla normas y estándares de calidad ya que es parte de la materia prima para la elaboración del chocolate y de otros productos, debido a esto y a nuevas investigaciones que demuestran que el grano del cacao son ricos en antioxidantes específicos, con la estructura básica de las catequinas y epicatequinas, similares encontrados en otros vegetales. Le da un valor agregado al cacao y que viene alcanzando en estos últimos años una mayor demanda, es por esta razón se realizó la investigación de los principales polifenoles en las semillas de cacao y evaluar como el proceso de fermentación afecta el contenido de ellos.

La investigación tuvo como objetivo determinar el contenido de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2, en accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) antes y después del beneficiado, del Cultivar San José Real de La Carrera, ubicada en el departamento de Usulután, por lo que en el proceso experimental se utilizaron semillas de cacao fermentadas y no fermentadas, se les determinaron las características fisicoquímicas (como el contenido de humedad, estimado de polifenoles totales, la identificación de los polifenoles por cromatografía de capa delgada y la cuantificación por Espectrofotometría Ultravioleta Visible). Además, durante la etapa de fermentación se midieron el pH, la temperatura y el índice de fermentación.

El proceso experimental se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología, en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), de la Universidad de El Salvador, en el segundo semestre del año 2015.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el contenido de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 en accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao), antes y después del beneficiado, del Cultivar San José del Real de La Carrera, en Usulután, El Salvador.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.2.1 Medir los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH e Índice de fermentación durante la fermentación en cotiledones de las accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao).

2.2.2 Cuantificar el contenido de humedad y estimado de polifenoles totales en cotiledones de las accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao).

2.2.3 Identificar por cromatografía de capa delgada, (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2, en extractos de cotiledones de las accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao).

2.2.4 Cuantificar por espectrofotometría Ultravioleta-Visible el contenido de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 a partir de cromatografía capa delgada de los extractos de cotiledones de las accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao).

2.2.5 Comparar los resultados obtenidos del contenido de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 con el contenido estimado de polifenoles totales en extractos de cotiledones de las accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao).

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.0 Generalidades del cacao.

3.1.1 Botánica del cacao

Clasificación botánica del cacao: ⁽¹⁰⁾

División:	Espermatofita
Clase:	Angiosperma
Sub-clase	Dicotiledónea
Orden	Malvales
Sub-orden	Malvinas
Familia	<i>Sterculiaceae</i>
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	Cacao



Figura N° 1. *Theobroma cacao* L.

Nombre científico: *Theobroma cacao* L. (cacao). Este árbol es nativo de regiones húmedas tropicales del norte de Sur América. Está clasificado en tres grupos morfo geográficos: criollo, forastero y trinitario, que presentan una gran variabilidad en cuanto a color, dimensiones y forma de las diferentes partes de flores, frutos y semillas ⁽⁴²⁾.

La diferencia de coloración entre los diferentes tipos de semillas de cacao se debe a la presencia de antocianinas en los cotiledones. Estos pigmentos de los cotiledones, ubicados en células especiales pigmentarias, forman parte del 10% de las células de almacenamiento. No se conoce la función que estos desempeñan en la semilla, aunque se ha propuesto que su papel es protector ⁽¹⁰⁾

⁽⁴²⁾.

A la semilla de cacao también se le conoce por los nombres de grano y almendra. Según la norma mexicana NMX-F-352-S-1980 se define al cacao en grano fermentado como el grano entero y sano extraído de los frutos maduros de árboles de la especie *Theobroma cacao* L. de la familia de las *Sterculiaceae*, que ha sido objeto de una buena fermentación, y que ha sido secado bajo condiciones adecuadas ya sea al sol o por medios artificiales ⁽¹⁰⁾ (42).

3.1.2 Tipos de cacao.

3.1.2.1 Cacao forastero.

Las semillas de cacao forastero también se les llama amazónicas pues su origen es en la cuenca alta del río Amazonas, desde donde fueron llevados a África Occidental y a Brasil; tienden a dar cacaos comunes en términos de calidad. Se caracteriza por ser de mayor tolerancia a las enfermedades que el cacao criollo. Las mazorcas son verdes (en estado inmaduro) y amarillas (cuando están maduras), con una forma de pequeño cuello de botella en la base.

Las semillas son aplanadas, pequeñas, se caracterizan por la acidez, y el sabor amargo debido al alto contenido de taninos, el cotiledón es color violeta cuando la semilla esta recién extraída del fruto y café oscuro cuando ha sido bien beneficiado. Dentro de este tipo se destacan distintas variedades como cundeamor, amelonado, sambito, calabacillo y angoleta.

Las almendras producen un chocolate con sabor básico de cacao. Pero el paradigma respecto al cacao forastero, como sinónimo de cacao corriente o básico está cambiando recientemente ⁽³⁾ (47).



Figura N° 2. Cacao forastero y su semilla.

3.1.2.2 Cacao criollo.

El cacao criollo fue cultivado originariamente en las selvas húmedas mexicanas y en la cuenca del Orinoco, desde donde se propagó a los demás países en Centro América, a Venezuela y a algunas islas del Pacífico como Samoa, Timor y Java. Son árboles relativamente bajos y menos robustos respecto a otras variedades. Su copa es redonda con hojas pequeñas de forma ovalada, de color verde claro y gruesas.

Este tipo de cacao se caracteriza por tener mazorcas alargadas de colores verde y rojizo en estado inmaduro, tornándose amarillas y anaranjadas rojizas cuando están maduras. Las semillas son más grandes que las del cacao forastero, y el cotiledón recién salido del fruto es ligeramente rosado. El cotiledón presenta un color entre marfil y parduzco o castaño muy claro cuando está correctamente beneficiado. El grano presenta un olor dulce y sabor agradable debido al escaso contenido en taninos, unido a un aroma delicado, es la característica distintiva de los tipos finos ⁽³⁾ (47).



Figura N° 3. Cacao criollo y su semilla.

3.1.2.3 Cacao trinitario.

El cacao trinitario, se desarrolló en la isla de Trinidad por el cruce entre cacao criollo y forastero realizado en forma natural entre los distintos tipos introducidos y también a partir de hibridaciones deliberadas a través de distintos programas de desarrollo en Trinidad. La calidad del cacao trinitario corresponde a características intermedias entre el cacao criollo y forastero según la cantidad de genes de uno o de otro que les hayan correspondido. Presentan granos de tamaño mediano a grande y cotiledones color castaño ⁽³⁾ (47).



Figura N° 4. Cacao trinitario y su semilla.

3.2 Beneficiado del cacao.

En el cultivo de cacao el beneficio constituye una parte fundamental y decisiva para obtener buena calidad del grano y permitir su correcta comercialización en el mercado nacional e internacional. Con un beneficio adecuado se desarrollan en los granos los principios fundamentales del sabor, el aroma y la calidad, lo que determina en gran medida su condición de finos y aromáticos, es decir la calidad del producto final. Este se puede definir como la serie de operaciones sucesivas que comienzan con la cosecha y apertura de las mazorcas maduras para la obtención de los granos (desgrane), continúa con la fermentación, secado y limpieza, terminando con la selección, clasificación y almacenamiento del grano

(17) (37).

3.2.1 Cosecha de las mazorcas.

Para la cosecha se debe hacer la identificación de las mazorcas maduras de cacao. Estas se identifican por los cambios de coloración externa, que varía dependiendo del tipo de cacao. La cosecha consiste en la recolección de mazorcas maduras y sanas. Otra señal de madurez es el sonido que se produce en la mazorca al golpearla ligeramente, emitiendo que algo se encuentra suelto en el interior. Las semillas provenientes de frutos no maduros ocasionan cambios desagradables en el aroma y el sabor (37) (54).

Este proceso lo debe realizar un personal capacitado y con herramientas bien afiladas para evitar daños en los cojines florales y afectar las futuras cosechas. La frecuencia de la recolección va a depender de factores como el volumen de la cosecha, la madurez de los frutos y la presencia de plagas, enfermedades o animales dañinos (37) (54).

3.2.2 Apertura de mazorcas.

Antes de partir los frutos, se separan las que poseen grado óptimo de madurez de las que están atacadas por plagas y enfermedades. Al partir las mazorcas es de gran importancia evitar causar daños mecánicos a las almendras, pues quedarán predispuestas al ataque de hongos e insectos, y los granos que lleguen al final del proceso, presentarán un aspecto defectuoso que alterará la calidad del producto. Esta labor se puede realizar con herramientas como machete corto, mazo de madera; partidor de lámina sin filo ⁽¹⁷⁾ ⁽⁴⁷⁾.

3.2.3 Desgranado.

Se refiere al proceso de extracción de la semilla de la cáscara. El proceso se realiza deslizando los dedos de la mano a lo largo de la placenta o vena central del fruto, se evita mezclar la placenta con las semillas pues constituye una impureza que perjudica la calidad del cacao. Es preferible abrir las mazorcas y extraer los granos lo más pronto que se pueda después de la cosecha. En caso de que la cosecha no se complete el mismo día, las mazorcas pueden esperar cosechadas de tres a cinco días antes de abrirlas, particularmente si se trata de cacaos de tipo forastero o trinitario. El periodo de espera se le llama “aguante” y es de dos días para los cacaos criollo ⁽³⁾ ⁽⁴⁷⁾.

3.2.4 Fermentación.

Este es el paso crucial en el beneficio del cacao. En este paso se desarrollan las cualidades de la semilla, agradables al gusto y al olfato. El fenómeno de la fermentación incluye la inducción de reacciones y cambios bioquímicos dentro de las almendras, necesarios para producir los precursores del sabor y aroma a

chocolate. Las semillas no fermentadas o con fermentación insuficiente producen cacao de baja calidad sensorial ⁽³⁾ ⁽⁵⁷⁾.

La fermentación es el proceso de transformación de los azúcares de la baba o mucílago en alcohol etílico mediante la acción de las levaduras. Esta fase es seguida por la transformación del alcohol en ácido acético, por la intervención de bacterias lácticas y acéticas. El ácido acético atraviesa la testa y se difunde hacia el interior de los cotiledones. Luego, mediante la acción combinada y balanceada de temperatura, acidez y humedad, ocurre la muerte del embrión. Con el embrión muerto, se rompe las estructuras de almacenamiento en el interior de células de los cotiledones, produciéndose la liberación de los polifenoles y proteínas de reserva, seguida por las reacciones químicas que generan los compuestos precursores del sabor y aroma del sabor a cacao y chocolate.

Para el desarrollo de la fermentación, se requiere que esta se lleve a cabo en un lugar que no se encuentre expuesto a corrientes de viento fuertes, aunque si tienen que estar ventilado ⁽³⁾ ⁽⁵⁷⁾. Las semillas extraídas del fruto deben depositarse en cajones de madera, aunque lo más importante es que tengan orificios en el fondo y los lados para la salida de los líquidos que se desprenden del mucílago. Los cajones deben colocarse unos 10 o 15 centímetros por encima del suelo para el fácil drenaje de estos líquidos ⁽⁴²⁾ ⁽⁴⁷⁾. La masa de las semillas se remueve para homogenizar la fermentación. La falta de remoción o su ejecución defectuosa, se hace que una gran proporción de la masa de cacao se quede sin fermentar.

El volteo o remoción debe realizarse a las 24 horas en el cacao criollo y cada dos días, en el caso del forastero y trinitario, evitando así la proliferación de mohos y la desecación de las almendras que se encuentra en la superficie. La remoción diaria permite un incremento más rápido de la temperatura (45 – 50 °C); y por lo tanto una fermentación más homogénea y de menor duración.

Además, el tiempo es un factor principal que determina el buen éxito de este proceso; el tiempo de fermentación que se debe dar a las semillas tiene relación con el grupo genético al que pertenece el cacao, la variedad genética superior (criollo) necesita menos tiempo para fermentar que el forastero; porque el mayor contenido de azúcar en el mucílago del criollo acelera el proceso. Por esa razón el cacao criollo, se fermenta generalmente en tres días. El cacao forastero, se fermentan de cuatro a cinco días; mientras que, el trinitario necesitan seis días o más ⁽³⁾ ⁽⁴⁷⁾.

Con respecto al pH, indica que la pulpa fresca tiene un pH de 3,5 a 5.0. En la misma etapa el pH de los cotiledones es de 6.6, debido a que la testa es permeable al ácido acético, este pasa al interior del cotiledón y el tercer día mata el embrión y baja el pH a 4,8 durante el resto de la fermentación y secado el pH sube y por lo general es de 5,5 en los granos secos ⁽²⁰⁾ ⁽⁵⁴⁾ ⁽⁵⁷⁾.

La longitud del tiempo de fermentación está relacionada con la cantidad de pulpa y concentración de polifenoles en las almendras, según el genotipo de que se trate. Por lo general, mientras el color de los cotiledones es más violeta-oscuro, el tiempo de fermentación se prolonga más. La intensidad de la coloración depende a su vez de la concentración de antocianina, pigmento que es parte de la carga total de polifenoles que contiene el cacao. El cacao criollo tiene menos antocianina y en general de polifenoles, por eso fermentan más rápido ⁽³⁾. Además, el grado de fermentación de las semillas de cacao se puede determinar por el contenido de antocianinas, ya que suelen desaparecer rápidamente durante el proceso de fermentación hasta en un 93 % generando un cambio de color de purpura a marrón ⁽²⁴⁾ ⁽⁶²⁾.

Micro-fermentación es un sistema útil para fermentar pequeñas cantidades de masa de cacao fresco, que han sido adaptas a materiales en proceso de

investigación, además es un sistema muy práctico de fermentación que también es dirigido a pequeños productores ^{(3) (40) (54)}.

3.2.5 Secado.

Esta fase es la continuación de las reacciones bioquímicas internas que conducen al desarrollo de los precursores del sabor y aroma del cacao en semillas bien fermentadas. Al final, la oxidación se detiene por la falta de humedad en la semilla, inactiva las enzimas que regulan el proceso oxidante. Cabe señalar que, al completarse la fermentación, las semillas terminan con alrededor del 55% de humedad, la que mediante el secado baja hasta 6 o 7%.

El objetivo principal del secado es disminuir la humedad de los granos en un rango de 5-7%, para permitir su almacenamiento y transporte, ya que un contenido de humedad superior al 8%, incrementa la probabilidad de contaminación fúngica ^{(26) (57)}.

En el proceso de secado se debe remover la masa de cacao frecuentemente para la distribución uniforme del calor para ello deben usarse utensilios de madera. En forma práctica el punto de secado se conoce tomando un puñado de semillas y si al oprimirlos crujen es señal de que están en el grado de sequedad requerido ^{(3) (53)}. Concluido este proceso se procede a examinar la apariencia exterior de los granos y determinar si tiene impurezas.

Finalmente se realiza la prueba de corte, que consiste en colocar alrededor de 100 granos del cacao seco en una bandeja. Se cortan longitudinalmente para apreciar las diferentes tonalidades en el color interno de los granos, así como las transformaciones físicas recibidas durante el proceso (Ver anexo N° 4).

3.2.6 Tostado.

El desarrollo del aroma del cacao se considera de origen térmico ya que es un fenómeno complejo que depende de los parámetros de tostadura y de la composición química de la semilla. Cualquiera que sea la técnica empleada para el tostado, los precursores de aroma desarrollados durante la fermentación y el secado participan en la formación del aroma del cacao tostado, por reacciones de Maillard, la caramelizan las proteínas y síntesis de compuestos azufrados ⁽⁴²⁾.

Las operaciones posteriores a la fabricación del chocolate sólo conducen a la eliminación de una parte de la fracción de compuestos volátiles. El sabor es la característica más importante para los fabricantes de chocolate, considerando, además, los aspectos físicos de la semilla (su tamaño, porcentaje de cascarilla) el contenido y pureza de la manteca; lo que originan sabores extraños como moho, humo, acidez y amargor en las semillas comerciales ⁽⁴²⁾. En las semillas de cacao, la proporción de polifenoles se ve afectada además por procesos del beneficiado como el secado, el tostado y la eliminación de la cáscara; así como otros tratamientos aplicados durante el procesamiento del cacao. Por la misma razón una diferencia en el grado de fermentación o diferencias dependientes de la clase de cacao producirán cambios en la calidad y las características organolépticas finales del producto ⁽⁴²⁾.

3.3 POLIFENOLES

3.3.1 Química y biosíntesis.

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen uno de los más numerosos y ampliamente distribuidos grupos de sustancias en el reino vegetal con más de 8.000 estructuras fenólicas conocidas en la actualidad. Ellos son productos del

metabolismo secundario de las plantas y biogénicamente surgen a partir de dos principales rutas sintéticas principales: la vía de shikimato y acetato ^{(26) (62)}.

Tanto el ácido acético y el ácido shikímico se derivan del metabolismo de la glucosa. Productos de la vía de shikimato primaria son los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), pero su degradación conduce también en la vía fenilpropanoide considerada como una vía secundaria. Sin embargo, la vía fenilpropanoide es presente de forma ubicua en las plantas superiores que forman el núcleo de una serie de vías relacionadas que conducen a diversos productos incluyendo flavonoides y estilbenos. La vía de fenilpropanoides parece esencial para la supervivencia de las plantas terrestres que proporcionan componentes de las plantas tales como la lignina con su función mecánica y estructural importante ^{(26) (62)}.

Los flavonoides, que constituyen el grupo más importante, pueden ser divididos en 13 clases con más de 5.000 compuestos descritos en 1990 ⁽⁶²⁾. Su estructura común es fenilpropanoide (C6-C3-C6) y consta de dos anillos aromáticos unidos a través de tres átomos de carbono que por lo general forman un heterociclo oxigenado ^{(26) (62)}. Los flavonoides se pueden clasificar en: flavanonas, flavanoles, isoflavonas, flavonas, flavonoles, leucocianidina, antocianidina, proantocianidina o antocinidinas ^{(40) (51)}.

El contenido (cualitativo y cuantitativo) de polifenoles en vegetales varía con las condiciones de crecimiento y los estímulos ambientales; difiere también de una especie a otra, y de un tejido a otro, encontrándose principalmente en frutas, donde el grado de maduración e incluso el manejo pos-cosecha de los mismos afectan el contenido de polifenoles. Sus funciones fisiológicas están relacionadas con la protección frente a la radiación UV y a las condiciones de estrés biótico como herbívora, infección, parasitismo y patogénesis de las plantas ⁽²⁶⁾.

3.4 Cacao como fuentes de polifenoles.

El cacao contiene alrededor de 380 sustancias químicas conocidas, 10 de las cuales son compuestos psicoactivos. En su estado natural, los granos de cacao son casi incomedibles debido a su alta concentración de polifenoles, lo que les da un sabor muy amargo.

En un producto de cacao final como el chocolate, el contenido de polifenoles podría disminuir desde 100 % a 10 % a lo largo de los diferentes procesos de fabricación. Por esta razón, diversos autores se han centrado en los efectos de los extractos de polifenol - enriquecido de cacao ⁽⁴⁾.

Los flavonoides que se encuentra en alta concentración en el cacao, y por consiguiente en el chocolate, son los llamados flavanoles. Los flavanoles del cacao se presentan en dos formas estructurales, como entidades únicas o monómeros, o como estructuras oligoméricas (polímeros).

Dentro de los flavanoles monómeros más importantes que se encuentra en el cacao y en sus subproductos, están la (-)-epicatequina y la (+)-catequina, y entre los productos poliméricos, las procianidinas. Estas últimas moléculas se presentan con diferente grado de polimerización en el cacao y sus subproductos. Se les encuentra como dímeros, trímeros, tetrameros hasta decámeros ^{(26) (58) (62)}.

Según otros estudios, se crítica el contenido de polifenoles de cacao en función de su origen y el proceso de fabricación del producto final. Tres grupos de polifenoles se pueden identificar en los granos de cacao: catequinas, que constituyen alrededor del 37 % del contenido de polifenoles en los granos, antocianidinas (aproximadamente 4 %), y proantocianidinas (aproximadamente 58 %). De las catequinas, (-) - epicatequina es la más abundante (hasta 35 %),

mientras que (+) - catequina, (+) - galocatequina, y (-) - epigalocatequina están presentes en cantidades más pequeñas.

En la figura N° 5 observamos las estructuras principales estudiadas en esta investigación ⁽²⁶⁾ (62). De los oligoméricos, las principales procianidinas son B1, B2, B3, B4, B5, C1, y D. Las proporciones de estos derivados por lo general cambian durante el proceso de fabricación. Por ejemplo, en la masa seca, sin grasa de los granos de cacao frescos, el contenido total de polifenoles solubles es de 15-20 %, lo que equivale al 6% de los granos de cacao, no fermentadas secadas al aire.

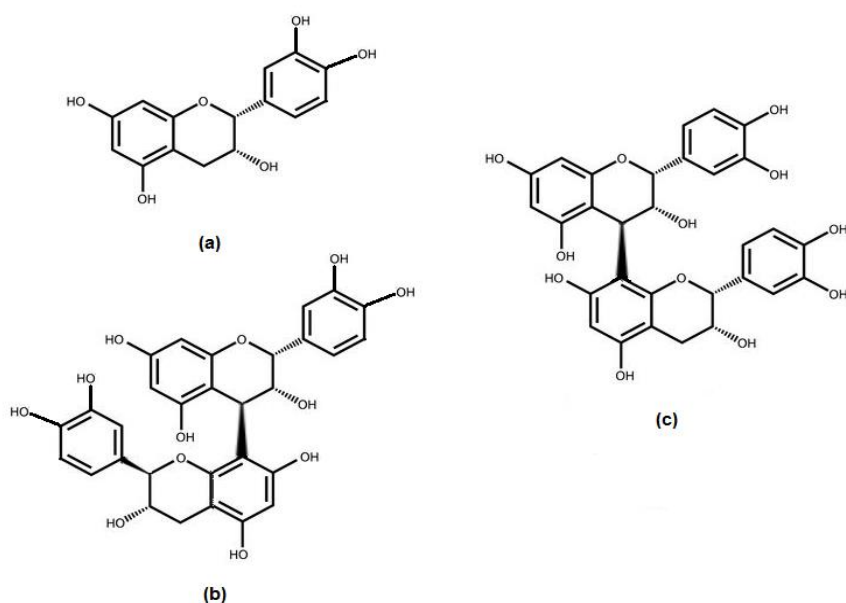


Figura N° 5. Estructura química de polifenoles en cacaos estudiados: (a) (-)- Epicatequina; (b) procianidina B1 y (c) Procianidina B2.

Por el contrario, en granos fermentados (no desengrasados) es de 5%, porque durante el proceso de fermentación epicatequina y contenido de polifenoles solubles se reduce en aproximadamente 10 a 20 %. Las antocianidinas desaparecen después del proceso de fermentación, y procianidinas disminuyen de 3 a 5 veces.

También la variación en el contenido fenólico de cacao dependiendo de su origen, por ejemplo, la concentración de catequinas, en granos de cacao fermentados desengrasados varía de 16.52 mg / g en el cacao de Costa Rica a 2.66mg / g en el cacao cultivado en Jamaica ⁽⁵¹⁾ ⁽⁶²⁾.

3.4.1 Procesos que afectan el contenido de polifenoles.

Es importante conocer que la materia prima del chocolate como sus derivados puede ser sujeta a cambios en el contenido de polifenoles durante las diversas etapas de procesamiento que la semilla de cacao se somete.

Los polifenoles de la semilla del cacao están almacenados en células distribuidas en grupos a través de los cotiledones. Son compuestos que participan activamente en las modificaciones bioquímicas en el interior de las almendras durante la fermentación. Una de ellas, la oxidación enzimática, causa la disminución del contenido de polifenoles, a través de la hidrólisis de las antocianinas y la polimerización de los monómeros y oligómeros de flavanoles, transformándolos en compuestos insolubles ⁽³⁾ ⁽²⁶⁾ ⁽³³⁾, debido a que los polifenoles se difunden desde los compartimientos celulares y se somete a la oxidación para producir taninos condensados insolubles de alto peso molecular ⁽²⁶⁾ ⁽³³⁾, Como resultado disminuye la astringencia y el amargor, influyendo positivamente sobre la calidad sensorial del cacao ⁽³⁾.

La ocurrencia de reacciones de condensación es confirmada por la disminución drástica en el contenido de epicatequina durante el segundo y tercer día de la fermentación ⁽²⁶⁾ ⁽⁶²⁾. La epicatequina y contenido de polifenoles solubles, respectivamente, se reduce aproximadamente 10% a 20% durante la fermentación. También, las antocianinas suelen desaparecer rápidamente durante el proceso de fermentación (pérdida del 93% después de 4 días)

generando un cambio de color ⁽⁶²⁾. Además de la oxidación enzimática durante la fermentación, también se ha propuesto, que el incremento de temperatura durante el secado en campo es un factor importante vinculada la pérdida de polifenoles ^{(26) (62)}.

La enzima polifenol oxidasa también es sensible al secado de manera que la actividad enzimática restante después de la fermentación y el secado de los granos es solo alrededor de 2%. También, se ha demostrado que los granos de cacao frescos sin fermentar secadas durante 2 días al sol, provoca una disminución de 50% en el contenido de epicatequina ^{(26) (62)}.

Las alteraciones en el contenido y composición de cantidad de polifenoles, en el proceso de manufactura del chocolate y en general los productos derivados del cacao, pueden darse principalmente durante el tostado, molienda, refinación y conchado, donde los granos o productos intermedios son expuestos a gran variedad de procesos térmicos que generalmente involucran la presencia de oxígeno; gracias a esto y debido a la alta actividad redox de los polifenoles, es posible anticipar que estos procedimientos son puntos cruciales a los cuales depende la calidad de los productos finales en términos de contenido de compuestos con actividad biológica. No obstante, el conocimiento de estos cambios es limitado y en la actualidad solo un proceso patentado los ha estudiado en relación con los parámetros del proceso, encontrando que generalmente temperaturas y tiempos de procesamiento prolongados reducen la cantidad de catequinas y procianidinas disponibles ^{(24) (62)}.

Además, se ha estimado que el contenido de polifenoles disminuye drásticamente hasta cerca de un 80 y 90% durante estas etapas de procesamiento. Aunque es necesario enfatizar que estos procesos de cosecha no están estandarizados a nivel mundial, generando alta variación en la

concentración de catequina en cacaos provenientes de diferentes procedencias (26).

3.4.2 Biodisponibilidad de los polifenoles en cacao.

Existe una gran controversia en torno a la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos en general y de los derivados del cacao, en particular. Por ejemplo, la epicatequina se absorbe bien, con una concentración plasmática máxima en alrededor de 2 horas y con aproximadamente el 20 % de epicatequina consumida se excreta en la orina.

En el caso de dímeros, su presencia se ha descrito también en el plasma. Por ejemplo, en un estudio, describen la presencia de dímeros de procianidinas, especialmente B2 (epicatequina - (4 β -8) - epicatequina) en sangre periférica de adultos sanos que habían consumido una bebida de cacao como las procianidinas está compuesta por epicatequina por esa razón se absorbe bien (4) (62). Estudios de intervención en humanos indican que la biodisponibilidad de los monómeros de los flavanoles en humanos es influenciada por la configuración estereoquímica. En el caso de la catequina, la absorción de (+)-isómero se ve favorecida en comparación con el (-)-isómero. Estos resultados fueron los mismos obtenidos de catequina en los compuestos puros de referencia y la alcalización en cacao en polvo.

En otro estudio, confirmaron estos hallazgos para los enantiómeros de las catequinas y, además, encontraron una clasificación en la absorción de cuatro catequinas en el siguiente orden: der: (-)-epicatequina > (+)-catequina = (+)-epicatequina > (-)-catequina (33).

3.4.2.1 Degradación gástrica de los polifenoles.

Se han producido resultados contradictorios en relación con la estabilidad gástrica de fenoles de cacao. Por ejemplo, Spencer informó de que, en el ambiente ácido del medio gástrico, oligómeros de procianidina son hidrolizados a mezclas de monómeros y dímeros de epicatequina. Sin embargo, en otros estudios se observó que, durante el tránsito gástrico, procianidinas eran notablemente estables en el ambiente del estómago y alcanzaron intacta el intestino delgado, disponible para la absorción o el metabolismo. Además, su absorción limitada en el intestino delgado podría influir en el proceso digestivo o la fisiología del intestino a través de la interacción directa con la mucosa del intestino y los solutos del lumen del intestino.

En consecuencia, algunos de los efectos en la salud de las procianidinas pueden estar asociados con la formación por la micro flora de los metabolitos de bajo peso molecular una vez que las procianidinas llegan al colon. Esta hipótesis ha sido corroborada por Gonthier, que demostraron que mientras que las proantocianidinas de alto peso molecular no están presentes en el plasma o en la orina, los monómeros y los ácidos aromáticos producidos durante su metabolismo por la microflora intestinal se pueden encontrar en este último. Estos investigadores también demostraron que la catequina se absorbe bien en el intestino delgado, con recuperaciones de 20-40 % ⁽⁴⁾ ⁽⁶²⁾.

3.4.2.2 Absorción intestinal de los polifenoles.

Según investigaciones se ha acoplado un método de digestión in vitro con flujo continuo, que dializa el paso duodenal para construir un modelo de examen que digestibiliza y bioaccesibiliza los polifenoles en matrices alimentarias de cacao. Sus resultados muestran que el contenido de grasa de las muestras de cacao

analizadas mejora la digestibilidad de algunos compuestos fenólicos, especialmente procianidinas, durante la digestión duodenal. El posible mecanismo probablemente está relacionado con la capacidad de la fracción grasa de interactuar con ciertos compuestos fenólicos a raíz de una mejor formación de micelas de los fenoles digeridos ⁽⁴⁾.

Un ensayo de biodisponibilidad humana con polifenoles de chocolate utilizando 40 g de chocolate negro (892 mg de polifenoles totales expresados como equivalente de ácido gálico y 82 mg de epicatequina) mostró que epicatequina en efecto, se absorbe en la sangre. El compuesto fue detectable en el plasma en forma de metabolitos conjugados glucurónidos y grupos sulfato después de 2 horas y todavía estaba presente después de 8 h. El aclaramiento de epicatequina desde el compartimento de plasma era muy rápido, con una eliminación $t_{1/2}$ de 1,9 y 2,3 h de 40 y 80 g de chocolate, respectivamente.

En otro estudio se encontró que el metabolismo de los fenoles simples se produce a través de vía común, siendo absorbido en el intestino delgado, y oligómeros más grandes que los trímeros son poco probable de ser absorbido en el intestino delgado en sus formas nativas. En experimentos in vitro utilizando capas individuales de células cacao como un modelo de la absorción en el intestino delgado han mostraron que sólo los atenuadores y trímeros de flavan-3-oles son capaces de cruzar el epitelio intestinal; por lo tanto, de procianidinas B2 se absorbe mal en ratas donde como procianidina B3 no se absorbe en absoluto ⁽⁴⁾ ⁽⁶²⁾.

En un estudio sobre la biodisponibilidad de polifenoles de cacao en voluntarios sanos, demostraron que la composición de flavonoides (principalmente monómeros de flavanoles y dímeros) de polvo de cacao puede ser mejorada mediante el procesamiento de la materia prima y que estas muestras flavanol -

enriquecido conducen aumentos en los productos de cacao flavan-3-oles presentes en el plasma y orina, aumentando así su biodisponibilidad ⁽⁴⁾ ⁽⁶²⁾.

3.5 Fundamentos teóricos para las determinaciones fisicoquímicas.

3.5.1 Durante la fermentación.

3.5.1.2 Potencial de hidrógeno.

El pH indica la concentración de iones hidronio $[H_3O]^+$ presentes en la muestra. Los valores de pH varían de 0 a 14 en disolución acuosa, siendo ácidas las disoluciones con pH menores a 7 y alcalinas las que tienen pH mayores a 7 mientras que un pH igual a 7 indica la neutralidad de la disolución acuosa.

Se conoce que el pH de la masa durante la fermentación de cacao juega un papel muy importante en el desarrollo de sabor del chocolate, aunque al inicio el factor pH no es parte intrínseca de la constitución del cotiledón, este es adquirido durante el proceso de fermentación como consecuencia de la actividad microbiana en la pulpa y la duración de proceso. Se sabe también que el material genético influye en la fermentación ⁽⁴⁸⁾. La acidez lo aporta el contenido de ácidos orgánicos que aportan acidez al perfil sensorial del cacao, varía entre el 1.2% y 1.6%. Algunos, entre ellos el acético, cítrico y oxálico, se forman durante la fermentación. El pH de la pulpa, originalmente en la proximidades de 3.7, aumenta hasta 4.5-5.0 y el de los cotiledones en un principio con pH 7.0, disminuye hasta aproximadamente en pequeñas pilas de granos fermentados sobre hojas de llantén, el pH de la pulpa puede aumentar hasta 6-7. A pesar de ello, es difícil, sin embargo, explicar los aumentos observados en el pH de la pulpa hasta valores 6-7 con las concentraciones que se han señalado de ácido acético; posiblemente en la fermentación de pequeñas pilas de granos, la mayor

disponibilidad de oxígeno produzca una oxidación más completa del ácido acético (y probablemente de láctico) ^{(18) (20)}.

3.5.1.2 Temperatura.

La temperatura es una propiedad general de la materia que nos informa sobre el estado de agitación de sus partículas. La Teoría Cinético-Molecular nos dice que la materia está formada por partículas y que estas se encuentran en un estado de continua agitación. La temperatura de un sistema material es proporcional a la energía cinética media de sus partículas ⁽¹⁹⁾.

Durante la fermentación es importante evaluar la temperatura ya que esta tiene influencia significativa sobre el cacao. El aumento de la temperatura es producto de reacciones exotérmicas relacionadas con la aireación y la actividad microbiana. Durante los primeros días de fermentación, la temperatura de la masa varía entre 45 y 50 °C, una variación normal dentro de este proceso. Luego empieza a descender lentamente para volver a subir a 48 y 50 °C, luego de la primera remoción de la masa. El embrión en el interior de la almendra muere cuando la temperatura llega a 45 °C. Las temperaturas más altas se producen en la capa superior de la masa entre el segundo y tercer día a partir del inicio de la fermentación ^{(3) (18) (47)}.

3.5.1.3 Índice de fermentación.

Los polifenoles son compuestos que se encuentran en las semillas de cacao, se almacenan en las células pigmentadoras de los cotiledones como antocianinas y dependiendo de su cantidad estas células pueden llegar a tener una tonalidad purpura oscura. En general los polifenoles presentes en las semillas de cacao desempeñan un papel importante en la calidad de la semilla ya que interviene en

su apariencia, color, olor y sabor del cacao, un cacao con alta cantidad de polifenoles concede a la semilla astringencia y un sabor amargo muy acentuado.

En la fermentación estos compuestos disminuyen debido a reacciones de oxidación que se llevan a cabo en el proceso y la semilla de cacao fermentada se torna marrón oscuro. Teóricamente, la duración de la fermentación se relaciona con la cantidad de pigmentos color púrpura presentes en los granos frescos y que cuanto más intenso es dicho color más larga debe ser la fermentación, de allí que los granos criollos fermenten mucho más rápido que el tipo forastero de color púrpura ⁽²³⁾ ⁽³²⁾.

El índice de fermentación es un método que se utiliza para medir la presencia de polifenoles, un índice de fermentación de 1 o mayor de 1 indica que el cacao se encuentra debidamente fermentado y ha disminuido su contenido de polifenoles hasta en un 40% o menos con respecto a la cantidad inicial. El IF de la muestra se obtiene mediante el cálculo de la relación de absorbancia a 460 nm y la absorbancia a 530 nm. El análisis de antocianinas se realiza por espectrofotometría UV-Vis, ya que, debido a su estructura, las antocianinas presentan máximos de absorción tanto en la región visible como en la ultravioleta lo que resulta muy importante para la caracterización estructural de dichos compuestos. Sus espectros de absorción se caracterizan por tener dos bandas separadas una en la región visible entre 465 y 550 nm y otra más pequeña en el UV alrededor de 275 nm. Debido a esto el índice de fermentación se mide a estas dos longitudes de onda en la región visible ⁽³²⁾.

3.5.1.4 Prueba de Corte.

Después del proceso de secado se procede a examinar las semillas, realizando la prueba de corte que consiste en colocar alrededor de 100 granos del cacao

seco en una bandeja, se cortan longitudinalmente para apreciar las diferentes tonalidades en el color interno de los granos, así como las transformaciones físicas recibidas durante el proceso.

La prueba de corte es un instrumento subjetivo de evaluación que sirve para conocer el estado o grado de fermentación de las almendras, además de otras características físicas y sanitarias (tamaño, peso, porcentaje de humedad, contenido de material extraño, mohos, hongos e insectos) vinculadas con la calidad. En el cuadro N° 1, se establece la diferencia entre cacao seco bien fermentado y mal fermentado ⁽³⁾ (10).

Cuadro N° 1. Diferencia entre cacao seco bien fermentado y mal fermentado.

BIEN FERMENTADO	MAL FERMENTADO
	
Granos hinchados	Granos aplanados
La cáscara se separa	La cáscara no se separa fácilmente
Color externo marrón	Color externo pardo claro
Pardo rojizo	Blanquecino
Color interno marrón	Color interno violeta
Naturaliza quebradiza	Naturaliza compacta
Cotiledón agrietado	Cotiledón compacto
Sabor medianamente amargo	Sabor astringente
Aroma agradable	Aroma desagradable

3.5.2 Determinaciones fisicoquímicas en semillas fermentadas y no fermentadas.

En el cuadro N° 2, se exponen las determinaciones fisicoquímicas que se ejecutaron en semillas de *Theobroma cacao* L. (cacao) fermentadas y no fermentadas.

Cuadro N° 2. Determinaciones fisicoquímicas en semillas fermentadas y no fermentadas de *Theobroma cacao* L. (cacao).

DETERMINACION	METODO
Contenido de humedad	Gravimétrico
Contenido estimado de Polifenoles	Folin Ciocalteu
Identificación y cuantificación de (-)-Epicatequina y Procianidina B ₁ Y B ₂	Cromatografía Capa delgada y Espectrofotómetro UV-Visible

3.5.2.1 Contenido de humedad.

La determinación del contenido de humedad es un parámetro muy importante en la calidad del cacao fermentado, un exceso de humedad indica un insuficiente secado y provoca disminución en la calidad del producto ⁽³⁸⁾.

Existen varias razones por las cuales determinar la húmeda:

- El agua, si está presente por encima de ciertos niveles, facilita el desarrollo de microorganismos.
- La humedad debe ajustarse adecuadamente para facilitar la molienda.
- La cantidad de agua presente puede afectar la textura.
- La determinación del contenido en agua representa una vía sencilla para el control de la concentración en las distintas etapas de la fabricación de alimentos.

3.5.2.2 Contenido estimado de polifenoles totales.

Se determina la concentración de polifenoles por la formación de compuestos coloreados con el reactivo. La determinación se fundamenta midiendo la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del reactivo de Folin-Ciocalteu. Sin embargo, este reactivo no solo mide los fenoles totales, sino que reaccionará con cualquier sustancia reductora. En consecuencia, el reactivo

mide la capacidad reductora total de una muestra, no sólo el nivel de compuestos fenólicos.

Este reactivo forma parte del ensayo de proteínas de Lowry, y también reaccionará con algunos compuestos que contienen nitrógeno, como la hidroxilamina y la guanidina ⁽²⁶⁾ ⁽⁴²⁾.

3.5.2.3 Determinación cualitativa de (-)- epicatequina, procianidina B1 y B2 por cromatografía capa delgada.

El método consiste en preparar, sobre una placa de vidrio adecuada, una capa delgada de un producto, que puede ser absorbente como los que se emplean en la absorción cromatografía en columna, o un soporte inerte que contiene una fase acuosa, como la cromatografía de partición en columna. Las mezclas que han de ser separadas se disuelven en un disolvente apropiado y se depositan en forma de una serie de manchas sobre la capa delgada cerca de uno de los lados de la placa; después se sumerge en una mezcla de disolvente adecuado y el conjunto se dispone en una cámara hermética. El frente del disolvente recorre hacia arriba la capa delgada y, transcurrido el tiempo conveniente, se extrae la placa de la cámara, se señala el frente del disolvente, se deja evaporar este y se determina por un medio adecuado las posiciones de los compuestos separados ⁽⁴¹⁾.

Las catequinas y proantocianidinas reaccionan con aldehídos aromáticos de ácidos fuertes produciendo productos de reacción de color, el cual se puede emplear para el análisis cualitativo y cuantitativo utilizando ensayos colorimétricos y espectrofotométricos. Hasta la fecha la detección de polifenoles se ha realizado por cromatografía de capa delgada con el aldehído aromático vainillina ó 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, sin embargo, estudios recientes le han brindado un enfoque colorimétrico al 4-dimetilaminocinamaldehído

(DMACA), ya que originalmente se utilizaba como reactivo de detección de índoles ⁽²⁷⁾.

Actualmente DMACA es utilizado para determinar la ubicación de flavanoles en diferentes tejidos de plantas y se utiliza para mejorar la sensibilidad y selectividad en cromatografía capa delgada y análisis de HPLC. Estudios recientes se ha determinado que este reactivo es aplicable para detención de catequinas como: (-)- catequinas, (-)- epicatequina, (-)- epigallocatequina, procianidinas A1, B1, B2. Han identificado que DMACA tiene muchas ventajas sobre la vainillina, entre esta podemos mencionar que el DMACA utiliza concentración mucho menor que la vainillina, asimismo la coloración producida por el reactivo DMACA permanece estable por 1 hora, sin embargo, la coloración obtenida por la vainillina permanece estable por 10 minutos ⁽²⁷⁾.

Por tal motivo se estudió la separación de las manchas de (-)- epicatequina y procianidina B2 se realizó por cromatografía de capa delgada, utilizando como reactivo revelador 4- dimetilaminocinamaldehído (DMACA).

3.5.2.4 Determinación cuantitativa de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 por Espectrofotometría Ultravioleta Visible.

La Espectrofotometría Ultravioleta-Visible es un método óptimo de análisis, que tiene como principio de medición la absorción y/o transmisión de energía, radiante emitida por una fuente de luz que atraviesa una sustancia. El método es espectroscópico por que se basa en la medida de la intensidad y de la longitud de onda de la energía radiante ⁽²¹⁾. La región del espectro electromagnético que aplica es la luz Ultravioleta- Visible que va desde los 10 nm hasta los 780 nm ⁽¹⁴⁾.

Todas las disoluciones que presentan color absorben radiación electromagnética perteneciente al espectro visible, el cual puede dividirse en varias zonas según se muestra en el siguiente cuadro N° 3.

En el cuadro N° 3, la columna del "color" indica la porción del espectro que es absorbida, mientras que la correspondiente al "color complementario" indica la porción de radiación electromagnética que no absorbe la muestra y que por tanto es transmitida a través de ella y puede ser captada por el ojo humano (color de la disolución) ⁽¹⁴⁾.

Cuadro N° 3. Colores indicativos de longitudes de onda.

Longitud de onda λ (nm)	Color	Color complementario
380-435	violeta	Verde-amarillo
435-480	Azul	Amarillo
480-490	Azul-verdoso	Anaranjado
490-500	Verde-azulado	Rojo
500-560	Verde	Púrpura
560-595	Verde-amarillo	Violeta
580-595	Rojo	azul
595-650	Anaranjado	Azul-verdoso
650-780	Rojo	Verde-azulado

Estudios realizados por Glavnik, Simonovska y Vovk, la identificación de (-)-epicatequina y procianidina B2 es aplicable para Espectrofotometría Ultravioleta-Visible, sin embargo, el método se acopló a reacción colorimétrica obtenida por 4- dimetilaminocinamaldehído en la cromatografía de capa delgada ⁽²⁷⁾.

La cuantificación se realizó con una longitud de onda 366 nm en curvas de calibración lineal de los estándares de (-)- epicatequina, procianidina B1y B2. Para determinar si la muestra analizada cumple con el coeficiente de regresión lineal.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio.

- Transversal: el estudio se realizó durante el segundo semestre del año 2015, se estudiaron trece accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao).
- Experimental: debido a que se realizó un estudio antes y después del proceso de beneficiado, para determinar el contenido de humedad, contenido, estimado de polifenoles totales, contenido de (-)-epicatequina, procianidaina B1 y B2 por espectrofotometría Ultravioleta-Visible.
- Prospectivo: es el primer estudio que se lleva a cabo en el país en la identificación y cuantificación de los principales polifenoles presente en accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao), antes y después del beneficiado.

4.2 Investigación bibliográfica.

La recopilación de referencias bibliográficas se realizó en las siguientes bibliotecas:

- Central de la Universidad de El Salvador.
- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de Universidad de El Salvador.
- Facultad de Ingeniería y Arquitectura de Universidad de El Salvador.
- Hugo Lindo de la Universidad Dr. José Matías Delgado.
- Internet.

4.3 Investigación de campo.

- Universo: todos los frutos de cacao localizados en el Cultivar San José del Real de la Carrera en Usulután, El Salvador.
- Muestra: trece accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao), las cuales se clasificaron según los descriptores morfológicos enunciados en el cuadro

N° 4 y que fueron en los tipos forastero y trinitario, estudiadas antes y después del beneficiado.

4.3.1 Recolección de las muestras.

Las muestras se recolectaron en el Cultivar San José del Real de la Carrera localizado en el Cantón San José, Municipio de Jiquilisco, departamento de Usulután, El Salvador. Para la selección de las mazorcas se tomó en cuenta que estuvieran libres de plagas e imperfecciones y estado óptimo de maduración.

La identificación se realizó con el aval de la Dra. Vianney Castañeda (ver anexo N°10), identificados por cambios de coloración externa, que varía dependiendo del tipo. En el cuadro N° 4, se muestran las características descriptivas que se utilizaron para la recolección y selección de las mazorcas. ⁽²¹⁾ ⁽³⁸⁾

Cuadro N° 4. Características descriptivas de las mazorcas de cacao según su tipo. ⁽²¹⁾ ⁽³⁸⁾

Tipo	Forastero	Trinitario
Características		
Forma	Esferoide	Oblonga
Color	Verde cambia a amarillo.	Verde con morado o rojos cambia a amarillo con rojo o anaranjadas.
Constricción basal	Ausente	Pronunciada
Ápice	Mamiforme	Intermedia
Rugosidad de la superficie	Ligera	Intermedia
Profundidad de los surcos	Superficial	Intermedia
Arreglo de semillas	Ordenado	Intermedia

Ya identificadas las mazorcas se depositaron, en bolsas plásticas rotuladas, posteriormente, se transportaron al laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), donde se realizaron los análisis posteriores. En el laboratorio, se retiraron de las bolsas para evitar acumulación de humedad.

4.4 Parte experimental.

Durante el proceso de fermentación se monitorearon las siguientes determinaciones fisicoquímicas: Temperatura, pH e índice de fermentación. Para las semillas fermentadas y no fermentadas se determinó el contenido de humedad, contenido estimado de polifenoles totales por duplicado, la identificación y cuantificación de (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2 se realizaron por triplicado. Para cada ensayo se promediaron los valores obtenidos tanto en base húmeda (BH) como en base seca (BS). El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

4.4.1 Tratamiento de las semillas de cacao no fermentadas.

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquema en anexo N° 2):

- Lavar las mazorcas para eliminar el polvo.
- Determinar el peso de las mazorcas de cacao, peso de mucílago-semilla y peso de corteza por cada muestra.
- Eliminar la pulpa con agua y secar.
- Secar en estufa a 55°C por 2 días hasta obtener una semilla libre de humedad. Tomando una o dos semillas, si al oprimirlo crujen, es señal de que están en el grado de sequedad requerido.
- Triturar con mortero y pistilo las semillas y luego tamizarlas.
- Desengrasar las muestras por el método de Soxhlet (ver numeral 4.4.2). ^{(16) (49)}
- Almacenar las muestras en un lugar fresco y seco para su conservación y hasta el momento del análisis.

4.4.2 Desengrasado por el método de soxhlet. ^{(16) (47)}

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquema en anexo N° 3):

- Triturar con mortero y pistilo las semillas.
- Pesar 5.0 g de muestra y luego colocar en el cartucho de extracción.
- Colocar el cartucho en el equipo Soxhlet (ver anexo 3).
- Agregar al balón de 100.0 mL de éter de petróleo.
- Calentar hasta su punto de ebullición por 6 horas.
- Retirar el cartucho y se colocar en un vaso precipitado de 100 mL.
- Evaporar en baño maría en cámara extractora de gases hasta que se elimine el olor a solvente.

4.4.3 Tratamiento de las semillas de cacao fermentadas.

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquema en anexo N° 2):

- Lavar las mazorcas para eliminar el polvo.
- Determinar el peso de mazorcas de cacao, peso de mucílago-semilla y peso de corteza por cada muestra.
- Colocar las semillas de cacao en los fermentadores plásticos con capacidad de medio galón.
- Agregar agua destilada en cantidad suficiente para cubrir las semillas de cacao.
- Colocar los depósitos en un baño maría con temperatura controlada a 45°C y fermentar en un período de 5 días.
- Remover y monitorear la temperatura, pH e índice de fermentación cada 24 horas.
- Eliminar la pulpa con agua y colocar las semillas en papel filtro.
- Secar en estufa a 55°C por dos días.

- Realizar la prueba de corte (ver anexo N° 4)
- Triturar con mortero y pistilo las semillas y luego tamizarlas.
- Desengrasar las muestras por el método de Soxhlet (ver anexo N° 3). ^{(16) (49)}
- Almacenar las muestras en un lugar fresco y seco para su conservación hasta el momento del análisis.

4.4.4 Parámetros fisicoquímicos durante el proceso de fermentación.

4.4.4.1 Medición de temperatura y pH.

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquema en anexo N° 2): Utilizando un pH-metro, tomar cada 24 horas el pH y la temperatura de las muestras de cacao en la superficie, centro y fondo del recipiente fermentador. Sacar el promedio de las 3 lecturas.

4.4.4.2 Índice de fermentación (IF) ⁽³²⁾.

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquemas en anexo N° 2):

- Tomar entre 1 a 2 granos de cacao fermentado de cada mezcla a partir del día 1 hasta el día 5.
- Lavar para eliminar el exceso de la pulpa y secar el exceso de humedad.
- Colocar en estufa a temperatura de 55°C por 24 horas.
- Triturar con mortero y pistilo las semillas y luego tamizarlas.
- Pesar 0.50 g de cacao de cada una de las muestras.
- Colocar en balón volumétrico de 50.0 mL.
- Llevar a volumen poco a poco con la mezcla metanol – HCl (97:3).
- Refrigerar por 16 horas a una temperatura 8°C.
- Filtrar y leer en espectrofotómetro a 460 nm y 530 nm en absorbancia.

- Calcular la relación entre ambas absorbancias.

Cálculos y expresión de resultados.

Se calculó el índice de fermentación de las absorbancias de la fracción II entre la absorbancia de la fracción I ⁽³²⁾, según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de fermentación} = \frac{\text{Fracción II}}{\text{Fracción I}}$$

Dónde:

Fracción I: Absorbancia a 530 nm

Fracción II: Absorbancia a 460 nm

4.4.5 Determinaciones fisicoquímicas en semillas secas fermentadas y no fermentadas.

4.4.5.1 Determinación del contenido de humedad. ^{(30) (42)}

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquema en anexo N° 2):

- Colocar las cajas de aluminio previamente limpias en la estufa a 110°C por un periodo 30 minutos.
- Colocar en el desecador por 30 minutos.
- Pesar la caja de aluminio en balanza analítica y anotar el peso inicial.
- Pesar 1 g de muestra homogenizada y anotar el peso.
- Colocar las cajas con las muestras en estufa por 1 hora a 110°C.
- Retirar y enfriar por 30 min en un desecador.
- Pesar las cajas de aluminio más la muestra y anotar los pesos.

- Seguir con el procedimiento de secado, enfriado y pesado hasta obtener un peso constante.

Cálculos y expresión de resultados.

Se calculó el contenido de humedad con el peso perdido de la muestra durante el secado según la siguiente fórmula ⁽³⁰⁾ ⁽⁴²⁾:

Dónde:

Peso de muestra: (Peso _{caja con muestra antes de secar}) – (Peso _{caja vacía})

Pérdida de peso: (Peso _{caja con muestra antes de secar}) – (Peso _{caja con muestra después de secar})

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Pérdida de peso}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ de materia seca} = 100 - \% \text{ de humedad.}$$

4.4.5.2 Determinación del contenido estimado de polifenoles totales. ⁽⁴⁰⁾ ⁽⁵⁰⁾

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquema en anexo N° 2):

- Pesar 1.0 g de cada muestra previamente desengrasadas.
- Colocar en un matraz de 200.0 mL.
- Adicionar 100.0 mL de etanol 70 % y colocar en el reflujo por 7 horas.
- Filtrar utilizando papel filtro y colocar en un balón volumétrico de 200.0 mL.
- Llevar a volumen con etanol al 70%.
- Tomar 0.3 mL del extracto con una pipeta y colocar en un tubo de ensayo.
- Adicionar 2.25 mL del reactivo de Folin ciocalteu previamente diluido,
- Agitar y dejar en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- Agregar 2.25 mL de solución de carbonato de sodio al 2%, agitar y reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Leer a una longitud de onda de 750 nm, utilizar como blanco etanol 70%.
- El contenido de polifenoles se determinó mediante el empleo de la curva estándar con concentraciones de catequina (10-100 µg de catequina/ mL) (ver anexo N° 8).

Nota: la solución diluida del reactivo de Folin Ciocalteu fue preparada diluyendo 1.0 mL del reactivo en 9.0 mL de agua desmineralizada.

Cálculos y expresión de resultados:

Se determinó la concentración de la curva de concentraciones de catequina a través de la sustitución en la ecuación obtenida por regresión lineal, utilizando una hoja electrónica de Excel.

$$Y = mX + b$$

Despejando la ecuación en función de "x" y sustituyendo por términos:

$$x = \frac{(y-b)}{m}$$

$$\text{concentración } (\mu\text{g}) = \frac{(\text{Abs}-b)}{m} \times \text{FD}$$

$$\text{concentración } (\text{g}) = \frac{\text{concentración } (\mu\text{g})}{1,000,000}$$

Dónde:

y = Es la absorbancia

x = Es la concentración

m = Es la pendiente

b = Es la ordenada de origen

Abs= Es la absorbancia de la muestra

FD= Es el factor de dilución.

El estimado de polifenoles en la muestra se calculó de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de polifenoles en base húmeda} = \frac{\text{Concentración (g)} \times 100}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

$$\% \text{ de polifenoles en base seca} = \frac{\% \text{ polifenoles en base húmeda}}{\% \text{ materia seca}} \times 100$$

4.4.5.3 Identificación de (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2 en extractos de semillas secas de cacao no fermentadas y fermentadas. ⁽²⁷⁾

Método: cromatografía de capa delgada.

Fase estacionaria: placas sílica gel (20 x 10 cm).

Fase móvil: n-propanol, agua y ácido acético (4:2:1) ver anexo N° 8.

Reactivo revelador: 4- dimetilaminocinamaldehído (DMACA) ver anexo N° 8.

Preparación de las soluciones madres de los estándares.

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquema en anexo N° 2):

- Solución madre para los estándares (-)-epicatequina y procianidina B₁ y B₂: pesar 1.0 mg de cada estándar y diluirlo con metanol hasta obtener una concentración de 0.5 mg/mL.
- Después de prepararlas se dejaron en refrigeración a 4°C por un día.

Preparación de extractos.

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquema en anexo N° 2):

- Pesar 0.02 g de semillas secas de cacao y desengrasadas
- Disolver en 2.0 mL de metanol al 70%.
- Agitar las muestras a 2700 rpm por 1 minuto y luego, utilizando vortex.
- Centrifugar a una frecuencia de 4000 rpm por 5 minutos.
- Filtrar el sobrenadante por una membrana de 0.45µm.
- Almacenar el filtrado en refrigeración hasta el momento del análisis.

Cromatografía capa delgada:

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver esquema en anexo N° 2):

- Saturar la cámara añadiendo 40 mL de fase móvil.
- Marcar en los extremos de la placa 1.0 cm en el borde inferior de ella utilizando un lápiz y una regla.
- Inyectar gota a gota un volumen de 10 µL de cada extracto a la altura marcada en los extremos y por cada punto de aplicación, dejar un espacio de 1.5 cm de distancia entre ellas.
- Depositar las placas en las cámaras previamente saturadas.
- Dejar que el eluyente recorra 2/3 parte de la placa.
- Retirar las placas con pinzas, teniendo cuidado no dañarla, marcar con un lápiz la altura alcanzada por la fase móvil.
- Secar la placa con aire caliente por 3 minutos.

- Rociar las placas con el reactivo revelador DMACA.
- Secar con aire caliente durante 3 minutos.
- Marcar los contornos de las manchas de cada muestra y medir las distancias de migración con una regla y se calculó los Rf obtenidos de cada muestra.

Nota: cada extracto se realizó por triplicado y el mismo proceso se hizo para las soluciones de los estándares.

Para calcular el Rf se aplicó la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

4.4.5.4 Cuantificación de (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2 extractos de semillas secas de cacao no fermentadas y fermentadas. ⁽²⁷⁾

Curvas de estándares de (-)- epicatequina y procianidina B1 y B2:

Realizar una curva de concentraciones conocidas, se partió de una solución madre de concentración de 0.5 mg/mL de (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2, posteriormente se prepararon las soluciones de trabajo de concentración de 10-100 µg/mL en metanol (ver anexo N° 8). Refrigeraron a 4°C por un día.

Material, equipo y reactivos (ver anexo N° 9).

Procedimiento (ver anexo N° 2):

- Recortar las manchas de cada extracto obtenidas de las placas.
- Raspar la mancha con una micro-espátula sobre un papel.
- Colocar en un tubo de ensayo con rosca con capacidad de 2 mL.
- Llevar a volumen de 2 mL con metanol.
- Agitar en un vortex por 1 minuto y dejar reposar por 3 minutos.

- Tomar el sobrenadante para las lecturas.
- Utilizando el espectrofotómetro leer las muestras a una longitud de onda de 366 nm.
- Utilizar como blanco sílica + metanol.
- Determinar la concentración de (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2, en cada muestra mediante el empleo de las curvas de calibración de los estándares

Nota: la curva de calibración de los estándares se realizó de igual forma como se prepararon los extractos de cada muestra y se realizó por cada proceso por triplicado.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

5.1 Clasificación de las muestras.

En el cultivar San José del Real de La Carrera se recolectaron entre 2 a 6 mazorcas de trece accesiones de cacao, estos se encontraban sanos y frescos; se procedió con la clasificación de las diferentes accesiones en tipo forastero y trinitario. Posteriormente se distribuyeron aquellas para el proceso de semillas de cacao no fermentadas y para el proceso de semillas fermentadas, estas se dejaron en el laboratorio, a temperatura ambiente, cubiertos con papel filtro durante 4 días, antes de iniciar el proceso de fermentación.





La clasificación de las accesiones se basó en los criterios determinados por los descriptores estándares para cacao y con el aval de la Dra. Vianney Castañeda (ver anexo N° 10). ⁽²¹⁾ ⁽⁴²⁾

En el siguiente cuadro se describe la clasificación.





Cuadro N° 5. Clasificación del cacao según descriptores morfológicos. ⁽²¹⁾ ⁽⁴²⁾

N° de mx.	Grupo genético	Muestra de frutos de cacaos	Descriptores morfológicos
1	Forastero		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: verde. - Constricción basal: ausente. - Ápice: apenzonado. - Rugosidad de la superficie: ligera. - Profundidad de los surcos: superficial. - Arreglo de semilla: ordenado. - Color predominante de la semilla: morado.





Cuadro N° 5. Continuación.

N° de mx.	Grupo genético	Muestra de frutos de cacaos	Descriptorios morfológicos
2	Forastero		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: amarillo. - Constricción basal: ausente. - Ápice: obtuso. - Rugosidad de la superficie: intermedia. - Profundidad de los surcos: intermedia. - Arreglo de semilla: ordenado. - Color predominante de la semilla: morado.
7	Forastero		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: amarillo. - Constricción basal: ligero. - Ápice: agudo. - Rugosidad de la superficie: intermedia. - Profundidad de los surcos: intermedia. - Arreglo de semilla: ordenado. - Color predominante de la semilla: morado.
8	Forastero		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: amarillo. - Constricción basal: ligero. - Ápice: agudo. - Rugosidad de la superficie: intermedia. - Profundidad de los surcos: intermedia. - Arreglo de semilla: intermedio. - Color predominante de la semilla: morado.
9	Forastero		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: amarillo. - Constricción basal: ausente. - Ápice: agudo. - Rugosidad de la superficie: ligera. - Profundidad de los surcos: superficial. - Arreglo de semilla: intermedio. - Color predominante de la semilla: morado.

Cuadro N° 5. Continuación.

N° de mx.	Grupo genético	Muestra de frutos de cacaos	Descriptorios morfológicos
10	Forastero		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: verde. - Constricción basal: ligero. - Ápice: agudo. - Rugosidad de la superficie: ausente. - Profundidad de los surcos: superficial. - Arreglo de semilla: ordenado. - Color predominante de la semilla: morado.
12	Forastero		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: ovoide. - Color: amarillo. - Constricción basal: ligero. - Ápice: agudo. - Rugosidad de la superficie: ligera. - Profundidad de los surcos: ligero. - Arreglo de semilla: intermedio. - Color predominante de la semilla: morado.
13	Forastero		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: verde. - Constricción basal: intermedio. - Ápice: atenuado. - Rugosidad de la superficie: fuerte. - Profundidad de los surcos: intermedio. - Arreglo de semilla: intermedio. - Color predominante de la semilla: morado.
3	Trinitario		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: rojo. - Constricción basal: ausente. - Ápice: agudo. - Rugosidad de la superficie: intermedia. - Profundidad de los surcos: intermedia. - Arreglo de semilla: intermedio. - Color predominante de la semilla: café claro.

Cuadro N° 5. Continuación.

N° de mx.	Grupo genético	Muestra de frutos de cacaos	Descriptorios morfológicos
4	Trinitario		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: rojo. - Constricción basal: ausente. - Ápice: dentado. - Rugosidad de la superficie: ligera. - Profundidad de los surcos: intermedia. - Arreglo de semilla: intermedio. - Color predominante de la semilla: café claro.
5	Trinitario		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: ovoide. - Color: verde. - Constricción basal: ausente. - Ápice: agudo. - Rugosidad de la superficie: profunda. - Profundidad de los surcos: desordenado. - Arreglo de semilla: ordenado. - Color predominante de la semilla: blanco-violeta.
6	Trinitario		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: ovoide. - Color: amarillo. - Constricción basal: ausente. - Ápice: agudo. - Rugosidad de la superficie: ligera. - Profundidad de los surcos: superficial. - Arreglo de semilla: ordenado. - Color predominante de la semilla: blancos y café.
11	Trinitario		<ul style="list-style-type: none"> - Forma: oblonga. - Color: rojo. - Constricción basal: intermedio - Ápice: atenuado. - Rugosidad de la superficie: intermedia. - Profundidad de los surcos: intermedio. - Arreglo de semilla: ordenado. - Color predominante de la semilla: violeta.

De acuerdo con las características morfológicas, las mazorcas se clasificaron en dos grupos correspondiendo el 62% de las muestras a cacao forastero (muestras

1, 2, 7, 8, 9, 10, 12 y 13) y el 38% a cacao trinitario (muestras 3, 4, 5, 6 y 11). En la siguiente tabla se detalla las cantidades de mazorcas cosechadas y la cantidad utilizada para los análisis en semillas de cacao fermentadas y no fermentadas.

Tabla N° 1. Mazorcas cosechadas para los procesos de semillas fermentadas y no fermentadas.

Grupo genético	N° de Mx.	Cantidad de muestras cosechadas	Cantidad de muestras para semillas no fermentadas	Cantidad de muestras para semillas fermentadas	Promedio medición de longitud (Cm.)	Cantidad de mazorcas con <i>Monilia sp.</i> No utilizadas
Forastero	1	6	3	2	20.6	1
	2	2	1	1	20.4	-
	7	2	1	0	20.4	1
	8	2	1	1	25.3	-
	9	5	2	3	12.9	-
	10	2	1	1	24.1	-
	12	2	1	1	16.0	-
Trinitario	13	3	1	1	20.2	1
	3	4	1	1	18.9	2
	4	4	2	1	17.8	1
	5	3	0	1	15.6	-
	6	4	2	2	16.3	-
	11	3	1	2	16.0	-
	Total	42	17	17		

La muestra N° 5 se reporta como (cero) ya que no se utilizó en el ensayo en semillas no fermentadas, ya que, de las 3 muestras cosechadas, una se encontró sobremadura, y otra inmadura, por lo que solo se utilizó una mazorca. De la muestra 7 se cosecharon 2 mazorcas y solo se tomó una para el proceso de semillas no fermentadas debido a que una de ellas presentó *Monilia*. Las mazorcas que presentaron *Monilia sp.* (1, 3, 4, 7 y 13) se descartaron para evitar interferencias en las mediciones y contaminación de las demás muestras. El tamaño de las mazorcas osciló entre 12.9 y 25.3 cm. La variación en la longitud depende del tipo de cacao, siendo el genotipo forastero el que presentó mayor longitud (20 cm).

Entre las accesiones cosechadas el tipo forastero presentó mayor longitud con respecto al tipo trinitario, entre las muestras recolectadas. La diferencia en las mazorcas varía según el cultivar y las condiciones agroecológicas del mismo. ^{(2)/(6)}

5.1.1 Determinación de peso de mucílago.

Tabla N° 2. Peso de mucílago-semilla de las muestras de cacao utilizadas para el análisis en semillas no fermentadas y fermentadas.

MAZORCAS NO FERMENTADAS					MAZORCAS FERMENTADAS			
Cacao forastero								
N° de Mx.	Cantidad de mx.	Peso de mazorca (g)	Peso de mucílago-semilla (g)	Peso de corteza (g)	Cantidad de mx.	Peso de mazorca (g)	Peso de mucílago-semilla (g)	Peso de corteza (g)
1	3	454.4	154.7	299.7	2	568.3	172.2	396.1
		531.6	141.6	390.0				
		537.3	151.0	386.3				
2	1	581.7	154.7	427.0	1	528.4	177.3	351.1
7	1	635.0	159.0	476.0	0	-	-	-
8	1	698.8	142.5	556.3	1	706.5	174.2	532.3
9	2	500.3	118.0	382.3	3	455.3	98.5	356.8
		395.8	119.5	276.3		356.4	116.3	240.1
						530.3	158.7	371.6
10	1	876.2	156.6	719.6	1	1041.2	230.7	810.5
12	1	466.0	124.2	341.8	1	341.9	95.4	246.5
13	1	471.2	111.0	360.2	1	412.9	115.1	297.8
Cacao trinitario								
3	1	623.1	162.4	460.7	1	796.2	163.5	632.7
4	2	208.0	78.1	129.9	1	260.1	89.5	170.6
		377.4	130.1	247.3				
5	0	-	-	-	1	422.4	139.4	283.0
6	2	446.0	118.8	327.2	2	341.1	83.3	257.8
		337.7	99.6	238.1		444.2	114.1	330.1
11	1	341.7	135.5	206.2	2	404.2	93.2	311.0
						376.2	87.5	288.7
Promedio		499.0	132.8	366.2	Promedio	501.3	130.7	370.6
Desviación estándar		156.7	23.5	140.0	Desviación estándar	194.1	42.0	158.6

En la tabla N° 2, se detalla el peso promedio de mucílago para las semillas no fermentadas (132.8 g) y para las semillas fermentadas (130.7 g).

Al comparar los resultados la variación es relativamente baja para ambos promedios en semillas fermentadas y no fermentadas; debido a que el tamaño de la mazorca no era igual para todas las muestras y la cantidad y tamaño de semillas de cada mazorca era diferente. Además, el tiempo de almacenamiento en la mazorca provocó una disminución en el volumen en la pulpa debido a la evaporación del agua en las semillas fermentadas.

También se observó que las muestras de cacao forastero son de mayor peso mucílago-semilla con respecto a las de cacao trinitario. El peso de la semilla depende del tamaño de la mazorca y puede ser influenciado por el tipo de cacao o las influencias agroecológicas. ⁽⁶⁾ (20)

5.2 Fermentación

Las mediciones realizadas durante los cinco días de fermentación fueron: pH, temperatura e índice de fermentación. Para el proceso de fermentación se analizaron doce accesiones debido a la accesión N° 7, presentó *Monilia sp.* Y se descartó para evitar la contaminación de las demás muestras.

5.2.1 Medición de pH.

Se determinó el pH en cada una de las doce muestras estudiadas en este análisis; midiéndose en la parte inferior, central y superior del recipiente cada 24 horas, durante los 5 días de fermentación. En la tabla N° 3 se muestran los datos de pH obtenidos de cada una de las muestras.

Tabla N° 3. Promedios de pH en semillas fermentadas.

tipo	Cacao forastero							prom.	dsv	Cacao trinitario					Prom.	DSV
Mx.	1	2	8	9	10	12	13			3	4	5	6	11		
N° de días																
1	4.5	4.7	4.9	4.1	4.6	4.9	4.4	4.6	0.3	4.5	3.9	3.9	4.1	3.8	4.0	0.3
2	4.5	4.8	4.8	3.9	4.9	5.3	4.7	4.7	0.4	4.6	4.2	4.7	4.4	3.8	4.3	0.4
3	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	0.0	7.0	7.0	7.0	4.4	7.0	6.5	1.2
4	6.9	6.9	7.0	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	0.0	6.9	6.9	6.6	6.9	6.9	6.8	0.1
5	6.9	6.9	7.0	7.0	6.9	6.9	6.9	6.9	0.0	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	0.0

Muestra N° 7 no se fermento.

En el primer día las muestras presentaron valores bajos de pH, 3.8 a 4.9, presentando la muestra 11 (trinitario) el valor más bajo y la muestra 12 (forastero) el valor más alto. Los valores obtenidos en el primer y segundo día no presentan mucha variación, ya que se encuentran dentro del rango de pH inicial de la pulpa (3,7 a 5.0) ⁽¹⁸⁾. A partir del tercer día, hay un incremento en el pH en la mayoría de las muestras con un valor de 7.0, excepto la muestra 6 con un valor de 4.4. A partir del cuarto día las muestras mantienen a un pH constante, finalizando la fermentación con un pH de 6.9.

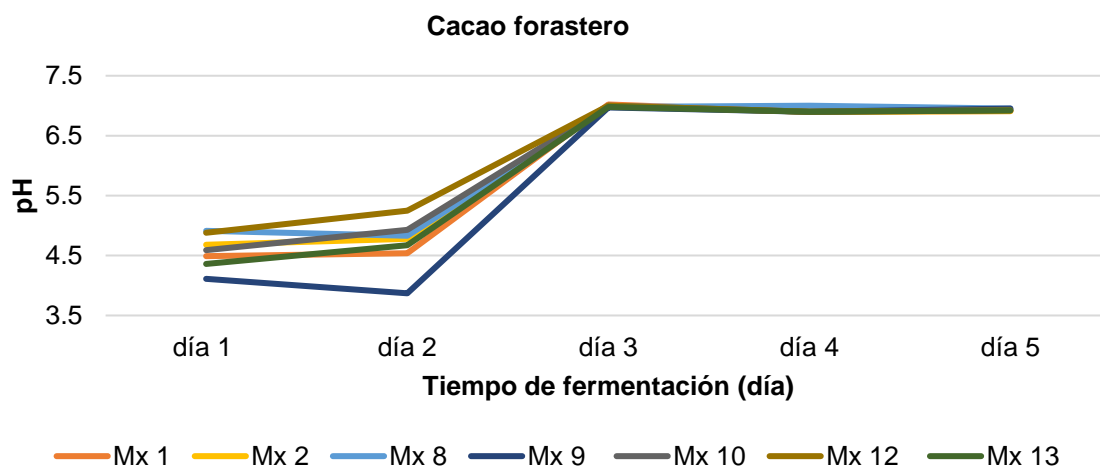


Figura N° 6. pH en semillas fermentadas de cacao forastero.

La figura N° 6 se observan en la gráfica los resultados de las muestras de cacaos forastero; en el primer día de fermentación se obtuvieron valores de pH entre 3.8 - 4.9, en el segundo día presentaron un leve aumento y a partir del tercer día un incremento en el pH (7.0).

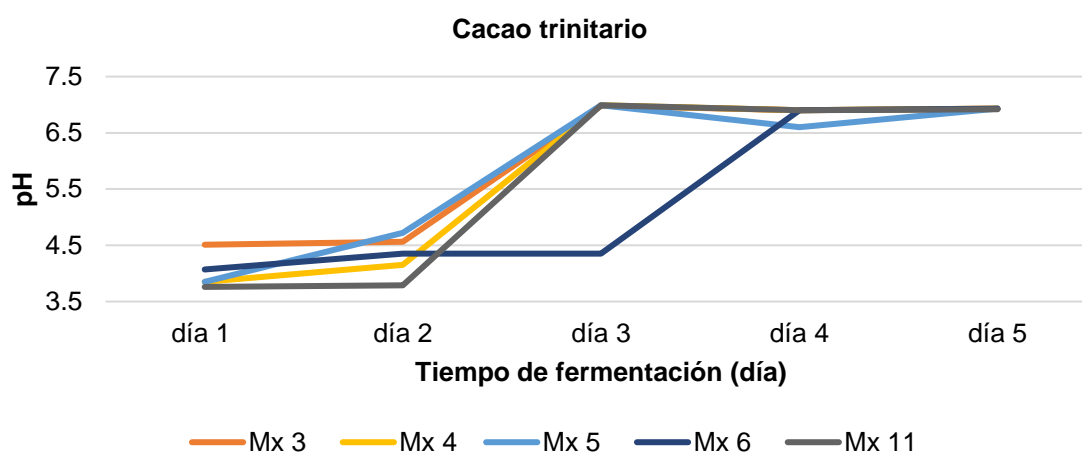


Figura N° 7. pH en semillas fermentadas de cacao trinitario.

En la figura N° 7, se observa que las muestras de cacao trinitario mostraron un comportamiento similar a los cacaos forastero obteniendo en el primer día valores entre 3.9 - 4.5, y a partir del tercer día un incremento en el pH (7.0). La muestra 6 presentó valores muy diferentes en los primeros tres días, probablemente a sus características genotípicas en sus semillas, las cuales se desconocen debido a que la investigación no llegó a nivel molecular.

El nivel bajo pH de los primeros días se debe a la acidez producida por la degradación de azúcares simples de la pulpa en etanol y anhídrido carbónico, mientras se metaboliza el ácido cítrico y los valores elevados de pH a partir del tercer día probablemente por el tiempo de almacenamiento en la mazorca durante 4 días (pH de 6.0-7.0), debido a la disminución del volumen de la pulpa por la evaporación del agua y la inversión de la sacarosa, lo que a su vez ocasiona una disminución en el azúcar total, influyendo en la cantidad de

bacterias productoras de ácido reduciendo la producción durante la fermentación y posiblemente la mayor disponibilidad de oxígeno produzca una oxidación más completa del ácido acético (y probablemente del láctico). ^{(18) (20)}

5.2.2 Medición de temperatura.

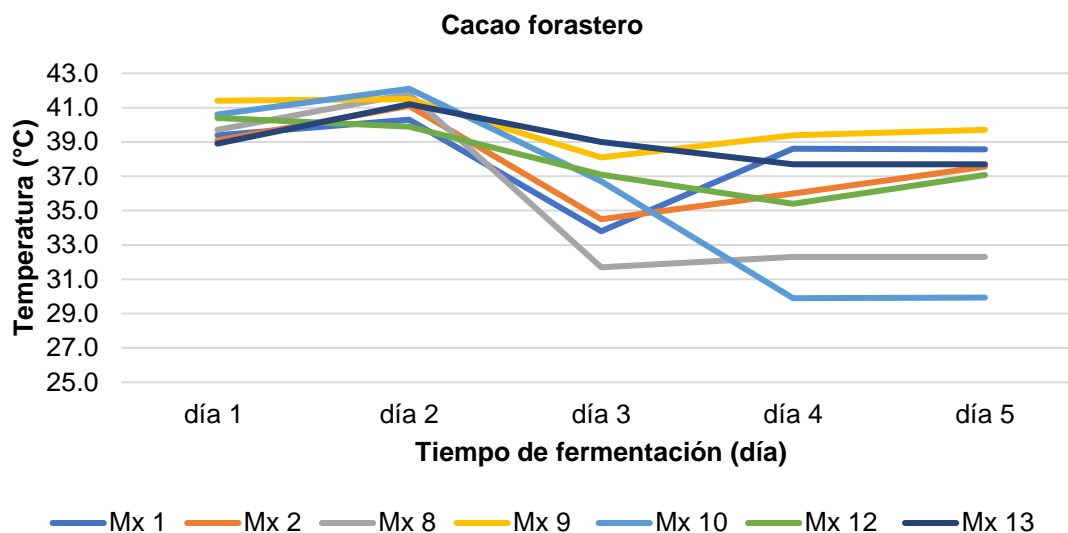
En la tabla N° 4 y figura N° 8, se presentan los promedios de temperatura en cada una de las doce muestras estudiadas durante los 5 días de fermentación.

Tabla N° 4. Promedio de temperatura (°C) en semillas fermentadas de las accesiones de cacao.

Tipo de cacao	Días	1	2	3	4	5
	Muestras					
Forastero	1	39.4	40.3	33.8	38.6	38.5
	2	39.1	41.1	34.5	36.0	37.5
	8	39.7	41.8	31.7	32.3	32.3
	9	41.4	41.5	38.1	39.4	39.7
	10	40.6	42.1	36.7	29.9	29.9
	12	40.4	39.9	37.1	35.4	37.7
	13	38.9	41.2	39.0	37.7	37.7
	Promedio	39.9	41.1	35.8	35.6	36.2
	Desviación estándar	0.9	0.8	2.6	3.5	3.6
Trinitario	3	35.7	39.2	37.8	37.9	37.8
	4	40.1	40.0	34.2	34.2	34.1
	5	38.9	40.7	30.4	31.8	31.8
	6	40.1	41.9	33.8	36.5	26.4
	11	40.1	41.3	37.6	39.2	37.0
	Promedio	39.0	40.6	34.8	35.9	33.4
	Desviación estándar	2.1	1.1	3.0	2.7	4.8

Muestra N° 7 no se fermento.

a.



b.

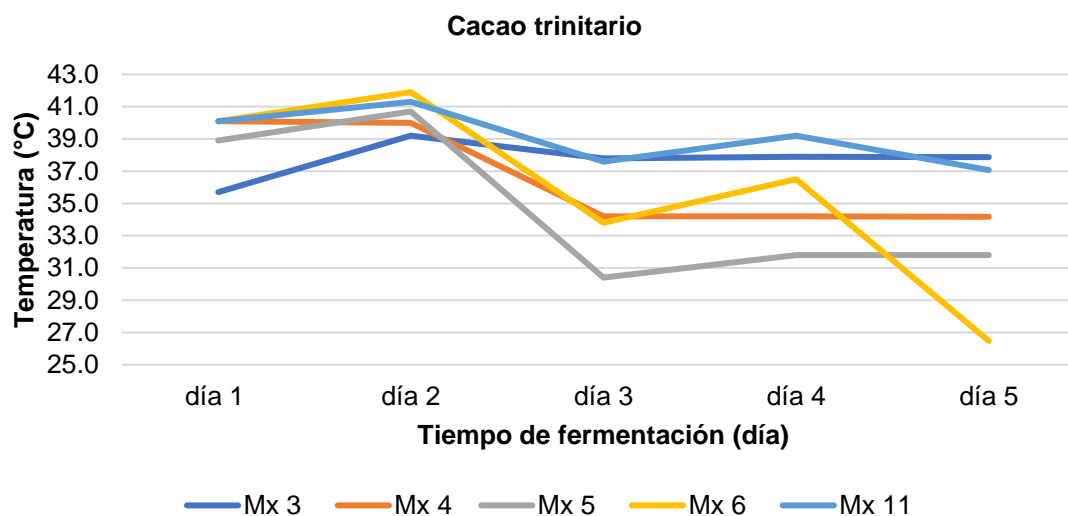


Figura N° 8. Temperatura en semillas fermentadas de cacao forastero (a) y cacao trinitario (b).

Se observa en el día 1 y 2, se alcanzó el nivel más alto de temperatura durante la fermentación, siendo 42.1 °C la temperatura superior alcanzada de la muestra 10; este incremento se debe al aumento de las bacterias aerobias, que favorecen el proceso exotérmico en la fermentación, elevando así la temperatura y

transformando del etanol en ácido acético esta reacción es favorable por el oxígeno en el medio. ⁽¹⁸⁾ ⁽²⁰⁾ Además podría atribuirse a la pérdida de agua durante el tiempo de almacenamiento que estuvieron las mazorcas lo cual favorece a la elevación de la temperatura durante la fermentación. Estos resultados corroboran con lo señalado por otros investigadores quienes señalan beneficioso el incremento de la temperatura durante el proceso, ya que es uno de los factores determinantes para la muerte del embrión y del inicio de las reacciones enzimáticas en los tejidos del cotiledón, dando origen a los precursores de sabor y aroma a chocolate. ⁽²⁰⁾

También observamos que a partir del tercer día la temperatura comenzó a disminuir, sin embargo, se puede observar que durante todo el proceso la temperatura se mantuvo estable sin importar el tipo de cacao. Otros estudios reportan que durante la fermentación debe alcanzar los 40-50 °C durante los primeros días dependiendo del aire aportado a la masa en fermentación; después de aproximadamente 3-5 días la temperatura comienza a descender, probablemente esto es debido a que el sustrato se encontraba agotado y no permitió el aumento en el crecimiento de bacterias aerobias. ⁽²⁾ ⁽¹⁸⁾

5.2.3 Determinación del índice de fermentación (IF). ⁽³²⁾

El índice de fermentación mide los polifenoles presentes en las semillas de cacao, estos se encuentran en forma de flavonoides entre ellos las antocianinas, las cuales se hidrolizan durante el proceso de fermentación disminuyendo así su contenido en la semilla de cacao, y es esta la disminución de antocianinas la que se miden en el índice de fermentación, por ello a mayor intensidad de color mayor cantidad de antocianinas y viceversa.

Se midió el índice de fermentación a partir del primer al quinto día de fermentación. En la figura N°5 se presentan los promedios de las mediciones para cada muestra.

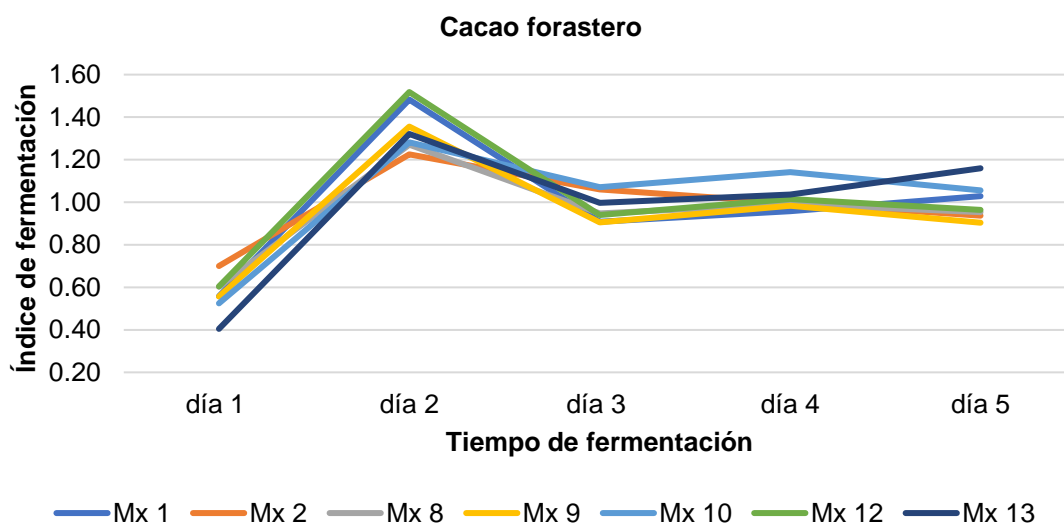
Tabla N° 5. Promedio de índice de fermentación en semillas fermentadas de las accesiones de cacao.

Tipo de cacao	Muestras	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
Forastero	1	0.56	1.48	0.91	0.96	1.03
	2	0.70	1.23	1.06	1.00	0.94
	8	0.60	1.27	0.95	0.99	0.95
	9	0.56	1.36	0.90	0.98	0.90
	10	0.52	1.28	1.07	1.14	1.06
	12	0.60	1.52	0.94	1.02	0.96
	13	0.40	1.32	1.00	1.04	1.16
	Promedio	0.56	1.35	0.98	1.02	1.00
Desviación estándar	0.09	0.11	0.07	0.06	0.09	
Trinitario	3	0.60	1.20	0.85	1.04	1.04
	4	0.58	1.50	0.80	1.08	1.08
	5	0.57	1.42	0.90	0.83	0.90
	6	0.75	1.28	0.94	1.11	0.97
	11	0.58	1.28	0.94	1.11	0.97
	Promedio	0.62	1.34	0.89	1.03	0.99
Desviación estándar	0.08	0.12	0.06	0.12	0.07	

Muestra N° 7 no se fermento.

En el primer día se obtuvieron valores de índice de fermentación menores a 1, en el día 2 todas las muestras obtuvieron valores arriba de 1 (1.20-1.52), que luego vuelve a bajar a valores entre 0.80 a 1.07, Manteniéndose en valores cercanos a 1.0 hasta el final de la fermentación. Según los promedios obtenidos las muestras se deben fermentar entre 4 a 5 días para garantizar que el proceso de fermentación se lleve a cabo adecuadamente y obtener un índice de fermentación con valores 1.0 o mayor. Además, el tiempo de almacenamiento antes de la fermentación influyó significativamente en la calidad fermentativa y en la apariencia de las semillas ya que el tiempo de almacenamiento en mazorcas permite índices de fermentación de 1.0 a partir del día 2 de fermentación, esto se podría utilizar para reducir el tiempo de fermentación de las semillas de cacao.

A.



B.

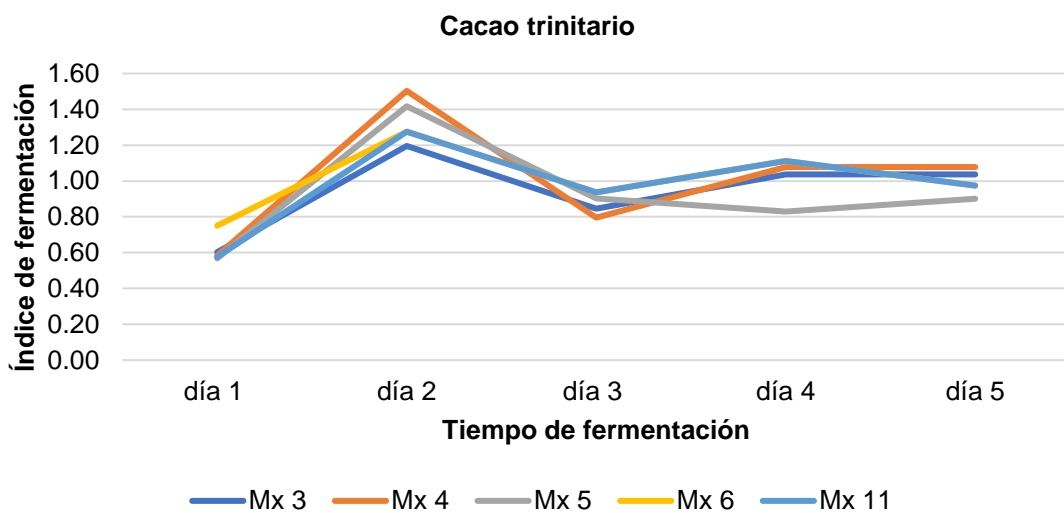


Figura N° 9. Índice de fermentación en semillas fermentadas de cacao forastero (A) y trinitario (B).

En la figura N° 9, se observa que el tipo forastero obtuvieron valores de índice de fermentación altos (0.40 a 1.16) que el tipo trinitario (0.57 a 1.08) entre el primer hasta el quinto día de fermentación, debido a que poseen más compuestos polifenólicos en sus semillas sobre todo antocianinas. De acuerdo con los

resultados obtenidos se puede concluir que a partir del día 2 de fermentación, se logró la disminución de los compuestos fenólicos reduciendo así el amargor y la astringencia del cacao y el valor de índice de fermentación para cada muestra vario en el rango aceptable (1,0-1,5). ^{(2) (32)}






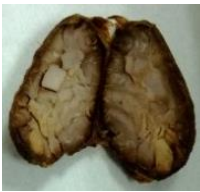


5.2.4 Prueba de corte.

Solo se realizó una inspección visual de las semillas fermentadas, ya que para realizar la prueba de corte se requiere 100 semillas de cacao por cada accesión, por lo tanto, se decidió tomar 3 almendras tomadas aleatoriamente ya que la cantidad de semilla que no era suficiente para determinar el análisis para cada muestra.

En el cuadro N° 6 se presentan los resultados obtenidos de la inspección visual para cada tipo de cacao. Las muestras en estudio lograron un nivel de fermentación aceptable. Se visualiza que las muestras 5, 3 y 11 pertenecientes a cacao trinitario presentan una coloración café en la periferia y en el centro blanco, y esa coloración es característica de un buen fermentado. Asimismo, las muestras de cacao forastero presentaron una fermentación completa ya que las almendras presentaron un color marrón o café, donde los ácidos han causado la muerte del embrión y apertura de las vacuolas celulares de pigmentación. ^{(10) (47)}

Cuadro N° 6. Inspección visual en semillas de cacao fermentadas.

MUESTRAS DE SEMILLAS DE CACAO TIPO FORASTERO			
			
1	2	8	9

Cuadro N° 6. Continuación.			
			
10	12	13	
Todas las almendras presentaron color café marrón, con fermentación completa.			
MUESTRAS DE SEMILLA DE CACAO TIPO TRINITARIO			
			
3	4	5	6
			
11			
Las muestras N° 3, 5 y 11 presentaron almendras color café en la periferia y en el centro un color café claro, con fermentación completa.			
Las muestras N° 4 y 6 presentaron almendras color café marrón, con fermentación completa.			

5.3 Determinaciones fisicoquímicas en semillas secas fermentadas y no fermentadas.

Las determinaciones que se realizaron en las semillas secas fermentadas y no fermentadas fueron el contenido de humedad, estimado de polifenoles totales, identificación y cuantificación del contenido de (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2 a trece accesiones. Los valores se promediaron y se presentan a continuación.

5.3.1 Determinación del contenido de humedad.

El contenido de humedad es muy importante en la calidad del cacao fermentado tanto para el almacenamiento y transporte seguro, como para el análisis, el obtenerlo dará trazabilidad en las mediciones como el contenido de polifenoles totales. La tabla N° 6 y figura N° 10 presentan los promedios de los datos obtenidos en el contenido de humedad en semillas fermentadas y no fermentadas.

Tabla N° 6. Promedios de contenido de humedad obtenida en el proceso en semillas fermentadas y no fermentadas.

Tipo de cacao	Muestra	Semillas no fermentadas	Semillas fermentadas
		% Contenido de humedad	% Contenido de humedad
Forastero	1	3.97	5.09
	2	4.99	4.56
	7	5.40	0.00
	8	5.09	4.65
	9	5.73	4.33
	10	5.58	4.34
	12	3.94	4.32
	13	4.86	3.48
	Promedio	4.95	4.40
	Desviación estándar	0.68	0.49
Trinitario	3	4.57	4.78
	4	3.81	4.75
	5	0.00	4.73
	6	5.19	5.06
	11	5.15	4.84
	Promedio	4.68	4.83
	Desviación estándar	0.65	0.13

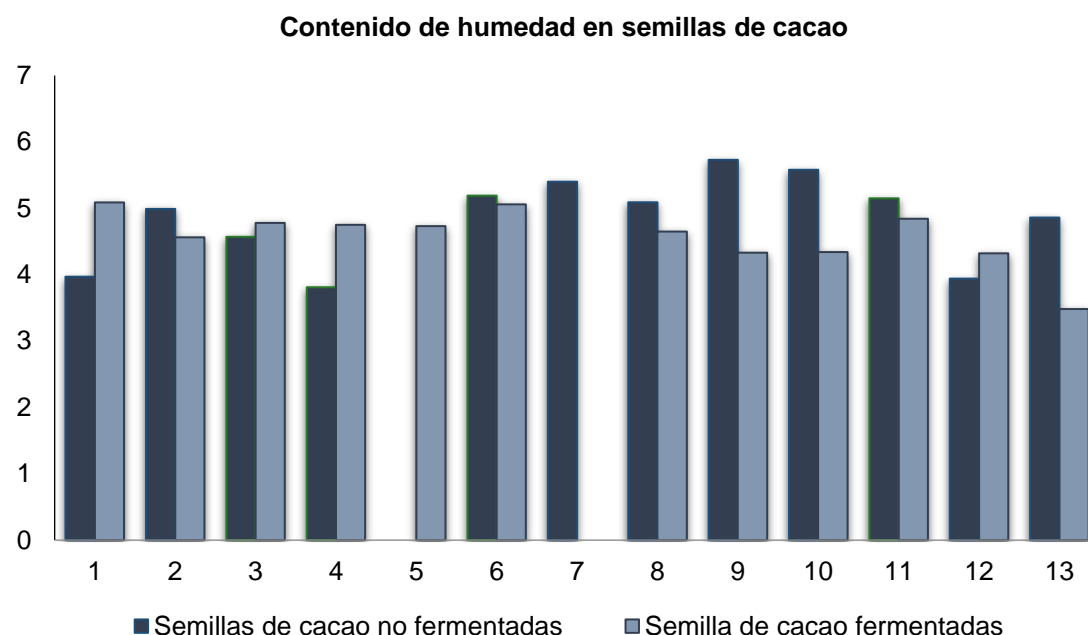


Figura N° 10. Contenido de humedad en semillas secas de cacao no fermentadas y fermentadas en los tipos forastero y trinitario.

Las especificaciones establecidas por las normas NMX-F-352-S-1980 (Mexico), INTE/ISO 23-02-04-09 (Costa Rica), NTC 1252 (Colombia) y COVENIN 50:1995 (Venezuela) que establecen un porcentaje máximo de humedad de cacao fermentado de 7.5% - 8.0% y un porcentaje máximo de humedad de cacao sin fermentar de 8.0%.^{(41) (42) (43)} Al igual que otras investigaciones establecen que las especificaciones del contenido de humedad deben estar entre 5-7.5%, para permitir su almacenamiento y transporte, ya que un contenido de humedad superior al rango se incrementa la probabilidad de contaminación por hongos y, al contrario, si se reduce demasiado la cáscara se vuelve muy quebradiza.⁽²⁶⁾

Las muestras analizadas cumplen con las especificaciones de contenido de humedad con un máximo de 5.73% de la muestra N° 9 en semillas no fermentada y 5.09% de la muestra N° 1 en semillas fermentadas. Con respecto al tipo de cacao ambos se encuentran por debajo del límite máximo de humedad (7.5 - 8%).

5.3.1.1 Contenido de materia seca.

El contenido de materia seca nos permitió determinar el contenido de polifenoles en base seca.

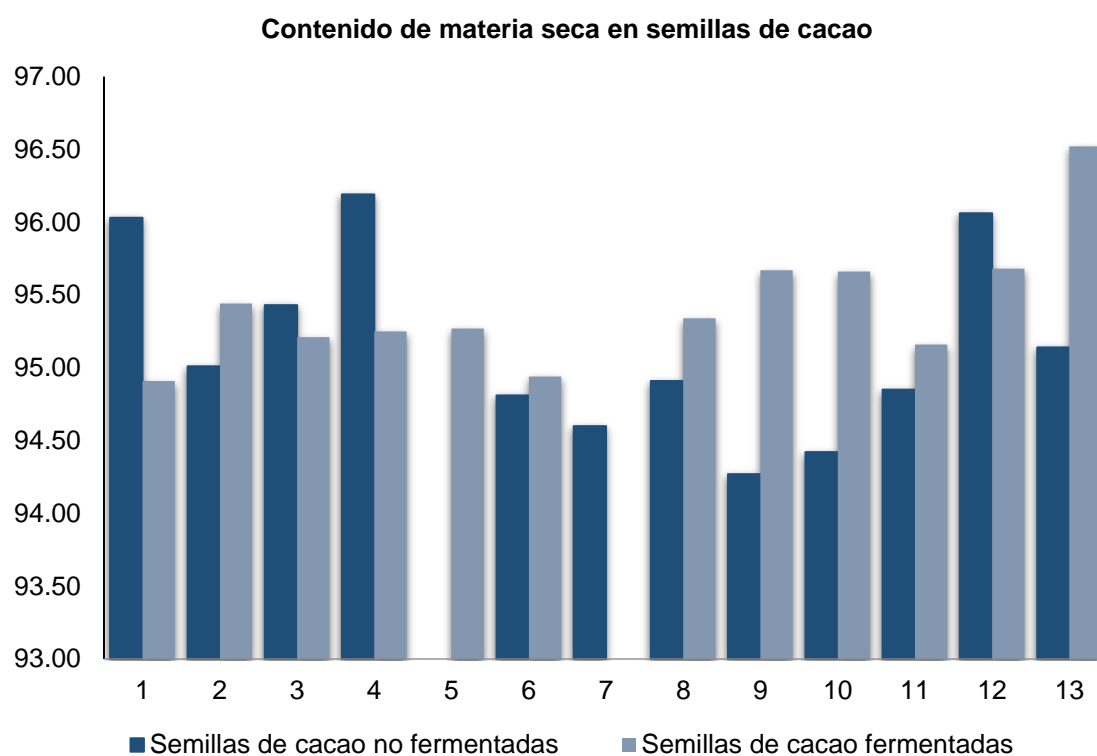


Figura N° 11. Contenido de materia seca en semillas secas de cacao no fermentadas y fermentadas en los tipos forastero y trinitario.

En la figura N° 11, se ilustra el contenido de materia seca, las muestras con mayor contenido fue la muestra N° 13 fermentada y la muestra N° 4 no fermentada, con valores de 96.52% y 96.16% respectivamente. Se puede decir que el contenido de materia seca cumple con lo que se esperaba, ya que este valor es la diferencia del contenido de humedad.

5.3.2 Determinación del contenido estimado de polifenoles totales.

Para el análisis cuantitativo se construyó una curva de calibración con estándar de catequina (10.0-100.0 µg/mL). En la tabla N° 7 presentan los resultados obtenidos para la curva.

Tabla N° 7. Concentración (µg) de Catequina y su lectura en absorbancia.

TUBO	CONCENTRACION (µg)	ABSORBANCIA
1	0.0	0.000
2	10.1	0.144
3	20.2	0.180
4	40.4	0.340
5	60.6	0.514
6	80.8	0.692
7	101.0	0.860

Con estos datos se procedió a graficar la absorbancia vs concentración de catequina utilizando una hoja electrónica de Excel.

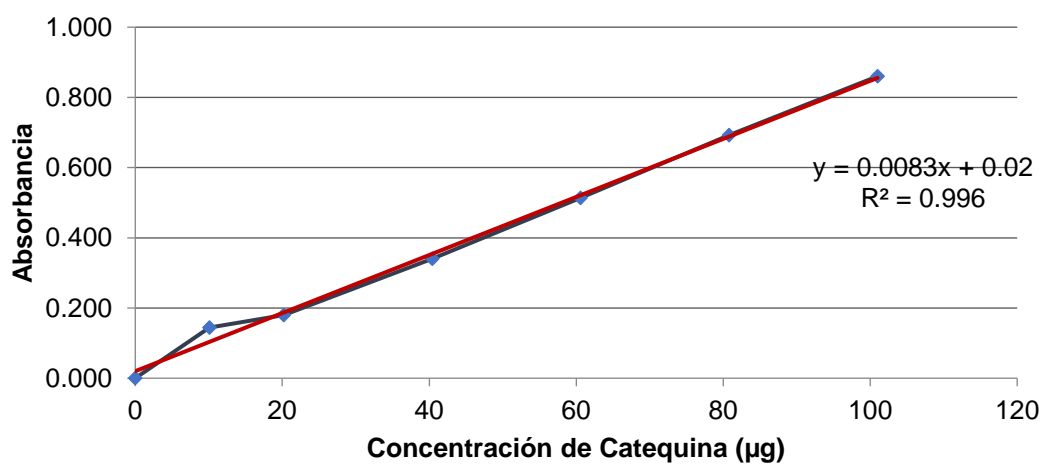


Figura N° 12. Absorbancia vs concentración de catequina.

Con el mismo programa (Excel) se obtuvo la regresión lineal de la serie de datos y la ecuación corresponde:

$$Y = 0.0083X + 0.02$$

Donde Y es la absorbancia y X la concentración de catequina. Despejando la ecuación en función de X y sustituyendo por términos

$$X = (Y - 0.02) / 0.0083$$

$$\text{Concentración } (\mu\text{g}) = \left[\frac{(\text{Abs.} - 0.02)}{0.0083} \right] \times \text{FD}$$

Dónde:

y = es la absorbancia

x = es la concentración

m = es la pendiente

b = es la ordenada de origen

Abs= es la absorbancia de la muestra

FD= es el factor de dilución.

El estimado de polifenoles en la muestra se calculó de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de polifenoles en base húmeda} = \frac{\text{Concentración (g)} \times 100}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

$$\% \text{ de polifenoles en base seca} = \frac{\% \text{ polifenoles en base húmeda}}{\% \text{ materia seca}} \times 100$$

En la siguiente tabla N°8, figura N° 13 y 14, se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de polifenoles totales (ver anexo N° 7 el cálculo).

Tabla N° 8. Promedio de contenido estimado de polifenoles totales en semillas de cacao fermentadas y no fermentadas.

Tipo	N° de muestras	Semillas no fermentadas		Semillas fermentadas	
		Estimado de polifenoles (BH)	Estimado de polifenoles (BS)	Estimado de polifenoles (BH)	Estimado de polifenoles (BS)
Cacao forastero	1	7.57	7.88	6.59	6.94
	2	4.25	4.47	3.65	3.82
	7	3.63	3.84	-	-
	8	5.81	6.13	4.77	5.00
	9	6.23	6.61	3.91	4.08
	10	5.36	5.67	7.45	7.79
	12	6.89	7.17	9.10	9.51
	13	7.47	7.85	4.57	4.74
Cacao trinitario	3	5.65	5.92	4.99	5.24
	4	7.14	7.42	7.34	7.70
	5	-	-	8.38	8.79
	6	3.88	4.09	3.00	3.15
	11	6.97	7.35	7.16	7.52
Promedio		5.90	6.20	5.91	6.19

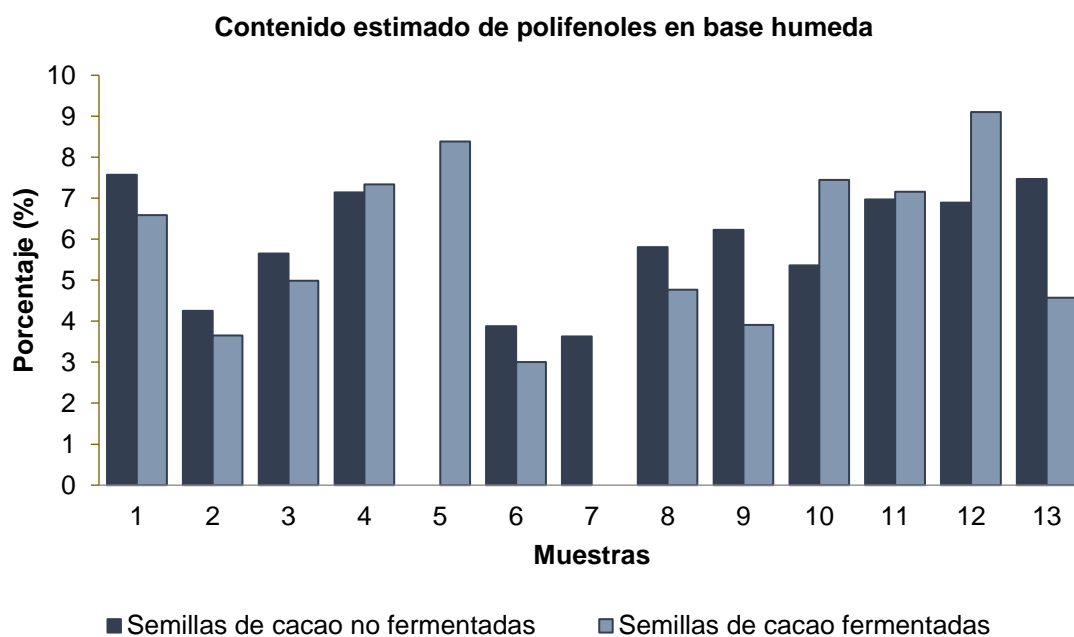


Figura N° 13. Promedios de contenido estimado de polifenoles en semillas de cacao no fermentadas y fermentadas en base húmeda.

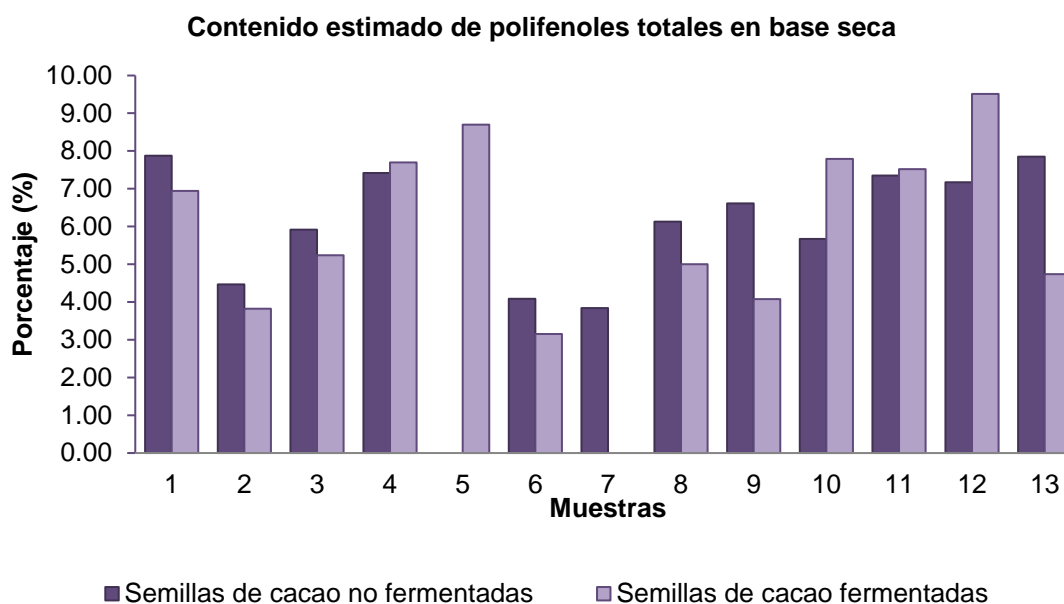


Figura N° 14. Promedios de contenido estimado de polifenoles en semillas de cacao no fermentadas y fermentadas en base seca.

Las muestras estudiadas presentaron valores de aceptación en base seca de 6.2% y 6.19 para semillas no fermentadas y fermentadas respectivamente, lo que coincide con otros estudios que reportan que los granos de cacao desengrasados frescos, el contenido total de polifenoles es de 15-20 %, lo equivalente al 6% en semillas no fermentadas secadas al aire y en semillas fermentadas alrededor del 5 % ⁽²⁶⁾ ⁽⁶²⁾. En otros estudios reportan un rango de 7.4 a 8.5 % de contenido estimado de polifenoles totales. ⁽²⁶⁾ ⁽⁴²⁾

Las muestras con mayor contenido de polifenoles fueron la 1, 4, 8, 9, 11, 12 y 13 en semillas no fermentadas y en semillas fermentadas fueron la 1, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12. También se observa que las muestras con menor contenido de polifenoles en semillas no fermentadas y fermentadas son las muestras N° 6 y 7, se obtuvieron valores entre 4.09, 3.15 y 3.84% respectivamente. Además, el promedio de pérdida en base seca y húmeda, en semillas de cacao fermentadas fue de 93.81 y 94.09% y en semillas no fermentadas 93.80 y 94.10%

respectivamente. De acuerdo con la pérdida de polifenoles obtenidos coincide a lo establecido teóricamente que durante la fermentación se pierde el 90% compuestos polifenólicos.

Con respecto al genotipo, el cacao trinitario presenta menor contenido de polifenoles en semillas no fermentadas (5.91% en base húmeda y 6.19% en base seca) que en semillas fermentadas (6.17 y 6.48% respectivamente). Por el contrario, el cacao forastero no fermentado presenta mayor contenido de polifenoles (5.90% y 6.20% en base húmeda y en base seca respectivamente), que las semillas fermentadas (5.72% en base húmeda y 5.98% en base seca). También, puede observarse que algunas muestras de cacao forastero (Nº 10 y 12), y cacao trinitario (Nº 4 y 11) aumentan su concentración con la fermentación, eso nos indican que posiblemente durante la fermentación sufrieron un proceso de epimerización que puede ser debido por la enzima polifenol oxidasa (PPO) o por los cambios fisicoquímicos que ocurren en el procesamiento del cacao. ⁽²⁶⁾

De acuerdo con los resultados obtenidos, las muestras de cacao analizadas tienen valores similares tanto en tipo forastero y trinitario antes de la fermentación y después de la fermentación, el tipo trinitario contienen mayor contenido de polifenoles en comparación al forastero, las accesiones estudiadas están dentro de las especificaciones.

5.3.3 Identificación de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 por cromatografía de capa delgada.

Para la identificación (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2, se realizó la identificación de los estándares para observar el comportamiento de cada uno, en la figura Nº 15 se observa el recorrido y en la figura Nº 16 el color de las machas de cada estándar.

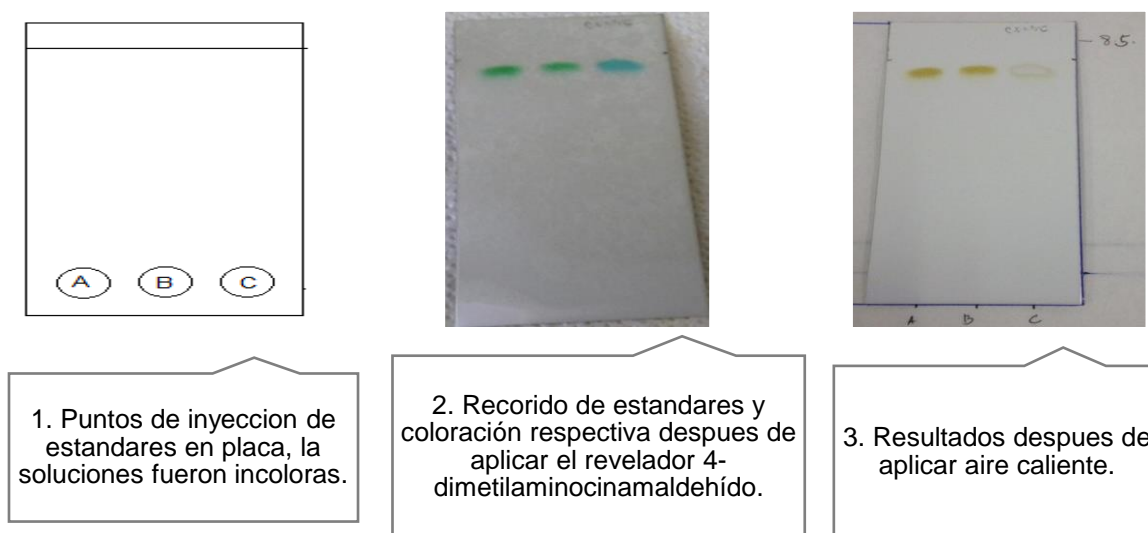


Figura N° 15. Cromatogramas obtenidos para estándares.

Dónde:

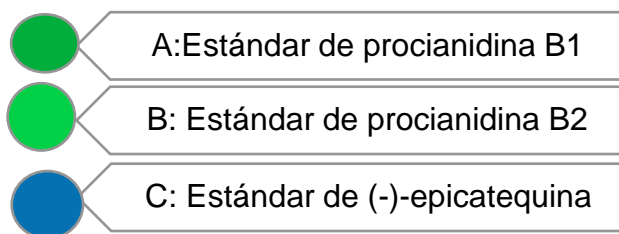


Figura N° 16. Identificación de color para cada estándar.

En el cromatograma de los estándares, después del recorrido de la fase móvil y aplicar aire caliente, se logra visualizar la diferencia de coloración para cada estándar.

Para los estándares se obtuvieron como resultados los siguientes Rf:

- Rf estándar de procianidina B1: 0.93
- Rf estándar de procianidina B2: 0.95
- Rf estándar de (-)-epicatequina: 0.95

La aplicación de los estándares y de las muestras se hizo en placas separadas debido a que se contaba con muy poca cantidad de los estándares y no se podía utilizar en todas las placas de las muestras.

En la figura N° 17, se observan los resultados de los cromatogramas para las semillas de cacao no fermentadas con el reactivo revelador y después de secado.

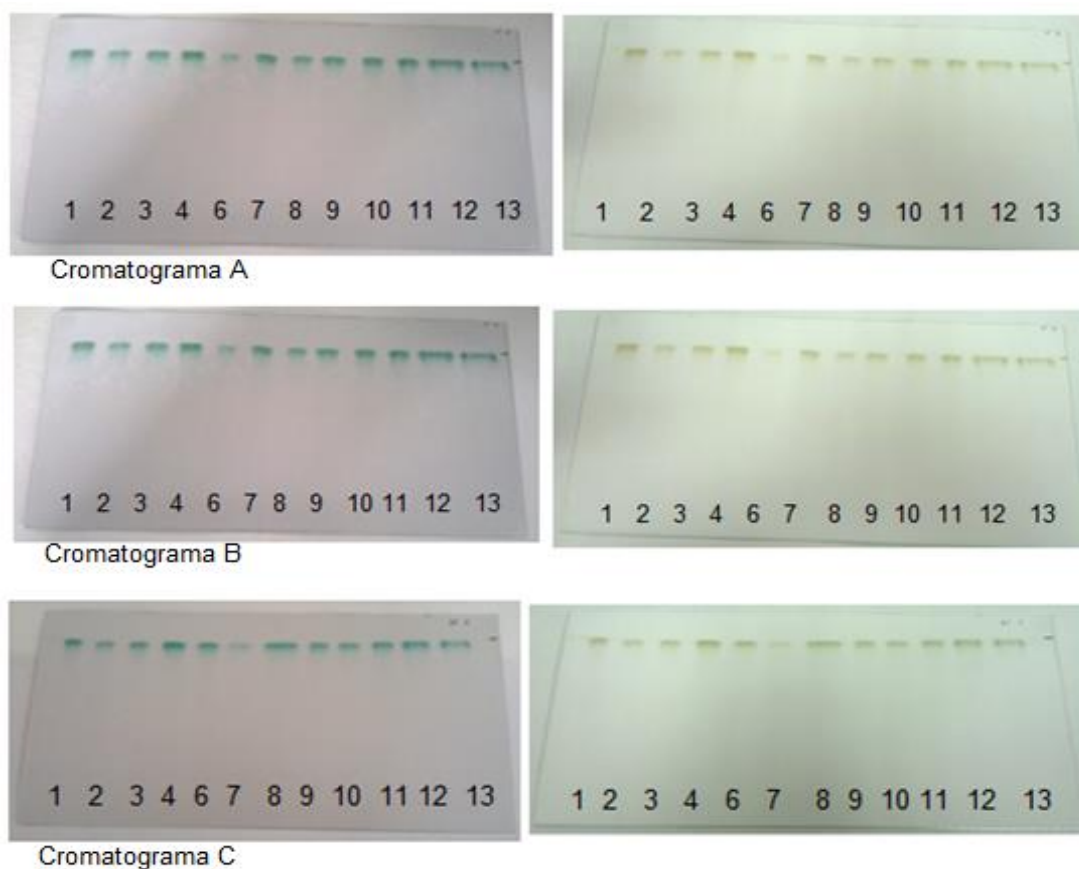


Figura N° 17. Cromatogramas de trece accesiones de semillas no fermentadas de *Theobroma cacao* L. (cacao) con el reactivo revelador 4-dimetilaminocinamaldehído.

En la figura N° 18 se observan los resultados de los cromatogramas para las semillas de cacao fermentadas, con el reactivo revelador y después de secado.

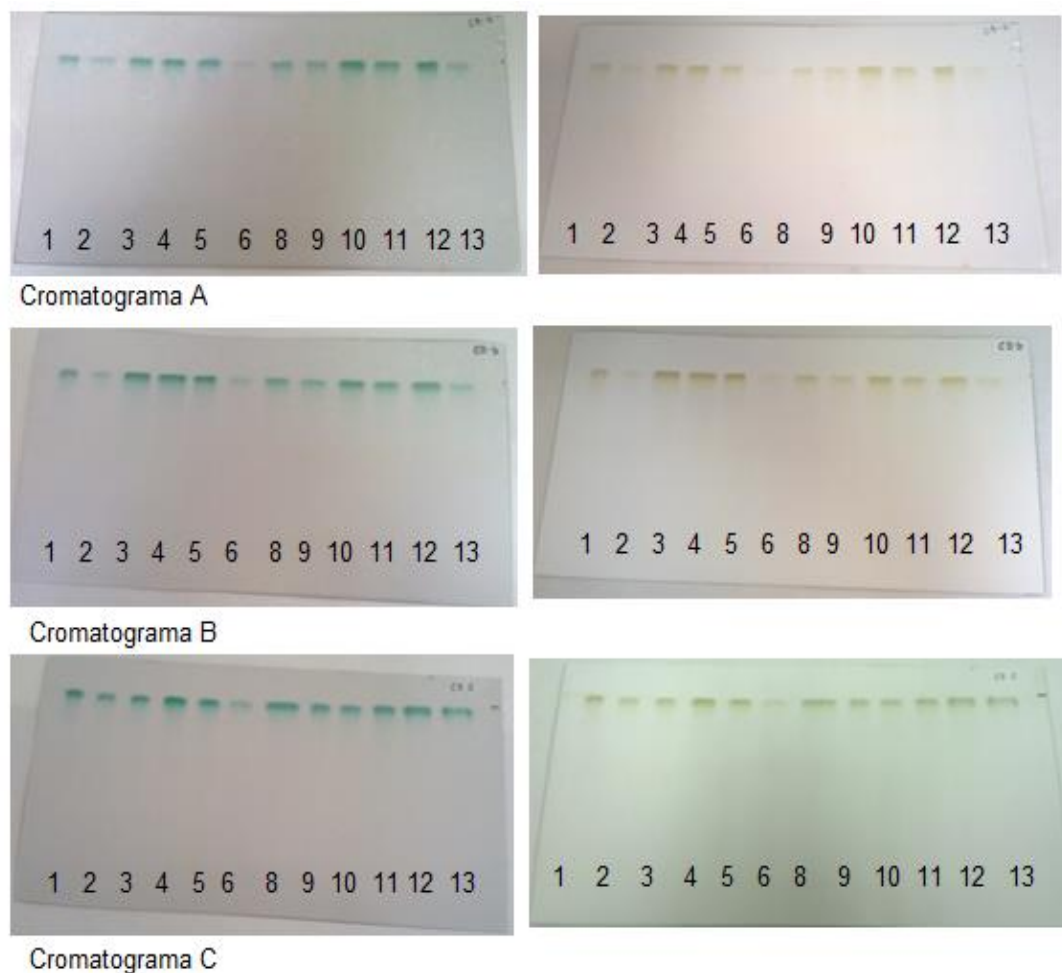


Figura N° 18. Cromatogramas de trece accesiones de semillas fermentadas de *Theobroma cacao* L. (cacao) con el reactivo revelador 4-dimetilaminocinamaldehído.

Los cromatogramas de las muestras no fermentadas y fermentadas presentaron un comportamiento similar respecto a la coloración y a la distancia recorrida por el compuesto, el color percibido es similar a los estándares de (-)-epicatequina y procianidina B2. En la tabla N° 9 se presentan los resultados de los promedios de la distancia recorrida por el compuesto entre la distancia recorrida por el eluyente.

Tabla N° 9. Promedio de Rf de las muestras no fermentadas y con fermentación.

Muestras no fermentadas	Promedio de Rf	Muestras fermentadas	Promedio de Rf
1	0.96	1	0.98
2	0.96	2	0.95
3	0.96	3	0.97
4	0.95	4	0.98
6	0.96	5	0.98
7	0.96	6	0.97
8	0.96	8	0.98
9	0.96	9	0.98
10	0.96	10	0.98
11	0.96	11	0.98
12	0.97	12	0.97
13	0.96	13	0.98
Promedio	0.96	Promedio	0.98
Desviación estándar	0.00	Desviación estándar	0.01

El principal objetivo es la determinación colorimétrica de los estándares para comparar el comportamiento con las muestras, y de esta forma identificarlas. Referente a los resultados obtenidos de la cromatografía capa delgada en muestras no fermentadas y fermentadas se puede visualizar que las manchas son muy similares a los estándares de (-)-epicatequina y procianidina B2, por lo que se determina que las muestras de cacao pueden corresponder al monómero de (-)-epicatequina y dímeros (-)-epicatequina-(4-8)-(-)-epicatequina para procianidina B2.

En los resultados obtenidos del Rf promedio es 0.96 y 0.98 para muestra no fermentadas y fermentadas respectivamente y comparado con los resultados de Rf de los estándares se puede determinar que las muestras no fermentadas pueden corresponder a (-)-epicatequina con Rf de 0.95 y procianidina B2 con Rf 0.95. Sin embargo, a pesar de que no se logró ver bien las separaciones de las manchas de las muestras puede ser que la fase móvil no fue la adecuada para el análisis a pesar de que el método lo indique posiblemente pudo haber afectado

otros factores que se desconocen, no obstante, se obtuvieron muchas que pueden ser una mezcla de los polifenoles, por lo tanto, se determinó proseguir con la cuantificación de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2.

5.3.4 Cuantificación de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 por Espectrofotómetro Ultravioleta Visible.

Resultados de curva de estándar de Procianidina B1.

Tabla N° 10. Concentración (μg) de procianidina B1 y absorbancia.

Tubo	Concentración (μg)	Abs (nm)
blanco	0.0000	0.0000
1	0.0500	0.0000
2	0.1000	0.0895
3	0.2000	0.1405
4	0.3000	0.1645
5	0.4000	0.1720
6	0.5000	0.1825

La gráfica de absorbancia vs concentración (ver figura N° 19), se tomaron en cuenta los datos de los tubos 2, 3, 4, 5 ya que, si se utilizaban todos los valores, no se genera la tendencia de la línea recta y se obtenía un coeficiente de determinación muy bajo.

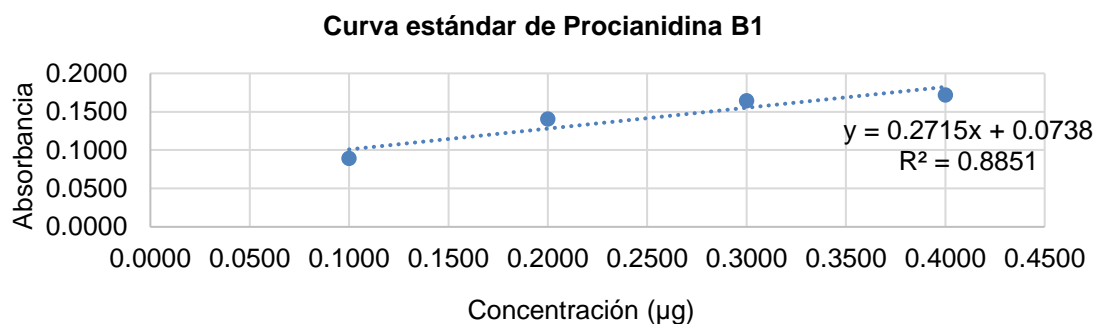


Figura N° 19. Absorbancia vs concentración de procianidina B1.

Con el mismo programa se obtuvo la regresión lineal y la ecuación corresponde (ver anexo N° 7).

$$Y=0.2715X+0.0738$$

Donde:

Y= es la absorbancia

X= la concentración de procianidina B1

Despejando la ecuación en función de X y sustituyendo por términos

$$X=(Y-0.0738)/0.2715$$

$$\text{Concentración } (\mu\text{g}) = \left[\frac{(\text{Abs.}-0.0738)}{0.2715} \right] \times \text{FD}$$

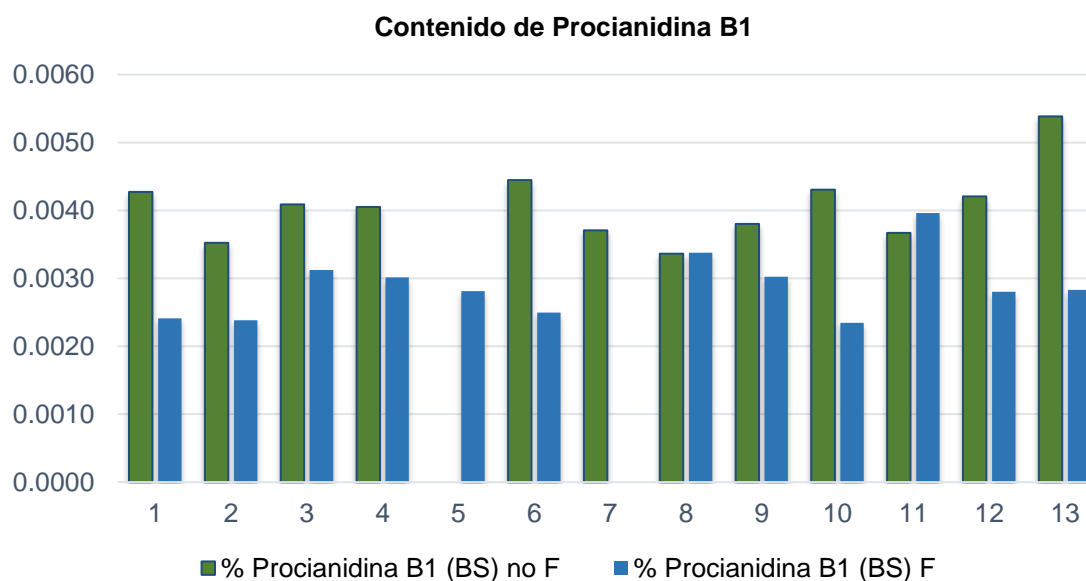


Figura N° 20. Contenido de procianidina B1 en muestras no fermentadas y fermentadas.

La figura N° 20 refleja que la mayoría de las muestras no fermentadas obtuvieron valores más altos de procianidina B1, que en las muestras en las que se ejecutó el proceso de fermentación, dicho proceso permite solubilizar los polifenoles de bajo peso molecular, por tal motivo las muestras no fermentadas presentan

mayor cantidad de procianidina B1. Cabe mencionar que las muestra 8 y 11 presenta un aumento en el contenido de procianidina B1 después del proceso de fermentación. Otras investigaciones demuestran que los compuestos polifenólicos se pueden dividir en polifenoles extraíbles, aquellos que se solubilizan en los disolventes acuoso-orgánico y polifenoles no extraíbles los que quedan retenidos en el residuo tras la extracción acuoso-orgánica, los complejos extraíbles poseen pesos moleculares bajos o medios, mientras que los no extraíbles son compuestos con un peso molecular elevado. ⁽⁸⁾

El proceso de fermentación permitió que se solubilizaran los polifenoles de bajo peso molecular en la mayoría de las muestras, excepto las muestras 8 y 11 dicho proceso permitió que se genere mayor cantidad de polifenoles no extraíbles, generando polímeros de compuestos de alto peso molecular no hidrolizables. ⁽⁸⁾

Resultados de curva de estándar de Procianidina B2.

Tabla N° 11. Concentración (μg) de Procianidina B2 y absorbancia.

Tubo	Concentración (μg)	Abs (nm)
Blanco	0.0000	0.0000
1	0.0500	0.0000
2	0.1000	0.0690
3	0.2000	0.0750
4	0.3000	0.0875
5	0.4000	0.1505
6	0.5000	0.1505

Para la elaboración de la gráfica de absorbancia vs concentración en hoja electrónica Excel, se tomaron en cuenta solos los tubos 1, 2, 3, 4, 5 ya que, si se utilizaban todos los valores, no se genera la tendencia lineal y con un coeficiente de determinación muy bajo.

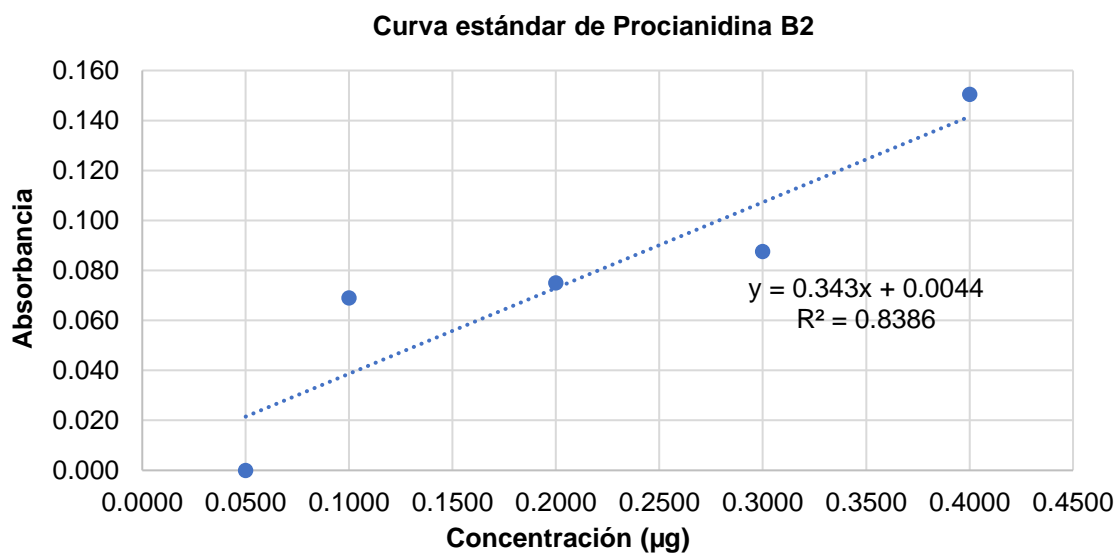


Figura N° 21. Absorbancia vs concentración de procianidina B2.

Con el mismo programa (Excel) se obtuvo la regresión lineal y la ecuación corresponde (ver anexo N° 7):

$$Y=0.343x+0.0044$$

Dónde:

Y= es la absorbancia

X= la concentración de procianidina B2

Despejando la ecuación en función de X y sustituyendo por términos

$$X=(Y-0.0044)/0.343$$

$$\text{Concentración } (\mu\text{g}) = \left[\frac{(\text{Abs.} - 0.0044)}{0.343} \right] \times \text{FD}$$

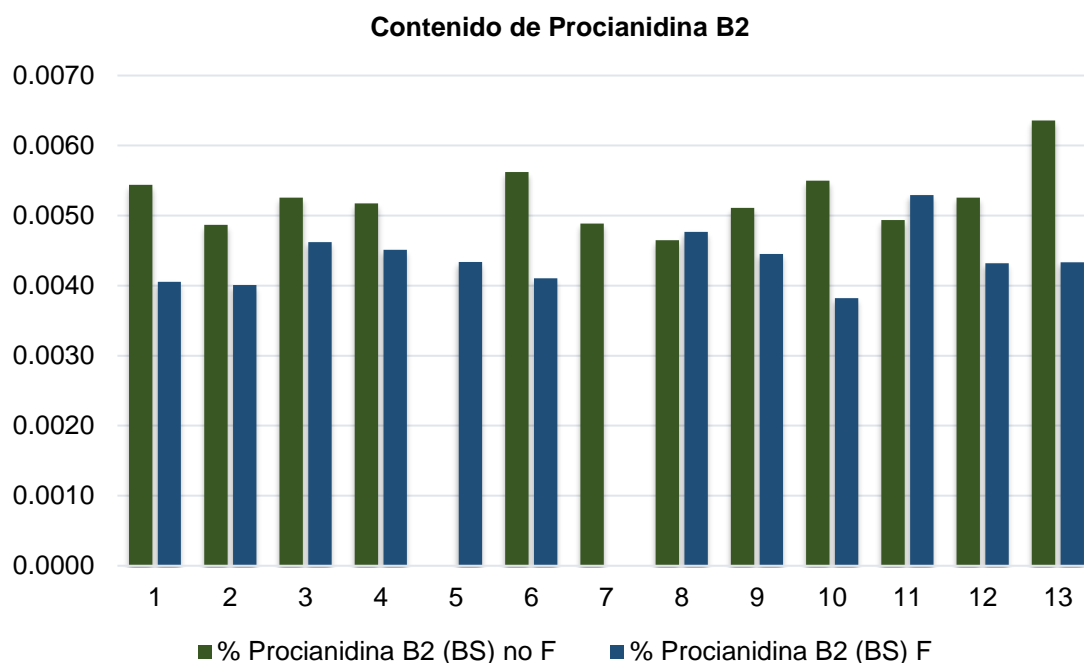


Figura N° 22. Contenido de procianidina B2 en muestras no fermentadas y fermentadas.

La figura 22 se observa que la mayoría de las muestras no fermentadas obtuvieron valores más altos de procianidina B2, que en las muestras fermentadas. Sin embargo, la muestra 8 correspondiente al tipo de cacao forastero presentó un leve aumento de procianidina B2 después del proceso de fermentación lo que demuestra que dicho genotipo aumenta la cantidad de procianidina B2 a pesar del proceso de fermentación.

También la gráfica refleja que la muestra 11 perteneciente al tipo de cacao trinitario presenta un aumento en el contenido de procianidina B2 después de la fermentación. Se concluye que el proceso de fermentación permitió que se solubilizaran los polifenoles de bajo peso molecular en la mayoría de las muestras, excepto las muestras 8 y 11 dicho proceso permitió que se genere mayor cantidad de polifenoles no extraíbles, generando polímeros de compuestos de alto peso molecular no hidrolizables ⁽⁸⁾.

Resultados de curva de estándar de (-)-Epicatequina.

Tabla N° 12. Concentración (µg) real de (-)-epicatequina y absorbancia.

Tubo	Concentración (µg)	Abs (nm)
blanco	0.0000	0.0000
1	0.0500	0.0645
2	0.1000	0.1270
3	0.2000	0.1300
4	0.3000	0.1285
5	0.4000	0.1360
6	0.5000	0.1360

La gráfica de absorbancia vs concentración, se tomaron en cuenta solos los tubos 2, 3, 4, 5 ya que, si se utilizaban todos los valores, no se generaba la tendencia lineal y con un coeficiente de determinación muy bajo.

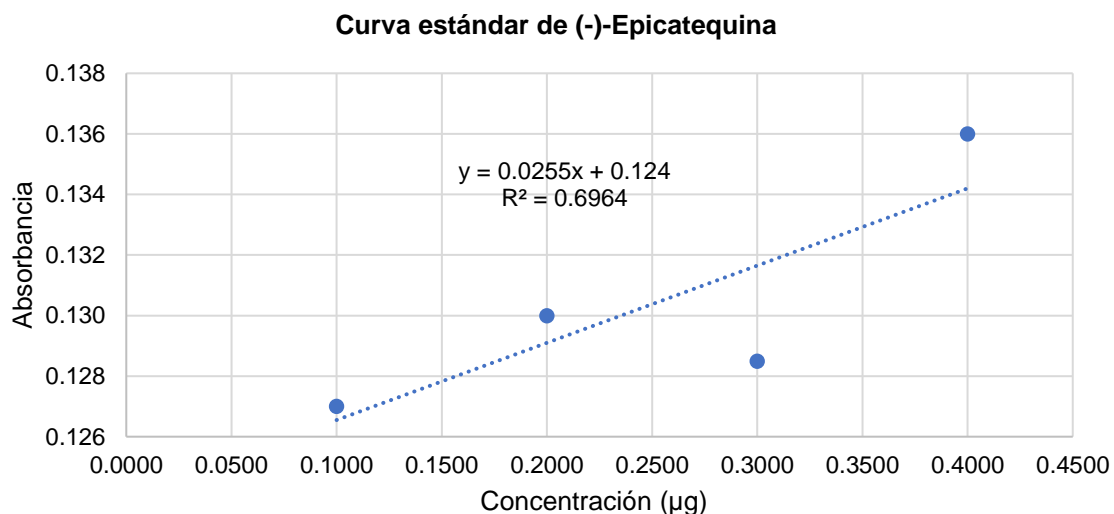


Figura N° 23. Absorbancia vs concentración de (-)-epicatequina.

Con el mismo programa (Excel) se obtuvo la regresión lineal y la ecuación corresponde (ver anexo N° 7):

$$Y=0.0255x+ 0.124$$

Dónde:

Y= es la absorbancia

X= la concentración de (-)- epicatequina

Despejando la ecuación en función de X y sustituyendo por términos

$$X=(Y-0.124)/0.0255$$

$$\text{Concentración } (\mu\text{g}) = \left[\frac{(\text{Abs.}-0.124)}{0.0255} \right] \times \text{FD}$$

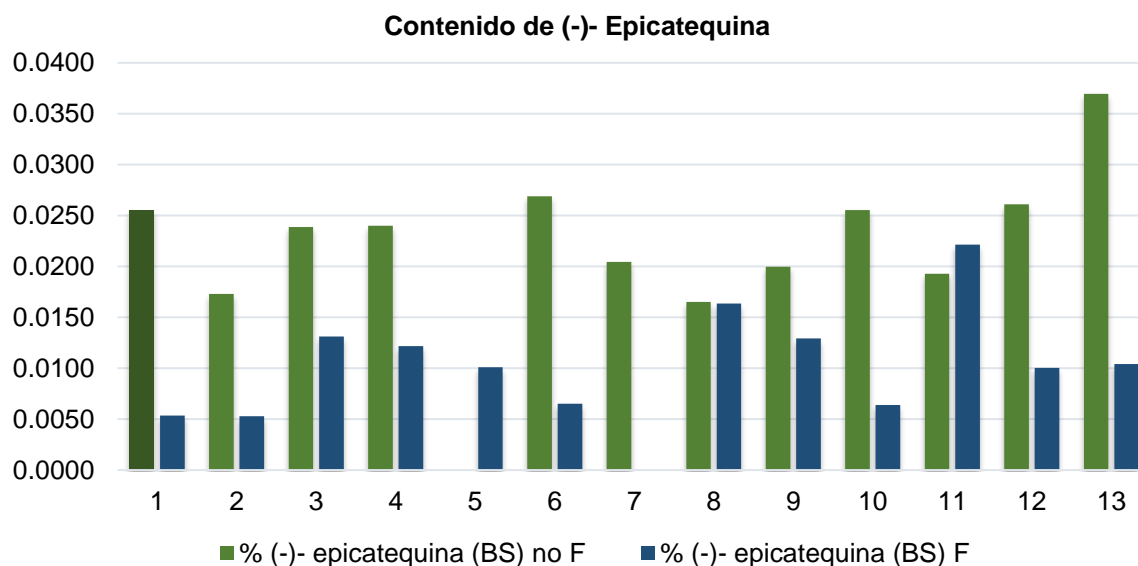


Figura N° 24. Contenido de (-)-epicatequina en muestras no fermentadas y fermentadas.

La figura anterior refleja que la mayoría de las muestras no fermentadas obtuvieron valores más altos de (-)-epicatequina, que en las muestras fermentadas. Sin embargo, la muestra 11 presentó un aumento en el contenido

de (-)-epicatequina perteneciente al tipo de cacao trinitario fermentada y en dichas muestras se generó un aumento en el contenido de (-)-epicatequina, después de la fermentación, dicho proceso permitió que se genere mayor cantidad de polifenoles polimerizados produciendo compuestos de alto peso molecular no hidrolizable ⁽⁸⁾.

Referente a los resultados obtenidos de los gráficos de estimado de procianidina B1, procianidina B2 y (-)- epicatequina se determinó el porcentaje de pérdida o ganancia de polifenoles después del proceso de fermentación, se realizó con el objetivo de determinar la cantidad de procianidina B1, B2 y (-)- epicatequina resultante después de dicho proceso. Para esta determinación se excluyeron los valores obtenidos en las muestras 5 y 7, debido a que solo la muestra 5 se logró fermentar, pero no se tomó en cuenta para el ensayo de semillas no fermentadas debido a que solo una mazorca se encontraba madura. Sin embargo, la muestra 7 no se fermentó por tener moniliasis.

Tabla N° 13. Valor (%) de pérdida o ganancia obtenida después fermentación en cacao trinitario.

Cacao trinitario			
Muestras	Procianidina B1 (%)	Procianidina B2 (%)	(-)- Epicatequina (%)
3	- 23.58	- 12.10	- 45.07
4	- 25.54	- 12.78	- 49.31
6	- 43.83	- 27.04	- 75.79
11	+ 7.99	+ 7.22	+ 14.76
promedios:	- 21.2	- 11.18	- 38.85

(+) Indica ganancia y (-) indica pérdida.

Sobre los resultados obtenidos en el cacao tipo trinitario la muestra 6, perdió más cantidad de (-)- epicatequina después de la fermentación, ya que sus moléculas fueron fácilmente hidrolizadas durante el proceso de fermentación ⁽⁸⁾, sin embargo, la muestra 11 presentó un aumento de polifenoles después de la

fermentación debido a la polimerización, formando compuestos de alto peso molecular no hidrolizables. ⁽⁸⁾

En general, las muestras de cacao trinitario analizadas, la procianidina B2 fue menos afectada por la fermentación con una reducción del 11%, para la procianidina B1 se obtuvo una pérdida de 21% y la (-)- epicatequina obtuvo mayor cantidad de pérdida con 39%. En otros estudios, las procianidinas disminuyen de 3 a 5 veces después de la fermentación. ⁽⁶²⁾

Tabla N° 14. Valor (%) de pérdida o ganancia obtenida después del proceso de fermentación en cacao forastero.

Cacao forastero			
Muestras	Procianidina B1 (%)	Procianidina B2 (%)	(-)- Epicatequina (%)
1	- 43.62	- 25.48	- 79.04
2	- 32.36	- 17.61	- 69.45
8	+ 0.36	+ 2.61	- 0.94
9	- 20.36	- 12.95	- 35.23
10	- 45.60	- 30.56	- 74.95
12	- 33.43	- 17.80	- 61.51
13	- 47.48	- 31.85	- 71.84
Promedios:	- 31.78	- 19.09	- 56.14

(+) Indica ganancia y (-) indica pérdida.

Según los resultados obtenidos en cacao forastero, la muestra 1 presentó mayor cantidad de pérdida de (-)- epicatequina después de la fermentación, ya que sus moléculas fueron fácilmente hidrolizadas ⁽⁸⁾, sin embargo, la muestra 8 presenta ganancia de polifenoles después de la fermentación debido a la polimerización, formando compuestos de alto peso molecular no hidrolizables. ⁽⁸⁾

En general, las muestras de cacao forastero analizadas la procianidina B2 presentó menor pérdida después de la fermentación con una reducción del 19%, para la procianidina B1 se obtuvo una pérdida de 32% y la (-)- epicatequina obtuvo mayor cantidad de pérdida con 56%.

5.3.5 Comparación entre la determinación de polifenoles totales y procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina.

En la siguiente tabla muestra el contenido de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina, que se determinó a partir de polifenoles totales, el dato se obtuvo restando a polifenoles totales el estimado obtenido de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina, estos valores se obtuvieron para 1.0 gramo de cacao de las muestras analizadas.

Tabla N° 15. Estimado de procianidina B1, B2 y (-)- epicatequina presentes en polifenoles totales no fermentado.

Cacao trinitario no fermentado				
Muestras	% Estimado de polifenoles totales (BS)	% Estimado de procianidina B1 (BS)	% Estimado de procianidina B2 (BS)	% Estimado de (-)- epicatequina (BS)
3	5.92	0.19	0.25	1.14
4	7.42	0.19	0.24	1.12
6	4.09	0.22	0.28	1.32
11	7.35	0.17	0.24	0.92
promedio:	6.20	0.19	0.25	1.13
Cacao forastero no fermentado				
1	7.88	0.21	0.27	1.24
2	4.47	0.17	0.24	0.84
7	3.84	0.17	0.22	0.93
8	6.13	0.16	0.22	0.77
9	6.61	0.19	0.25	0.98
10	5.67	0.21	0.27	1.25
12	7.17	0.19	0.24	1.19
13	7.85	0.27	0.31	1.82
promedio:	6.20	0.19	0.25	1.13

Estimado de polifenoles totales vs estimado de (-)- epicatequina, procianidina B1 y B2 en cacao trinitario

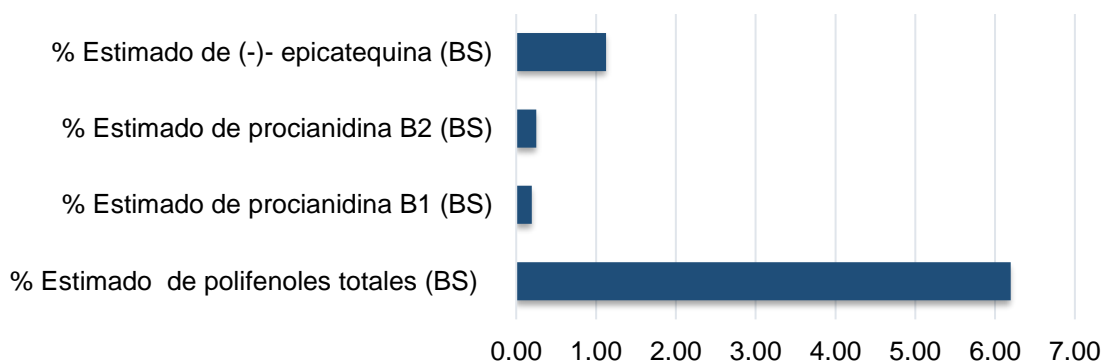


Figura N° 25. Estimado de polifenoles totales vs estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina, en cacao trinitario no fermentado.

Se determinó que para las muestras de cacao trinitario no fermentado en un gramo hay 6.2% de polifenoles totales y un 18% es de (-)- epicatequina, 3% de procianidina B1 y 4% de procianidina B2.

Estimado de polifenoles totales vs estimado de (-)- epicatequina, procianidina B1 y B2 en cacao forastero

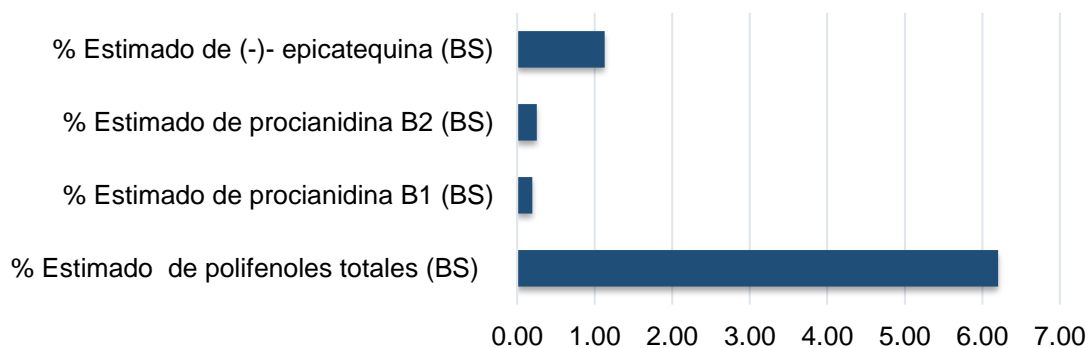


Figura N° 26. Estimado de polifenoles totales vs estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina, en cacao forastero no fermentado.

Para las muestras de cacao forastero no fermentadas, se determinó en un gramo hay 6.2% de polifenoles totales, con un 18% de (-)- epicatequina, 3% de

procianidina B1 y 4% de procianidina B2. Posteriormente se analizaron los datos para determinar cuánto porcentaje están presentes en polifenoles totales después de fermentación.

Tabla N°16. Estimado de procianidina B1, B2 y (-)- epicatequina presentes en polifenoles totales con fermentación.

Cacao trinitario fermentado				
Muestras	% Estimado de polifenoles totales (BS)	% Estimado de procianidina B1 (BS)	% Estimado de procianidina B2 (BS)	% Estimado de (-)- epicatequina (BS)
3	5.24	0.1554	0.2298	0.6524
4	7.70	0.1486	0.2222	0.5994
5	8.70	0.1379	0.2127	0.4945
6	3.15	0.1231	0.2021	0.3207
11	7.52	0.1971	0.2633	1.1016
Promedio:	6.46	0.1524	0.2260	0.6338
Cacao forastero fermentado				
1	6.94	0.1199	0.2016	0.2659
2	3.82	0.1180	0.1985	0.2618
8	5.00	0.1639	0.2314	0.7948
9	4.08	0.1448	0.2129	0.6193
10	7.79	0.1075	0.1752	0.2933
12	9.51	0.1373	0.2117	0.4924
13	4.74	0.1393	0.2134	0.5127
Promedio:	5.98	0.1330	0.2064	0.4629

Estimado de polifenoles totales vs estimado de (-)- epicatequina, procianidina B1 y B2 en cacao trinitario

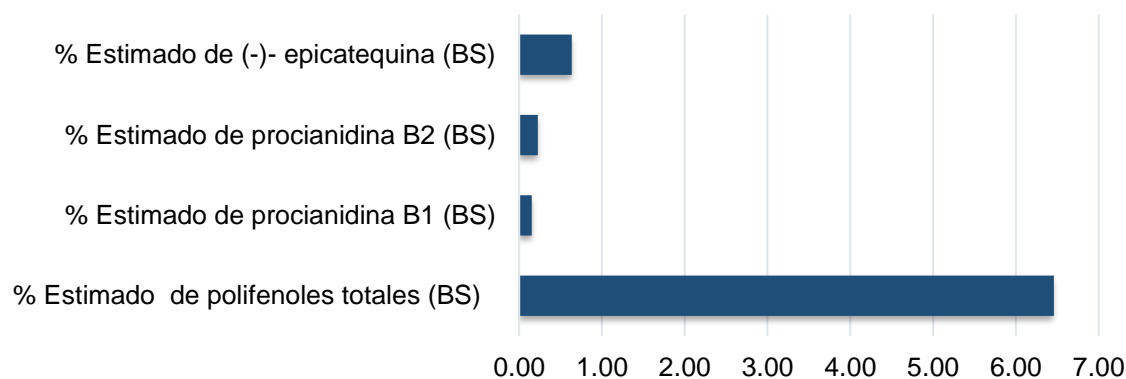


Figura N° 27. Estimado de polifenoles totales vs estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina, en cacao trinitario fermentado.

Para las muestras de cacao trinitario analizadas después de la fermentación, se determinó en un gramo hay 6.4% de polifenoles totales y en ellos se encuentra un 9% de (-)- epicatequina, 2% de procianidina B1 y 3.4% de procianidina B2.

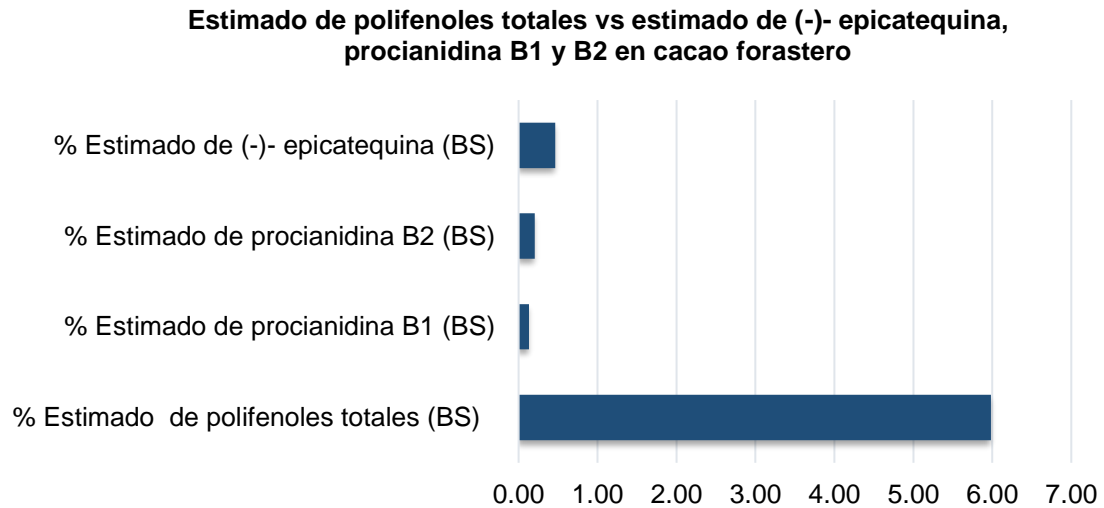


Figura N° 28. Estimado de polifenoles totales vs estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina, en cacao forastero fermentado.

Las muestras de cacao forastero analizadas después de fermentadas, en un gramo hay 5.9% de polifenoles totales y dentro de éstos un 7.7% es (-)-epicatequina, 2.2% procianidina B1 y 3.5% la procianidina B2.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. En las mediciones de pH a partir del tercer día las muestras presentaron un aumento hasta finalizar la fermentación con pH (6.9-7.0), debido al tiempo de almacenamiento en la mazorca durante 4 días que hace que se obtenga un pH 6.0-7.0 por la disminución del volumen de la pulpa, evaporación del agua y la inversión de la sacarosa.
2. El nivel alto de temperatura durante la fermentación fue debido al proceso exotérmico generado por los microorganismos presentes en el medio y con una tendencia bastante similar en todas las accesiones sin importar el tipo de cacao.
3. A pesar del tiempo de almacenamiento en mazorca se logró una efectiva fermentación en todas las muestras, ya que el valor del índice de fermentación para cada muestra varió en el rango aceptable (1,0-1,5), a partir del día 2 se obtuvo valores arriba de 1.0, que caracterizan a una buena fermentación.
4. En el contenido de humedad de las accesiones analizadas se obtuvieron en promedio de 4.86% en semillas de cacao no fermentadas y 4.61% en semillas fermentadas, la cual se encuentran por debajo del porcentaje máximo de humedad de cacao de 7.5% a 8.0%.
5. El contenido estimado de polifenoles totales de las accesiones analizadas están dentro de las especificaciones que establecen un rango de 5 a 8.5%, obteniendo un promedio en semillas de cacao no fermentadas 6.20% y 6.19% fermentadas.

6. El cacao tipo forastero tuvo menor contenido de polifenoles en comparación al cacao tipo trinitario, posiblemente durante la fermentación y secado, los polifenoles sufrieron un proceso de epimerización.
7. En la determinación cualitativa de (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2, se logró visualizar los diferentes colores en las manchas de verde azulado, los Rf obtenidos son de 0.96 y 0.98 para muestra no fermentadas y fermentadas respectivamente, correspondiendo a monómeros (-)-epicatequina con Rf de 0.95 y dímeros procianidina B2 con Rf 0.95.
8. En estimado de (-)- epicatequina, procianidina B1 y B2 se obtuvieron valores mayores en muestras fermentadas que en muestras no fermentadas, debido que durante la fermentación se genere mayor cantidad de polifenoles no extraíbles, generando polímeros de compuestos de alto peso molecular no hidrolizables.
9. Al comparar los resultados obtenidos en estimado de polifenoles totales con (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2, se comprueba que la epicatequina y el contenido de polifenoles se reduce aproximadamente 10-20% y las procianidinas disminuyen de 3 a 5 veces debido a la fermentación.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Implementar métodos como densitometría, cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta eficacia para obtener una exacta identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos de las muestras de cacao.
2. Investigar qué tipo de fase móvil debe ser la adecuada para obtener una completa separación de las manchas.
3. Promover que se realicen investigaciones en la línea de polifenoles a estudiantes egresados de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, en otras accesiones de cacao para hacer una selección del cultivo y potencializar la calidad del cacao en el país.
4. Promover investigaciones sobre el cacao y sus derivados, con el objeto de ser más competitivos en el mercado internacional.
5. Comparar los resultados obtenidos con otros cultivares de cacao, con el objetivo de enriquecer el cultivo de cacao en el país.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Acosta Martínez, M. E. Hernandez Gamez, R. (2012) Cuantificación de taninos por dos métodos espectrofotométricos en muestras forrajeras y raciones totales a base de leguminosas: *Canavalia ensiformis* (Canavalia), *Vigna sinensis* (frijol mono) y Gramineas: *Sorghum vulgare* (sorgo). Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. [Consultado 08.2015].
2. Alas Rivera, C. A. Morales Solorzano, A. (2015). Estandarización del proceso de fermentación de la mezcla de semillas de tres accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) del Cultivar San Jose Real de la Carrera ubicada en el departamento de Usulután. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. [Consultado 03.2016].
3. Amores, F. Palacios Jiménez, J. Zhang, D. (2009) Entorno ambiental, genética, Atributos de calidad y singularización del cacao en el Nor Oriente de La Provincia de Esmeraldas. Boletín Técnico N° 135. Ecuador. Disponible en: http://www.google.com/sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.procitropicos.org.br%2Fportal%2Fnewbb%2Fdl_attachment.php%3Fattachid%3D1282567199%26post_id%3D29&ei=KdedU62XBO3LsQSkIAGYAg&usg=AFQjCNGwqwdITAZ8VWSxFdQ24j_f21nhfg&bvm=bv.68911936,d.cWc&cad=rja [consultado 09.2013]
4. Andújar, M.C. Giner, R. M. Ríos, J.L. (2012) Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. España. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488419/pdf/OXIMED2012-906252.pdf> [consultado 03.2014]

5. Aranceta, J. Guía de alimentos funcionales. Puleva Food y SENC. Disponible en: http://www.fesnad.org/publicaciones/pdf/guia_alimentos_funcionales.pdf [Consultado 04.2014]
6. Arciniegas Leal, A. M. (2005) Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del catie. Escuela de postgrado, programa de educación para el desarrollo y la conservación del centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Costa Rica. Disponible en: http://www.catie.ac.cr/BancoMedios/Documentos%20PDF/pcc_adriana_arciniegas.pdf [Consultado 03.2014]
7. Arenivar, B. Gutiérrez, C. (2009) Diseño de estrategia para mejora de procesos de industrialización y diversificación de productos del cacao en la asociación cooperativa de producción agrícola hacienda “La Carrera”, en el departamento de Usulután. Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola, Universidad Dr. José Matías Delgado. Disponible en: http://webquery.ujmd.edu.sv/siab/catalog/biblio_search_form.php?ffset=10&cc=0&searchType=desc_ppales_anadoc,desc_post_nadoc,desc_prop_anadoc&searchText=CACAO&sortBy=default&sfrase=default [Consultado 03, 2014]
8. Arranz Martinez, S. (2010) Compuestos polifenolicos (extraíbles y no extraíbles) alimentos en la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España. Disponible en: <http://eprints.sim.ucm.es/11255/1/T32158.pdf> [Consultado 10.2015]

9. Astorga, C. Ayestas, E. Munguía, R. Orozco, L. Vega, C. (2013) Caracterización de árboles promisorios de cacao en fincas orgánicas Waslala, Nicaragua. Disponible en: <http://repositorioBibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/11554/5861/1/3.Ayestas.pdf> [Consultado 03.2014]
10. Batista, L. (2009) Guía técnica el cultivo de cacao. República Dominicana. Disponible en: <http://www.rediaf.net.do/publicaciones/guias/download/cacao.pdf> [Consultado 07.2012]
11. Bercian de Mendoza, J. Mata Conrado, D. (2012) Evaluar y determinar los factores físicos-químicos y microbiológicos sobre el índice de fermentación tradicional y no tradicional del grano cacao (*theobroma cacao* L) forastero, cultivado en la Hacienda San José del Real La Carrera Usulután. producción agrícola hacienda “La Carrera”, en el departamento de Usulután. Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola, Universidad Dr. José Matías Delgado. Disponible en: http://webquery.ujmd.edu.sv/siab/catalog/bibliosearchform.php?offset=10&cc=0&searchType=desc_ppales_anadoc,desc_post_anadoc,desc_prop_anadoc&searchText=CACAO&sortBy=default&sfrase=default [Consultado 03, 2014]
12. Bonilla, G. Castañeda, V. Pérez, J. (2011) Caracterización genética de los tipos de cacao establecidos en el Cultivar Cooperativa Hacienda La carrera Usulután, El Salvador. El Salvador. Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola, Universidad Dr. José Matías Delgado. [Consultado 03.2014]
13. Cisneros Trujillo, J. (2011) Estudio agro morfológico y fisicoquímico de los eco tipos de cacao cultivados en los cantones de El Carrizal y Vainillas en el departamento de Chalatenango y en el cantón Milingo y caserío San Juan en Suchitoto, departamento de Cuscatlán. Disponible en:

http://webquery.ujmd.edu.sv/siab/catalog/biblio_search_form.php?offset=10&cc=0&searchType=desc_ppales_anadoc,desc_post_anadoc,desc_prop_anadoc&searchText=CACAO&sortBy=default&sfrase=default
[Consultado 03, 2014]

14. Cooper, K. Campos Gimeñez, E. Jimeñez Alvarez, D. Korneäl Nagy, D. J. Williamson, G. (2007) Rapid reversed phase Ultra-Performance Liquid Chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. J.Agric. Food Chem. 2007, 55, 2841–2847. Disponible en: <http://worldcocoafoundation.org/category/knowledge-center/research-documents/> [Consultado 09.2015]
15. Determinación espectrofotométrica. Disponible en: [http:// www.uca.es /grup-invest/corrosion/integrado/P2.pdf](http://www.uca.es/grup-invest/corrosion/integrado/P2.pdf). [Consultado 02.2014]
16. Domínguez, X. A. (1973) Métodos de investigación fitoquímica. Editorial limusa (México). (1ª Edición).
17. Dúran Quirós, A. Mora Acedo, D. (1998) SURCOS Tomo I. El beneficiado del cacao. Costa Rica. Disponible en: https://books.google.com.sv/books?id=YmSFK7IW5PAC&pg=PA63&lpg=PA63&dq=prefermentacion+en+semillas+de+cacao&source=bl&ots=Qo6pQH4jg7&sig=CIEo9o3fhM5I7CfzELg_OQBph4w&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=pre-fermentacion%20en%20semillas%20de%20cacao&f=false. [Consultado 08.2015].
18. Ecología microbiana de los alimentos (volumen II). Editorial acribia S.A. (1980) [Consultado 03.2014]

19. Fasoli, L. (2013) Conceptos básicos de termómetro y termometría. Facultad de Ciencias Agrarias. Técnica Superior de Etнологía y Viticultura. Física. Disponible en: http://http://campus.fca.uncu.edu.ar:8010/pluginfile.php/18234/mod_resource/content/0/Conceptos%20b%C3%A0sicoas%20de%20termometros%20y%20termometria%2017-06-2013.pdf [consultado 03.2014]
20. Flores Zurita, M. (2014) Evaluación del almacenamiento en mazorca y frecuencia de volteo del grano durante la fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. Disponible en: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/3352/1/AGI-2014-014.pdf>[Consultado 10, 2014]
21. García Carrión, L. F. (2012) Catálogo de cultivares de cacao del Perú. Disponible en: http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/cacao/cultivares_2012.pdf [Consultado 04.2014]
22. García López, M. (2011) Estudio agromorfológico y fisicoquímico de ecotipos de cacao cultivados en los municipios de Usulután y California del Departamento de Usulután en El Salvador. Disponible en: http://webquery.ujmd.edu.sv/siab/catalog/biblio_search_form.php?offset=10&cc=0&searchType=desc_ppales_anadoc,desc_post_anadoc,desc_prop_anadoc&searchText=CACAO&sortBy=default&sfrase=default [Consultado 03, 2014]
23. Garrido, A. Ronco, A.M. Cuantificación por cromatografía y espectrofotometría de un pigmento natural (Astaxantina). Disponible en: https://www.google.com/sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=https%3A%2F%2Fwww.u-cursos.cl%2Fingenieria%2F2009%2F1%2FBT30A%2F1%2Fmaterial_docente%2Fbajar%3Fid_material%3D229545&ei=9mulU42POvbMsQTUI4CQDw&usg=AFQjCNEzEx

yPFuUjjM9iDAU-3C718ALGpQ&bvm=bv.69411363,d.cWc&cad=rja
[Consultado 04.2014]

24. Gervaise, Rovedas L.; Graziani de Fariñas, L. Ortiz de Bertorelli, L. (2009) Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Trop.* 59(2). 119-197. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/at/v59n1/art08.pdf> [Consultado 02.2014]
25. Gervaise, Rovedas L.; Graziani de Fariñas, L. Ortiz de Bertorelli, L. (2009) Influencia de varios factores sobre índices físicos del grano de cacao en fermentación. *Agronomía Trop.* 59 (1). Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002-192X2009000100008&script=sci_arttext [Consultado 02.2014]
26. Gil Quintero, J. A. (2012). Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Colombia. Disponible en: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co/dspace/bitstream/10495/1621/1/TESIS%20Jorge%20Andres%20Gil%20FINAL.pdf> [Consultado 02.2013]
27. Glavnik, Vesny, S. B Vovk, I. (2009) Densitometric determination of (+)-catechin and (-)-epicatechin by 4-dimethylaminocinnamaldehyde reagent. [en línea]. Slovenia. 4485–4491. Disponible en: Journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma. [Consultado 06.2013].
28. Graziani de Fariñas, L. Lemus, M. Ortiz de Bertorelli, L. Trujillo de Leal, A. (2002) Efecto del mezclado de cacaos tipos criollo y forastero de la localidad de Cumboto sobre algunas características físicas de los granos

durante la fermentación. Venezuela. Disponible: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at5201/art/lemus_m.htm [Consultado 02.2014]

29. Gutiérrez Seijas, M. (2012) Efecto de la frecuencia de remoción y tiempo de fermentación en cajón cuadrado sobre la temperatura y el índice de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.). Perú. Disponible en: <http://udoagricola.udo.edu.ve/V12N4UDOAg/V12N4Gutierrez914.pdf> [Consultado 01.2015]
30. Horwitz, W. Editor. Official methods of analysis of AOAC international, 2005. [Consultado 03.2014].
31. Jorrín, J. V. Novo, M. N. Abril Díaz, J. A. Bárcena Ruiz. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. [Base de datos en internet]. Departamento de bioquímica y biología molecular. Campus universitario de Rabanales. 14071-Córdoba. Disponible en: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmo/pdf/11%20CROMATOGRAFIA%20DE%20CAPA%20FINA%20DE%20AAs.pdf> [Consultado 05.2014]
32. K. S. Firibu; O.A. Emmanuel; Q. Jennifer; S. B. Agnes; and S. T. Jemmy (2012) Influence of pulp-preconditioning and fermentation on fermentative quality and appearance of Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao* L) beans. Disponible en: <http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20%2801%29%202011/%2817%29IFRJ-2011-150.pdf> [Consultado 03.2014]
33. Kothe, L. Zimmermann, B. F.; Galensa, R. (2013) Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. Food Chemistry 141 (2013) 3656–3663.

Disponible en: <http://worldcocoafoundation.org/category/knowledge-center/research-documents/> [Consultado 10.2015].

34. Lacueva, A. C. Monagas M. Khan, N. Pulido Izquierdo, M. Urpi Sarda M. Permanyer. Lamuela Raventós, R. M. (2008) Flavanol and Flavonol Contents of Cocoa Powder Products: Influence of the Manufacturing Process. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 3111–3117. Disponible en: <http://worldcocoafoundation.org/category/knowledge-center/research-documents/> [Consultado 09.2015]
35. León Lobos, P. Muñoz Schick, C.; Rosas Cerda, M. Salazar Suazo, E. (2006) Estado de la conservación ex situ de los recursos fitogenéticos cultivados y silvestres en Chile. *Boletín INIA N° 156*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura. Chile. Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR34003.pdf>. [Consultado 03.2014]
36. Manejo pos-cosecha y captación de cacao. (2011) Disponible en: <http://www.chocolatecortes.com/pr/wp-content/uploads/2013/01/pos-cacao.pdf> [Consultado 05.2014]
37. Manual del cultivo de cacao. Manual No. 76. Comité Técnico Estación Experimental Central De La Amazonía - INIAP – DENAREF. Ecuador. (2009). Disponible en: http://www.lica.int/ni/Estudios_PDF/cultivoCacaoEcuador.pdf [Consultado 09.2013]
38. Marcano, D. Hasegawa, M. (2002) *Fitoquímica Orgánica*. Venezuela. Disponible en: <http://books.google.com/sv/books?id=hPkjgPwXD-QC&pg=PA7&lpg=A7&dq=Marcano+Deanna+y+HasegawaMasahisa.+%282002>

%29.+Fitoqu%C3%ADmica+Organica.+Venezuela&source=bl&ots=N8Kc
p80ilz&sig=D_tiFlax8N4pt3LTNG5Vz3xXyPo&hl=es&sa=X&ei=sgzoU8O
VBtLJsQSboYLQCg&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=Marcano%20
Deanna%20y%20Hasegawa%20Masahisa.%20%282002%29.%20Fitoqu
%C3%ADmica%20Organica.%20Venezuela&f=false
[Consultado 05.2014]

39. Martínez Botello, D. (2014) Selección, conservación y evaluación de materiales de alto rendimiento en producción y calidad (Fase I y III), parcelas de agroforestería y jardines clonales. Colombia, FEDECACAO. Disponible en: [http:// es. slideshare.net /FundacinColinvestigacin-y-monitoreo-de-materiales-de-cacao-clonado-fedecacao](http://es.slideshare.net/FundacinColinvestigacin-y-monitoreo-de-materiales-de-cacao-clonado-fedecacao) [Consultado 08.2015].
40. Menéndez Soriano, C. (2012) Efectos vasculares de la quercetina y la catequina: interacciones y papel de los procesos de conjugación y desconjugación metabólica. Madrid, España. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/16238/1/T33896.pdf>. [Consultado 05.2014]
41. Metas & Metrológicos Asociados. Metrología Óptica. Espectrofotómetros de Ultravioleta-Visible [revista en internet]. (2007). 6 (2). Disponible en: <http://www.metas.com.mx/guiametas/La-Guia-MetAs-07-04espectrofotometria.pdf> [Consultado 02.2014]
42. Morazán Chávez, A. I. (2012) Evaluación de las características microultraestructurales para el control de calidad de la fermentación de ocho genotipos diferentes de semillas fermentadas de *Theobroma cacao* L. El Salvador. [Consultado 03.2014].

43. Norma de Costa Rica, INTE CTN 23-02-04-09. (2009, 23 julio). Cacao y productos derivados del cacao. Instituto de normas técnicas de Costa Rica. Disponible en: http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_INTE_23-02-04-09.pdf [Consultado 04.2016].
44. Norma técnica colombiana, NTC 1252. (2003, 28 abril). Cacao en grano. ICOTEC. Disponible en: <https://www.grancolombia.com.co/pdf/norma.pdf> [Consultado 04.2016].
45. Normas Mexicanas. (1980, 26 marzo). Cacao en grano fermentado, fermented cocoa beans. Dirección general de normas. Disponible: <https://www.grancolombia.com.co/pdf/norma.pdf> [Consultado 03.2014].
46. Orellana Torres, T. Molina Guzmán, L. (2010) Estudio fisicoquímico y microbiológico en el proceso de fermentación tradicional y no tradicional, mediante la utilización de cuatro medios de cultivo para identificar la presencia de levaduras, bacterias lácticas y acéticas en las semillas de cacao *Theobroma cacao* del ecotipo Trinitario, cultivado en la Hacienda San José del Real de La Carrera–Usulután. Disponible en: http://webquery.ujmd.edu.sv/siab/catalog/biblio_search_form.php?offset=10&c=0&searchType=desc_ppales_anadoc,desc_post_anadoc,desc_prop_anadoc&searchText=CACAO&sortBy=default&sfrase=default [Consultado 03, 2014]
47. Palacios Cedeño, Á. L. (2008) Establecimientos de parámetros (físicos, químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar *Theobroma cacao* producido en dos zonas identificadas al norte y sur del litoral ecuatoriano. Ecuador. Disponible en: <http://www.google.com.sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.iniap.gob.ec%2Fnsite%2Fimagenes%2Fdocumentos%2FE>

STABLECIMIENTOS_PARAMETROS.pdf&ei=YNidU_5eic2xBOb4gNgL&usg=AFQjCNEPTpLCZLY1gv3ovY0MUPgBH5P6nQ&bvm=bv.68911936,d.cWc [Consultado 03.2014]

48. Pérez Zuñiga, J. I. (2009) Evaluación y caracterización de selecciones clonales de cacao (*Theobroma cacao* L.) del Programa de Mejoramiento del CATIE. Costa Rica. Disponible en: http://www.catie.ac.cr/BancoMedios/Documentos%20PDF/pcc_jose_perez.pdf. [Consultado 03.2014]
49. Procedimiento para determinar materia grasa. Disponible en: http://www.ispch.cl/lab_amb/met_analitico/doc/ambiente%20pdf/GrasSoxhlet.pdf. [Consultado 03.2014]
50. Pulido A, B. L. Rapoport, H. Rodríguez, M. I. Olmedilla A. Búsqueda de sistema de selección de variedades polinizantes. En: Foro del Olivar y el medio ambiente. España. Explosiva. 2005. 7P Disponible en: <file:///C:/Users/F.%20Fuentes%20Argueta/Downloads/A074.pdf> [Consultado 03.2014].
51. Quiroz Reyes; Aguilar Mendez; Ramírez Ortiz y Ronquillo de Jesús. (2013) Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 12, No. 1 (2013) 11-18. Disponible: <http://worldcocoafoundation.org/category/knowledge-center/research-documents/> [Consultado 10.2015].
52. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. (2006) Nutraceuticos: componente emergente para el beneficio

de la salud. Sistema de información científica. Vol. XL. Núm. 3. 20(28): 22-23. [Consultado 03.2014]

53. Red Regional de generación y transferencia de tecnología en cacao (PROCACAO). (1990) Seminario regional sobre tecnología poscosecha y calidad mejorada del cacao. Turrialba Costa Rica. PROCACAO. 20-21. Disponible en: http://books.google.com/sv/books?id=1HArmXYE_rIC&pg=PA222&lpg=PA222&dq=influencia+de+pH+en+fermentacion+de+cacao&source=bl&ots=uHmEwekUEQ&sig=L8Zj79gN92p83stVNaLkZb7xlQg&hl=es&sa=X&ei=aodiU7uZEurE8gHFk4GIBQ&ved=0CEcQ6AEwBg#v=onepage&q=influencia%20de%20pH%20en%20fermentacion%20de%20cacao&f=false [Consultado 10.2013]

54. Reyes E. H. Vivas, J. Romero, A. (2000) La calidad de cacao: II Cosecha y fermentación. Venezuela. FONAIAP DIVULGA N° 66. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd66/texto/calidadcacao.htm [Consultado 08.2015]

55. Rouessac, F. Rouessac, A. (2003) Análisis Químico. Métodos y técnicas instrumentales modernas. Editor McGraw-Hill. [Consultado 03.2014]

56. Sánchez Campuzano, V. A. (2007) Caracterización Organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. Ecuador. Disponible en: http://conectarura.org/sitio/sites/default/files/documentos/Caracterizacionorganolepticacacao%20Theobroma%20cacao%20L.seleccionarboles%20perfilesabor_interescmercial.pdf [Consultado 11.2013]

57. Solanes, R. E. Alimentos funcionales y sus productos nutracéuticos (AF). Disponible en: http://ocw.upm.es/tecnologia-de-alimentos/industria-alimentaria-y-su-repercusion-en-la-salud/contenidos/alimentos_funcionales/Unidad6.htm [Consultado 02.2014]
58. Suazo Mercado, Y. S. (2012) Efecto de la fermentación y el tostado Sobre la concentración polifenólica y Actividad antioxidante de cacao Nicaranguense. España. . Disponible en: <http://www.google.com/sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB0QFjAA&url=http%3A%2F%2Facademica.unavarra.es%2Fhandle%2F2454%2F6534&ei=wtidUxH9WksQSw9YGABw&usg=AFQjCNGJ1WqAKS5h4EJnVuxv9egvlfptyQ&bvm=bv.68911936,d.cWc> [Consultado 03.2014]
59. Trase, E. (1991) Farmacognosia. McGraw-Hill – Interamericana. México. (13ª ed.) 271-272. [Consultado 10.03.2014]
60. Valenzuela B., A. (2007) El Chocolate, Un Placer Saludable. Revista Chilena de Nutrición. Vol. 34, 003. Chile. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/469/46934302.pdf> [Consultado 09.2013]
61. Vargas Santander, C. (2012) Fermentación y secado del cacao para optimizar la industria del chocolate. Disponible en: http://es.slideshare.net/Cientifica_del_Sur/fermentacin-del-cacao-para-optimizar-la-industria-del-chocolate [Consultado 08.2015].
62. Wollgast, J. (2005) The contents and effects of polyphenols in chocolate. [Dissertation]. Germany. [Internet]. Disponible en: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2005/2239/pdf/WollgastJan-2005-06-10.pdf> [Consultado 02.2013]

GLOSARIO

- **Accesión:** Se denomina así a la muestra viva de una planta o población mantenida en un banco de germoplasma para su conservación y/o uso. Una especie puede estar representada por varias accesiones que se diferencian por el tipo de población al que pertenecer (variedad primitiva, variedad tradicional, variedad mejorada, líneas avanzadas de mejoramiento, plantas silvestres) y/o por su origen (lugar de recolección o creación) ⁽³³⁾.
- **Alimento funcional:** son aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar. Estos alimentos, además, ejercen un papel preventivo ya que reducen los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades ⁽⁵⁾.
- **Beneficiado del cacao o manejo de cosecha y post cosecha:** este proceso incluye etapas de recolección, desgranado, fermentación, secado y almacenamiento ⁽³⁶⁾.
- **Cotiledones.** Son las hojas primordiales constitutivas de la semilla y se encuentran en el germen o embrión ⁽⁵⁷⁾.
- **Genotipo:** se refiere a la información genética que posee un organismo en particular ⁽⁵⁶⁾.
- **Fermentación:** Es un proceso catabólico de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico ⁽⁵⁹⁾.
- **Flavonoides:** es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides" ⁽⁴⁰⁾.

- **Híbridos:** es el organismo vivo animal o vegetal procedente del cruce de dos organismos de razas, especies o subespecies distintas, o de alguna o más cualidades diferentes ⁽¹⁶⁾.
- **Isómeros:** Se llaman isómeros a moléculas que tienen la misma fórmula molecular pero distinta estructura. Se clasifican en isómeros de cadena, posición y función ⁽¹⁶⁾.
- **Isomerización:** Se define isomerización como el proceso químico mediante el cual una molécula es transformada en otra que posee los mismos átomos pero dispuestos de forma distinta. De este modo, se dice que la primera molécula es un isómero de la segunda ⁽¹⁶⁾.
- **Polimerización:** La polimerización es una reacción química por la cual los reactivos, monómeros (compuestos de bajo peso molecular), forman enlaces químicos entre sí, para dar lugar a una molécula de gran peso molecular (macromolécula), ya sea esta de cadena lineal o de estructura tridimensional, denominada polímero ⁽¹⁶⁾.
- **Ecotipo:** es una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, un ambiente particular o un ecosistema definido, con unos límites de tolerancia a los factores ambientales ⁽¹³⁾.
- **Epimerización:** un epímero es un estereoisómero de otro compuesto que tiene una configuración diferente en uno solo de sus centros estereogénicos ⁽¹⁶⁾.

El proceso de epimerización consiste en la alteración en la conformación espacial de un compuesto para convertirse en su epímero. Específicamente, las catequinas simples (catequina y epicatequina son dos isómeros, que a su vez pueden tener cada una de ellas dos epímeros (+ y -), de acuerdo con las estructuras que se muestra en la figura: Se conoce que, durante la biosíntesis, la catequina y epicatequina se sintetizan

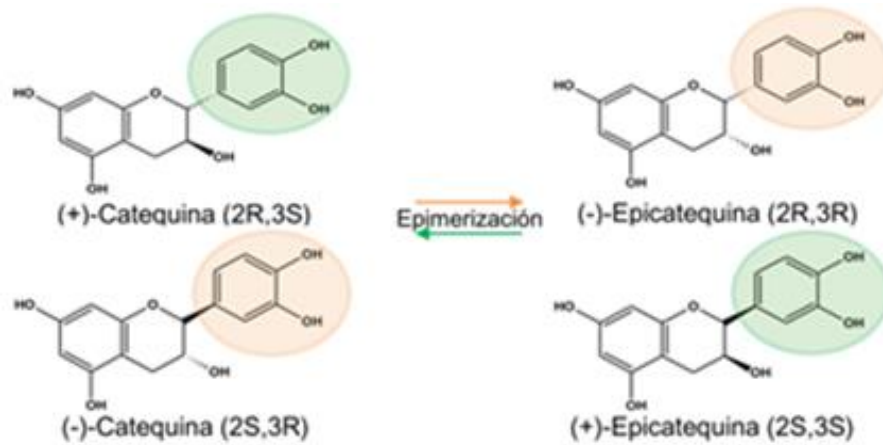


Figura N° 29. Estructuras químicas de las principales catequinas en cacao y sus respectivos enantiómeros.

principalmente como (+)-catequina y (-)-epicatequina, y que las formas atípicas (-)- catequina y (+)-epicatequina están presentes muy raramente en la naturaleza y su presencia se debe a una acción enzimática o condiciones del medio que favorecen la reacción ⁽²⁶⁾.

- **Epimeros:** es un estereoisómero de otro compuesto que tiene una configuración diferente en uno solo de sus centros estereogénicos ⁽¹⁶⁾.
- **Enantiómeros:** Son estereoisómeros cuyas moléculas son imágenes de espejo entre sí, pero éstas no pueden ser sobrepuestas una en la otra por lo que no coinciden en todas sus partes ⁽¹⁶⁾.
- **Taninos condensados:** (a veces también llamados **proantocianidinas**) son polímeros de un flavonoide llamado antocianidina ⁽¹⁶⁾.

ANEXOS

ANEXO N° 1
UBICACIÓN DEL CULTIVAR SAN JOSÉ DEL REAL DE LA CARRERA

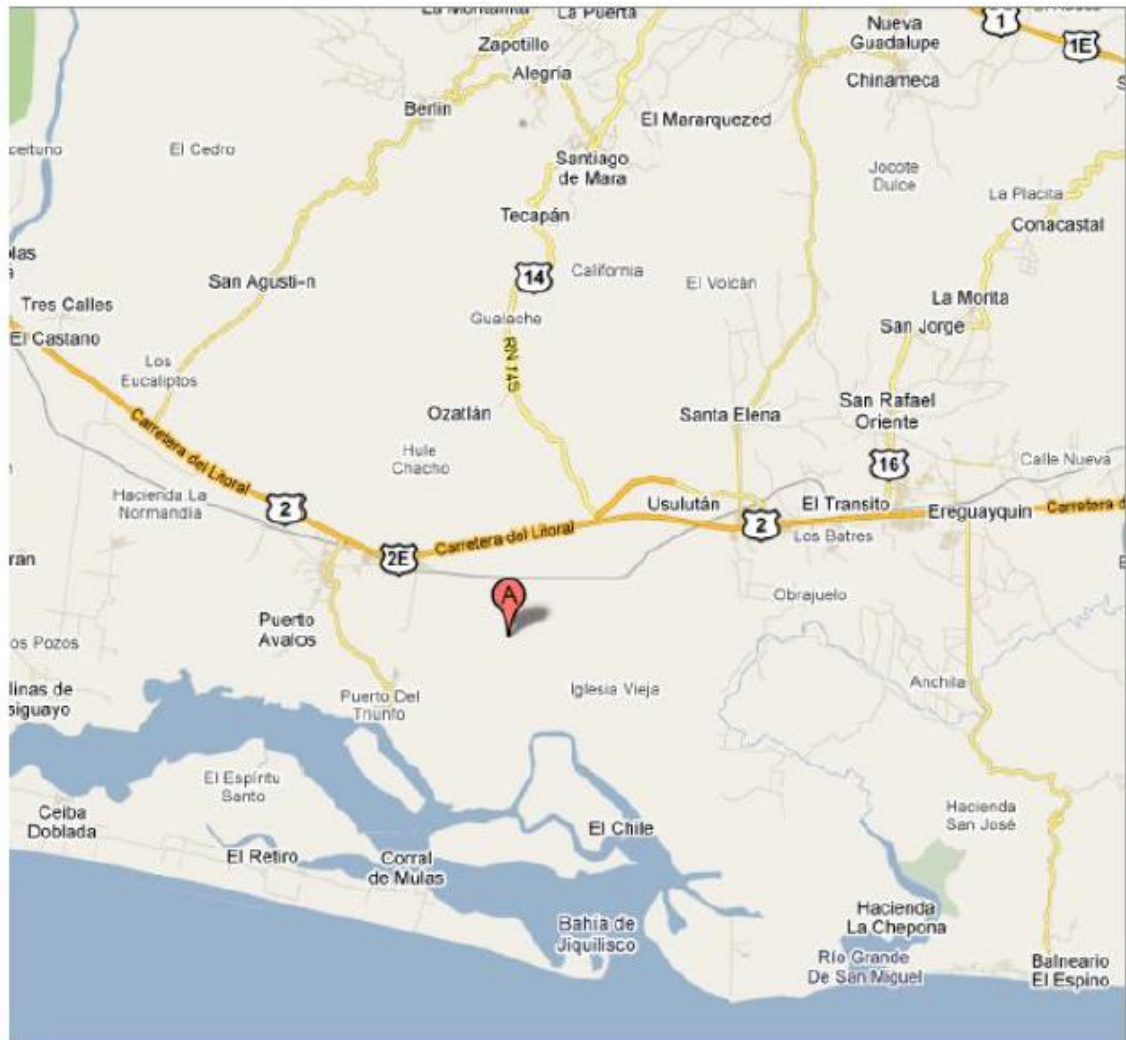


Figura N° 30. (A) Ubicación del Cultivar San José del Real de La Carrera en Usulután (Ubicación: $+13^{\circ} 18' 0.00''$, $-88^{\circ} 30' 0.00''$; Altitud: 41 metros), marcada por la letra A.

ANEXO N° 2
ESQUEMAS DE PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS REALIZADAS

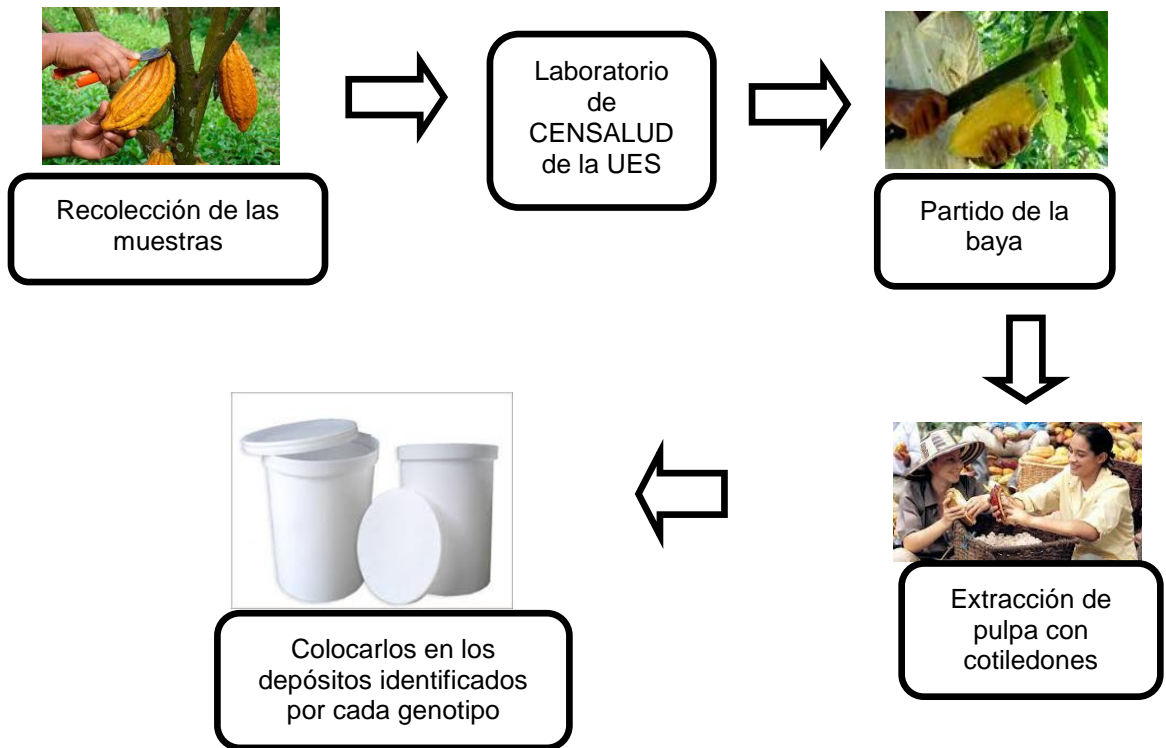


Figura N° 31. Esquema del procedimiento para el tratamiento previo de las muestras de cacao.

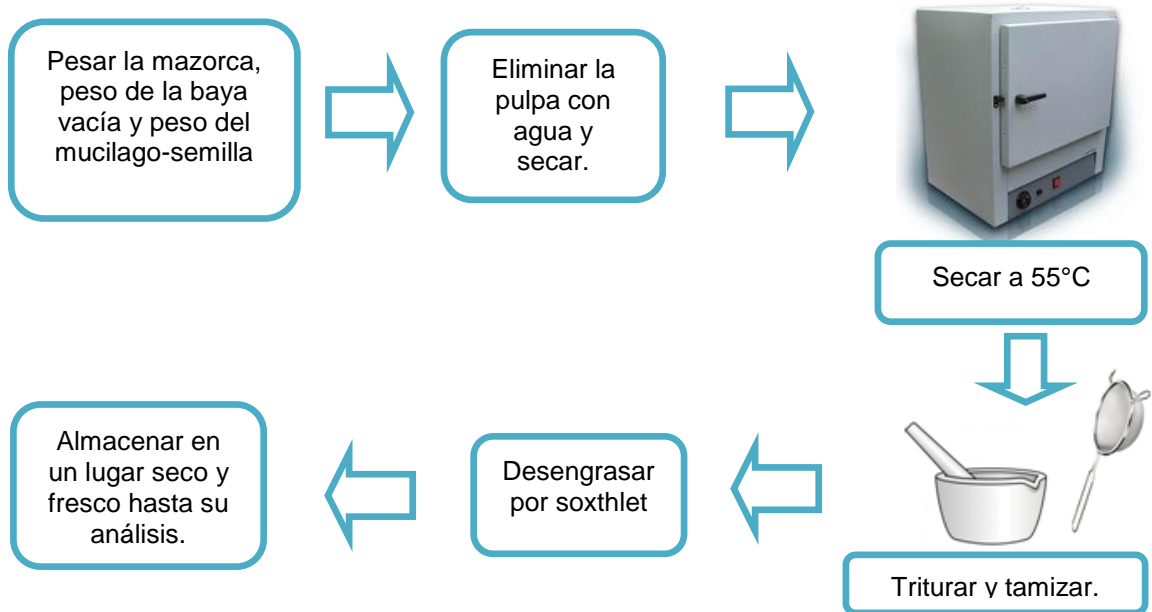


Figura N° 32. Esquema del procedimiento en semillas de cacao no fermentadas.

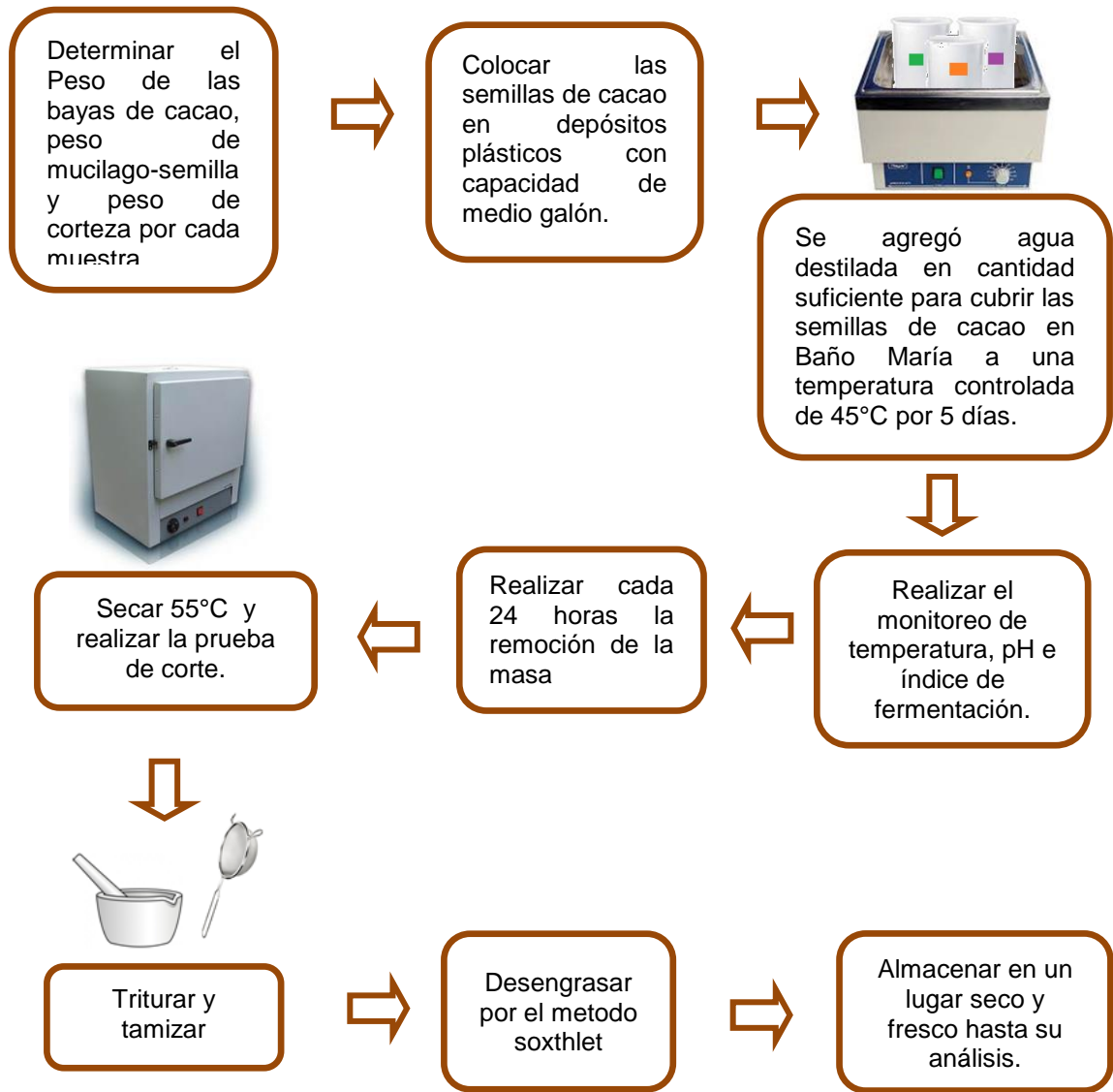


Figura N° 33. Esquema del procedimiento en semillas de cacao fermentadas.

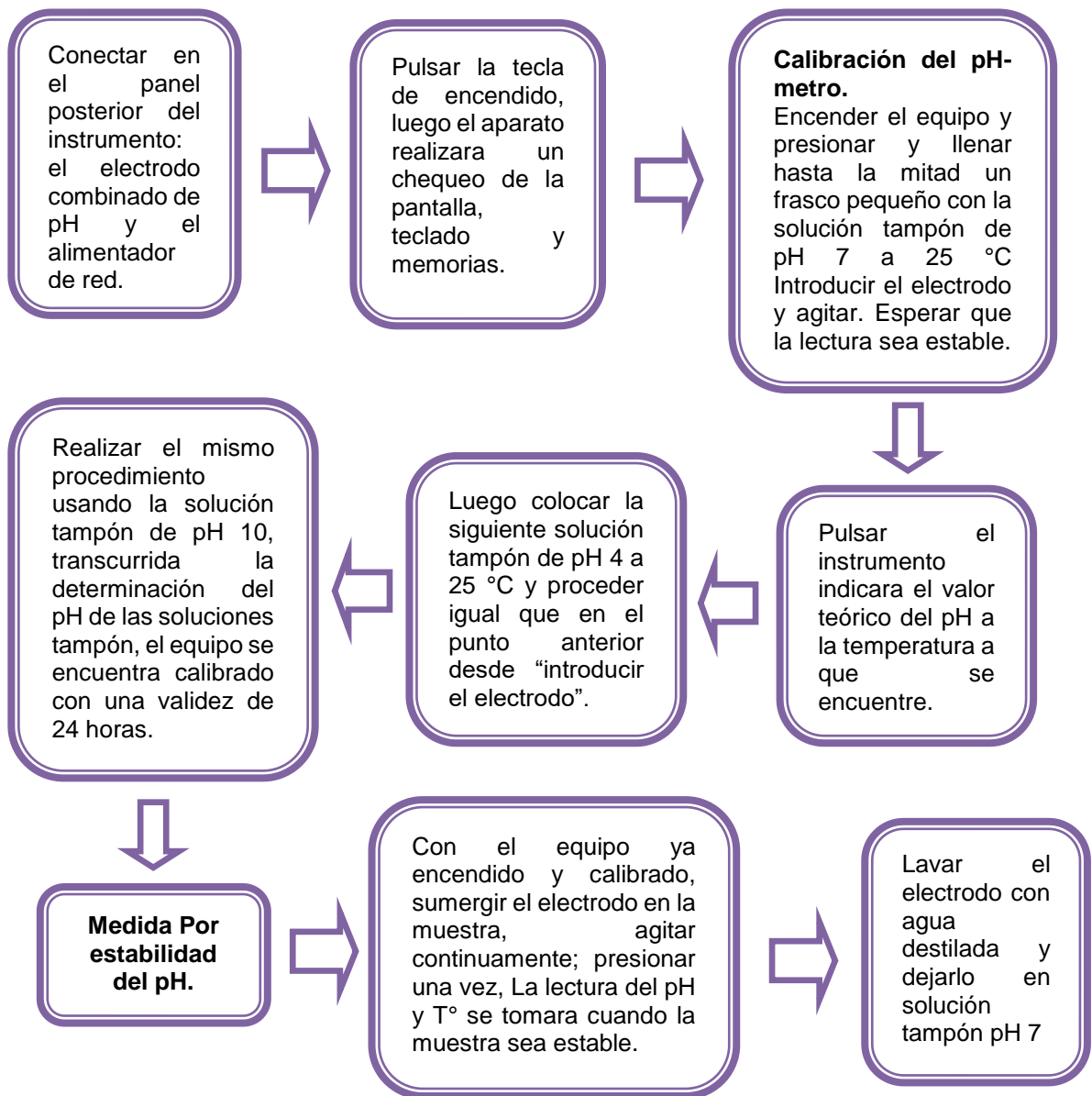


Figura N°34. Esquema del procedimiento para la medición del pH y temperatura.

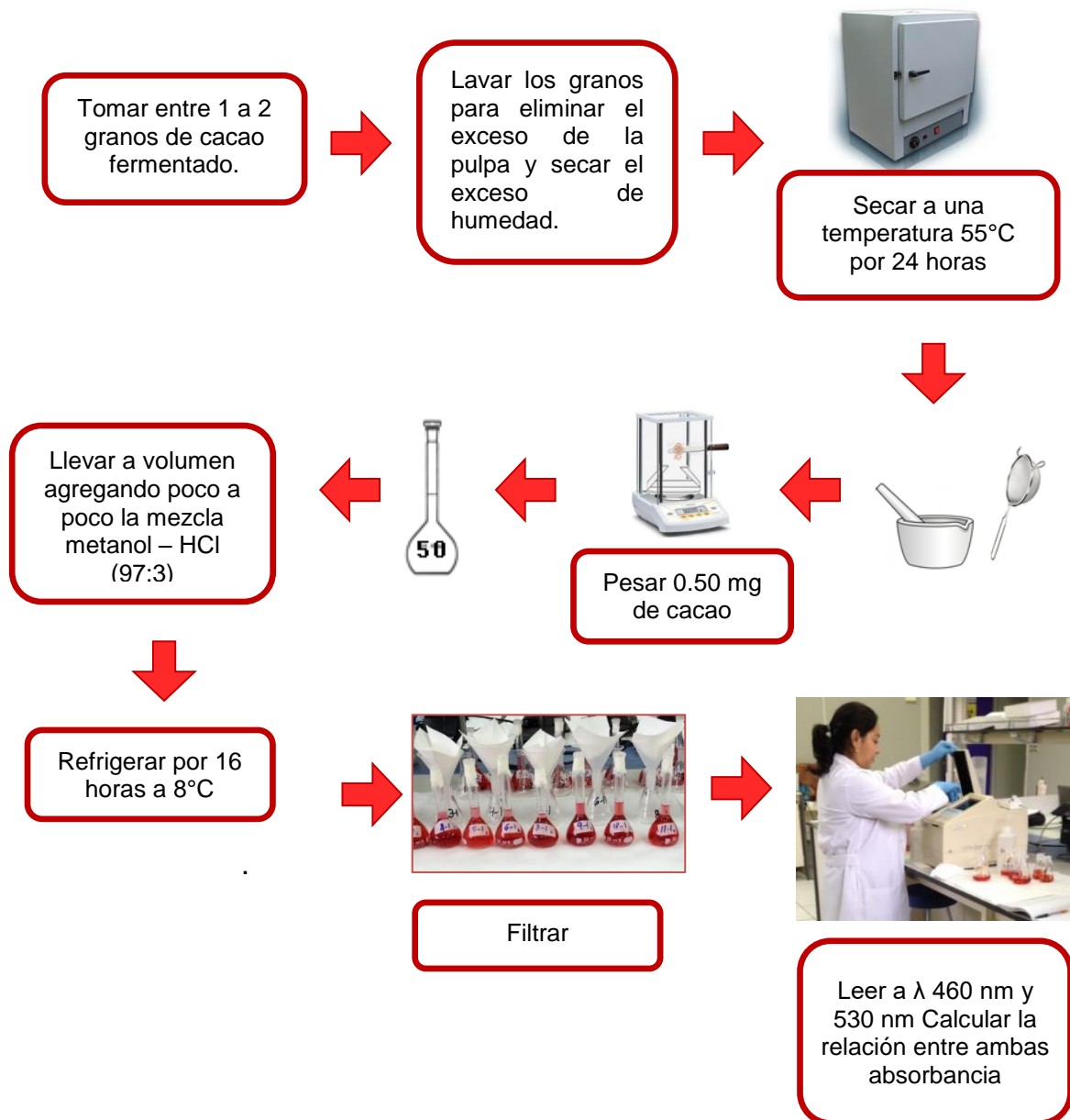


Figura N° 35. Esquema del procedimiento para la medición del índice de fermentación.

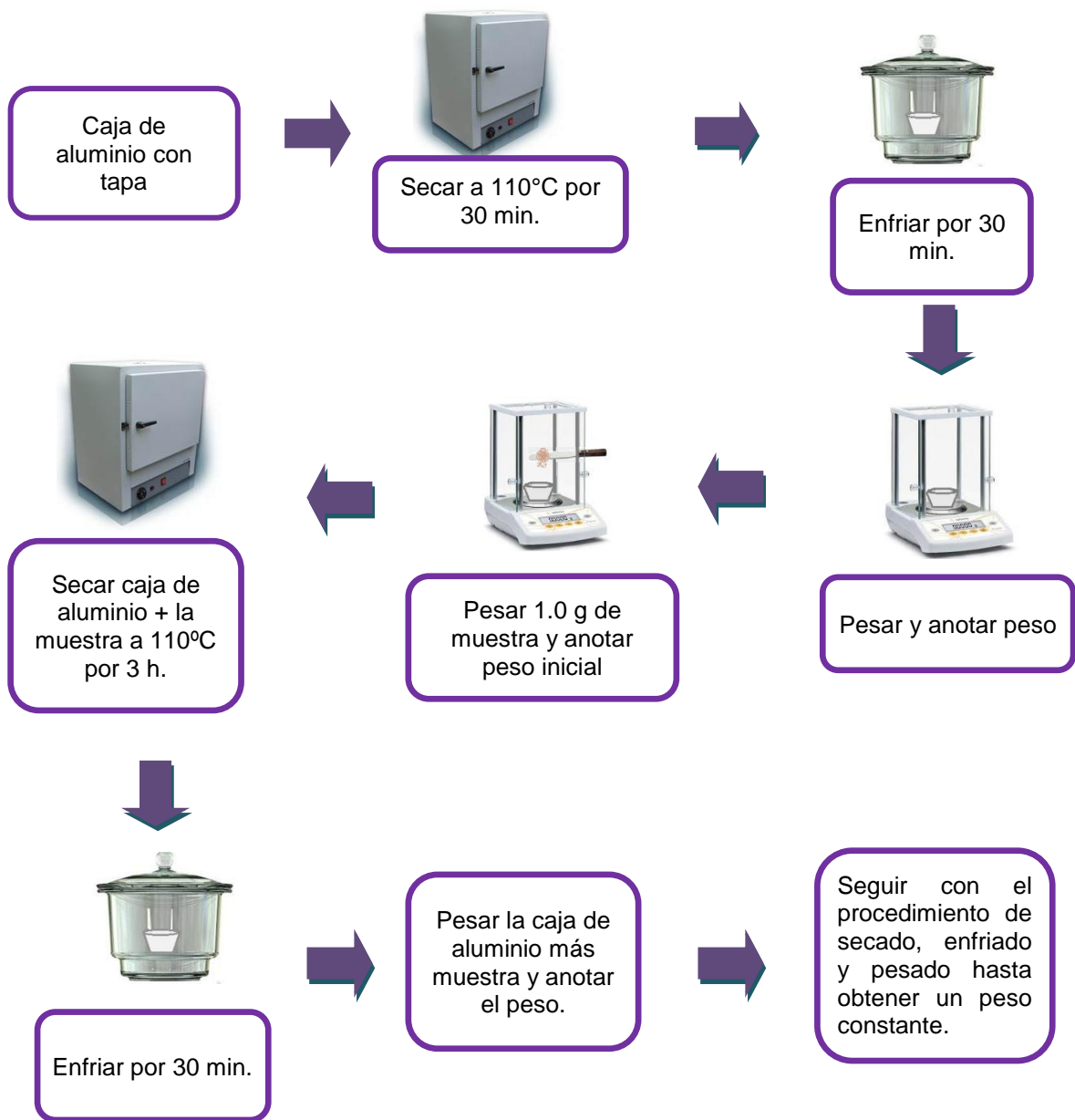


Figura N° 36. Esquema del procedimiento para la determinación del contenido de humedad.

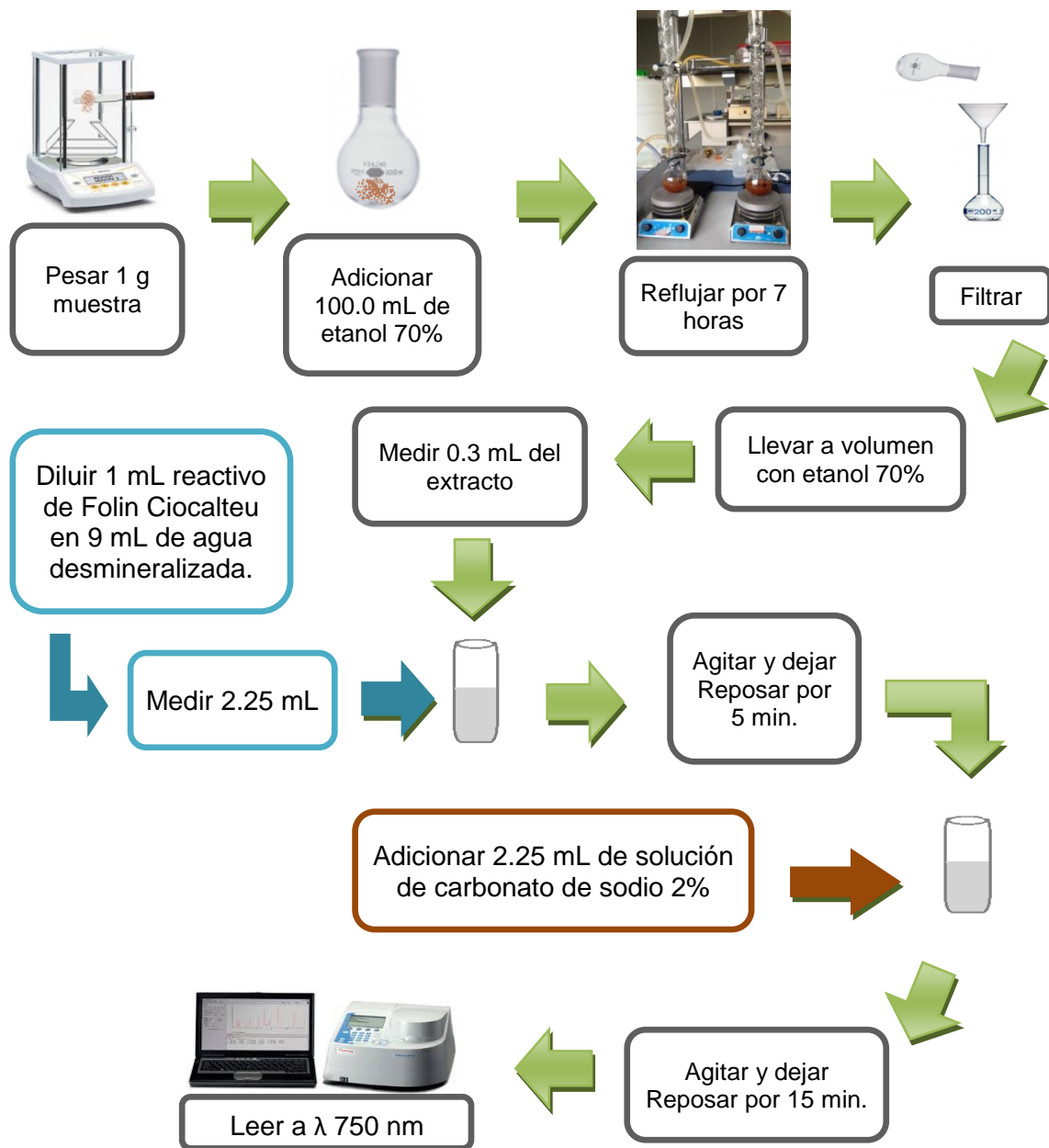


Figura N° 37. Esquema del procedimiento para la determinación del estimado de polifenoles totales.

Nota: se determinó la concentración mediante el empleo de una curva estándar de Catequina (10-100 µg).

- Preparación de las soluciones madres de los estándares.
Estándares: (-)-Epicatequina y Procianidina B1 y B2

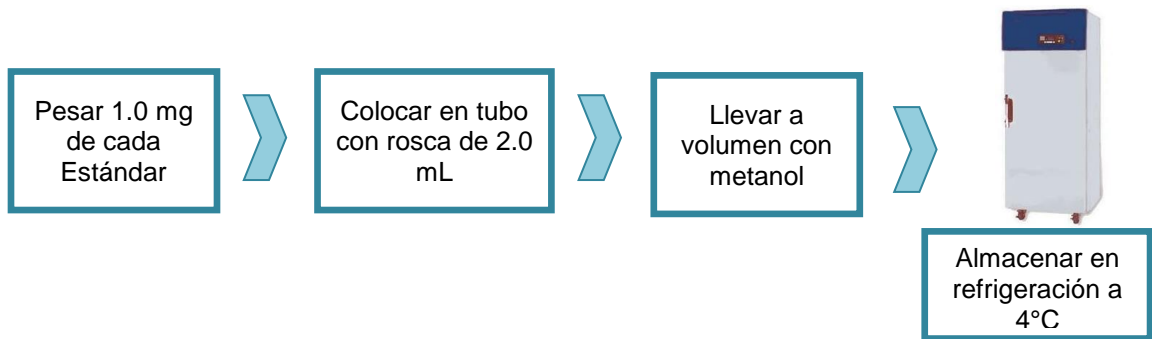


Figura N° 38. Esquema del procedimiento para la preparación de las soluciones madres de (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2.

- Preparación de extractos.

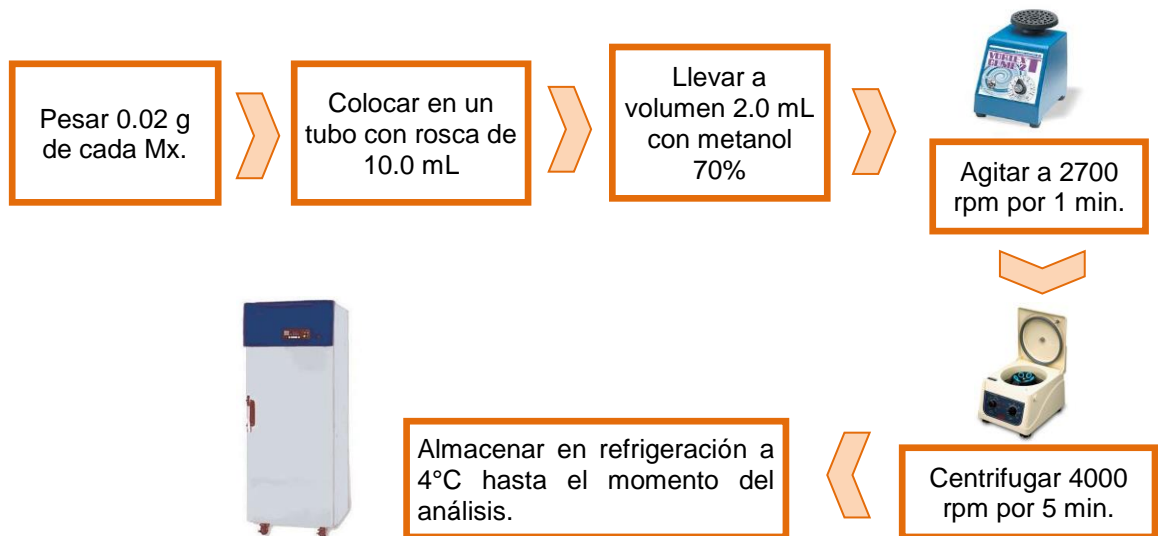


Figura N° 39. Procedimiento para la preparación de los extractos de las semillas secas fermentadas y no fermentadas.

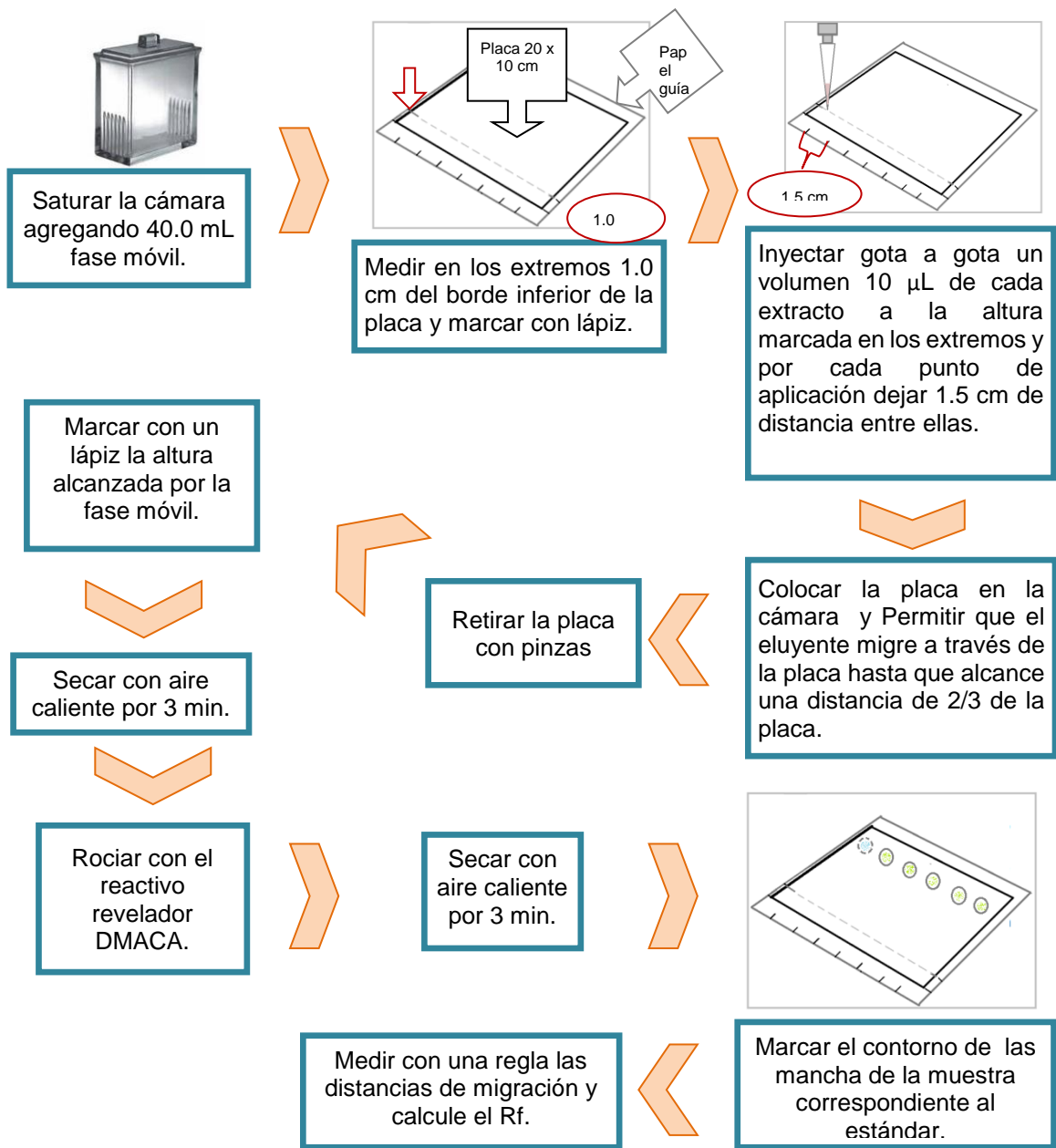


Figura N° 40. Esquema del procedimiento para la aplicación de los estándares y extractos de las semillas secas fermentadas y no fermentadas.

Nota: cada aplicación de cada extracto se realizó por triplicado.

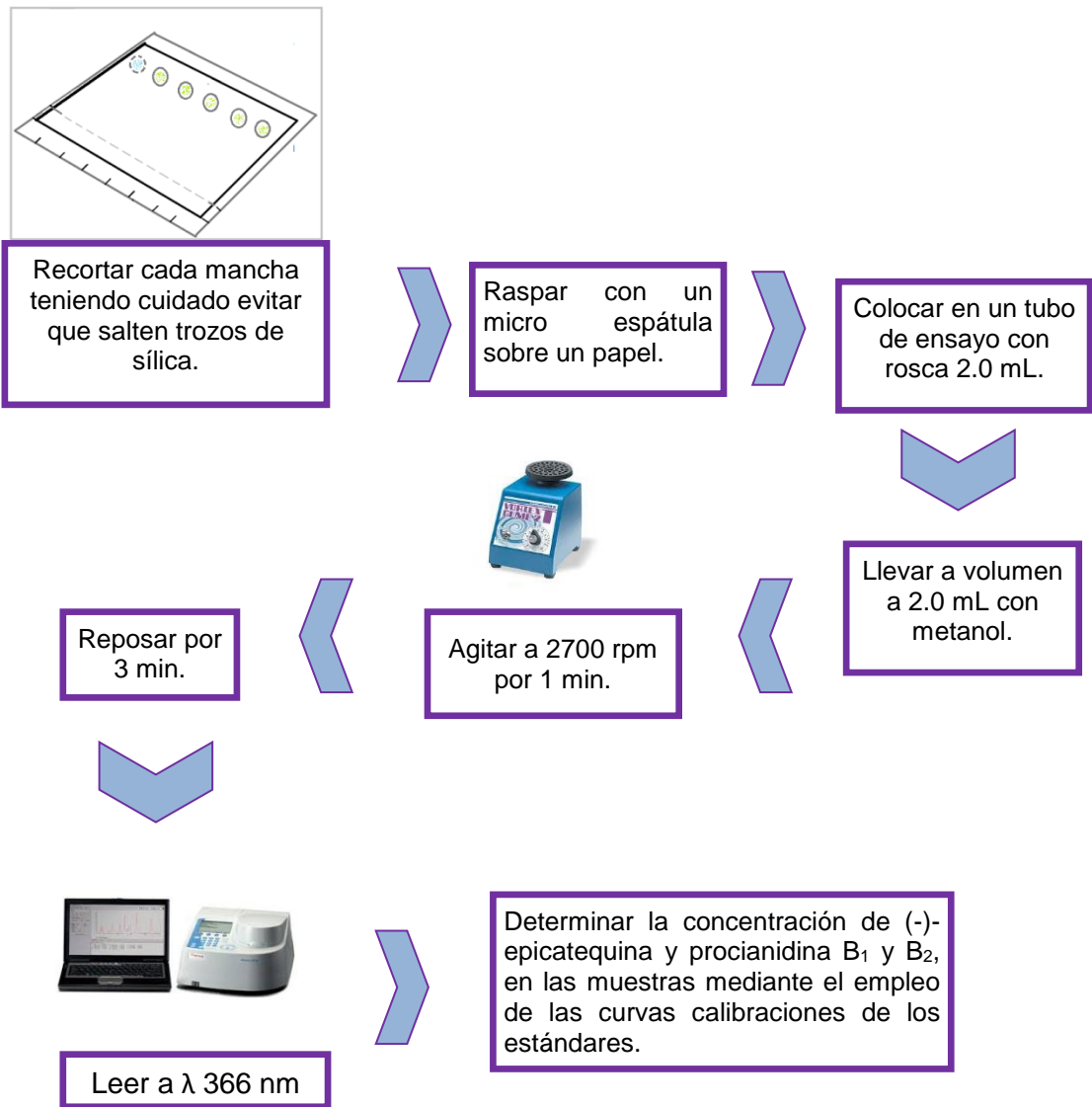


Figura N° 41. Esquema del procedimiento para la Identificación de los extractos de las semillas secas fermentadas y no fermentadas.

Nota: la preparación del blanco es sílica + metanol para la lectura y la curva de calibración de los estándares se realizó de igual como se trató los extractos de cada muestra.

ANEXO N° 3
EXTRACION DE LA MATERIA GRASA EN LAS MUESTRAS DE
CACAO (16) (49)

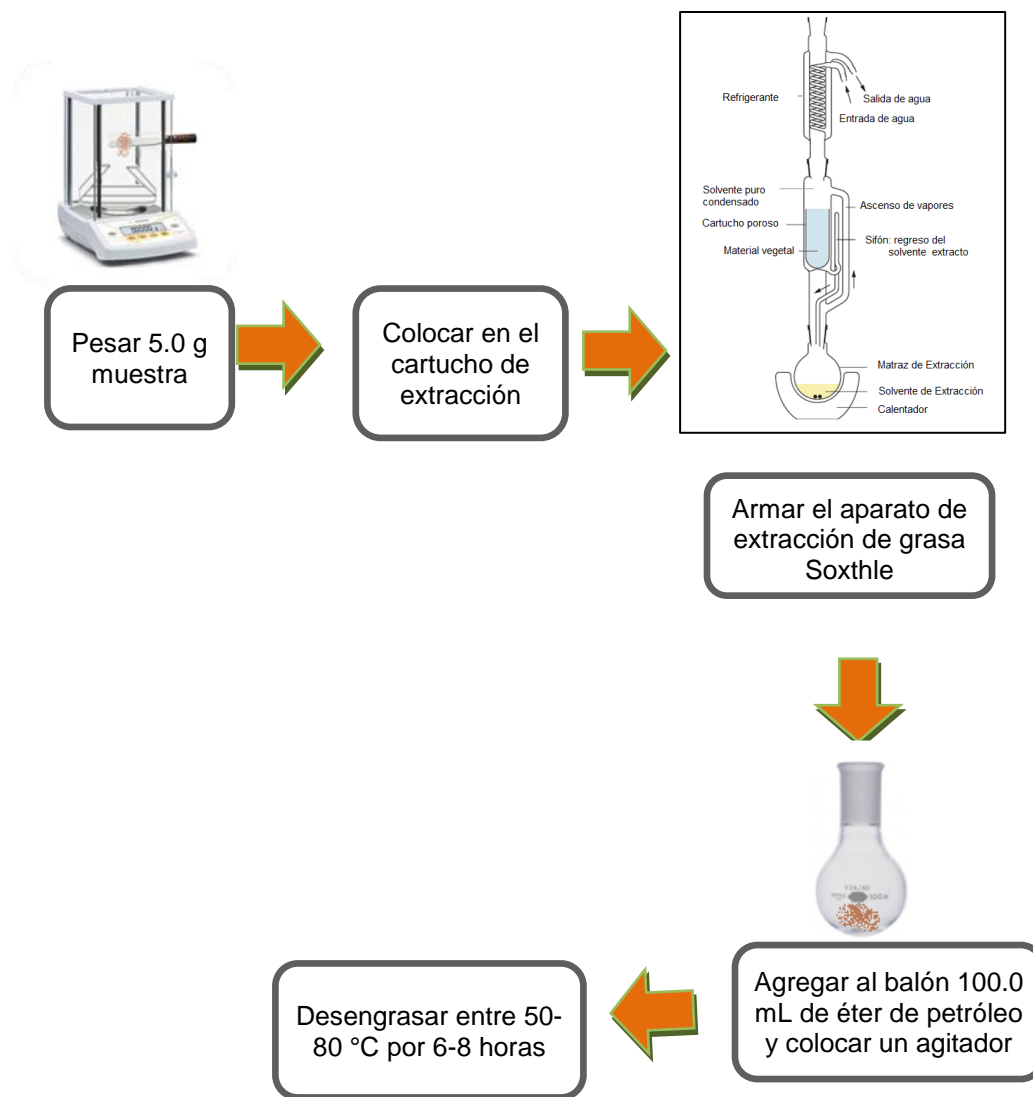


Figura N° 42. Esquema del procedimiento para la extracción de grasas Soxhlie.

ANEXO N° 4.
PRUEBA DE CORTE Y CRITERIOS PARA LA INSPECCIÓN VISUAL
DE LAS SEMILLAS FERMENTADAS

PRUEBA DE CORTE

- Tomar 1 o 2 granos de cacao secos.
- Hacer un corte vertical en el centro de la semilla.
- Comparar el color del cotiledón con los criterios para ver el grado de fermentación.

CRITERIOS PARA LA INSPECCIÓN VISUAL DE LAS SEMILLAS FERMENTADAS (10)

- **Almendras de color marrón o café:** poseen una fermentación completa; los ácidos han causado la muerte del embrión y apertura de las vacuolas celulares de pigmentación. Las almendras están hinchadas y la testa se separa fácilmente del cotiledón. La calidad del sabor y aroma del grano es óptima para la elaboración de chocolates gourmet.
- **Almendras marrones con bordes violetas:** han sufrido solo una fermentación parcial; los ácidos no han penetrado completamente y una proporción de las vacuolas está intacta; el cotiledón está algo compacto y la testa moderadamente suelta. La calidad del sabor es regular y aprovechable para producir chocolate.
- **Almendras violetas:** son aquellas que no se han fermentado completamente; contienen un exceso de acidez procedente de la pulpa, la que en forma de ácido acético penetró tempranamente a los cotiledones. Las almendras no están hinchadas y la apariencia interna es compacta; son la fuente de un sabor astringente y ácido.
- **Almendras pizarrosas (de color gris oscuro como el de una pizarra escolar):** las almendras no han logrado fermentar, entre otras razones porque provienen de bayas pintonas; la compactación es extrema y producen sabores amargos y astringentes de alta intensidad; el color gris pizarra es un defecto muy serio para la industria.

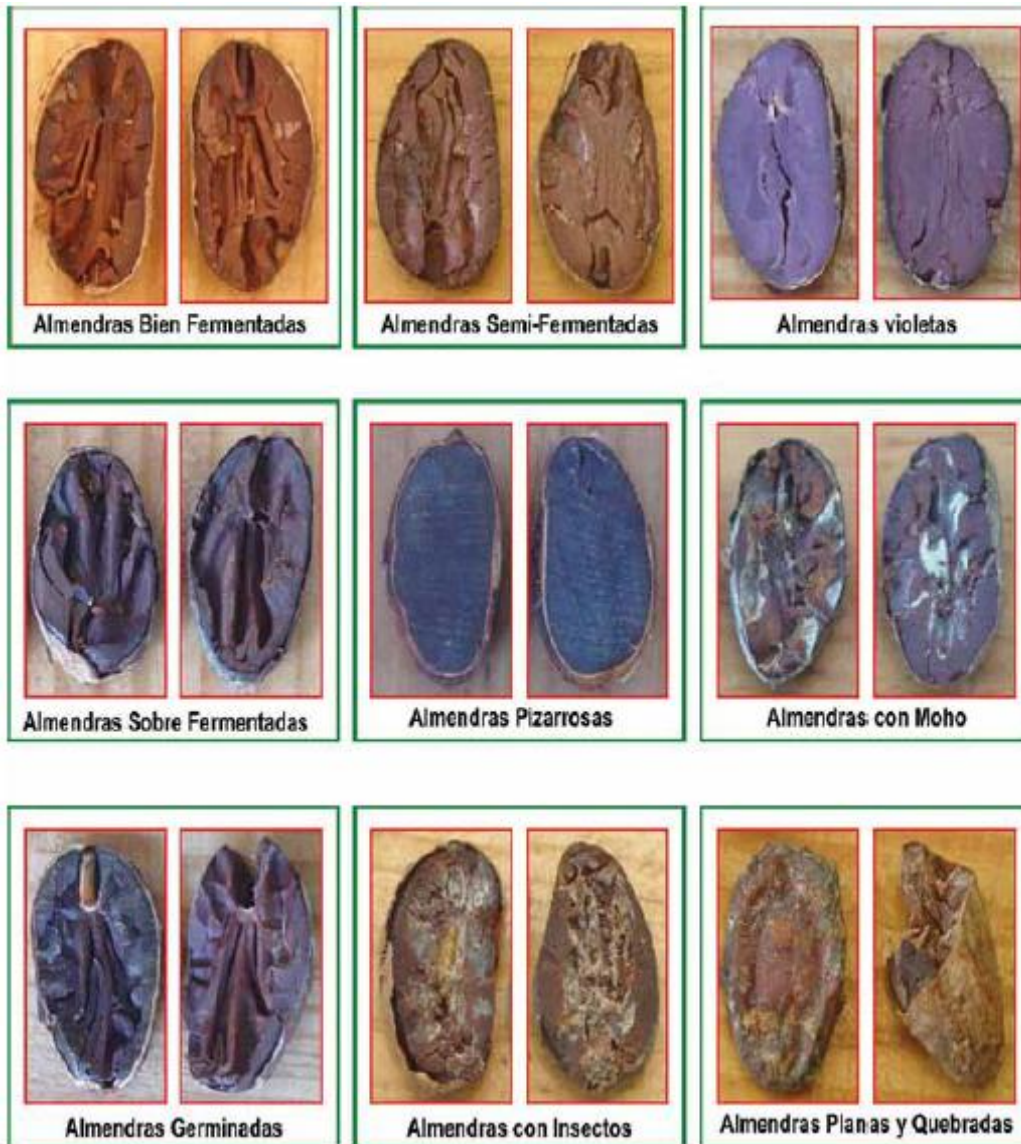


Figura N° 43. Criterios para la Inspección visual de las semillas ⁽¹¹⁾

ANEXO N° 5
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS FRUTOS DE CACAO
ANALIZADOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Descriptores Morfológicos de frutos de cacao para la clasificación de las Muestras (21).



Figura N° 44. Ápice y constricción basal del fruto de cacao.

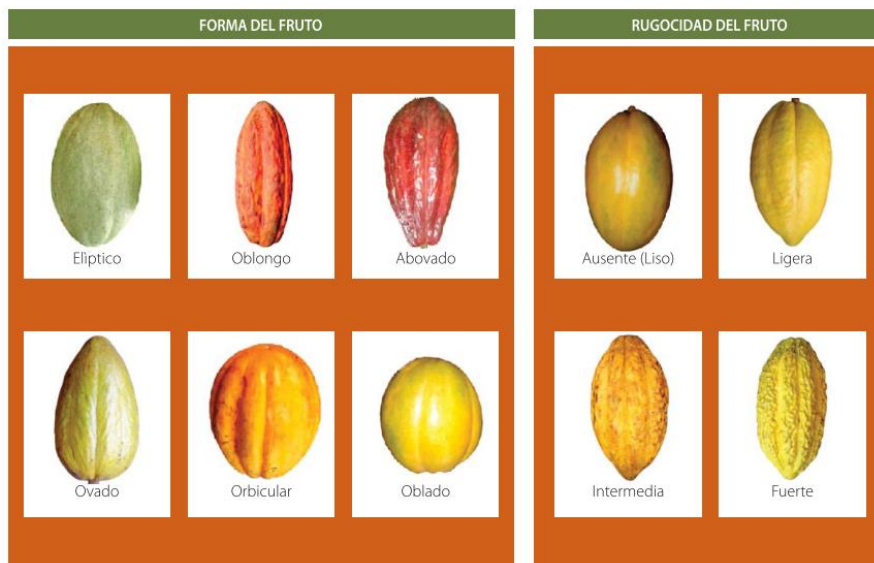


Figura N° 45. Forma y rugosidad del fruto de cacao.

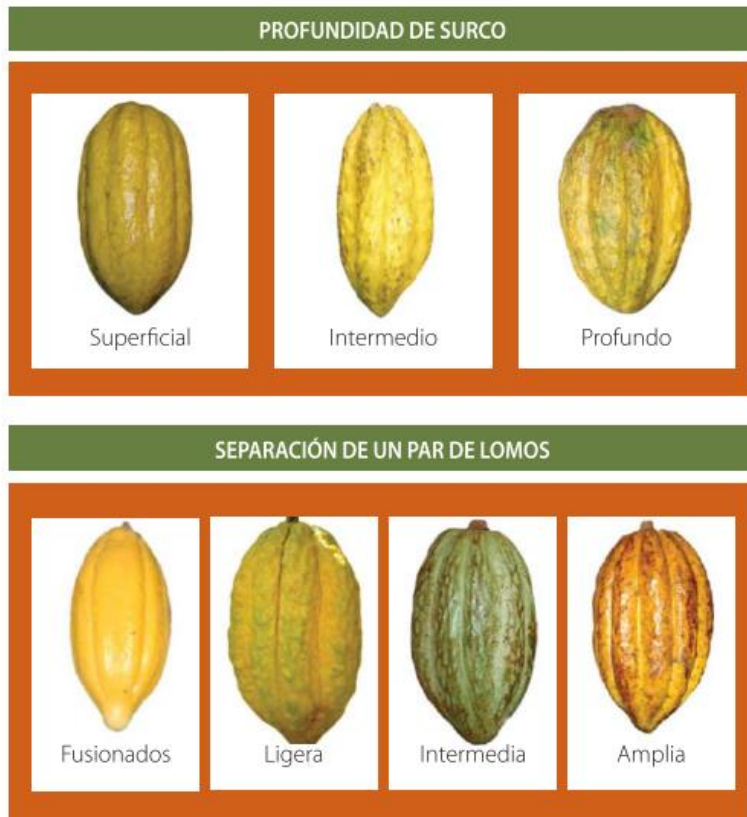


Figura N° 46. Profundidad del surco y separación de lomos del fruto de cacao.

Descriptores Morfológicos de semilla de cacao ⁽²¹⁾.



Figura N° 47. Descriptores morfológicos de semillas de cacao.

Cuadro N° 6. Características descriptivas de los frutos de cacao según su tipo

(41) (47)

TIPO	FORASTERO	TRINITARIO
CARACTERÍSTICAS		
Forma	Esferoide	Oblonga
Color	Verde cambia a amarillo	Verde con morado cambia a amarillo con rojo
Constricción basal	Ausente	Pronunciada
Ápice	Mamiforme	Intermedia
Rugosidad de la superficie	Ligera	Intermedia
Profundidad de los surcos	Superficial	Intermedia
Arreglo de semillas	Ordenado	Intermedia

ANEXO N° 6
RESULTADOS DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS DURANTE
LA FERMENTACION

DETERMINACION DEL INDICE DE FERMENTACION

Ejemplo de caculo para la determinación de IF:

$$\text{Índice de fermentación} = \frac{\text{Fracción II}}{\text{I}}$$

Dónde:

Fracción I: Absorbancia a 530 nm

Fracción II: Absorbancia a 460 nm

Muestra N° 1.

$$\text{Índice de fermentación} = \frac{0.230}{0.485} = 0.474$$

Tabla N°18. Resultados individuales para la determinación del índice de fermentación (IF) durante la fermentación.

DIAS	1			2		
	Fracción I Abs. (530 nm)	Fracción II Abs. (460 nm)	IF Fracción II / Fracción I	Fracción I Abs. (530 nm)	Fracción II Abs. (460 nm)	IF Fracción II / Fracción I
1	0.485	0.230	0.474	0.316	0.461	1.459
	0.363	0.233	0.642	0.332	0.500	1.506
2	0.451	0.280	0.621	0.243	0.297	1.222
	0.362	0.282	0.779	0.246	0.302	1.228
3	0.450	0.230	0.511	0.274	0.299	1.091
	0.333	0.231	0.694	0.237	0.308	1.300
4	0.515	0.304	0.590	0.281	0.458	1.630
	0.468	0.270	0.577	0.319	0.439	1.376
5	0.524	0.214	0.408	0.209	0.298	1.426
	0.353	0.257	0.728	0.213	0.300	1.408
6	0.357	0.254	0.711	0.252	0.289	1.147
	0.271	0.214	0.790	0.258	0.292	1.132
8	0.442	0.215	0.486	0.219	0.292	1.333
	0.366	0.263	0.719	0.216	0.261	1.208
9	0.269	0.146	0.543	0.354	0.464	1.311
	0.502	0.286	0.570	0.360	0.504	1.400

Tabla N° 18. Continuación

Días / muestras	1			2			
10	1.117	0.354	0.317	0.348	0.463	1.330	
	0.488	0.357	0.732	0.343	0.423	1.233	
11	0.36	0.207	0.575	0.244	0.313	1.283	
	0.352	0.203	0.577	0.24	0.304	1.267	
12	0.595	0.292	0.491	0.281	0.549	1.954	
	0.254	0.182	0.717	0.294	0.318	1.082	
13	0.425	0.255	0.600	0.273	0.348	1.275	
	0.54	0.113	0.209	0.240	0.328	1.367	
Días	3			4			
Muestra	Fracción I Abs. (530 nm)	Fracción II Abs. (460 nm)	IF Fracción II / Fracción I	Muestra	Fracción I Abs. (530 nm)	Fracción II Abs. (460 nm)	IF Fracción II / Fracción I
1	0.267	0.280	1.049	1.1	0.216	0.277	0.780
	0.310	0.238	0.768	1.2	0.253	0.223	1.135
2	0.235	0.291	1.238	2.1	0.219	0.290	0.755
	0.271	0.239	0.882	2.2	0.251	0.245	1.024
3	0.312	0.302	0.968	3.1	0.271	0.308	0.880
	0.345	0.249	0.722	3.2	0.313	0.262	1.195
4	0.413	0.365	0.884	4.1	0.326	0.295	1.105
	0.452	0.320	0.708	4.2	0.366	0.348	1.052
5	0.421	0.370	0.879	5.1	0.229	0.248	0.923
	0.378	0.350	0.926	5.2	0.230	0.313	0.735
6	0.188	0.166	0.883	6.1	0.199	0.174	1.144
	0.150	0.165	1.100	6.2	0.166	0.243	0.683
8	0.336	0.311	0.926	8.1	0.234	0.231	1.013
	0.303	0.294	0.970	8.2	0.272	0.281	0.968
9	0.318	0.297	0.934	9.1	0.298	0.260	1.146
	0.281	0.246	0.875	9.2	0.258	0.314	0.822
10	0.315	0.343	1.089	10.1	0.359	0.321	1.118
	0.274	0.288	1.051	10.2	0.320	0.275	1.164
11	0.237	0.238	1.004	11.1	0.288	0.252	1.143
	0.276	0.240	0.870	11.2	0.328	0.304	1.079
12	0.304	0.306	1.007	12.1	0.260	0.250	1.040
	0.315	0.275	0.873	12.2	0.300	0.303	0.990
13	0.246	0.201	0.817	13.1	0.234	0.185	1.265
	0.216	0.254	1.176	13.2	0.196	0.243	0.807

Tabla N° 18. Continuación.

Días	5		
Muestra	Fracción I Abs. (530 nm)	Fracción II Abs. (460 nm)	IF Fracción II / Fracción I
1	0.264	0.250	1.056
	0.308	0.308	1.000
2	0.189	0.198	0.955
	0.239	0.260	0.919
3	0.353	0.350	1.009
	0.305	0.287	1.063
4	0.261	0.237	1.101
	0.311	0.295	1.054
5	0.196	0.214	0.916
	0.244	0.275	0.887
6	0.165	0.197	0.838
	0.208	0.251	0.829
8	0.232	0.250	0.928
	0.186	0.190	0.979
9	0.243	0.294	0.827
	0.286	0.292	0.979
10	0.364	0.352	1.034
	0.319	0.296	1.078
11	0.277	0.289	0.958
	0.231	0.233	0.991
12	0.255	0.271	0.941
	0.213	0.216	0.986
13	0.220	0.190	1.158
	0.218	0.188	1.160

ANEXO N° 7

**RESULTADOS Y EJEMPLOS DE CALCULOS DE LA
DETERMINACION DEL CONTENIDO HUMEDAD, ESTIMADO DE
POLIFENOLES TOTALES Y CUANTIFICACION DE (-)-
EPICATEQUINA Y PROCIANIDINA B1 Y B2.**

Tabla N° 19. Resultados individuales de contenido de humedad en semillas fermentadas y no fermentadas.

Muestras	semillas fermentadas		semillas no fermentadas	
	% HUMEDAD	% MATERIA SECA	% HUMEDAD	% MATERIA SECA
1	5.0717	94.9283	4.0710	95.9290
	5.1016	94.8984	3.8723	96.1277
2	4.5749	95.4251	4.7076	95.2924
	4.5482	95.4518	5.2637	94.7363
3	5.0509	94.9491	4.3061	95.6939
	4.5187	95.4813	4.8361	95.1639
4	4.7026	95.2974	3.8515	96.1485
	4.7928	95.2072	3.7725	96.2275
5	4.7425	95.2575	-	-
	4.7143	95.2857	-	-
6	5.0474	94.9526	5.1790	94.8210
	5.0658	94.9342	5.1990	94.8010
7	-	-	5.4262	94.5738
	-	-	5.3695	94.6305
8	4.7153	95.2847	5.0584	94.9416
	4.5945	95.4055	5.1302	94.8698
9	4.3695	95.6305	5.7047	94.2953
	4.2810	95.7190	5.7534	94.2466
10	4.3781	95.6219	5.2205	94.7795
	4.3063	95.6937	5.9347	94.0653
11	4.9153	95.0847	5.2042	94.7958
	4.7657	95.2343	5.1041	94.8959
12	4.6495	95.3505	3.9837	96.0163
	3.9872	96.0128	3.8856	96.1144
13	3.4455	96.5545	4.7785	95.2215
	3.5095	96.4905	4.9347	95.0653

Ejemplo del cálculo de la determinación del contenido de humedad.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Pérdida de peso}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ de materia seca} = 100 - \% \text{ de humedad.}$$

Datos Muestra 1 de semillas de cacao no fermentadas:

Peso inicial de la muestra: 0.5011 g.

Peso final de la muestra: 0.4807 g.

Pérdida de peso: $(0.5011 - 0.4807) \text{ g} = 0.0204 \text{ g}$

$$\% \text{ de humedad} = \frac{0.0204 \text{ g}}{0.5011} \times 100$$

$$\% \text{ de humedad} = \mathbf{4.0710}$$

$$\% \text{ de materia seca} = 100 - 4.0710\%$$

$$\% \text{ de materia seca} = \mathbf{95.9290}$$

Tabla N° 20. Resultados individuales contenido estimado de polifenoles totales en semillas de cacao fermentadas y no fermentadas.

Muestras	Semillas fermentadas		Semillas no fermentadas	
	Estimado de polifenoles (BH)	Estimado de polifenoles (BS)	Estimado de polifenoles (BH)	Estimado de polifenoles (BS)
1	6.6024	6.9552	7.6940	8.0205
	6.5696	6.9228	7.4363	7.7358
2	3.4123	3.5759	3.9747	4.1711
	3.8791	4.0640	4.5167	4.7676
3	4.5859	4.8298	6.1316	6.4076
	5.3890	5.6441	5.1631	5.4255
4	7.2610	7.6194	6.9471	7.2254
	7.4129	7.7861	7.3253	7.6125
5	8.1598	8.5661	-	-
	8.5944	9.0196		
6	2.8187	2.9685	3.4444	3.6325
	3.1717	3.3410	4.3094	4.5457
7	-	-	3.6944	3.9064
			3.5656	3.7679
8	4.9222	5.1658	5.7573	6.0641
	4.6086	4.8305	5.8691	6.1865
9	4.0466	4.2315	6.1922	6.5668
	3.7667	3.9352	6.2644	6.6469
10	7.4290	7.7691	5.2369	5.5254
	7.4691	7.8053	5.4774	5.8229
11	7.1632	7.5335	6.3990	6.7503
	7.1479	7.5056	7.5414	7.9470
12	8.9513	9.3878	6.6446	6.9203
	9.2431	9.6270	7.1391	7.4277
13	4.6742	4.8410	7.6217	8.0042
	4.4726	6.6352	7.3092	7.6886

Ejemplo del cálculo de la determinación del contenido de estimado de polifenoles totales.

Cálculos y expresión de resultados:

Se determinó la concentración de las muestras a través de la sustitución en la ecuación obtenida por regresión lineal de los datos de la curva de concentraciones de catequina.

$$Y = mX + b$$

Despejando la ecuación en función de "x" y sustituyendo por términos:

$$x = \frac{(y-b)}{m}$$

$$\text{concentración } (\mu\text{g}) = \frac{(\text{Abs}-b)}{m} \times \text{FD}$$

$$\text{concentración (g)} = \frac{\text{concentración } (\mu\text{g})}{1,000,000}$$

Dónde:

y = es la absorbancia

x = es la concentración

m = es la pendiente

b = es la ordenada de origen

"Abs" = es la absorbancia de la muestra

"FD" = es el factor de dilución.

El % de polifenoles en la muestra se calculó de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de polifenoles en base húmeda} = \frac{\text{Concentración (g)} \times 100}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

$$\% \text{ de polifenoles en base seca} = \frac{\% \text{ polifenoles en base húmeda}}{\% \text{ materia seca}} \times 100$$

Ejemplo:

Muestra N° 1 de semillas no fermentadas.

Absorbancia: 0.978 nm

Peso de la muestra desengrasada: 1.0001 g.

% materia seca: 95.9290%

FD= 200 / 0.3 = 666.6667

Concentración (μg): $[(0.978-0.02)/0.0083] \times 666.6667$

Concentración (μg): 76947.7950 μg.

Concentración (g): 76947.7960 (μg) / 1, 000,000

Concentración (g): 0.0769 g

% de polifenoles en base húmeda: $(0.0769 \text{ g} \times 100) / 1.0001 \text{ g}$.

% de polifenoles en base húmeda: 7.6940

% de polifenoles en base seca: $(7.6940 \times 100) / 95.9290$

% de polifenoles en base seca: 8.0205

Tabla N° 21. Promedios de procianidina B1 en muestras de semillas de cacao no fermentadas y fermentadas.

Semillas de cacao no fermentadas								
muestras sf	promedio de peso (g)	promedio de abs (nm)	concentración de procianidina b1 (µg)	concentración de pocianidina b1 (mg)	concentración de procianidina b1 (g)	estimado de procianidina b1 (bh)	% materia seca	% estimado de procianidin a b1 (bs)
1	0.0205	0.188	0.4206	0.0008	0.00000084	0.0041	96.03	0.0043
2	0.0205	0.167	0.3433	0.0007	0.00000069	0.0033	95.01	0.0035
3	0.0210	0.185	0.4096	0.0008	0.00000082	0.0039	95.43	0.0041
4	0.0214	0.187	0.4169	0.0008	0.00000083	0.0039	96.19	0.0041
6	0.0203	0.190	0.4280	0.0009	0.00000086	0.0042	94.81	0.0044
7	0.0219	0.178	0.3838	0.0008	0.00000077	0.0035	94.60	0.0037
8	0.0215	0.167	0.3433	0.0007	0.00000069	0.0032	94.91	0.0034
9	0.0204	0.173	0.3654	0.0007	0.00000073	0.0036	94.27	0.0038
10	0.0205	0.187	0.4169	0.0008	0.00000083	0.0041	94.42	0.0043
11	0.0210	0.173	0.3654	0.0007	0.00000073	0.0035	94.85	0.0037
12	0.0219	0.194	0.4427	0.0009	0.00000089	0.0040	96.07	0.0042
13	0.0203	0.215	0.5201	0.0010	0.00000104	0.0051	95.14	0.0054
Semillas de cacao fermentadas								
1	0.0201	0.137	0.2298	0.0005	0.000000	0.0023	94.91	0.0024
2	0.0202	0.137	0.2298	0.0005	0.000000	0.0023	95.44	0.0024
3	0.0201	0.156	0.2989	0.0006	0.000001	0.0030	95.22	0.0031
4	0.0203	0.154	0.2916	0.0006	0.000001	0.0029	95.25	0.0030
5	0.0204	0.149	0.2735	0.0005	0.000001	0.0027	95.27	0.0028
6	0.0203	0.140	0.2407	0.0005	0.000000	0.0024	94.94	0.0025
8	0.0206	0.165	0.3316	0.0007	0.000001	0.0032	95.35	0.0034
9	0.0209	0.157	0.3025	0.0006	0.000001	0.0029	95.67	0.0030
10	0.0218	0.141	0.2444	0.0005	0.000000	0.0022	95.66	0.0023
11	0.0201	0.178	0.3789	0.0008	0.000001	0.0038	95.16	0.0040
12	0.0204	0.149	0.2735	0.0005	0.000001	0.0027	95.68	0.0028
13	0.0203	0.150	0.2771	0.0006	0.000001	0.0027	96.52	0.0028

Tabla N° 22. Promedios de procianidina B2 en muestras de semillas de cacao no fermentadas y fermentadas.

Semillas de cacao no fermentadas								
MUESTRAS SF	promedio de peso (g)	Promedio de Abs (nm)	Concentración de procianidina B2 (µg)	Concentración de procianidina B2 (mg)	Concentración de procianidina B2 (g)	% de procianidina B2 (BH)	% Materia seca	% de procianidina B2 (BS)
1	0.0205	0.188	0.5353	0.0011	1.0706E-06	0.0052	96.03	0.0054
2	0.0205	0.167	0.4741	0.0009	9.4810E-07	0.0046	95.01	0.0049
3	0.0210	0.185	0.5265	0.0011	1.0531E-06	0.0050	95.43	0.0053
4	0.0214	0.187	0.5324	0.0011	1.0647E-06	0.0050	96.19	0.0052
6	0.0203	0.190	0.5411	0.0011	1.0822E-06	0.0053	94.81	0.0056
7	0.0219	0.178	0.5061	0.0010	1.0122E-06	0.0046	94.60	0.0049
8	0.0215	0.167	0.4741	0.0009	9.4810E-07	0.0044	94.91	0.0046
9	0.0204	0.173	0.4915	0.0010	9.8309E-07	0.0048	94.27	0.0051
10	0.0205	0.187	0.5324	0.0011	1.0647E-06	0.0052	94.42	0.0055
11	0.0210	0.173	0.4915	0.0010	9.8309E-07	0.0047	94.85	0.0049
12	0.0219	0.194	0.5528	0.0011	1.1055E-06	0.0050	96.07	0.0053
13	0.0203	0.215	0.6140	0.0012	1.2280E-06	0.0060	95.14	0.0064
Semillas de cacao fermentadas								
1	0.0201	0.137	0.3866	0.0008	7.7318E-07	0.0038	94.91	0.0041
2	0.0202	0.137	0.3866	0.0008	7.7318E-07	0.0038	95.44	0.0040
3	0.0201	0.156	0.4420	0.0009	8.8397E-07	0.0044	95.22	0.0046
4	0.0203	0.154	0.4362	0.0009	8.7230E-07	0.0043	95.25	0.0045
5	0.0204	0.149	0.4216	0.0008	8.4315E-07	0.0041	95.27	0.0043
6	0.0203	0.140	0.3953	0.0008	7.9067E-07	0.0039	94.94	0.0041
8	0.0206	0.165	0.4682	0.0009	9.3644E-07	0.0045	95.35	0.0048
9	0.0209	0.157	0.4449	0.0009	8.8980E-07	0.0043	95.67	0.0044
10	0.0218	0.141	0.3983	0.0008	7.9650E-07	0.0037	95.66	0.0038
11	0.0201	0.178	0.5061	0.0010	1.0122E-06	0.0050	95.16	0.0053
12	0.0204	0.149	0.4216	0.0008	8.4315E-07	0.0041	95.68	0.0043
13	0.0203	0.150	0.4245	0.0008	8.4898E-07	0.0042	96.52	0.0043

Tabla N° 23. Promedios de (-)-epicatequina en muestras de semillas de cacao no fermentadas y fermentadas.

Semillas de cacao no fermentadas								
MUESTRAS SF	promedio de peso (g)	Promedio de Abs (nm)	Concentración de (-)-epicatequina (µg)	Concentración de (-)-epicatequina (mg)	Concentración de (-)-epicatequina (g)	% de (-)-epicatequina (BH)	% Materia seca	% de (-)-epicatequina (BS)
1	0.0205	0.188	2.5098	0.0050	0.000005	0.0245	96.03	0.0255
2	0.0205	0.167	1.6863	0.0034	0.000003	0.0165	95.01	0.0173
3	0.0210	0.185	2.3922	0.0048	0.000005	0.0228	95.43	0.0239
4	0.0214	0.187	2.4706	0.0049	0.000005	0.0231	96.19	0.0240
6	0.0203	0.190	2.5882	0.0052	0.000005	0.0255	94.81	0.0269
7	0.0219	0.178	2.1176	0.0042	0.000004	0.0193	94.60	0.0204
8	0.0215	0.167	1.6863	0.0034	0.000003	0.0157	94.91	0.0165
9	0.0204	0.173	1.9216	0.0038	0.000004	0.0188	94.27	0.0200
10	0.0205	0.187	2.4706	0.0049	0.000005	0.0241	94.42	0.0255
11	0.0210	0.173	1.9216	0.0038	0.000004	0.0183	94.85	0.0193
12	0.0219	0.194	2.7451	0.0055	0.000005	0.0251	96.07	0.0261
13	0.0203	0.215	3.5686	0.0071	0.000007	0.0352	95.14	0.0370
Semillas de cacao fermentadas								
1	0.0201	0.137	0.5098	0.00102	1.0196E-06	0.0051	94.91	0.0053
2	0.0202	0.137	0.5098	0.00102	1.0196E-06	0.0050	95.44	0.0053
3	0.0201	0.156	1.2549	0.00251	2.5098E-06	0.0125	95.22	0.0131
4	0.0203	0.154	1.1765	0.00235	2.3529E-06	0.0116	95.25	0.0122
5	0.0204	0.149	0.9804	0.00196	1.9608E-06	0.0096	95.27	0.0101
6	0.0203	0.140	0.6275	0.00125	1.2549E-06	0.0062	94.94	0.0065
8	0.0206	0.165	1.6078	0.00322	3.2157E-06	0.0156	95.35	0.0164
9	0.0209	0.157	1.2941	0.00259	2.5882E-06	0.0124	95.67	0.0129
10	0.0218	0.141	0.6667	0.00133	1.3333E-06	0.0061	95.66	0.0064
11	0.0201	0.178	2.1176	0.00424	4.2353E-06	0.0211	95.16	0.0221
12	0.0204	0.149	0.9804	0.00196	1.9608E-06	0.0096	95.68	0.0100
13	0.0203	0.150	1.0196	0.00204	2.0392E-06	0.0100	96.52	0.0104

Ejemplo del cálculo para el estimado de procianidina B1, B2 y (-)-epicatequina presentes en polifenoles totales sin proceso de fermentación en porcentaje en base seca.

Para la comparación entre la (-)- epicatequina, procianidina B1 Y B2 con polifenoles totales se estandarizo para 1.0 g de muestra. Debido que la determinación de de (-)- epicatequina, procianidina B1 Y B2 se realizó para 0.02 g y los polifenoles totales se realizaron para 1.0 g de muestra. No se realizó a 1.0 g. por falta de muestra y por tal motivo se realizó la siguiente relación:
Los cálculos se realizaron en Excel con todos los decimales.

Muestra N° 1 procianidina B1

Peso real de muestra: 0.0205 g

% estimado de procianidina B1 (BS): 0.0043%

Calculo: $(1g \times 0.0043\%) / (0.0205 g) = 0.21\%$ de estimado de procianidina B1 (BS) en 1 g de muestra.

Muestra N° 1 procianidina B2

Peso real de muestra: 0.0205 g

% estimado de procianidina B2 (BS): 0.0054

Calculo: $(1g \times 0.0054\%) / (0.0205 g) = 0.27\%$ de estimado de procianidina B2 (BS) en 1 g de muestra.

Muestra N° 1 (-)- epicatequina

Peso real de muestra: 0.0205 g

% estimado de (-)- epicatequina (BS): 0.0255

Calculo: $(1g \times 0.0255\%) / (0.0205 g) = 1.24\%$ de estimado de (-)- epicatequina (BS) en 1 g de muestra.

Tabla N° 24. Estimado de procianidina B1, B2 y (-)- epicatequina presentes en polifenoles totales sin proceso de fermentación en porcentaje en base seca.

Cacao trinitario sin proceso de fermentación				
Muestras	Estimado de polifenoles totales (BS)	Estimado de procianidina B1 (BS)	Estimado de procianidina B2 (BS)	Estimado de (-)- epicatequina (BS)
3	5.92	0.19	0.25	1.14
4	7.42	0.19	0.24	1.12
6	4.09	0.68	0.28	1.32
11	7.35	0.67	0.24	0.92
promedio:	6.20	0.43	0.25	1.13
Cacao forastero sin proceso de fermentación				
Muestras	Estimado de polifenoles totales (BS)	Estimado de procianidina B1 (BS)	Estimado de procianidina B2 (BS)	Estimado de (-)- epicatequina (BS)
1	7.88	0.21	0.27	1.24
2	4.47	0.17	0.24	0.84
7	3.84	0.55	0.22	0.93
8	6.13	0.77	0.22	0.77
9	6.61	0.73	0.25	0.98
10	5.67	0.57	0.27	1.25
12	7.17	0.60	0.24	1.19
13	7.85	0.60	0.31	1.82
promedio:	6.20	0.5248	0.2517	1.1284

Tabla N° 25. Estimado de procianidina B1, B2 y (-)- epicatequina presentes en polifenoles totales con proceso de fermentación en porcentaje en base seca.

Cacao trinitario con proceso de fermentación				
Muestras	Estimado de polifenoles totales (BS)	Estimado de procianidina B1 (BS)	Estimado de procianidina B2 (BS)	Estimado de (-)- epicatequina (BS)
3	5.24	0.1554	0.2298	0.6524
4	7.70	0.1486	0.2222	0.5994
5	8.70	0.1379	0.2127	0.4945
6	3.15	0.1231	0.2021	0.3207
11	7.52	0.1971	0.2633	1.1016
Promedio:	6.46	0.1524	0.2260	0.6338
Cacao forastero con proceso de fermentación				
Muestras	% Estimado de polifenoles totales (BS)	% Estimado de procianidina B1 (BS)	% Estimado de procianidina B2 (BS)	% Estimado de (-)- epicatequina (BS)
1	6.94	0.1199	0.2016	0.2659
2	3.82	0.1180	0.1985	0.2618
8	5.00	0.1639	0.2314	0.7948
9	4.08	0.1448	0.2129	0.6193
10	7.79	0.1075	0.1752	0.2933
12	9.51	0.1373	0.2117	0.4924
13	4.74	0.1393	0.2134	0.5127
Promedio:	5.98	0.1330	0.2064	0.4629

Ejemplo del cálculo para determinar el valor (%) de pérdida o ganancia obtenida después del proceso de fermentación para el tipo de cacao forastero y trinitario.

Se realizaron estos cálculos con el objetivo de determinar si hubo pérdida o ganancia de polifenoles después del proceso de fermentación.

Los cálculos se realizaron en Excel con todos los decimales.

Muestra 1 valor (%) de procianidina B1

% Estimado de procianidina B1 (BS) SF: 0.0043

% Estimado de procianidina B1 (BS) CF: 0.0024

0.0043% ---- 100%

0.0024% ---- cuanto % se obtuvo después del proceso de fermentación

100% - (cuanto % se obtuvo después del proceso de fermentación) = Valor (%) de pérdida o ganancia obtenida después del proceso de fermentación

$(0.0024\% \times 100\%) / 0.0043\% = 56.38\%$

100% - 56.38% = 43.62% de pérdida de polifenoles después del proceso de fermentación.

Tabla N° 26. Valor (%) de pérdida o ganancia obtenida después del proceso de fermentación para el tipo de cacao forastero y trinitario.

Cacao trinitario			
Muestras	Valor (%) de procianidina B1	Valor (%) de procianidina B2	Valor (%) de (-)-epicatequina
3	- 23.58	- 12.10	- 45.07
4	- 25.54	- 12.78	- 49.31
6	- 43.83	- 27.04	- 75.79
11	+ 7.99	+ 7.22	+ 14.76
promedios:	- 21.2	- 11.18	- 38.85
Cacao forastero			
1	- 43.62	- 25.48	- 79.04
2	- 32.36	- 17.61	- 69.45
8	+ 0.36	+ 2.61	- 0.94
9	- 20.36	- 12.95	- 35.23
10	- 45.60	- 30.56	- 74.95
12	- 33.43	- 17.80	- 61.51
13	- 47.48	- 31.85	- 71.84
Promedios:	- 31.78	- 19.09	- 56.14

(+) indica ganancia y (-) indica pérdida.

ANEXO N° 8
PREPARACION DE REACTIVOS

MEDICION DE ÍNDICE DE FERMENTACIÓN

- mezcla metanol – HCl (97:3): medir en probeta 194 mL de metanol, luego incorporar a un vaso precipitado 250mL. Agregar 6mL de HCl 37%, agitar.
- Para 3 muestras de cacao es necesario preparar 200 mL de mezcla.

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO ESTIMADO DE POLIFENOLES

- Reactivo de Folin: en un matraz de 500 ml colocar 20 g de Wolframato de Sodio y 5 g de Molibdato de Sodio, disolver en aproximadamente 100 ml de agua destilada, a esta mezcla agregar 10 ml de Ácido Fosfórico y 20 ml de Ácido Clorhídrico, bajo un sistema refrigerante se hizo hervir por siete horas, una vez frío se agregaron 30 g de Sulfato de Litio y algunas gotas de Bromo, para luego ebulir nuevamente por 15 minutos. Posteriormente y una vez frío se aforó con agua destilada a 200 ml.
- Solución de etanol al 70%: Diluir 70 mL de etanol en agua desmineralizada y aforar a 100 mL.
- Solución de carbonato de sodio al 2%: Disolver 2 g de carbonato de sodio y aforar con agua desmineralizada hasta 100 mL.
- Solución patrón de Catequina: Pesar 0.02 g de Catequina anhidra en balanza analítica, disolver y aforar con agua desmineralizada hasta 100 mL [0.2 mg/mL]. Preparar una serie de tubos como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla N° 27. Serie de tubos para curva patrón de Catequina.

TUBO	Solución de catequina (0.2 mg / mL) (mL)	Agua destilada (mL)	Concentración de catequina (µg)
1	0.0	2.0	0.0
2	0.1	1.9	10
3	0.2	1.8	20
4	0.4	1.6	40
5	0.6	1.4	60
6	0.8	1.2	80
7	1.0	1.0	100

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE (-)-EPICATEQUINA Y PROCIANIDINA B₁ y B₂

Solventes a utilizar:

- Solución de metanol al 70%: Diluir 70 mL de metanol en agua desmineralizada y aforar en balón volumétrico de 100 mL.

Preparación de la solución madre del estándar.

- Solución madre para los estándares (-)-epicatequina y procianidina B₁ y B₂: pesar 1.0 mg de cada estándar y diluirlo con metanol hasta obtener una concentración de 0.5 mg/mL. Después de prepararlas se dejarán en refrigeración a 4°C.

Preparación del Eluyente: Está conformado por una mezcla de n-propanol – agua – ácido acético (4:2:1, v/v/v). Se preparará 100mL de eluyente.

- Utilizando probeta de 100mL, medir 57.1mL de n-propanol. Medir en una probeta de 50 mL, 28.6 mL de agua desmineralizada. Medir en probeta de 50 mL, 14.3 mL de ácido acético. Mezclar y agitar en vaso precipitado de 150 mL.

Reactivo revelador:

- Se pesará 1,152 mg de 4- dimetilaminocinamaldehido (DMACA) y luego colocarlo en un balón volumétrico de 100 mL, incorpórale 10 mL de una mezcla de HCl concentrado y etanol en una proporción 10:70 (v/v), agitar hasta disolver, luego incorporar de 10 en 10 mL de mezcla con agitación constante hasta llevar a volumen. Luego se tomará una alícuota de 3mL y se llevará a volumen de 100 mL con la mezcla para obtener una concentración de 0.3456 mg/mL.
- mezcla de HCl concentrado y etanol 10:70 (v/v): utilizando una probeta de 100 mL medir 87.5 mL de etanol, después medir 12.5 mL de HCl concentrado. Mezclar y agitar en vaso precipitado de 150 mL.

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE (-)-EPICATEQUINA Y PROCIANIDINA B1 Y B2.

Curva de estándares de (-)- epicatequina y procianidina B1 Y B2.:

Se realizará una curva con concentraciones conocidas, se partirá de una solución madre de concentración de 0.5 mg/mL de (-)-epicatequina y procianidina B₁ y B₂, se prepararán soluciones de trabajo de concentración de 10-100 µg/mL en metanol. Después de prepararlas se dejarán en refrigeración a 4°C en espera del análisis.

Tabla N° 28. Serie de tubos para la curva de los estándares

Tubo	Solución de procianidina B1 y B2 y (-)-epicatequina (0.5 mg / mL) (µL)	Metanol (mL)	Concentración de procianidina B1 y B2 y (-)-epicatequina (µg)	Concentración de procianidina B1 y B2 y (-)-epicatequina en 10 µL (µg)
1	40	1.96	10	0.1
2	80	1.92	20	0.2
3	160	1.84	40	0.4
4	240	1.76	60	0.6
5	320	1.68	80	0.8
6	400	1.60	100	1.0

ANEXO N° 9
LISTADO DE MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

Tratamiento previo de muestras sin proceso de beneficiado.

Reactivo:

- Agua desmineralizada.
- Éter de petróleo ó n-hexano.

Material:

- Papel toalla
- Estufa
- Molino
- Tamiz malla 1mm
- Matraz
- Cuerpo del extractor Soxhlet
- Condensador Friedrich ó condensador Allihn
- Papel filtro o dedal de celulosa
- Algodón
- Espátula
- Pinza tipo tijera de acero inoxidable
- Caja de aluminio
- Termómetro graduado de 0-150°C
- Baño maría

Equipo:

- Balanza analítica
- Equipo de Soxhlet
- Rotavapor
- Estufa de aire reforzado o ventilación forzada calibrada a 45°C
- Desecador con desecante químico.

Tratamiento previo de muestras con proceso de beneficiado.

Reactivo:

- Agua destilada
- Mezcla metanol – HCl (97:3)
- Éter de petróleo ó n-hexano.

Material:

- Depósitos plásticos con capacidad de medio galón.
- Termómetro graduado de 0-150°C
- Agitador
- Espátula
- Pinza tipo tijera de acero inoxidable
- Caja de aluminio
- Termómetro graduado de 0-150°C
- Balón volumétrico 50 mL
- Vaso precipitado de 50mL
- Navaja
- Molino
- Tamiz malla 1mm
- Matraz
- Cuerpo del extractor Soxhlet
- Condensador Friedrich ó condensador Allihn
- Papel filtro o dedal de celulosa
- Algodón
- Embudo
- Trípode
- Baño maría

Equipo:

- Balanza analítica.
- Termómetro digital
- pH-metro digital
- Estufa de aire reforzado o ventilación forzada calibrada a 45°C
- Desecador con desecante químico.
- Refrigerador
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible
- Equipo de Soxhlet
- Rotavapor

Determinación de temperatura

Equipo:

- Termómetro digital con rango de medición -50 a 300°C.

Determinación de pH

Equipo:

- pH-metro digital con rango de medición

Determinación índice de fermentación.

Reactivo:

- Mezcla metanol – HCl (97:3)

Material:

- Espátula
- Pinza tipo tijera de acero inoxidable

- Caja de aluminio
- Termómetro graduado de 0-150°C
- Balón volumétrico
- Papel filtro
- Embudo
- Trípode

Equipo:

- Balanza granataria
- Balanza analítica
- Estufa de aire reforzado o ventilación forzada calibrada a 45°C
- Desecador con desecante químico
- Refrigerador
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible

Determinación de contenido de humedad.

Material:

- Cajas de aluminio para humedad
- Pinzas tipo tijera de acero inoxidable
- Espátula para pesar

Equipo:

- Estufa de aire reforzado o ventilación forzada calibrada a 45°C
- Balanza analítica
- Desecador con desecante químico

Determinación del contenido estimado de polifenoles

Reactivo:

- Solución de etanol 70%

- Reactivo de folin ciocalteu
- Agua destilada
- Carbonato de sodio al 2%

Material:

- Matraz
- Refrigerante
- Baño maría
- Balón volumétrico de 200 mL
- Balón volumétrico de 10 mL
- Balón volumétrico de 100 mL
- Probeta de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 1 mL

Equipo:

- Balanza analítica
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible

Determinación cualitativa: (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2 en extractos de semillas en tres accesiones de cacao antes y después del beneficiado.

Reactivo:

- (-)-epicatequina
- procianidina B2
- metanol al 70%
- mezcla de n-propanol – agua – ácido acético (4:2:1, v/v/v)
- 4- dimetilaminocinamaldehido (DMACA)
- mezcla de HCl concentrado y etanol en una proporción 10:70 (v/v)

Material:

- Balón volumétrico de 100 mL

- Vaso precipitado de 50 mL
- Tubos de ensayo
- Papel filtro
- Embudo
- Trípode
- Frascos de vidrio ámbar
- Probeta de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 3 mL
- Placas de sílica gel ó placas preparadas
- Lápiz grafito
- Micropipetas de 10 μ L
- Micropipetas 0.1 mL

Equipo:

- Balanza analítica
- Vortex
- Refrigerador

Determinación cuantitativa: (-)-epicatequina y procianidina B1 y B2 en extractos de semillas en tres accesiones de cacao antes y después del beneficiado.

Reactivo:

- (-)-epicatequina
- procianidina B2
- metanol

Material:

- Cuchillo cartonero
- Tubo de ensayo
- Balones volumétricos de 5 mL

Equipo:

- Balanza analítica
- Vortex
- Refrigerador
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible.

ANEXO N° 10

CARTA DE LA CLASIFICACION DE MUESTRAS RECOLECTADAS



CENSALUD



Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

Universidad de El Salvador

Ciudad Universitaria, 21 de Septiembre de 2017

A quien interese.

Yo, Dra. Vianney Castañeda, confirmo que la clasificación del cacao recolectados para el trabajo de investigación denominado "DETERMINACION DEL CONTENIDO DE (-)-EPICATEQUINA, PROCIANIDINA B1 Y B2 EN ACCESIONES DE *Theobroma cacao* L. (CACAO), ANTES Y DESPUES DEL BENEFICIADO, DEL CULTIVAR SAN JOSE DEL REAL DE LA CARRERA, EN USULUTAN, EL SALVADOR" se realizó en base a los descriptores morfológicos, obteniendo como resultados: cacao forastero las muestras 1, 2, 7, 8, 9, 10, 12 y 13 y caco trinitario las muestras 3, 4, 5, 6, y 11.



Dra. Vianney Castañeda
Coordinadora Proyecto CACAO
Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
Universidad de El Salvador

HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA