

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



CARACTERIZACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE POLIFENOLES EN
SEMILLAS CRUDAS DE OCHO ACCESIONES DE DIFERENTES
GENOTIPOS DE *Theobroma cacao* L EN EL SALVADOR

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

NIDIA ALEJANDRA RODRIGUEZ PEÑA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

JULIO 2019

CIUDAD UNIVERSITARIA, 31 DE JULIO DE 2019

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO CRISTOBAL HERNAN RIOS BENÍTEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LICENCIADO SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAESTRO ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MScQ. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORA EN AREA EN: APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

MScQ. Sonia Maricela Lemus

ASESORA DE AREA EN: CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y COSMETICOS

Licda Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

DOCENTES ASESORAS

MScQ. Amy Elieth Morán Rodríguez

Dra. Vianney Castañeda Monroy

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a mis docentes del tribunal calificador: MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez, MSc. Sonia Maricela Lemus y Licenciada Zenia Ivonne de Márquez, quienes han guiado la presente investigación, gracias a sus consejos, opiniones y correcciones hoy logro culminar este trabajo de la mejor manera.

Este trabajo de investigación fue realizado bajo la supervisión y asesoría de la MSc. Amy Morán y Dra. Vianney Monroy, a quienes expreso mi más profundo agradecimiento, por toda la orientación, paciencia, tiempo, esfuerzo y dedicación brindada a la realización de este trabajo.

A los propietarios de Finca La Sierra, Ingeniero Boris Portillo; Finca Concepción, Licenciado Eduardo Zacapa y Finca Cáceres, Don Juan Cáceres por su apertura, confianza y colaboración, para la ejecución del estudio.

Al licenciado Guillermo Castillo de la Facultad de Química y Farmacia y a la Facultad de Agronomía en especial al Laboratorio de Análisis e investigación del Departamento de Química Agrícola por su apoyo a la realización de esta tesis.

A CENSALUD, por brindarme el espacio, los instrumentos, reactivos y equipos necesarios para el desarrollo de este estudio, a todo el personal de CENSALUD en especial Zoilita por toda la paciencia y colaboración hacia mi persona.

Nidia Rodríguez

DEDICATORIA

Primero que nada agradezco a Dios, por todo su amor por todas sus bendiciones, por haberme dado la sabiduría y la fortaleza de seguir adelante, por guiarme de la mejor manera, por facilitarme todos los medios y las personas necesarias para poder llevar a cabo este trabajo y poder cumplir una de las metas más significativas en mi vida. Te lo dedico a ti Dios porque sin ti nada soy.

Le dedico este trabajo a mis padres y a mi hermana, gracias por todo el amor, la paciencia y comprensión, gracias por no dejar que me rindiera, gracias por todo el sacrificio y esfuerzo hecho para darme un mejor futuro, gracias por la motivación, gracias por ser un ejemplo a seguir. Gracias papá porque fuiste el que me acompañó más de cerca en este desafío, gracias por brindarme todos tus conocimientos, tus consejos y tu asesoría, gracias por brindarme tu ayuda y por todas las horas que dedicaste para que este trabajo resultará de la mejor manera. Este triunfo va por los cuatro, los amo con todo mi corazón.

Le dedico este logro a todos mis amigos, por sus consejos, por la ayuda, porque sin todos los ángeles que Dios puso en mi camino nada de esto hubiera sido posible, los quiero demasiado.

Nidia Rodríguez

INDICE

	Pág. N°
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xiii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	16
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	18
3.1. Historia del cacao	18
3.1.1. Evolución histórica del cultivo del cacao en El Salvador	19
3.1.1.1. El cultivo del cacao en Mesoamérica prehispánica	19
3.1.1.2. El cultivo de cacao en época de la colonia	19
3.1.1.3. El cultivo de cacao en el siglo XX y comienzo del XXI en El Salvador.	20
3.1.1.4. Situación actual del cultivo de cacao en El Salvador.	21
3.2. Taxonomía	22
3.3. Clasificación de cacao	22
3.4. Composición química de la semilla de cacao	24
3.4.1. Lípidos	24
3.4.2. Proteínas	25
3.4.3. Acidez	25
3.4.4. Carbohidratos	26
3.4.5. Fibra	26

3.4.6. Vitaminas y minerales	26
3.4.7. Alcaloides	26
3.4.8. Concentración de polifenoles	27
3.5. Polifenoles en plantas	28
3.5.1. El cacao como fuente de polifenoles	30
3.6. De los granos de cacao al chocolate: Alteraciones en la composición y contenido de polifenoles.	31
3.6.1. Proceso de pre-industrialización del cacao.	31
3.6.2. Proceso de industrialización de cacao: efecto de polifenoles.	33
3.7. Efecto del cacao y el chocolate sobre la salud	34
3.7.1. Cacao como alimento funcional	34
3.7.2. Prevención frente a enfermedades cardiovasculares	35
3.7.3. Prevención frente al cáncer	37
3.7.4. Prevención de enfermedades neurodegenerativas.	37
3.8. Importancia de las determinaciones fisicoquímicas	39
3.8.1. Contenido de humedad	39
3.8.2. Contenido de grasa	40
3.8.3. Contenido de proteína	40
3.8.4. Contenido estimado de polifenoles	41
3.9. Determinación de la actividad antioxidante	43
3.9.1. Método ABTS ^{•+} .	43

Capítulo IV

4.0 Diseño Metodológico	47
4.1. Tipo de estudio	47
4.2. Investigación bibliográfica	47
4.3. Investigación de campo	47
4.3.1. Universo	47

4.3.2. Muestra	48
4.3.3. Recolección de la muestra	48
4.4. Parte experimental	49
4.4.1. Determinaciones fisicoquímicas que se realizan a las semillas crudas de cacao.	49
4.4.1.1. Tratamiento a la semilla de cacao	51
4.4.1.2. Determinación de humedad	51
4.4.1.3. Determinación de grasa	52
4.4.1.4. Determinación de proteína	53
4.4.1.5. Determinación de polifenoles totales	55
4.4.2. Capacidad antioxidante de polifenoles presentes en semillas de cacao.	57
4.4.2.1. Obtención del extracto hidroalcohólico	58
4.5. Análisis estadístico	60

Capítulo V

5.0 Resultados y discusión de resultados	62
5.1. Contenido de humedad	64
5.2. Contenido de grasa	66
5.3. Contenido de proteína	69
5.4. Contenido de polifenoles totales	71
5.5. Capacidad antioxidante	75
5.6. Relación del contenido de polifenoles totales influenciado por el genotipo de cacao.	82

Capítulo VI

6.0. Conclusiones	88
-------------------	----

Capítulo VII

7.0 Recomendaciones

91

Bibliografía

Glosario

Anexos

ABREVIATURAS Y SIGLAS

Abreviatura	Significado
ABTS ^{•+}	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
AG	Ácidos grasos
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
CENSALUD-UES	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud- Universidad de El Salvador
CI50	Concentración de inhibición al 50%
DPPH	2,2-difenil-2-picrilhidrazil
ES-CACAO	Sociedad cooperativa de productores de cacao de El Salvador de R.L. y C.V.
FEDECACAO	Federación nacional de cacaoteros
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
ICCO	Organización Internacional del Cacao
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
mM	Mili molar
μM	Micro molar
Mz	Manzanas
nm	Nanómetros
Qq	Quintal
TEAC	Capacidad antioxidante en Equivalentes trolox
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

RESUMEN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) está siendo objeto de diversas investigaciones a nivel mundial, un tema de interés han sido los polifenoles, debido a su actividad antioxidante y sus beneficios para la salud. En el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud de la Universidad de El Salvador (CENSALUD-UES) se están caracterizando los diferentes tipos de cacao presentes en el país, en este contexto se realizó la presente investigación, cuyos objetivos fueron: determinar el contenido de humedad, grasa, proteínas y polifenoles totales; medir la capacidad antioxidante en semillas de cacao mediante el método ABTS^{•+} y relacionar si el contenido de polifenoles totales se ve influenciado por el genotipo de cacao. El trabajo práctico de la investigación se llevó a cabo en el período de agosto de 2017 a noviembre de 2018. Los materiales genéticos de cacao utilizados provenían de tres fincas distribuidos así: 3 accesiones de Trinitario en Finca Concepción, Departamento de Usulután; 3 accesiones de Forastero y 1 accesión de Criollo Moderno en Finca La Sierra, Departamento de Sonsonate y 1 accesión de Criollo en Finca Cáceres, Departamento de Usulután. Los resultados obtenidos indican que el contenido de humedad en el cacao resultó ser bajo, siendo una ventaja ya que limita el crecimiento microbiano; los contenidos de grasas y proteínas resultaron altos dando calidad competitiva y valor agregado para la producción de manteca de cacao, chocolate y sus derivados; el contenido de polifenoles varía respecto al genotipo, grado de madurez y área geográfica, el cacao trinitario tiene menor contenido de polifenoles y por ende menor capacidad antioxidante, por el contrario el cacao tipo forastero y criollo moderno registraron mayor contenido de polifenoles. Los resultados permiten concluir que el presente estudio puede ser útil para impulsar el aprovechamiento industrial del cacao cultivado en El Salvador y se recomienda realizar otras investigaciones de la capacidad antioxidante de los polifenoles del cacao, para reafirmar sus bondades y difundir con una base más fundamentada la calidad del cacao cultivado en El Salvador

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) pertenece a la Familia Esterculiácea, conocido también como cacaotero o cocoa en inglés, estudios recientes reportan que el cacao es una especie endémica de América del sur cuyo centro de origen está localizado en la región comprendida entre las cuencas de los ríos Caquetá, Putumayo y Napo, tributarios del río Amazonas. La palabra Cacao viene del maya Ka'Kaw y del griego teobroma que significa “comida de los Dioses”.

Es una de las especies más importantes en los bosques húmedos tropicales. Las semillas de este cultivo son la fuente del cacao comercial, que es muy utilizado en la industria chocolatera, farmacéutica y cosmética. Contienen cerca de 300 compuestos volátiles incluyendo ésteres, hidrocarbocarbonos, monocarbonilos, piroles, y otros, que son componentes importantes del sabor del cacao.

Por otra parte, es una rica fuente de fitoquímicos con polifenoles y alcaloides. Los polifenoles han ganado mucha atención recientemente debido a su actividad antioxidante y sus beneficios para la salud en la prevención y tratamiento de cáncer (capacidad de eliminación de radicales libres), enfermedades cardiovasculares y otras patologías.

El contenido fenólico y la concentración de polifenoles en los granos de cacao dependen del genotipo (Criollo, Forastero, Criollo moderno y Trinitario), también del grado de madurez, procesamiento y almacenamiento. Alrededor del 12-18% del peso del grano seco de cacao consiste en polifenoles, los cuales están asociados con el sabor, el color y las actividades antioxidantes de sus derivados. Estos se modifican o degradan en gran medida durante la fermentación, el secado y el tostado lo que afecta la actividad antioxidante de este componente. En El Salvador, el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, está desarrollando estudios de caracterización

de los diferentes tipos de cacao cultivados en el país ya que se desea producir un alimento funcional con cacao autóctono conociendo todos los efectos beneficiosos que trae consigo este a la salud.

Como parte de esa caracterización, es de suma importancia el estudio del contenido de polifenoles en semillas crudas de cacao cultivado en El Salvador, para lo cual se utilizaron accesiones de diferentes genotipos que están en estudio (Criollo, Forastero, Criollo moderno y Trinitario).

El estudio del contenido de polifenoles en semillas crudas de cacao, se realizó por medio del método Folin-Ciocalteu, y se analizó la capacidad antioxidante de accesiones de diferentes genotipos de cacao utilizando el método de capacidad atrapadora del radical ABTS^{•+}; además se realizó también el contenido de humedad, contenido de grasa y proteína.

El desarrollo práctico de la investigación, se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD-UES), durante el período de agosto de 2017 a noviembre de 2018, las determinaciones antes mencionadas se realizaron por duplicado, utilizando muestras de 8 accesiones, con 3 árboles elite de cacao por accesión, resultando 24 árboles de cacao distribuidos: 3 de Criollo en Finca Cáceres; 9 de Forastero y 3 de Criollo moderno en Finca La Sierra y 9 de Trinitario en Finca Concepción.

Los resultados permiten concluir que el presente estudio puede ser útil para impulsar el aprovechamiento industrial del cacao cultivado en El Salvador y se recomienda realizar a partir de este estudio otras investigaciones de la capacidad antioxidante de los polifenoles del cacao, para reafirmar sus bondades y difundir con una base más fundamentada la calidad del cacao cultivado en El Salvador.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Caracterizar cualitativa y cuantitativamente polifenoles, en semillas crudas de ocho accesiones de diferentes genotipos de *Theobroma cacao L.* en El Salvador.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar el contenido de humedad, grasa, proteínas y polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu) en semillas crudas de diferentes genotipos de cacao.

2.2.2 Medir la capacidad antioxidante en semillas crudas de diferentes genotipos de cacao mediante el método de capacidad atrapadora del radical ABTS^{•+}.

2.2.3 Relacionar si el contenido de polifenoles totales se ve influenciado por el genotipo de cacao.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1. Historia del cacao

El término cacao (cocoa en inglés) deriva del término “cacahuatl”, proveniente de las lenguas Mayas y Aztecas. Según el diccionario etimológico de Joan Corominas, el término cacao se tomó del Náhuatl kakáwa. [52]

El cacao está clasificado en el género *Theobroma*, de la familia Esterculiácea, con 22 especies descritas, ubicadas principalmente en Sudamérica y partes de Centroamérica. [46]

Estudios recientes reportan que el cacao es una especie endémica de América del sur cuyo centro de origen está localizado en la región comprendida entre las cuencas de los ríos Caquetá, Putumayo y Napo, tributarios del río Amazonas. [19] Con respecto a la primera región, se ha sostenido que el punto de origen de la domesticación del cacao se encontraba en Mesoamérica (entre México, Guatemala, El Salvador y Honduras), donde su uso está atestiguado alrededor de 2000 años antes de Cristo. No obstante, estudios recientes demuestran que por lo menos una variedad de *Theobroma cacao* tiene su punto de origen en la Alta Amozonía y que ha estado siendo utilizado en la región por más de 5000 años. La domesticación por los indígenas de Centroamérica se realizó durante la época precolombina siendo cultivado desde el siglo VI. [19] Por sus efectos, los médicos Mayas prescribían el consumo de cacao como estimulante, calmante del dolor, o bebida reconstituyente para los guerreros. La manteca de cacao también fue utilizada por los mayas como ungüento para la curación de heridas.

[52]

Los aztecas impusieron el uso de las semillas del cacao como moneda de cambio para el comercio o para producir el llamado “Chocolatl”, una bebida hecha de granos de cacao tostado y molido mezclados con agua, a la que a menudo se le

añadían otros ingredientes como vainilla, miel o especias (chile picante, clavo o canela); además añadían harina de maíz como emulsionante para absorber la manteca de cacao. ^[52]

3.1.1. Evolución histórica del cultivo del cacao en El Salvador.

3.1.1.1. El cultivo del cacao en Mesoamérica prehispánica.

El cacao se ha cultivado y consumido desde hace más de 3000 años en los pueblos de origen Maya que habitaron lo que hoy es el sur de México, Guatemala, Honduras y el Occidente de El Salvador; fueron los verdaderos cultivadores del cacao; perfeccionaron su cultivo, aprendieron a curar y conservar sus semillas y hacer una bebida agradable para ellos, la cual ocupaban para sus ceremonias y como moneda de cambio. Luego transmitieron estos conocimientos a los pueblos vecinos como los aztecas al norte y otros pueblos indígenas hacia el sur de Mesoamérica. La calidad genética del cacao cultivado por los Mayas en estas tierras era del tipo Criollo, el cual es considerado como un cacao de la mejor calidad. ^[27]

3.1.1.2. El cultivo de cacao en época de la colonia.

Alrededor del año 1524, los conquistadores españoles al ingresar a lo que hoy es el Occidente de El Salvador, se encontraron con grandes extensiones sembradas de cacao, por los pobladores indígenas de la zona, en el área llamada los Izalcos, que comprendía desde el río Paz en Ahuachapán, las montañas de Apaneca, llegando hasta Armenia en Sonsonate; En esta área, se estima una extensión de más de 10,000 manzanas sembradas de cacao durante esa época, siendo el centro de esta zona de producción los pueblos de Izalco y Caluco en Sonsonate. ^[51]

Ya para el año 1550, desde el puerto de Acajutla en Sonsonate se exportaba a Nueva España (México) cerca de 50,000 cargas de cacao (una carga equivalía a

58 lbs), es decir 29,000 qq de cacao aproximadamente, según registros de los españoles de la época; convirtiéndose el cacao en el primer producto de exportación de El Salvador. [51]

A mediados de los años 1700, ocurrieron dos fenómenos importantes que contribuyeron al comienzo del declive del cultivo del cacao en las tierras de El Salvador. En España la corona abolió el sistema de las encomiendas en sus colonias, debido a los excesos de abusos cometidos a las poblaciones indígenas; como también el nacimiento y erupciones constantes del Volcán de Izalco, que se mantuvo haciendo erupciones periódicas por los siguientes 200 años (hasta 1966), arruinando con sus cenizas la mayoría de plantaciones de cacao existente en la zona. [51]

Los indígenas, únicos cultivadores de cacao de esa época, ya no tenían ningún interés en renovar sus plantaciones dañadas por las cenizas del Volcán Izalco, según consta en documentos del Alcalde Mayor de Sonsonate, quien era la máxima autoridad española de esa época en dicha área. Así el cacao fue siendo sustituido por los cultivos del añil, la caña de azúcar, las ganaderías y también para mediados de 1850 con café. [51]

3.1.1.3. El cultivo de cacao en el siglo XX y comienzo del XXI en El Salvador.

El cultivo del cacao en esa época, casi desapareció en El Salvador, a excepción de 200 Mz sembradas en la Hacienda “La Carrera”, Usulután y 100 Mz. en distintas fincas pequeñas en el departamento de Sonsonate, como también algunos árboles en distintas zonas del país, remanentes de plantaciones antiguas. Todas estas plantaciones fueron manejadas en su mayoría con tecnología mala y obsoleta, casi en total abandono. El Salvador, se ha convertido en el mayor importador de semillas de cacao, en Centro América, principalmente de Nicaragua, Honduras y Guatemala, con una importación de 800 Toneladas Métricas por año. [51]

3.1.1.4. Situación actual del cultivo de cacao en El Salvador.

En El Salvador, la producción y comercialización de cacao, no ha tenido mucho auge a lo largo de la historia, ya que, básicamente, es una producción muy doméstica, estrictamente limitada y sin plantaciones comerciales registradas. Sin embargo, en la actualidad se ha podido estimar un área cultivada de aproximadamente 500 manzanas. ^[51]

Existen dos organizaciones de productores que están tratando de fortalecer el sector en el país, las cuales se detallan en el cuadro N° 1. ^[43] Por otra parte, son muy pocos los productores que obtienen provecho de sus plantaciones, debido a que éstas se encuentran afectadas por moniliasis y el material genético es muy variable, poco productivo y poco resistente a enfermedades. ^[43]

Por lo anterior se tiene una baja producción de cacao, a nivel nacional, creando gran dependencia de las importaciones del mismo, para poder satisfacer la demanda de las empresas transformadoras. ^[43]

Cuadro N° 1. Organizaciones cacaoteras en El Salvador

Organización	Nombre Completo	Miembros	Situación Actual
ESCACAO	Sociedad Cooperativa de Capital Variable	24	Legalmente constituida
AABEX-CACAO	Asociación Agropecuaria de Beneficiadores y Exportadores de Cacao.	33	Legalmente constituida.

3.2. Taxonomía

En el Cuadro N°2, se resume la taxonomía del cultivo de cacao. ^{[19] [26][49]}

Cuadro N°2. Taxonomía del cacao.

Reino	Plantae
División	Spermatophyta
Clase	Angiospermae
Orden	Malvales
Sub-orden	Malvinae
Familia	Esterculiácea
Tribu	Byttnerioideae
Genero	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao</i>

3.3. Clasificación de cacao.

El cacao se clasifica en tres grupos genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario. ^{[18][34]}

El cacao Criollo comprende árboles delgados; los frutos tienen una cubierta delgada y una pigmentación predominantemente amarillo-rojiza; con almendras de cotiledones color blanco marfil (Ver figura N° 1). La semilla presenta un olor dulce y sabor agradable asociado al escaso contenido de taninos. Muestran signos de depresión endogámica y frecuentemente, más bajos rendimientos y mayor susceptibilidad a plagas. Este tipo de cacao requiere de dos a tres días para completar su fermentación. El cacao Criollo constituye del 5-10 % de la producción mundial. ^{[18][24][34]}

Este grupo fue considerado inicialmente por los botánicos como una sub-especie de *Theobroma cacao*; sin embargo otros autores mediante el estudio con marcadores moleculares de una amplia población de criollos, demostraron que este grupo no constituía una sub-especie tal como se proponía. Y que adicionalmente, por estos marcadores se distinguieron dos tipos dentro de este grupo, los criollos antiguos que es el criollo por excelencia y los criollos modernos que son criollos antiguos que han sufrido introgresión de genes forasteros; de tal forma que los criollos antiguos constituyen el grupo de criollos verdaderos, la hibridación natural entre los forasteros y los criollos, es lo que generó más tarde

los criollos modernos y trinitarios, por lo que los criollos modernos presentan características del genotipo criollo antiguo y forastero. ^[19]

El cacao tipo Forastero posee fruto verde con cubierta gruesa, un mesocarpo fuertemente lignificado, semillas redondas y ligeramente aplanadas, cotiledones de color violeta (ver figura N° 2). Las semillas se caracterizan por la acidez y sabor amargo, relacionado al alto contenido de taninos. Cerca del 80% de la producción mundial de cacao corresponde a este tipo. ^{[18] [24] [34]}

El cacao tipo Trinitario es de origen híbrido entre formas Criollo y Forastero, es muy heterogéneo genéticamente y morfológicamente muy polimorfo, por lo cual no es fácil delimitarlo a través de características comunes. Las plantas son muy robustas con frutos verdes o pigmentados y con semillas violeta claro a violeta oscuro (Ver figura N° 3). El 10-15 % de la producción mundial de cacao se origina en las formas Trinitario. ^{[18] [24] [34]}

En el Cuadro N° 3, se detallan las características del fruto de cacao por genotipo.

Cuadro N°3. Características del fruto de cacao según el genotipo. ^{[12] [32]}

Tipo	Criollo	Forastero	Trinitario
Forma	Ovoide	Esferoide	Oblonga
Color	Verde cambia a amarillo	Verde cambia a amarillo	Verde con morado cambia a amarillo con rojo
Constricción basal	Ausente o presente	Ausente	Pronunciada
Ápice	Mamiforme	Mamiforme	Atenuada
Rugosidad de la superficie	Intensa	Ligera	Intermedia
Profundidad de surcos	Profundo	Superficial	Intermedia
Arreglo de semillas	Desordenado	Ordenado	Intermedia



Figura N° 1. Fruto de cacao criollo, fruto de cacao criollo moderno, fruto de cacao Forastero, fruto de cacao Trinitario.

El contenido de polifenoles se relaciona con la variedad del cacao, lugar de producción y origen geográfico; pero también existen elementos externos que inciden en el contenido de polifenoles, como factores ambientales y agronómicos. Se ha demostrado que la concentración de polifenoles en el cacao varía con respecto al genotipo; La variedad tipo Criollo posee menos contenido de polifenoles, oscilando entre 4 y 5 g/100 g de semilla peso seco. El tipo Trinitario ha mostrado contenido de 6.4 g/100 g de semilla p.s y el tipo Forastero con niveles más elevados que oscilan entre 7.2 y 8.2 g/100 g de semilla peso seco. Es de hacer notar que el contenido de polifenoles está asociado también al contenido de taninos. [24] [33]

En CENSALUD-UES, se realizó un estudio evidenciando el mismo comportamiento, el contenido de polifenoles en cacao tipo Criollo fue menor con un 5.23% y en cacao tipo Forastero fue mayor con un 8.65%. [42]

3.4. Composición química de la semilla de cacao.

El grano de cacao está formado por la semilla, que supone del 78 al 82% de su peso, y por la cáscara (10-16%) que la envuelve y la protege. Además, el grano contiene un pequeño porcentaje de humedad (5-8%). La composición de la semilla del cacao depende de factores como el genotipo o las condiciones de

crecimiento del árbol (características del suelo, clima, horas de insolación, entre otros). [52]

3.4.1. Lípidos

Aproximadamente del 48 al 57% del peso de la semilla descascarillada y seca del grano de cacao corresponde a su contenido en lípidos. La fracción lipídica del cacao se conoce como la manteca de cacao y es la responsable de buena parte de las tan apreciadas propiedades sensoriales del chocolate. En la fracción grasa de la semilla de cacao, los ácidos grasos (AG) predominantes son los saturados, esteárico (C18:0 - 35%) y palmítico (C16:0 - 25%), pero también contiene una alta proporción de AG monoinsaturados (AGMI) representados casi exclusivamente por el ácido oleico (C18:1 - 35%) y también una pequeña cantidad de poliinsaturados (AGPI) en forma de linoleico (C18:2 - 3%). [52]

3.4.2. Proteínas

Son el segundo componente más abundante del grano de cacao y suponen un 17.5%; incluyen la albúmina, globulina, prolaminas y glutelina. Cambios en la composición de proteínas durante la fermentación y tostado de los granos de cacao han sido descritos; como consecuencia de la fermentación del cacao, se reduce la cantidad de proteína total, produciéndose una hidrólisis de las mismas que da lugar a la liberación y por tanto un aumento de péptidos y aminoácidos libres. Durante el tostado, también se produce una disminución de la fracción de albúmina, proteína total y aminoácidos libres. [52]

3.4.3 Acidez

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. En los cotiledones el pH desciende desde aproximadamente 6.5 en semillas frescas al inicio de la fermentación hasta valores dentro del rango de 5.0 y 5.5 en semillas fermentadas. [4]

3.4.4 Carbohidratos

El mucílago es un medio rico para el desarrollo microbiano, contiene alrededor del 14% y 15% de azúcares, de los cuales el 60% es sacarosa y el 39% una mezcla de glucosa y fructosa, además de contener el 90% de agua, 2-3% de pectina 1% - 3% de ácido cítrico y alrededor del 1% de sales minerales. [4]

3.4.5 Fibra

La semilla de cacao no procesada es una buena fuente de fibra, principalmente insoluble (15-20% del peso de la semilla). Durante el procesado de las semillas de cacao parte de la fibra se pierde y el contenido medio de fibra en sus derivados, como el cacao en polvo o el chocolate, es del 1 al 9%. Por tanto, sólo algunos de los derivados del cacao son una buena fuente de fibra. [52]

3.4.6 Vitaminas y minerales

Respecto al contenido en vitaminas y minerales, la semilla de cacao contiene una gran cantidad de éstos, muchos de los cuales siguen estando presentes en altas concentraciones en los subproductos. Los procesos de fermentación y tratamientos térmicos a los que se somete el grano de cacao conllevan una hidrólisis de los fitatos, hecho que supone que la biodisponibilidad de los minerales que contienen los derivados del cacao no se vea afectada, ya que los fitatos contenidos naturalmente en las semillas interfieren en la absorción de ciertos minerales. [52]

3.4.7 Alcaloides

El cacao presenta también un contenido considerable en alcaloides de tipo base púrica, de la familia de las metilxantinas (teobromina, cafeína y teofilina), compuestos que le confieren un pequeño poder estimulante. El alcaloide mayoritario es la Teobromina (metabolito de la Cafeína) (nombre que deriva del

género *Theobroma*). Este alcaloide representa entre el 0.8 y el 2% del contenido total de los granos de cacao desecados. [52]

3.4.8 Concentración de polifenoles

Los polifenoles de la semilla de cacao se encuentran almacenados en células distribuidas en los cotiledones. Los más abundantes en cacao son metabolitos tipo flavonoides, especialmente tres grupos básicos: catequinas, antocianinas y proantocianinas. La principal catequina es (-) epicatequina, que representa cerca del 30% del contenido de polifenoles de la semilla de cacao; la fracción de antocianinas consiste principalmente de cianidina-3-arabinosa y cianidina-3-D-galactosa y entre las proantocianidinas, las más abundantes son aquellas unidades diméricas, triméricas y oligoméricas de epicatequina y flavan-3,4-diol.

Los polifenoles son compuestos que participan en las modificaciones bioquímicas en el interior de la semilla de cacao 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 monómeros y oligómeros de flavonoides, transformándolos en compuestos insolubles. Como resultado disminuye la astringencia y amargor mejorando la calidad sensorial del cacao. En semillas violetas este fenómeno es incompleto por lo que el amargor y astringencia se encuentra asociada a una mayor concentración final de polifenoles. Con la fermentación la concentración de polifenoles se reduce a un 40% o más. [4]

En la Figura N° 3 se muestran las sustancias biológicamente activas provenientes del cacao y sus derivados. Ya se sabe que la composición de la semilla del cacao depende de factores como el genotipo o las condiciones de crecimiento del árbol (características del suelo, clima, horas de insolación, entre otros). [52]

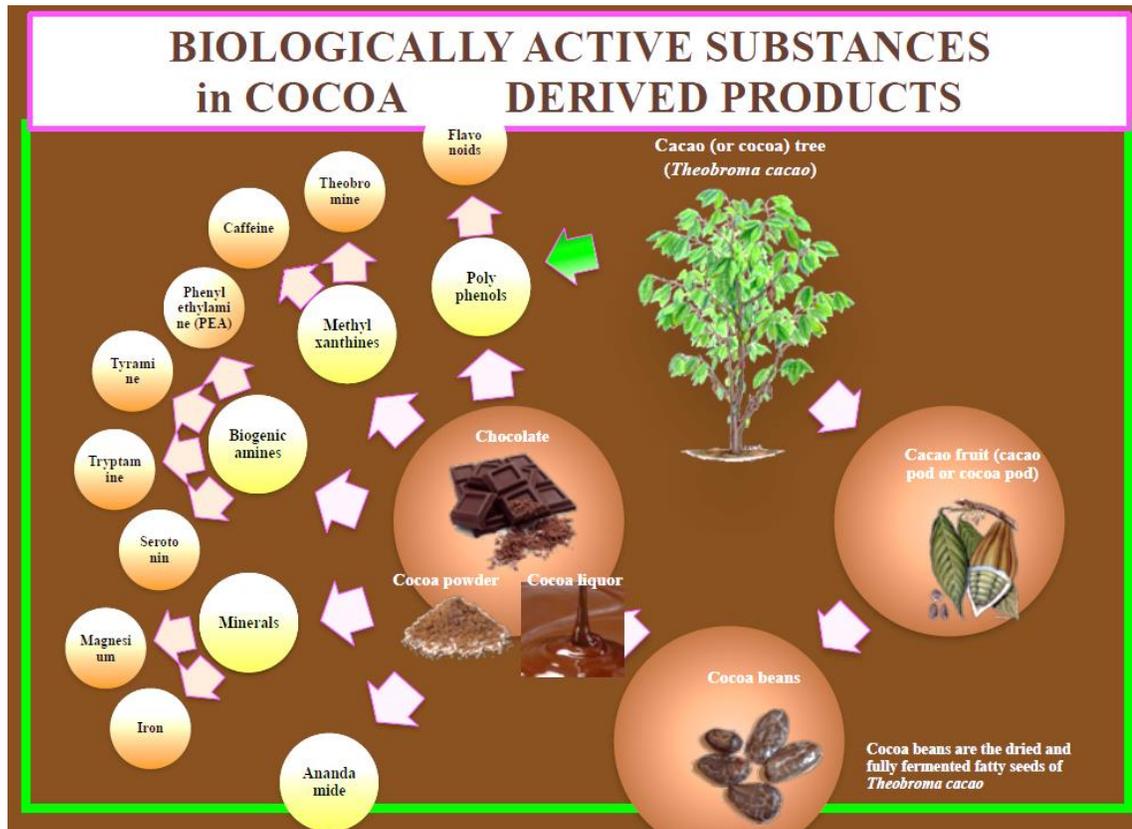


Figura N° 3. Sustancias biológicamente activas en productos derivados del cacao.

3.5. Polifenoles en plantas

Los polifenoles son uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuamente distribuidos entre las especies vegetales, con más de 8,000 estructuras químicas reportadas hasta el momento, que se caracterizan por tener en su estructura química al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo y frecuentemente se encuentran como derivados de ésteres, éteres y glucósidos. [33]

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 madurez e incluso el manejo poscosecha 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 herbivoría, infección, parasitismo y patogénesis de las plantas. [47] Entre los polifenoles de las plantas se pueden encontrar moléculas simples como ácidos fenólicos, fenilpropanoides y flavonoides o compuestos polimerizados como Ligninas, Melaninas y Taninos. Sin embargo, los flavonoides caracterizados por presentar un sistema C6-C3-C6, constituyen uno de los grupos fenólicos más numerosos e importantes. [33]

Biosintéticamente, estos compuestos pueden considerarse como tetracétidos de síntesis mixta (Figura N° 4), ya que utilizan el p-cumaroil-CoA como molécula iniciadora, a la cual se unen tres moléculas de malonil-CoA. El p-cumaroil-CoA proviene de la ruta del shiquimato- fenilpropanoides, y el malonil-CoA implica a la ruta del acetato-malonato. [33]

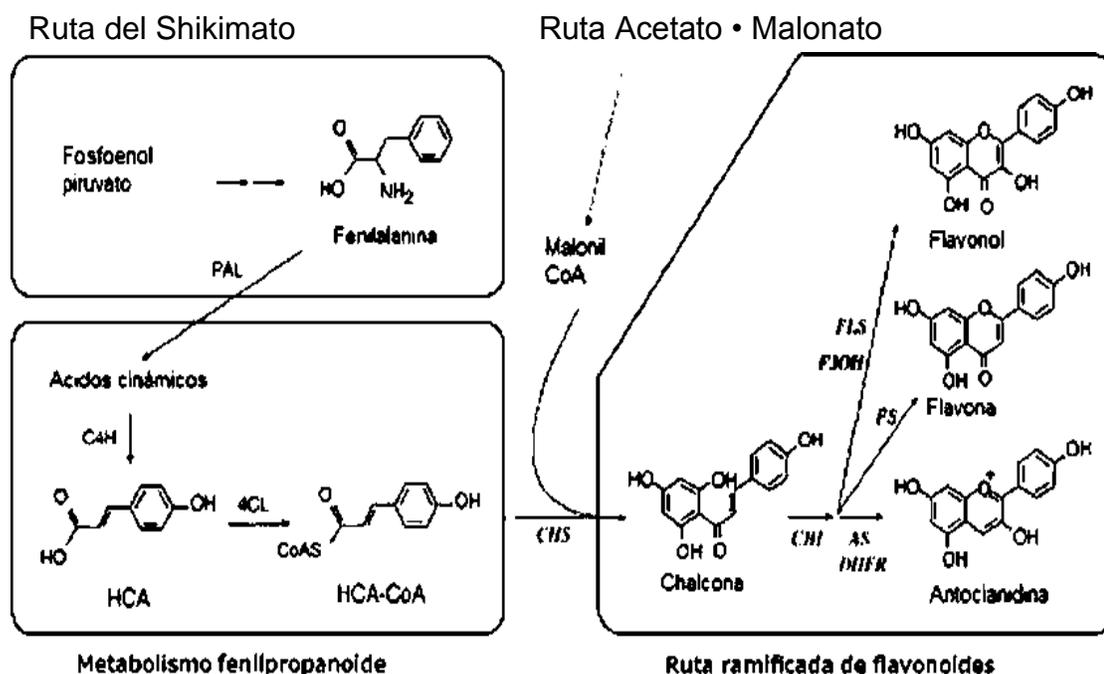


Figura N° 4. Ruta biosintética de flavonoides. [33]

3.5.1. El cacao como fuente de polifenoles

Los flavonoides ocupan un lugar muy importante entre los antioxidantes naturales provenientes de la dieta. De hecho, una gran diversidad de alimentos de origen vegetal, tanto en su estado natural como procesado, constituyen una fuente variable, pero importante de antioxidantes. [33]

El cacao y sus productos derivados, principalmente el polvo de cacao (cocoa), el chocolate y el licor de cacao, se caracterizan por tener una alta proporción de estos compuestos. Los polifenoles encontrados en el grano de cacao se almacenan en las células pigmentadoras de los cotiledones y dependiendo del contenido de antocianinas estas células pueden llegar a tener una tonalidad púrpura oscura. Los grupos de polifenoles más abundantes en cacao son metabolitos tipo flavonoide, especialmente 3 grupos básicos con un núcleo común tipo flavan-3-ol: Catequinas (37%), Antocianinas (4%) y Proantocianidinas (58%) [33]

En estudios previos se ha mostrado que el contenido total de polifenoles solubles en los granos de cacao secos y desengrasados de la variedad Forastero, varía entre 10-15%, donde el contenido de (-)-epicatequina oscila entre 34.65 y 43 mg/g, mientras que los cacaos Criollos contienen solo 2/3 partes de este contenido. [33]

En general, los polifenoles presentes en el cacao desempeñan un papel importante en la calidad de alimentos derivados, ya que intervienen en su apariencia, color, olor, acidez, e incluso en sus propiedades potencialmente beneficiosas para la salud humana. Estos parámetros son de particular importancia en la cadena de producción de chocolate, ya que muchos de ellos pueden ser evaluados por los transformadores de cacao en el mercado, dando lugar a su elección o rechazo. [33]

Adicionalmente, estos compuestos exhiben un amplio rango de efectos biológicos, entre los que se incluyen acciones antibacteriales, antiinflamatorias, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales, anticarcinogénicas y vasodilatadoras, además de ser útiles en la prevención de enfermedades coronarias y desórdenes neurodegenerativos; estas funciones biológicas se han atribuido a su actividad antioxidante y la capacidad para estabilizar radicales libres. [33]

3.6. Alteraciones en la composición y contenido de polifenoles.

3.6.1. Proceso de pre-industrialización del cacao.

La mayor parte de los granos de cacao destinados a la producción de chocolate, son sometidos en el lugar de cultivo a los primeros pasos para el procesamiento. Específicamente los procesos de fermentación y secado al sol toman lugar en esta etapa del proceso de producción (preindustrialización), y son importantes para el desarrollo de aromas y/o precursores de aromas en el chocolate. [33]

Luego de que las mazorcas son cosechadas, las semillas de cacao son removidas y transferidas a cajas de madera donde es llevada a cabo la fermentación, durando de 2 a 3 días cuando se trata de granos de cacao Criollo, y de 5 a 7 días para cacao Forastero. [33]

Durante el primer día de fermentación, el mucílago adherido a la semilla comienza a drenar líquidos con un aumento constante en la temperatura. Bajo condiciones anaerobias, los microorganismos producen ácido acético y etanol. Estos procesos inhiben la germinación de las semillas y contribuyen a cambios estructurales durante la fermentación de los granos tales como la remoción de enzimas y sustratos compartimentalizados. Los líquidos celulares se mueven a través de la pared celular y se esparcen sobre el grano de cacao, esto ocurre generalmente entre las 24 y 48 horas de la fermentación. Al tercer día, la

temperatura del grano aumenta generalmente hasta 45°C, y alcanza los 50°C cuando la fermentación ha terminado. [33]

Durante la fermentación de los granos de cacao, los polifenoles difunden desde los compartimientos celulares y se oxidan para producir taninos insolubles de alto peso molecular. [33]

Las reacciones de oxidación son catalizadas por la enzima polifenol oxidasa, no obstante, esta enzima es fuertemente inactivada durante el primer día de fermentación, pasando de una actividad enzimática del 50% al 6% durante los días 1 y 2. 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. [33]

Una vez terminado el proceso de fermentación, los granos son puestos en bandejas y secados al sol o de manera artificial. El objetivo principal del secado es disminuir la humedad de los granos hasta un 5- 7%, para permitir su almacenamiento y transporte, ya que un contenido de humedad superior al 8%, incrementa la probabilidad de contaminación fúngica. [33]

Además de la oxidación enzimática durante la fermentación, se ha propuesto que el incremento de temperatura durante el secado en campo es un factor importante vinculado a la pérdida de polifenoles. [33]

En general, se ha encontrado que el contenido de polifenoles disminuye drásticamente hasta cerca de un 80% durante estas etapas del procesamiento. Es necesario enfatizar que estos procesos de preindustrialización no están estandarizados a nivel mundial, generando alta variación en la concentración de catequinas de cacaos provenientes de diferentes procedencias. [33]

3.6.2. Proceso de industrialización de cacao: efecto sobre el contenido de polifenoles.

El primer paso en el proceso de industrialización del cacao es la limpieza del grano, luego se tuesta para el desarrollo de sabores. El tiempo de tostado puede variar entre 5 y 120 minutos y la temperatura entre 120 y 150 °C. Al tostar el grano, este pierde su cobertura externa la cual es removida fácilmente y da lugar a la almendra que continuará en el proceso. El siguiente paso consiste en moler las almendras, en dos etapas, en la primera se convierte a pasta fluida y en la segunda se alcanza el tamaño de partícula deseado. [33]

Hasta el momento se conoce que las alteraciones en el contenido y composición de polifenoles, en el proceso de manufactura del chocolate y en general los productos derivados del cacao, pueden darse principalmente durante estos procedimientos, pues 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 de los cuales depende la calidad de los productos finales en términos de contenido de compuestos con actividad biológica. [33]

No obstante, el conocimiento de estos cambios es limitado y en la actualidad solo un proceso patentado los ha estudiado en relación a los parámetros del proceso, encontrando que generalmente temperaturas y tiempos de procesamiento prolongados reducen la cantidad de polifenoles disponibles. [33]

Hoy, a pesar que la industria cuenta con tecnología moderna para el procesamiento del cacao, no posee en sus procesos un control estricto en cuanto a conservación de polifenoles y certificación de su contenido en el producto final. [33]

Además, la pérdida de catequinas y en general de polifenoles, que se presenta durante los procesos de poscosecha en preindustrialización e industrialización, conduce a la generación de productos de menor calidad, en donde se acepta ampliamente que los alimentos derivados del cacao presentan efectos benéficos en la prevención de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, debido a sus componentes bioactivos con capacidad de actuar como antioxidantes. [28]

Son numerosos los estudios a nivel internacional que han tratado el tema de la composición química del cacao o de sus subproductos, sin embargo, en El Salvador no se han realizado, y esto nos sitúa en un lugar de completo desconocimiento acerca de las características del cacao perteneciente al país.

3.7. Efecto del cacao y el chocolate sobre la salud.

3.7.1. Cacao como alimento funcional.

A lo largo de la historia un consumo excesivo de chocolate se ha asociado con ciertos riesgos o problemas de salud como el sobrepeso o la obesidad, diabetes, caries dental, acné o migraña. Hoy en día muchos de estos problemas de salud asociados al consumo de chocolate no han podido ser científicamente probados por la ICCO; en ese sentido, en septiembre de 2004, el comité de promoción de dicha organización, consideró la necesidad de promover una campaña para contrarrestar las alegaciones negativas realizadas sobre el chocolate y la obesidad, enfatizando los aspectos nutricionales positivos del cacao y el chocolate; para tal fin, se elaboró un documento de consenso “Inventario de los atributos de salud y nutrición del cacao y el chocolate” (Inventory of the Health and Nutritional attributes of cocoa and chocolate) según la Organización Internacional del Cacao (International Cocoa Organization) en el año 2005. Tras esta iniciativa, se declaró que el chocolate podía formar parte de una alimentación saludable cuando se consumía con moderación. De manera que en el contexto

de una alimentación y estilos de vida saludables (práctica de ejercicio físico regular), se puede comer chocolate con moderación sin riesgo de ganancia ponderal. [52]

En la actualidad, son numerosas las líneas de investigación que están estudiando el efecto del chocolate como alimento capaz de prevenir diferentes enfermedades crónicas y cada vez más se está convirtiendo en un alimento al que la mayoría de investigadores atribuyen efectos más beneficiosos que perjudiciales. [33]

Como demuestra la evidencia científica, a mayor contenido de sólidos de cacao en el chocolate, mayores parecen ser los beneficios para la salud tras su ingestión, puesto que se conservan la mayor parte de los compuestos presentes en el grano de cacao, especialmente los compuestos antioxidantes del grupo de los flavonoides. [33]

3.7.2. Principales actividades beneficiosas atribuidas al cacao y chocolate.

3.7.2.1. Prevención frente enfermedades cardiovasculares.

Los efectos antioxidantes de los flavonoides del cacao han estado ampliamente estudiados tanto *in vitro* por su habilidad de eliminar las especies radicales o por su capacidad quelante de metales prooxidantes, como *in vivo* por la capacidad de retardar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los flavonoides del cacao pueden modular la función plaquetaria, reduciendo la trombogénesis mediante diferentes mecanismos, basados principalmente en la inhibición de la hemostasis primaria y otras vías asociadas con la activación y agregación plaquetaria (que incluyen la síntesis de eicosanoides, peróxidos de hidrógeno, movilización del calcio, inhibición del inositol fosfato y modulación de las concentraciones de adenosín monofosfato cíclico AMPc). [52]

En la mayoría de las enfermedades cardiovasculares (ECV), incluyendo la aterosclerosis y la insuficiencia cardíaca crónica, hay signos de inflamación aguda o crónica. Los factores desencadenantes y mecanismos que conducen a la inflamación pueden variar entre las distintas condiciones clínicas, pero existen muchos mediadores comunes pro-inflamatorios, incluyendo los eicosanoides y las citoquinas. La evidencia experimental demuestra, en ensayos *in vitro*, que algunos flavonoides derivados del cacao podrían reducir la producción y el efecto de mediadores pro-inflamatorios, ya sea directamente o actuando sobre las vías de señalización. [52]

Otros compuestos del cacao como la epicatequina y procianidinas han demostrado también ser efectivas *in vitro* en la proliferación celular frente la acción del peroxinitrito, inhibiendo las reacciones de oxidación y nitración causadas por este compuesto. [52]

El cacao podría además ser beneficioso en las alteraciones que implican una activación anómala de la respuesta inmune. El extracto fenólico del licor de cacao ha demostrado *in vitro* un efecto modulador de la función inmunitaria al inhibir la producción de peróxidos, todos ellos muy oxidantes (peróxido de hidrógeno y anión superóxido) por parte de linfocitos y granulocitos activados, y la proliferación de células T, así como la proliferación de linfocitos y la producción de inmunoglobulinas. [52]

Además, por su perfil lipídico el chocolate tiene un efecto hipocolesteromiante. Se demostró un aumento del 4% en las concentraciones medias de colesterol o lipoproteínas de alta densidad (HDL) tras ingerir durante 4 semanas 22g de cacao en polvo y 16g de chocolate negro al día un incremento de las concentraciones plasmáticas de c-HDL tras la toma diaria de 75g de chocolate negro durante 3 semanas, sin que se modificara la fracción LDL. [52]

Se ha demostrado que el consumo durante 6 semanas de 41g de chocolate negro al día se asociaba mejoría en los niveles totales de triglicéridos plasmáticos. [52]

3.7.3. Prevención frente al cáncer.

Algunas investigaciones han descrito el efecto beneficioso de ciertos compuestos del cacao como los flavonoles, las catequinas y las procianidinas, en la progresión tumoral. Sin embargo, a pesar de los estudios existentes, aun habiendo numerosos estudios epidemiológicos observacionales hasta el momento, existen insuficientes evidencias del papel que el cacao puede tener en la prevención del cáncer y la mortalidad por cáncer. [52]

3.7.4. Prevención de enfermedades neurodegenerativas.

El estrés oxidativo se ha asociado con la pérdida neuronal en las enfermedades neurodegenerativas, y con la pérdida cognitiva asociada a la edad. Investigaciones recientes han demostrado que los flavonoides del cacao, a nivel del sistema nervioso central protegen a las neuronas contra el daño producido por las neurotoxinas y reducen la inflamación a nivel neuronal. Por ello, podrían considerarse agentes protectores frente a la apoptosis neuronal causada por el estrés oxidativo, promoviendo la memoria, el aprendizaje y la función cognitiva. Por tanto, el consumo de alimentos ricos en flavonoides, como el cacao y el chocolate, podría limitar la neurodegeneración asociada a una serie de trastornos neurológicos y con ello prevenir o revertir el deterioro cognitivo normal o asociado a otros trastornos. [52]

En ese sentido Williams y Spencer en una investigación realizada en el 2011, concluyeron que los flavonoides podrían tener incluso una potencial utilidad frente a la enfermedad de Alzheimer, previniendo la progresión neurodegenerativa y promoviendo el rendimiento cognitivo. [43]

Todos estos efectos beneficiosos procedentes del cacao se pueden apreciar a continuación en la Figura N°5.

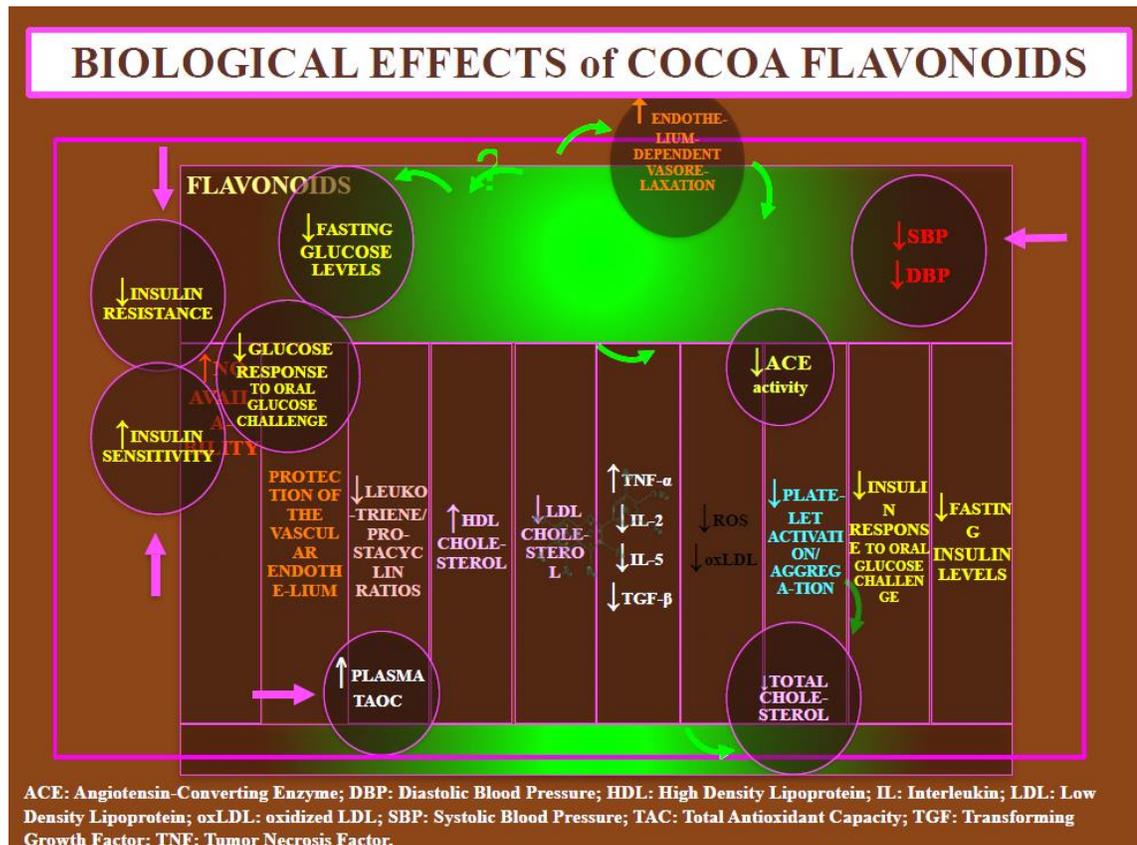


Figura N° 5. Efectos biológicos de los flavonoides (polifenoles) del cacao.

Debido a todos estos efectos biológicos del cacao son numerosas las líneas de investigación que están estudiando dichos efectos del chocolate como alimento capaz de prevenir diferentes enfermedades crónicas y cada vez más se está convirtiendo en un alimento al que la mayoría de investigadores atribuyen efectos más beneficiosos que perjudiciales. Considerándolo como un alimento funcional. Según el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (International Life Sciences Institute, ILSI) en Europa, un alimento puede ser considerado funcional: "si se logra demostrar satisfactoriamente, o bien que posee un efecto beneficioso sobre

una o más funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, y que mejora el estado de salud y del bienestar o bien que reduce el riesgo de una enfermedad”. [9]

3.8. Importancia de las determinaciones fisicoquímicas.

A continuación, se expone la importancia de realizar las determinaciones fisicoquímicas que forman parte de la caracterización de las semillas de cacao; para efectos de la investigación se realizarán las siguientes determinaciones:

3.8.1. Contenido de humedad.

La determinación del contenido de humedad es un parámetro muy importante debido que es un factor clave para la preservación, empaque, transporte y almacenamiento del cacao por lo que influye en la calidad del cacao. [20] [44]

Existen varias razones por las cuales, la mayoría de las industrias de alimentos determinan la humedad, las principales son las siguientes:

- El agua, si está presente por encima de ciertos niveles, facilita el desarrollo de los 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. [44]

Los fabricantes requieren que el cacao en grano tenga un contenido de humedad de aproximadamente el 7%. Si supera el 8%, implica no sólo una pérdida de material comestible, sino también un mayor riesgo de crecimiento de mohos y bacterias, con consecuencias potencialmente graves para la seguridad alimentaria. Con un contenido de humedad inferior al 6,5%, la cáscara será

demasiado frágil y los granos se desintegrarán, dando lugar a una proporción elevada de granos rotos. [21][47]

Otros estudios proponen límites aceptables en granos de cacao almacenados a largo plazo de 6 % a 7% de humedad. [2]

3.8.2. Contenido de grasa.

Todas las células humanas, animales y vegetales contienen grasa, que se forman en las células a partir de los hidratos de carbono; para el organismo las grasas son una importante fuente de energía. [27]

Desde un punto de vista nutricional son muy importantes, porque son vehículos de las vitaminas liposoluble A, D, E y K. Desde el punto de vista químico, las grasas son ésteres de glicerina con 3 moléculas de ácido graso. [27]

Según investigaciones y normas internacionales un porcentaje bajo en grasa es menor al 52%, ya que el porcentaje de grasa contenida en cacao se encuentra en un rango del 52% al 55% y es demasiado alto si es mayor al 55%. [22]

3.8.3. Contenido de proteína

Las proteínas son el segundo componente más abundante del grano de cacao y suponen un 17.5 % y otros estudios que indican un rango de 15.2 a 19.8% [2][39] Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco. [27]

Las proteínas intervienen en las reacciones bioquímicas que ocurren durante el procesamiento del grano de cacao, contribuyendo de esta manera en la formación de los precursores de sabor. [53]

3.8.4. Contenido estimado de polifenoles.

Los polifenoles son compuestos que participan en las modificaciones bioquímicas en el interior de la semilla de cacao, una de ellas, la oxidación enzimática. El contenido de polifenoles se relaciona con la variedad del cacao, lugar de producción y origen geográfico; pero también existen elementos externos que inciden en el contenido de polifenoles, como factores ambientales y agronómicos. Los polifenoles del cacao están íntimamente relacionados con el sabor del chocolate y su amargor. La cantidad de polifenoles en semillas secas de cacao oscila entre el 15 y 20 %. [53]

Se determina la concentración de polifenoles por la formación de compuestos coloreados con el reactivo Folin-Ciocalteu. 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. [44]

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. [25]

Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio

ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles. [25]

Como se muestra en la Figura N°6 el mecanismo de acción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción. [28]

También se pueden producir variaciones en el modo de expresar los resultados, sin embargo, el patrón recomendado es el ácido gálico.

Recientes investigaciones han utilizado el método de Folin-Ciocalteu variando el uso de ácido gálico por equivalentes de (\pm)- catequina, ácido tanínico, ácido clorogénico, vainillínico, y equivalente de ácido felúrico como patrones. [17]

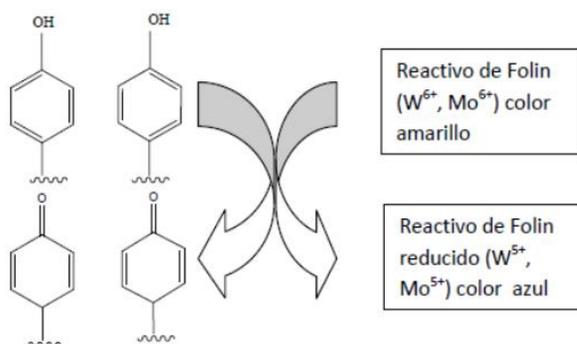


Figura N° 6. Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu. [28]

3.9. Determinación de la actividad antioxidante.

La determinación de la actividad antioxidante se basa en ensayos con dos tipos de mecanismo de reacción: (1) HAT: Ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno y (2) SET: Ensayos basados en reacciones de transferencia de un solo electrón que posee el potencial para reducir algún compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. [17]

Entre las pruebas que utilizan reacciones tipo HAT se encuentran el ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno) y el TRAP (Poder antioxidante total de captura de radicales) y entre los que utilizan el mecanismo tipo SET se encuentra FRAP (Capacidad antioxidante de reducción del ion férrico) y CUPRAC (Capacidad antioxidante de reducción cúprica), entre otros. Existen métodos en los cuales se aplica los dos tipos de mecanismo como el método de la capacidad atrapadora del radical ABTS^{•+} y el ensayo de actividad antioxidante sobre el radical DPPH. [5] [17]

3.9.1. Método ABTS^{•+}

El ensayo ABTS^{•+} o TEAC fue reportado por primera vez por Miller y Rice-Evans en 1995, quienes se basaron en la capacidad de barrido de los antioxidantes del radical ABTS^{•+} (Figura N° 7). En este ensayo el ABTS es oxidado por los radicales peróxidos y otros oxidantes generando el radical ABTS^{•+}, el cual posee un color verde intenso. [6] [17]

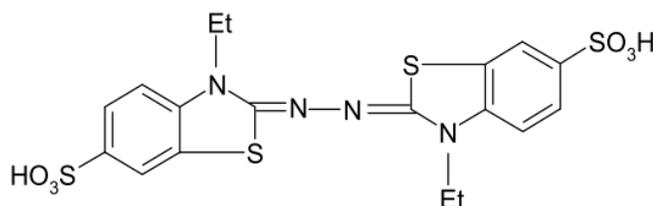


Figura N° 7. Estructura del 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) ABTS^{•+}. [6] [17]

El radical ABTS^{•+} es el más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de las antocianinas por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. [10]

Según la metodología descrita por KUSKOSKI et al. [25] el radical ABTS^{•+} se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 (± 0.1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas (antocianos) se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 μL de la muestra. A 980 μL de dilución del radical ABTS^{•+} así generado se le determina la absorbancia a 754nm a 30°C , se añade 20 μL de la muestra (dilución de antocianos) y se mide de nuevo la absorbancia a 754 nm pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua transcurridos 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 μM (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C), en este último caso por tratarse de alimentos. [11]

Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, el radical ABTS^{•+} es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable, además que el radical ABTS^{•+} puede ser solubilizado en medio acuoso u orgánico.

A pesar de esto los valores actividad antioxidante pueden depender del tiempo escogido para efectuar la medida. La absorbancia medida por el método ABTS se determinada a los 1 y 7 minutos; los resultados obtenidos por algunos investigadores indican que la reacción con el radical $ABTS^{\bullet+}$ no se completa hasta pasado 1 minuto, el tiempo de 4 minutos es el más apropiado. No obstante, sugieren tiempos de medida de 6 minutos para los patrones de referencia y de 7 minutos para los compuestos puros, extractos de plantas o de alimentos. ^[11]

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1. Tipo de Estudio:

- EXPERIMENTAL: Se realizaron cuatro determinaciones fisicoquímicas y la capacidad antioxidante presente en semillas crudas de cacao. El trabajo práctico de esta investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD-UES).
- EXPLORATORIO: Esta investigación se realizó para dar una visión general de la capacidad antioxidante de 8 accesiones de diferentes genotipos de cacao cultivado en tres fincas de El Salvador, ya que este es un tema muy reciente y poco explorado al que se le puede sacar mucho provecho y dar lugar a investigaciones más completas sobre el tema.
- TRANSVERSAL: La investigación se ejecutó en un tiempo determinado; es decir en tiempo de cosecha en el cual el cacao tuvo el grado de madurez requerido para el análisis, con el que se determinó las características físicas y químicas que definen al cacao cultivado actualmente en El Salvador.

4.2. Investigación Bibliográfica

Se realizó la búsqueda en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.
- Internet

4.3. Investigación de campo

4.3.1. Universo: Árboles de cacao cultivados en las siguientes fincas: Finca Concepción en el Municipio de Berlín, Departamento de Usulután; Finca La Sierra

en el Municipio de San Julián, Departamento de Sonsonate y Finca Cáceres en el Municipio de Tecapán, Departamento de Usulután. (Ver Anexo N°1).

4.3.2. Muestreo: No probabilístico o dirigido.

4.3.3. Muestra: 8 accesiones de cacao (*Theobroma cacao L.*) preseleccionadas y estudiadas por la Doctora Vianney Castañeda en la investigación denominada “Guía de conceptos básicos de genética en cacao, para su aplicación en la caracterización de germoplasma de cacao nativo de El Salvador”.^[19]

Estas se clasificaron en los tipos Criollo, Forastero, Criollo moderno y Trinitario, siendo las más representativas y adecuadas para los fines de esta investigación, al igual que los árboles elite de donde provienen dichas accesiones.

Las accesiones estudiadas se resumen en:

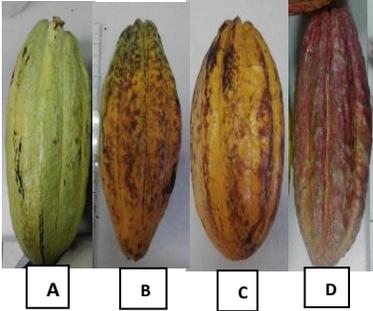
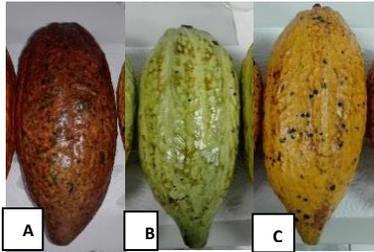
- 1 accesión de Criollo;
- 3 accesiones de Forastero,
- 1 accesión criollo moderno
- 3 accesiones de Trinitario.

Codificación de muestras (Ver Anexo N° 2)

4.3.4. Recolección de la muestra: fueron muestreados tres árboles elite previamente seleccionados por ser los más representativos por cada accesión, obteniendo frutos de cacao de 24 árboles (1 fruto o mazorca por árbol elite) distribuidos así: 3 de Criollo en Finca Cáceres; 9 de Forastero y 3 Criollo moderno en Finca La Sierra y 9 de Trinitario en Finca Concepción.

Como se aprecia en el Cuadro N° 4, el cual además contiene ilustraciones de las muestras obtenidas según las Figuras N° 8, 9 y 10.

Cuadro N° 4. Cantidad de árboles y accesiones obtenidas por finca con la respectiva figura que ilustra los genotipos utilizados.

Nombre de la finca	N° de arboles elite	N° de accesiones	Genotipos	Ilustracion de los Genotipos
Finca Cáceres (Finca control)	3	1	Criollo	 <p>Figura N° 8. Genotipo Criollo.</p>
Finca La Sierra	12	3 1	Forastero Criollo Moderno	 <p>Figura N° 9. Genotipos: A: Forastero verde B: Forastero amarillo con anillo verde. C: Forastero amarillo amelonado. D: Criollo moderno.</p>
Finca Concepción	9	3	Trinitario	 <p>Figura N° 10. Genotipos A: Trinitario rojo. B: Trinitario verde. C: Trinitario amarillo</p>

4.4. Parte Experimental

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, en las muestras de semillas crudas de las ocho accesiones de *Theobroma cacao L.* antes descritas (ver cuadro N° 5), por duplicado en el periodo de agosto 2017 a octubre del 2018.

Cuadro N° 5. Distribución de muestras de semillas de cacao de los genotipos estudiados y determinaciones realizadas.

Finca	Accesión (tipo / cantidad)		N° de árboles élite	N° de mazorcas	Determinaciones realizadas (por duplicado)
Cáceres	Criollo (Control)	1	3	3	1. Físicoquímicas: - contenido de humedad, - grasas - proteína - Polifenoles totales 2. Capacidad antioxidante de polifenoles.
La Sierra	Forastero	3	9	9	
	Criollo Moderno	1	3	3	
Concepción	Trinitario	3	9	9	
TOTALES		8	24	24	

4.4.1. Determinaciones físicoquímicas realizadas a las semillas crudas de cacao. (ver Anexo N°4)

Las determinaciones físicoquímicas se efectuaron aplicando en cada caso el método correspondiente que se detallan en el Cuadro N° 6.

Cuadro N° 6. Determinaciones físicoquímicas.

Determinación físicoquímica	Método
Humedad	Gravimétrico
Grasa	Gravimetría- Extracción con éter
Proteínas	Digestión Kjeldahl
Polifenoles Totales	Folin-Ciocalteu
Capacidad antioxidante	ABTS ^{o+}

Ver anexo N° 3, 4, N° 5 y N° 6 para las especificaciones de los parámetros estudiados, los procedimientos aplicados, la preparación de reactivos y el material, equipo y los reactivos utilizados respectivamente.

4.4.1.1 Tratamiento a las semillas de cacao. [44]

Para cada muestra se realizó lo siguiente:

- Pesar de cada fruto, el mucílago-semilla y la corteza.
- Eliminar la pulpa con agua.
- Secar con papel filtro para eliminar el exceso de agua, envolver en papel filtro y colocar sobre una bandeja.
- Colocar en la estufa a una temperatura de 55°C, hasta obtener una semilla libre de humedad, al tomar una o dos semillas y al oprimirlas crujen es señal de que están en el grado de sequedad requerido.
- Triturar las semillas de cacao utilizando un mortero y pistilo.

4.4.1.2 Determinación de humedad [7, 15, 37, 45]

La cantidad de agua se eliminó por calentamiento en estufa entre 100-110 °C durante 2 horas.

Procedimiento: (Ver anexo N°4)

- Preparar un recipiente de aluminio limpio en la estufa a 110°C por un periodo 30 min.
- Enfriar en desecador por 30 minutos.
- Pesar el recipiente vacío en balanza analítica y anotar el peso.
- Pesar 1 gramo de muestra homogenizada en una balanza analítica. Anotar el peso.
- Secar las muestras en estufa a 100-110°C durante 2 horas.
- Sacar la muestra de la estufa y enfriar en un desecador durante 10 minutos.
- Pesar las muestras secas hasta peso constante.

- Calcular el contenido de humedad como el peso perdido de la muestra durante el secado según la ecuación N° 1 (E1).

$$(E1) \quad \% \text{ de humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde:

P_i=Peso inicial

P_f=Peso final

% de materia seca = 100 - % de humedad.

Reportar como pérdida por secado a 100-110 °C.

4.4.1.3 Determinación de grasa [15, 36, 37, 45]

Una muestra homogénea, seca y pesada de semillas de cacao se sometió a una extracción con éter etílico. Posteriormente, se realizó la extracción total de la materia grasa libre haciendo uso del extractor Soxhlet.

Procedimiento: (Ver anexo N°4)

Preparación de la muestra:

- Homogenizar la muestra.
- Pesar de 2 a 5 gramos de muestra preparada en el dedal de extracción o papel filtro previamente pesado y tapado con algodón desgrasado. Registrar el peso como "m".
- Secar el matraz de extracción por 30 min a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ y enfriar en desecador.
- Pesar el matraz de extracción. Registrar peso como m₁.
- Poner el matraz de extracción en el sistema Soxhlet, el dedal en el tubo de extracción y adicionar el solvente al matraz.
- Extraer la muestra con éter etílico por 6 a 8 horas a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/segundos.

- Una vez terminada la extracción eliminar el solvente por evaporación en rotavapor. Hasta que no se detecte olor a éter.
- Secar el matraz con la grasa en estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 min, enfriar en desecador y pesar. Registrar peso como m_2 .
- Calcular el contenido de grasa mediante las ecuaciones N° 2 y 3 (E2) y (E3):

$$(E2) \text{ \% de grasa cruda en base húmeda} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100$$

Donde:

m : peso de la muestra

m_1 : tara del matraz vacío

m_2 : peso matraz con grasa

$$(E3) \text{ \% de grasa cruda en base seca} = \frac{\text{\% de grasa cruda en base húmeda}}{\text{\% materia seca}} \times 100$$

4.4.1.4. Determinación de proteína. [7, 37, 44, 45]

Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el que se destila recibiendo en:

- Ácido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de un indicador mixto.
- Ácido bórico formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico.

Procedimiento: (Ver anexo N°4)

- Efectuar un ensayo en blanco usando una sustancia orgánica sin nitrógeno (sacarosa) que sea capaz de provocar la reducción de los derivados nítricos y nitrosos eventualmente presentes en los reactivos.
- Pesar en balanza analítica 0.1-0.2 g de muestra homogeneizada (m) en un tubo de digestión Kjeldahl.

- Agregar 2.5 g de sulfato de potasio, 0.15 g de sulfato cúprico (o media pastilla de acelerador kjeldhal) y 12 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Encender el aparato de digestión y precalentar a temperatura de 360 °C.
- Colocar los tubos en el portatubos del equipo Kjeldahl.
- Accionar la trampa de succión de gases que contiene NaOH al 15%.
- Calentar en manta calefactora hasta total destrucción orgánica hasta que la solución esté transparente con una coloración azul verdosa.
- Sacar los tubos de la manta calefactora y dejarlos en reposo hasta que enfríen.
- Desconectar la trampa hasta que haya finalizado el enfriamiento.
- Adicionar 25 a 30 mL de una solución de ácido bórico al 4% más indicador rojo de metilo y verde bromocresol en un matraz de 250 mL.
- Conectar el matraz al aparato de destilación, esperar a la formación de vapores.
- Diluir la muestra en el tubo con no más de 80 mL de agua desmineralizada y conectar al equipo de destilación cuidando que el tubo conector toque el fondo del tubo.
- Adicionar 60 mL aproximadamente de NaOH al 40% al tubo.
- Accionar el aparato de destilación y destilar un volumen de 100 a 150 mL.
- Lavar el tubo conector con agua destilada y recibir en el tubo de digestión.
- Titular con HCl al 0.1 N hasta viraje de color de verde a rojo.
- Calcular el contenido de proteínas con las ecuaciones N° 4, 5 y 6. (E4) (E5) y (E6)

$$(E4) \% \text{ de Nitrogeno en base húmeda} = \frac{14 \times N \times V \times 100}{m \times 1000}$$

Donde:

14: peso atómico del nitrógeno.

N: Normalidad real del HCl (número de equivalentes/L)

V: volumen gastado de HCl 0.1 N en mL.

m: masa de la muestra, en gramos

1000: factor de conversión de Normalidad de Litros a mL

$$(E5) \% \text{ de Proteína cruda en base húmeda} = \% \text{ de Nitrogeno} \times 5.4$$

Donde:

5.4: factor establecido para semillas de cacao. ^[15]

$$(E6) \% \text{ de Proteína cruda en base seca} = \frac{\% \text{ de Proteína cruda en base húmeda}}{\% \text{ de materia seca}} \times 100$$

2.4.1.5 Determinación de polifenoles totales ^[16, 17, 28, 30, 44]

Ensayo Folin-Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm (región visible).

Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolib-dico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de pulpa de frutos. Recientes investigaciones han utilizado el método de Folin-Ciocalteu variando el uso de ácido gálico por equivalentes de (\pm)- Catequina, ácido tanínico, ácido clorogénico, vainillínico, y equivalente de ácido felúrico como patrones.

Procedimiento (Ver anexo N° 4)

- Pesar 1.0 g de muestra homogenizada en balanza analítica.
- Extraer a reflujo con etanol al 70% durante 7 horas.
- Filtrar el extracto y aforar a 200 mL con etanol al 70%
- Diluir 1.0 mL del reactivo de Folin Ciocalteu en 9.0 mL de agua desmineralizada.
- Tomar 2.25 mL y adicionarlos a 0.3 mL del extracto. Agitar para disolver. Reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 2.25 mL de solución de carbonato de sodio al 2%. Agitar la mezcla y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Realizar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.
- Determinar la concentración de polifenoles mediante el empleo de la curva estándar con concentraciones conocidas de Catequina (10-100µg de catequina/mL).
- Calcular el contenido de polifenoles con las ecuaciones N° 9 y 10 (E9) (E10).
- Determinar la concentración de las muestras a través de la sustitución en la ecuación obtenida (E7) por regresión lineal de los datos de la curva de concentraciones de catequina.

$$(E7) Y = mX + b$$

Despejando la ecuación (E7) en función de “x” y sustituyendo por términos

$$(E8) x = \frac{(y-b)}{m}$$

Dónde:

y = Absorbancia

x = Concentración

m = Pendiente

b = Ordenada de origen

Quedando la ecuación de la siguiente manera, para calcular el contenido de polifenoles:

$$(E9) \text{ Concentración } (\mu\text{g}) = \frac{(\text{Abs}-b)}{m} \times \text{FD}$$

Dónde:

Abs = Absorbancia de la muestra

m = Pendiente

b = Ordenada de origen

FD = Factor de dilución.

$$(E10) \text{ Concentración (g)} = \frac{\text{concentración } (\mu\text{g})}{1,000,000}$$

El % de polifenoles en la muestra se calculó con la siguiente ecuación N° 11 y 12

(E11) (E12):

$$(E11) \text{ \% de polifenoles en base húmeda} = \frac{\text{Concentración (g)} \times 100}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

$$(E12) \text{ \% de polifenoles en base seca} = \frac{\text{\% polifenoles en base húmeda}}{\text{\% materia seca}} \times 100$$

4.4.2 Capacidad antioxidante de polifenoles presentes en semillas de cacao.

[10, 11, 14, 23, 40, 41, 48, 50]

Ensayo de decoloración del radical ABTS^{•+}

Es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable.

En este ensayo el ATBS es oxidado por los radicales peróxido y otros oxidantes generando el radical ABTS^{•+}, el cual posee un color verde intenso.

El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 μM (concentración final) en etanol. Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox).

4.4.2.1 Obtención de extracto hidroalcohólico [23]

Procedimiento: (Ver anexo N°4)

- Limpiar el grano de cacao manualmente.
- Colocar el grano entero y crudo en un mortero y triturar con pistilo hasta tener un tamaño pequeño uniforme.
- Pesar en balanza analítica en un beaker de 50 mL 10 g de muestra.
- Colocar los 10 g de muestra en un Erlenmeyer de 250 mL.
- Medir 100 mL del solvente (agua/etanol, 50:50 v/v) y agregarlos al Erlenmeyer.
- Agitar, tapar y rotular el Erlenmeyer con el nombre de la muestra y la hora de la preparación del extracto.
- Dejar reposar por 24 horas.
- Pasar extracto a tubos de centrifuga.
- Centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm.
- Filtrar, esta será la solución madre.

Preparación de diluciones

- Luego de filtrar la solución madre se refrigera a 4°C y se preparan soluciones de trabajo de: 5, 40, 70, 95 µg/mL en balones volumétricos de 100 mL. Ver Cuadro N° 7.

Cuadro N° 7. Serie de diluciones de solución madre.

N° Tubo	Extracto (mL)	Agua/Etanol (50:50) (mL)	Dilución µg/ml
1	0.5	Hasta 100 mL	5
2	4.0	Hasta 100 mL	40
3	7.0	Hasta 100 mL	70
4	9.5	Hasta 100 mL	95

Preparación de estándar: Ver anexo N° 5.

Solución de 2,2`-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) 7 mM en agua: Ver anexo N° 5.

Solución de persulfato de potasio 2.4 5mM en agua: Ver anexo N° 5.

Formación del catión (ABTS^{•+}): Ver anexo N° 5.

Preparación de la solución de uso: Ver anexo N° 5.

Preparación de los tubos de reacción

- Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregar agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran sustancias contenidas en el agua de chorro.
- Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz.
- Preparar una serie de tubos que contiene los reactivos que se citan en el Cuadro N°8.

Cuadro N° 8. Serie de tubos a preparar para reacción con radical ABTS^{•+} ^[23]

Reactivo	Extracto y dilución de cada Mx	Solución ABTS^{•+}
Control	10 µL	990 µL
Ensayo	10 µL	990 µL
5 µg/ml	10 µL	990 µL
40 µg/ml	10 µL	990 µL
70 µg/ml	10 µL	990 µL
95 µg/ml	10 µL	990 µL

* Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se preparó por duplicado. El blanco de la corrida es etanol al 95%.

Tanto la solución de ABTS^{•+} como la muestra deben haber estado en la incubadora a 37°C mínimo 30 minutos antes de mezclarlo.

- Leer absorbancia a 30°C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis.
- Calcular el porcentaje de la inhibición de la concentración mediante la ecuación N° 13:

$$(E13) \% \text{ de la inhibición} = \frac{(\text{absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución}) * 100}{\text{absorbancia del control}}$$

- Graficar la concentración del extracto (eje X) vs. porcentaje de absorbancia (eje Y).
- Determinar la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (r_2) el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.
- Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (CI50), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de ABTS^{•+}.
- Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la ecuación de la siguiente manera (E14):

$$(E14) CI50 = \frac{(50 - \text{pendiente})}{\text{intercepto}}$$

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de un extracto representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto. Los valores de TEAC se determinan con la siguiente ecuación (E15) [22]:

$$(E15) TEAC = \frac{CI50 \text{ TROLOX}}{CI50 \text{ mx cacao}}$$

4.5 Análisis Estadístico

No se utilizó ningún tipo de análisis estadístico, las muestras se realizaron por duplicado, solo se midió la media aritmética por muestra.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Determinación del contenido de humedad, grasa, proteínas y polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu) en semillas crudas de diferentes genotipos de cacao.

Para poder llevar a cabo las diferentes determinaciones se dio tratamiento a la muestra, para esto fue necesario la recolección de algunos datos de cada fruto, en el cuadro N° 9 se presenta el peso del fruto, peso del mucilago-semilla (peso M-S), peso de la corteza y el número de semillas por fruto.

Ver codificación de muestras en Anexo N° 3.

Cuadro N° 9. Datos de peso y número de semillas por árbol élite.

Finca	Muestra	Peso del fruto (g)	Peso M-S (g)	Peso corteza (g)	# de semillas
Finca Cáceres	CCAE1	460.90	129.00	331.70	29
	CCAE2	493.10	146.50	346.45	34
	CCAE3	433.85	101.00	332.62	25
Finca La Sierra	FVAE1	536.60	93.10	439.12	45
	FVAE2	764.10	142.80	416.30	35
	FVAE3	324.80	90.50	234.10	34
	FAVAE1	663.30	61.30	602.00	22
	FAVAE2	576.60	93.60	483.00	28
	FAVAE3	427.00	107.00	318.90	34
	FAAE1	611.00	110.80	500.20	39
	FAAE2	417.10	87.00	329.90	36
	FAAE3	435.10	90.00	345.00	37
	CMAE1	324.20	91.60	232.40	36
	CMAE2	1,113.10	98.80	919.20	42
	CMAE3	477.20	126.30	347.30	46

Cuadro N° 9. Continuación.

Finca	Muestra	Peso del fruto (g)	Peso M-S (g)	Peso corteza (g)	# de semillas
Finca Concepción	TRAE1	674.30	155.70	515.30	31
	TRAE2	1053.50	216.80	832.80	44
	TRAE3	1217.40	200.50	1011.90	42
	TAAE1	1028.00	237.70	789.80	49
	TAAE2	875.70	194.00	681.40	37
	TAAE3	1108.20	188.70	918.70	45
	TVAE1	928.00	166.20	761.00	37
	TVAE2	1158.40	148.50	1008.70	30
	TVAE3	1147.30	237.00	908.50	57

M-S: Mucílago-semilla; g: gramos ■ Valores de pesos más bajos ■ Valores de pesos más altos

Nota aclaratoria: los valores sombreados en rojo, son datos en los que no se pudo determinar el peso de la corteza fresca, por lo que los pesos disminuyeron.

Como se puede apreciar en el Cuadro N° 9, los mayores pesos de frutos se encontraron en el cacao proveniente de Finca Concepción, fluctuando entre 674.3 gramos y 1217.4 gramos, por el contrario los pesos más bajos correspondieron al cacao proveniente de Finca Cáceres, con un rango de peso entre 433.85 gramos y 493.10 gramos; el mismo comportamiento se manifestó en peso de mucilago, peso de corteza y cantidad de semillas por fruto; por tanto puede aseverarse que el peso y número de semillas depende del tamaño del fruto, del espesor del mucílago y de la diversidad genética de cacao.

Los datos generados en la investigación permiten afirmar que el cacao posee una amplia variabilidad genética para la mayoría de caracteres, especialmente para el tamaño, forma, color de los frutos, semillas y tamaño de árboles. El número de almendras que almacenan los frutos depende del tipo de cultivo; la forma y tamaño de los frutos depende de sus características genéticas, el medio

ambiente donde crece y se desarrolla el árbol, así como el manejo de la plantación. [32]

5.1. Contenido de humedad

En el cuadro N° 10, se presentan los resultados de la determinación de la humedad y el porcentaje de materia seca en las diferentes muestras por finca; haciendo uso del método gravimétrico.

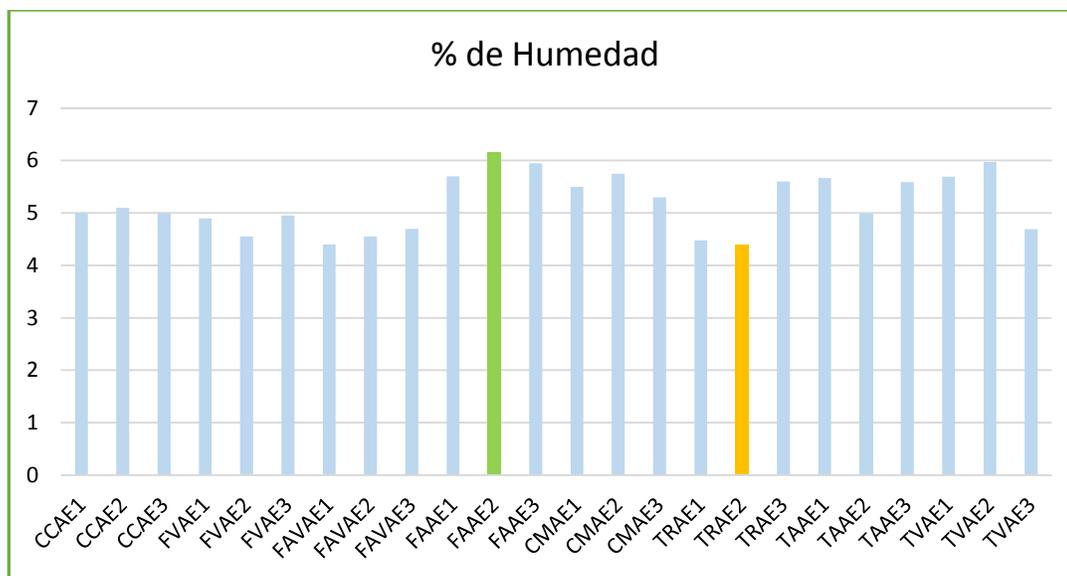
Cuadro N° 10. Contenido de humedad en semillas crudas de cacao y el porcentaje de materia seca.

Finca	Muestra	% de Humedad	% de materia seca
Finca Cáceres	CCA1E1	5.00	95.00
	CCA1E2	5.10	94.90
	CCA1E3	5.00	95.00
Finca La Sierra	FVAE1	4.90	95.10
	FVAE2	4.55	95.45
	FVAE3	4.95	95.05
	FAVAE1	4.40	95.60
	FAVAE2	4.55	95.45
	FAVAE3	4.70	95.30
	FAAE1	5.70	94.30
	FAAE2	6.15	93.85
	FAAE3	5.95	94.05
	CMAE1	5.50	94.50
	CMAE2	5.75	94.25
	CMAE3	5.30	94.70

Cuadro N° 10. Continuación.

Finca	Muestra	% de Humedad	% de materia seca
Finca Concepción	TRAE1	4.48	95.52
	TRAE2	4.39	95.61
	TRAE3	5.60	94.40
	TAAE1	5.67	94.33
	TAAE2	4.98	95.02
	TAAE3	5.59	94.41
	TVAE1	5.69	94.31
	TVAE2	5.97	94.03
	TVAE3	4.69	95.31

■ Valor más bajo ■ Valor más alto

**Figura N° 11.** Contenido de humedad en semillas crudas de cacao.

En el cuadro N° 10 puede observarse que todas las muestras poseen un porcentaje de humedad similar, siendo la muestra de finca Concepción TRAE2

la que mostró menor contenido de humedad (4.39%) y la muestra de finca La Sierra FAAE2 con mayor contenido de humedad (6.15%).

Teniendo en cuenta las especificaciones de la Norma Mexicana NMX-F-352-S-1980, la cual se refiere a grano de cacao lavado, secado y no fermentado, que se aplicó al estudio, las muestras cumplen con las especificaciones para el contenido de humedad (7.5% máx.), al igual a límites máximos establecidos por otros autores en granos de cacao no fermentados o fermentados que van de un 6% a un 7% , estos porcentajes al ser bajos representan una gran ventaja debido a que son un limitante al crecimiento de microorganismos, siempre que se mantengan a esas condiciones de humedad durante toda su manipulación, [21, 44, 45, 47]

Este parámetro brinda información sobre la calidad del cacao y acerca del comportamiento de las reacciones enzimáticas y microbiológicas del grano.[2]

Respecto al genotipo la muestra tipo criollo cuya función fue servir de control en esta investigación, mantuvieron un rango más cerrado es decir valores muy cercanos entre sí, diferente a las muestras de tipo forastero, criollo moderno y trinitario que presentan valores más variados.

El genotipo de cacao, la zona de procedencia del fruto, las condiciones ambientales y de manejo, sumado al nivel de madurez en que se cosechan los frutos también podrían influir en el contenido de humedad de las semillas de cacao.

5.2. Contenido de grasa

En el cuadro N° 11, se muestra los resultados de la determinación de grasa en las diferentes muestras por finca, haciendo uso del método soxhlet.

Cuadro N° 11. Contenido de grasa en semillas crudas de cacao.

Finca	Muestra	% de grasa cruda BH	% de grasa cruda BS
Finca Cáceres	CCAЕ1	46.10	48.53
	CCAЕ2	46.00	48.47
	CCAЕ3	46.10	48.53
Finca La Sierra	FVAЕ1	54.69	57.51
	FVAЕ2	58.85	61.65
	FVAЕ3	54.24	57.06
	FAVAЕ1	56.97	59.59
	FAVAЕ2	57.20	59.92
	FAVAЕ3	55.49	58.22
	FAAE1	54.83	58.14
	FAAE2	51.68	55.06
	FAAE3	53.32	56,69
	CMAE1	53.41	55.98
	CMAE2	55.54	58.92
	CMAE3	59.01	62.31
Finca Concepción	TRAE1	55.16	57.75
	TRAE2	59.16	61.87
	TRAE3	52.79	55.92
	TAAE1	48.05	50.94
	TAAE2	53.49	56.29
	TAAE3	55.85	58.98
	TVAE1	54.70	58.00
	TVAE2	53.47	56.86
	TVAE3	55.65	58.39

■ Valor más bajo ■ Valor más alto

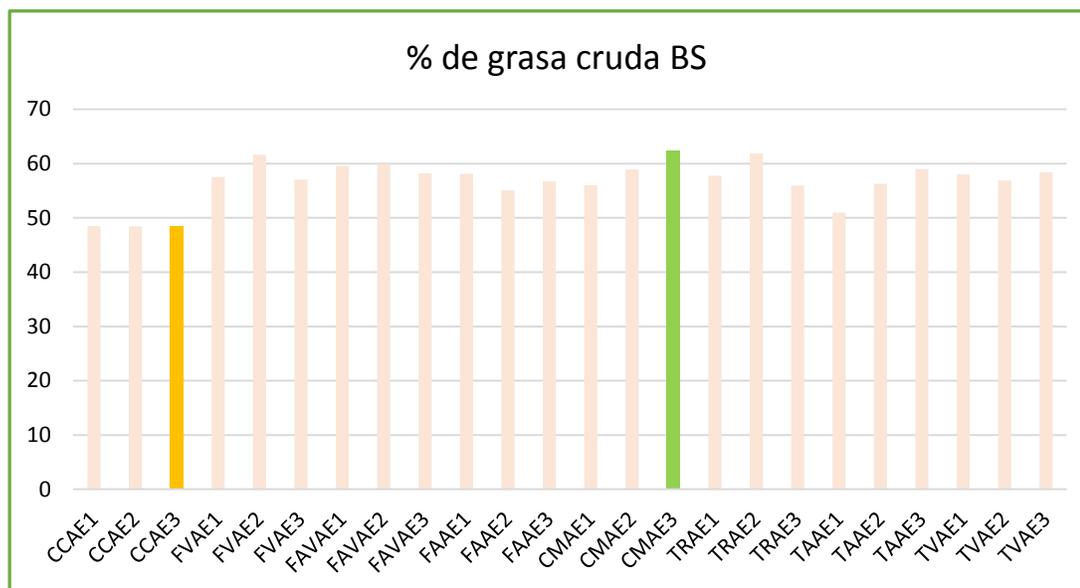


Figura N° 12. Contenido de grasas en semillas crudas de cacao.

Respecto al contenido de grasa cruda, se evidencia que la muestra con menor contenido de estas en base seca corresponde a CCAE2 de finca Cáceres (48.47%), y la muestra con mayor contenido de las mismas fue CMAE3 de finca La Sierra (62.31%); en cuanto a grasa cruda en base húmeda los valores más bajos se encontraron también en finca Cáceres (46.00%) y los más altos en finca la Sierra (59.01%).

La mayoría de los valores obtenidos tomando como referencia la FEDECACAO (50-55%) para grano seco y un rango propuesto por otros autores que va de 48% a 57% para grano seco [2], indican un contenido alto de grasa, que indican la buena calidad alimenticia de la semilla en estado fresco, y se comprueba según la literatura que al someterse a lo diferentes procesos para la elaboración de los derivados del cacao se disminuye en gran medida muchos de los componentes de la semilla del cacao cruda. [2, 21, 27]

En esta investigación el genotipo con mayor contenido de grasa es el Forastero, es el tipo de cacao es utilizado para la producción de manteca de cacao y de productos que tienen una elevada proporción de chocolate. [21, 42]

El genotipo que presenta menor contenido de grasa es el Criollo, el cual es muy utilizado para la mezcla de granos para la producción de sabores específicos, siendo por excelencia el cacao fino o de aroma, los valores de grasa deben considerarse sólo como indicadores ya que pueden variar según el origen, factores tipo climáticos y genéticos. [21, 42]

5.3. Contenido de proteínas

En el cuadro N° 12 se detallan los resultados de la determinación de proteína en las diferentes muestras por finca; haciendo uso del método de digestión Kjeldahl.

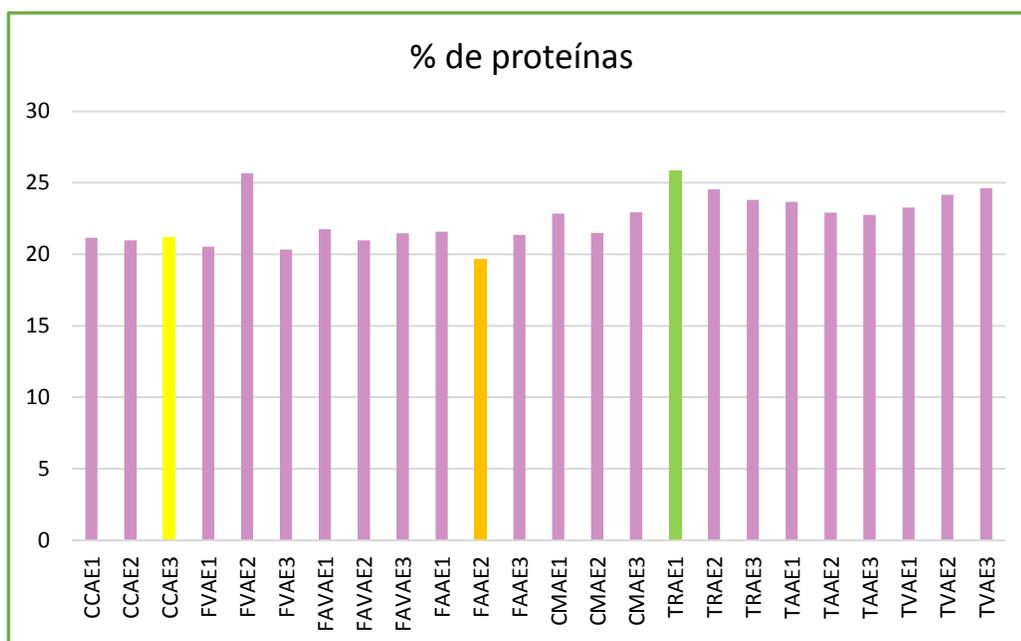
Cuadro N° 12. Contenido de proteínas en semillas crudas de cacao.

Finca	Muestra	% de proteínas
Finca Cáceres	CCAЕ1	21.15
	CCAЕ2	20.98
	CCAЕ3	21.17
Finca La Sierra	FVAЕ1	20.53
	FVAЕ2	25.68
	FVAЕ3	20.33
	FAVAЕ1	21.77
	FAVAЕ2	20.98
	FAVAЕ3	21.46
	FAAE1	21.57
	FAAE2	19.63
	FAAE3	21.36
	CMAE1	22.85
	CMAE2	21.50
	CMAE3	22.94

Cuadro N° 12. Continuación.

Finca	Muestra	% de proteínas
Finca Concepción	TRAE1	25.83
	TRAE2	24.54
	TRAE3	23.80
	TAAE1	23.68
	TAAE2	22.92
	TAAE3	22.76
	TVAE1	23.28
	TVAE2	24.17
	TVAE3	24.62

■ Valor más bajo
 ■ Valor más alto
 ■ Valor intermedio

**Figura N° 13.** Contenido de proteínas en semillas crudas de cacao.

Como se observa en el cuadro N° 12, los porcentajes de proteína resultaron ser elevados, fluctuando entre 19.63 % que corresponde al genotipo FAAE2, proveniente de finca La Sierra y 25.83% para el genotipo TRAE1, de finca

Concepción y un valor intermedio para el genotipo CCAE3, de finca Cáceres que reportó el 21.17% de proteínas; este comportamiento posiblemente obedezca a la condición en que se hicieron los análisis, es decir, se utilizó semillas de cacao crudas que no sufrieron ningún proceso de transformación o degradación de sus componentes.

Aunque no existe parámetro documentado para el contenido de proteínas en semillas crudas de cacao para estos genotipos, se puede afirmar que los contenidos de proteínas obtenidos en la presente investigación son altos, tomando de referencia la investigación realizada por Delgado J. (2016), en Perú, quien reporta que la variedad de cacao Forastero contiene 13.59% y la variedad Trinitario el 13.97% y alude la variedad Criollo con un comportamiento intermedio de 13.88%.

Los procesos de transformación como la fermentación pueden disminuir los contenidos de proteínas ya que estas intervienen en las reacciones bioquímicas, por tanto, aunque no ha sido objeto del estudio, se puede aseverar de conformidad a las investigaciones que cuando la semilla ha sido sometida a procesos de transformación los porcentajes de proteínas son inferiores que, en semilla cruda, fluctuando entre el 12 y el 18 %. [2, 3, 27, 28]

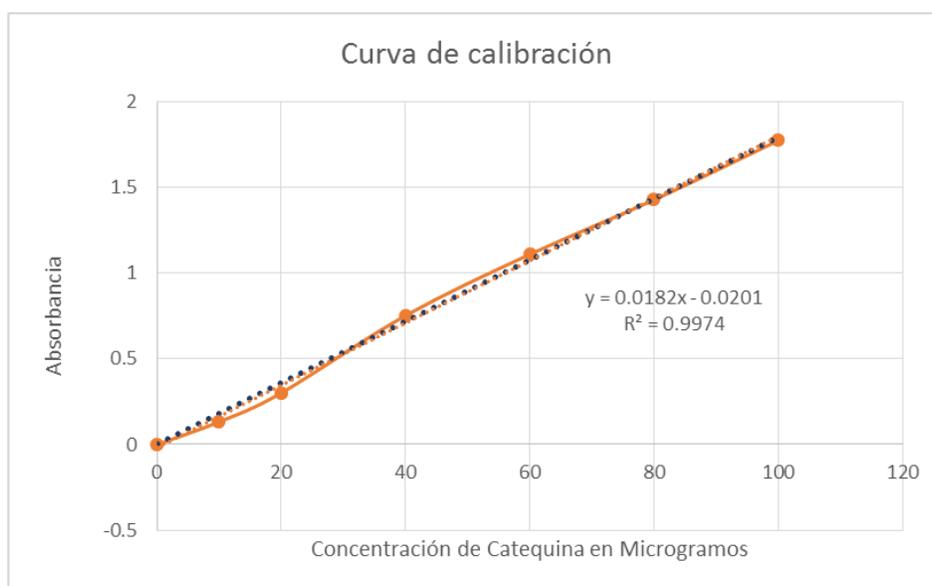
Las proteínas además son el segundo componente más abundante luego de los lípidos, las cuales le dan un valor agregado al cacao en estudio.

5.4. Contenido de polifenoles totales

Para determinar la concentración de polifenoles se empleó la curva estándar con concentraciones conocidas de Catequina (10-100µg de catequina/mL ver Cuadro N° 13), que se muestra en la Figura N° 11.

Cuadro N° 13. Concentraciones de Catequina para curvas de calibración.

N° de tubo	Solución de Catequina (mL)	Agua desmineralizada (mL)	Concentración de catequina (Microgramos)	Absorbancia	Log Concentración St.
1	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00
2	0.10	1.90	10.00	0.13	1.00
3	0.20	1.80	20.00	0.30	1.30
4	0.40	1.60	40.00	0.75	1.60
5	0.60	1.40	60.00	1.11	1.78
6	0.80	1.20	80.00	1.42	1.90
7	1.00	1.00	100.00	1.77	2.00

**Figura N° 14.** Curva estándar de concentraciones conocidas de Catequina.

En el cuadro N° 14 se puede observar los resultados del contenido de polifenoles totales en las diferentes muestras por finca; haciendo uso del método Folin-Ciocalteu.

Cuadro N° 14. Contenido de polifenoles totales en semillas crudas de cacao.

Finca	Muestra	% de polifenoles totales en base seca
Finca Cáceres	CCAЕ1	14.76
	CCAЕ2	14.86
	CCAЕ3	14.96
Finca La Sierra	FVAЕ1	12.36
	FVAЕ2	16.27
	FVAЕ3	15.95
	FAVAЕ1	16.07
	FAVAЕ2	15.54
	FAVAЕ3	16.11
	FAAE1	20.74
	FAAE2	16.49
	FAAE3	14.81
	CMAE1	14.07
	CMAE2	16.20
	CMAE3	21.32
Finca Concepción	TRAE1	14.57
	TRAE2	8.63
	TRAE3	15.75
	TAAE1	15.59
	TAAE2	11.47
	TAAE3	10.42
	TVAE1	11.40
	TVAE2	13.28
	TVAE3	11.85

Valor más bajo
 Valores más altos

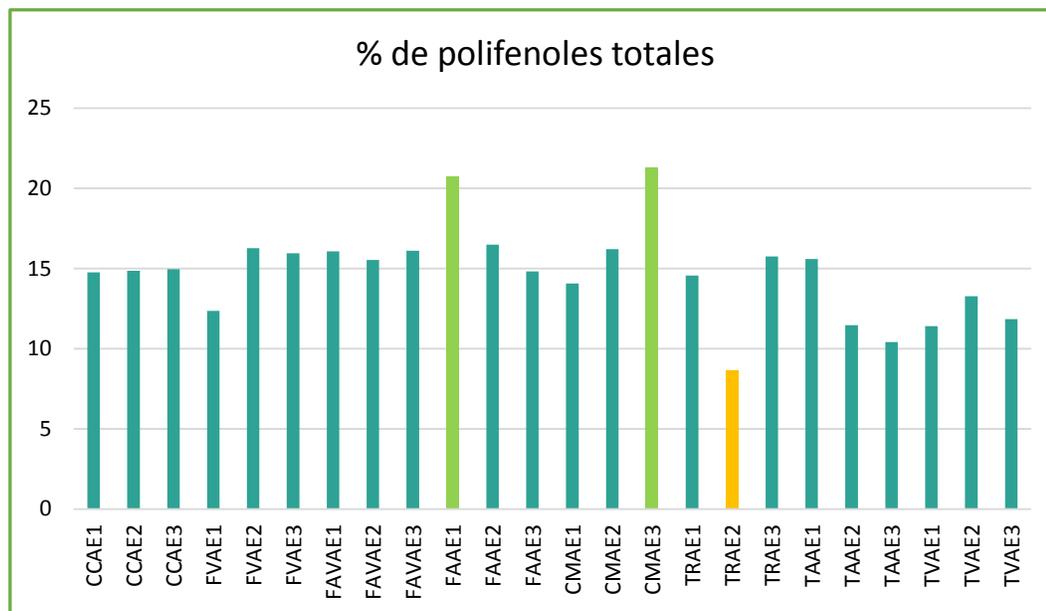


Figura N° 15. Contenido de polifenoles en semillas crudas de cacao.

Como se puede observar en el cuadro N° 14, los valores del contenido de polifenoles fue mayor en los genotipos CMAE3 (21.32%) y FAAE1 (20.74%) de finca La Sierra y los valores más bajos se obtuvo en el genotipo TRAE2 de finca Concepción (8.63%).

Los resultados en contenido de polifenoles de las fincas Cáceres y La Sierra, coinciden con valores reportados en una investigación realizada en Venezuela por Domingo G., quien determinó contenidos de polifenoles que varían del 12 al 18% en granos de cacao [25].

Caso contrario ocurrió en finca Concepción en donde de 9 árboles élite, 5 reflejaron contenidos inferiores al 12%, caso similar ocurrió en una investigación llevada a cabo en CENSALUD con cacao tipo forastero y trinitario, donde el cacao tipo trinitario resulto tener un porcentaje de polifenoles bastante bajo, [2] lo que puede deberse al genotipo, dado que el contenido fenólico y la concentración de

polifenoles en los granos de cacao varia de un genotipo a otro, encontrando los niveles más altos en los cultivares: Criollo, Forastero y Criollo Moderno.

El grado de madurez posiblemente también afecta el contenido de polifenoles ya que, en cada localidad estudiada, el nivel de maduración en que se cosecharon los frutos fue diferente.

5.5. Medición de la capacidad antioxidante en semillas crudas de diferentes genotipos de cacao mediante el método de capacidad atrapadora del radical ABTS^{•+}.

El cuadro N° 15 muestra los resultados obtenidos para el estándar usado para determinar la capacidad antioxidante, Trolox, que se trabajó a concentraciones de 0 a 15 μM , y cuyas gráficas de porcentajes de inhibición (capacidad antioxidante) se presentan en las Figuras N° 16, 17 y 18.

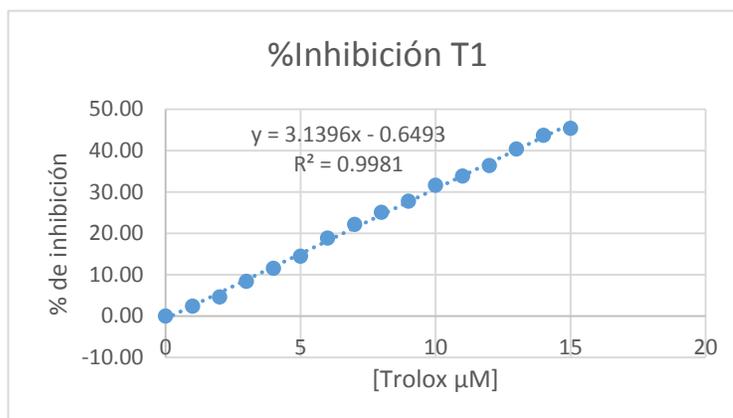
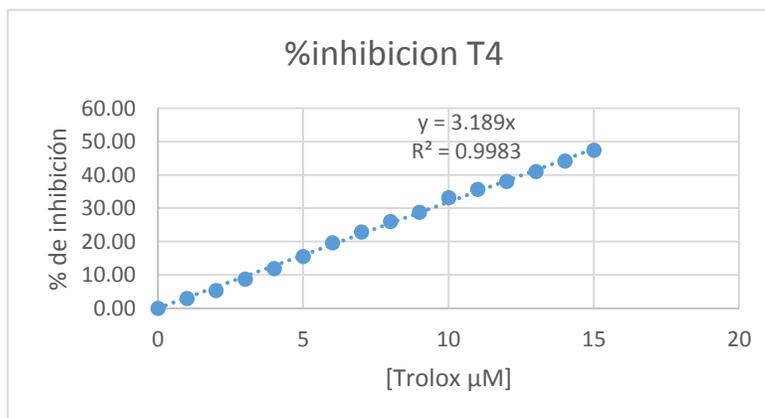
Es importante mencionar que la capacidad antioxidante varia respecto al genotipo y tiempo de reacción, dado que la decoloración como porcentaje de inhibición del radical ABTS está determinado en función de la concentración y el tiempo; la reacción con el radical ABTS no se completa hasta pasado el minuto uno, por ello se hizo la lectura al minuto 1 al minuto 4 y 6. [40] [48]

Cuadro N° 15. Capacidad antioxidante para curvas de porcentaje de inhibición de Trolox.

[μM]	t=1 min	%Inhibición T1	t= 4 min	%inhibición T4	t= 6 min	%inhibición T6
0	0.55	0.00	0.55	0.00	0.54	0.00
1	0.53	2.38	0.53	2.93	0.52	3.67
2	0.52	4.57	0.52	5.31	0.51	6.24
3	0.50	8.41	0.50	8.79	0.49	9.36
4	0.48	11.52	0.48	11.90	0.48	12.29

Cuadro N° 15. Continuación.

5	0.47	14.44	0.46	15.57	0.45	16.51
6	0.44	18.83	0.44	19.60	0.43	21.83
7	0.43	22.12	0.42	22.89	0.41	24.59
8	0.41	25.05	0.40	26.01	0.40	26.97
9	0.39	27.79	0.39	28.75	0.38	30.83
10	0.37	31.63	0.36	33.15	0.36	34.68
11	0.36	33.82	0.35	35.71	0.34	37.80
12	0.35	36.38	0.34	38.10	0.32	41.83
13	0.33	40.40	0.32	41.03	0.30	44.77
14	0.31	43.69	0.30	44.14	0.28	47.71
15	0.30	45.34	0.29	47.44	0.27	51.19

**Figura N° 16.** Comportamiento del porcentaje de inhibición de Trolox en el minuto 1.**Figura N° 17.** Comportamiento del porcentaje de inhibición de Trolox en el minuto 4.

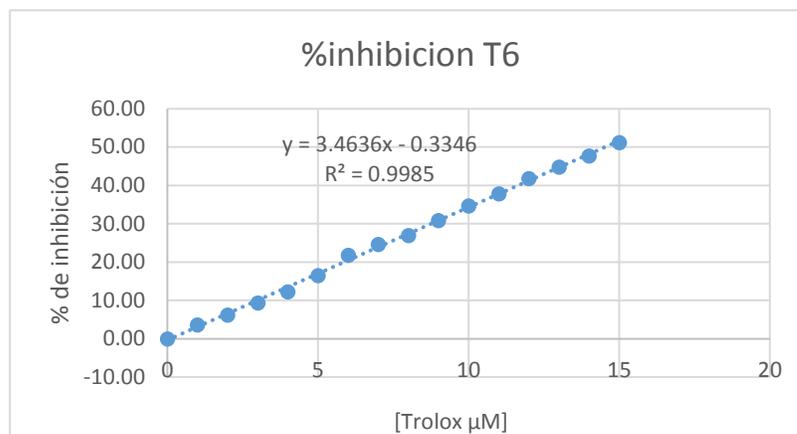


Figura N° 18. Comportamiento del porcentaje de inhibición de Trolox en el minuto 6.

Como se observa en las Figuras N° 16, 17 y 18 el porcentaje de inhibición del estándar Trolox al radical $ABTS^{•+}$, es importante porque permite determinar la actividad antioxidante de Trolox a una concentración de inhibición del 50% (CI50), lo que significa la concentración requerida para expresar un 50% de disminución de absorbancia del radical $ABTS^{•+}$.

Las concentraciones del estándar Trolox requeridas para un 50% de disminución en la absorbancia del radical $ABTS^{•+}$. (CI50), a diferentes tiempos, son las siguientes: para el minuto 1 es 72.17 μM .; para el minuto 4 es 150.37 μM y para el minuto 6 es 139.08 μM .

En los cuadros N° 16 y N° 17, se presentan los valores obtenidos de la capacidad antioxidante en las diferentes muestras de acuerdo a la finca de procedencia; haciendo uso del método de la capacidad atrapadora del radical $ABTS^{•+}$; donde el CI50 es la concentración del extracto ($\mu g/ml$) requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia del radical $ABTS^{•+}$. En las figuras 15 y 16 se puede apreciar el comportamiento de las muestras respecto al tiempo de reacción.

Cuadro N° 16. Capacidad antioxidante de los extractos de muestras de cacao expresada en términos de CI50.

Finca	Muestra	T1	T4	T6
Finca Cáceres	CCA1E1	2.32	1.26	0.96
	CCA1E2	3.24	1.59	0.88
	CCA1E3	1.77	1.34	0.77
Finca La Sierra	FVAE1	14.84	3.35	1.06
	FVAE2	1.61	1.40	1.13
	FVAE3	2.02	1.61	1.07
	FAVAE1	1.85	1.53	1.33
	FAVAE2	1.96	1.27	1.21
	FAVAE3	1.76	1.18	1.08
	FAAE1	1.65	1.42	1.05
	FAAE2	1.53	1.20	1.13
	FAAE3	16.98	1.86	1.29
	CMAE1	2.57	1.13	0.69
	CMAE2	2.72	1.17	0.70
	CMAE3	2.21	1.09	0.74
Finca Concepción	TRAE1	22.21	11.64	5.99
	TRAE2	115.41	11.02	2.10
	TRAE3	2.16	1.33	1.10
	TAAE1	19.42	8.08	1.29
	TAAE2	21.20	2.52	1.06
	TAAE3	46.13	5.94	2.08
	TVAE1	24.93	1.76	1.44
	TVAE2	18.59	2.41	1.04
	TVAE3	74.90	10.29	2.13

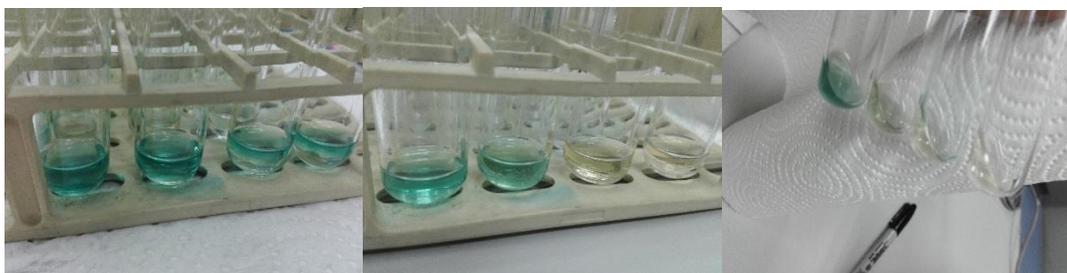
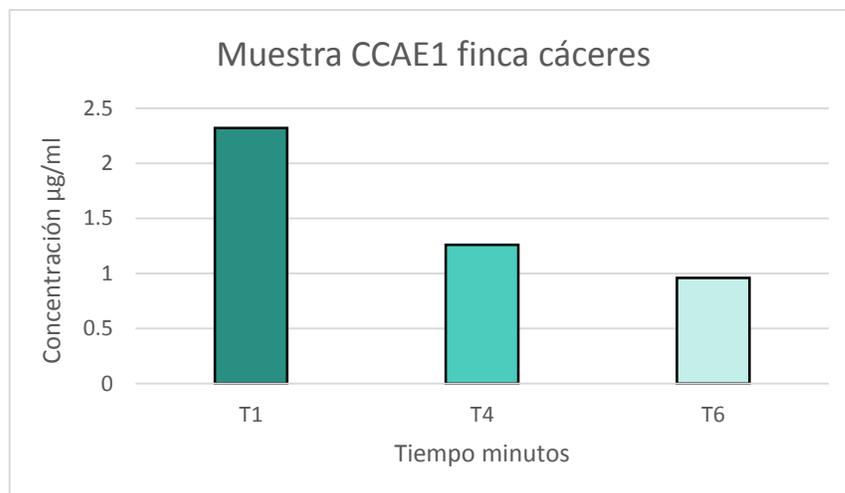


Figura N° 19. Comportamiento de las muestras respecto al tiempo de reacción.

Como se observa en la Figura N° 19 el comportamiento de las muestras obedece a que a medida aumenta el tiempo de la reacción disminuye la concentración necesaria para disminuir al 50% la absorbancia del radical $ABTS^{•+}$.

Cuadro N° 17. Capacidad antioxidante de los extractos de muestras de cacao expresada en términos de TEAC.

Finca	Muestra	T1	T4	T6
Finca Cáceres	CCAЕ1	31.07	119.78	144.78
	CCAЕ2	22.30	94.52	158.68
	CCAЕ3	40.84	112.61	179.64

Cuadro N° 17. Continuación.

Finca La Sierra	FVAE1	4.86	44.84	131.52
	FVAE2	44.86	112.12	122.69
	FVAE3	35.72	93.43	130.37
	FAVAE1	39.09	98.03	104.96
	FAVAE2	36.88	118.33	114.82
	FAVAE3	41.05	126.90	128.37
	FAAE1	43.81	105.89	131.91
	FAAE2	47.04	125.08	122.58
	FAAE3	4.25	80.84	108.08
	CMAE1	28.07	133.58	202.13
	CMAE2	26.56	128.64	197.43
	CMAE3	32.65	138.07	188.17
Finca Concepción	TRAE1	3.25	12.92	23.24
	TRAE2	0.63	13.64	66.22
	TRAE3	33.42	113.04	126.21
	TAAE1	3.72	18.61	107.51
	TAAE2	3.40	59.78	131.41
	TAAE3	1.56	25.33	66.94
	TVAE1	2.90	85.33	96.77
	TVAE2	3.88	62.28	134.36
	TVAE3	0.96	14.62	65.35

Valores más bajos
 Valores más altos

Para facilitar la interpretación de la información generada en esta determinación, entenderemos TEAC como la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (estándar) de un extracto, que representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto y que se expresa como $\mu\text{moles de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao}$. Como se observa en el cuadro N° 17 y en la Figura N° 20 la capacidad antioxidante varía respecto al

genotipo y tiempo de reacción, dado que la decoloración como porcentaje de inhibición del radical ABTS está determinado en función de la concentración y el tiempo; la reacción con el radical ABTS no se completa hasta pasado el minuto uno, por ello se hizo la lectura al minuto 1 al minuto 4 y 6. Y como se observa en la Figura a continuación a medida que avanza el tiempo de reacción aumentan la capacidad antioxidante de la muestra dando resultados en términos de μmoles de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao.

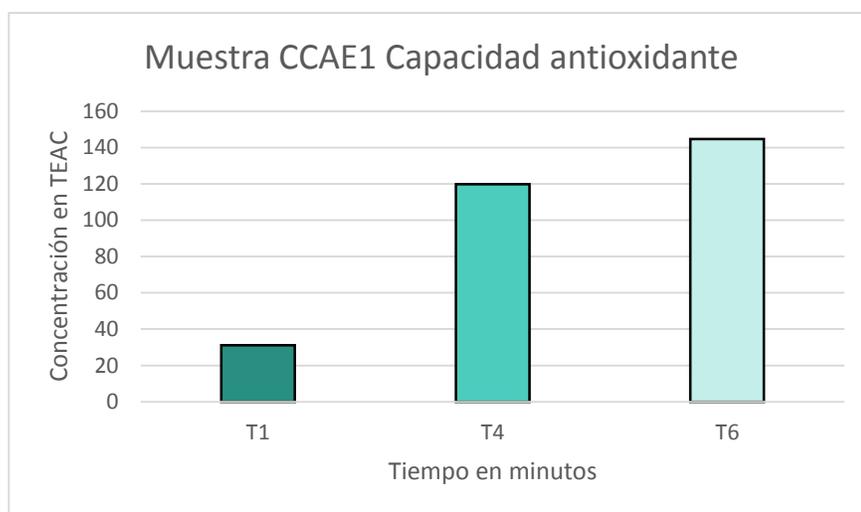


Figura N° 20. Comportamiento de las muestras respecto al tiempo de reacción.

Los resultados evidencian que la muestra con mayor capacidad antioxidante en el minuto uno es el FAAE2 de finca La Sierra ($47.04 \mu\text{moles}$ de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao) y con menor capacidad antioxidante es el TRAE2 de finca Concepción ($0.63 \mu\text{moles}$ de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao); en el minuto cuatro la muestra con mayor capacidad antioxidante es el CMAE3 de finca La Sierra ($138.07 \mu\text{moles}$ de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao) y con menor capacidad antioxidantes es el TRAE1 de finca Concepción ($12.92 \mu\text{moles}$ de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao); en el minuto seis la muestra con mayor capacidad antioxidante es el CMAE1 de finca La Sierra ($202.13 \mu\text{moles}$ de equivalentes trolox/g de

semilla cruda de cacao) y con menor capacidad antioxidante es el TRAE1 de finca Concepción (23.24 μ moles de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao); este comportamiento confirma que en la medida que el tiempo de reacción es mayor la capacidad antioxidante también es mayor.

En cuanto al genotipo, se evidencia que el CMAE1 de finca la Sierra (202.13 μ moles de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao) es el que posee mayor capacidad antioxidante y el genotipo TRAE1 de finca concepción (23.24 μ moles de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao) menor capacidad antioxidante.

El comportamiento de la capacidad antioxidante en los diferentes genotipos y diferentes tiempos de reacción evaluados en la presente investigación, confirman lo expresado en la bibliografía, quienes manifiestan que las frutas que poseen valores de actividad antioxidante expresada en Equivalentes Trolox (TEAC) superiores a uno, son buena fuente de antioxidantes y estas plantas han sido frecuentemente recomendadas para estudios epidemiológicos, bioquímicos y nutricionales ^[40] ^[48]. Los diferentes genotipos de cacao evaluados en esta investigación son una buena fuente de antioxidantes, no obstante, el genotipo Criollo moderno mostró mayor actividad antioxidante.

5.6. Relación del contenido de polifenoles totales influenciado por el genotipo de cacao.

Se sabe que el contenido de polifenoles en cacao corresponde alrededor del 12-18% del peso seco del grano entero de cacao (*Theobroma cacao* enfoque nutricional) los cuales están asociados con el sabor, el color y la actividad antioxidante de sus derivados. ^[25]

Los polifenoles de las semillas de cacao se encuentran distribuidos en los cotiledones, durante el proceso de fermentación se manifiesta una disminución del contenido de polifenoles, debido a que son participes de las modificaciones bioquímicas que sufre la semilla en este proceso conllevando a una disminución del amargor y la astringencia; y de esa manera mejorando la calidad sensorial, pero en las semillas violetas este fenómeno es incompleto por lo que el contenido de polifenoles es mayor, como se observa en el Cuadro N° 14, donde el contenido en las semillas del cacao tipo Forastero y criollo moderno es mayor que los otros dos genotipos, respaldando así la teoría ya que como se muestra en la Figura N°21, las semillas del cacao tipo Forastero son las más violetas. Por lo que el contenido de polifenoles está estrechamente relacionado al genotipo de cacao y a otros factores como las condiciones agronómicas del cultivo, grado de madurez las zonas de producción, coherente a lo expresado por ES-CACAO para condiciones de El Salvador [51].



Figura N° 21. Semillas de cacao tipo criollo (1), cacao trinitario (2), cacao criollo moderno (3) y cacao forastero (4).

El genotipo de cacao influye en gran medida ya que es notoria la diferencia de genotipo a genotipo y el que da valores más altos son el genotipo criollo, el forastero y el criollo moderno.

De igual manera influye el grado de madurez del fruto cómo se evidencia en la figura N°22 , y almacenamiento debido a que unos frutos fueron guardados en la refrigeradora para evitar la maduración excesiva de estos, aun así, la presentación física del fruto y la semilla cambio como se observa en la figura N°23.



Figura N° 22. Frutos de Finca La Sierra en diferentes etapas de maduración según genotipo.



Figura N° 23. Fruto almacenado en refrigeradora.

El estudio permitió determinar (ver cuadro N° 14) que el genotipo de cacao con mayor contenido de polifenoles fue el cacao proveniente de Finca la Sierra que está ubicada en San Julián con 20.74% y 21.32% que corresponde al cacao tipo forastero y al denominado criollo moderno respectivamente. Además, se logró apreciar que la actividad antioxidante también fue mayor en el cacao proveniente de Finca La Sierra, con 202.13 μ moles de equivalentes trolox/g de semilla cruda de cacao, por lo que puede afirmarse que la cantidad de polifenoles y la capacidad antioxidante mantienen una relación directamente proporcional y que dependen de el genotipo de cacao.

Algunos investigadores manifiestan que las frutas que poseen valores de actividad antioxidante expresada en Equivalentes Trolox (TEAC) superiores a uno, son buena fuente de antioxidantes ^[40] ^[48], por lo que se confirma mediante la presente investigación que el cacao cultivado en las fincas estudiadas (Finca La Sierra, Concepción y Cáceres) es de excelente capacidad antioxidante por lo que podría ser utilizado para la elaboración de un alimento funcional por sus altos porcentajes de polifenoles, dado que alimento funcional según el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida International (Life Sciences Institute, ILSI) en Europa, posee un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, y mejora el estado de salud y del bienestar o bien reduce el riesgo de enfermedad.

Las determinaciones de esta investigación, se realizaron en semilla cruda, situación que favoreció que los niveles obtenidos de polifenoles fueran altos y por consiguiente también la capacidad antioxidante.

En el cuadro N° 18 se presenta el resumen de los resultados obtenidos en la investigación realizada, en el cual puede visualizarse de mejor manera el comportamiento de los datos para cada determinación por finca y genotipo.

Cuadro N° 18. Resumen de las diferentes determinaciones llevadas a cabo en semillas crudas en 8 accesiones de cacao de diferente genotipo.

Finca	Muestra	% de Humedad	% de materia seca	% de grasa cruda	% de proteínas	% de polifenoles totales	Cap. Antiox.(T1)	Cap. Antiox.(T4)	Cap. Antiox.(T6)
Finca Cáceres	CCAE1	5	95	48.53	21.15	14.76	31.07	119.78	144.78
	CCAE2	5.1	94.9	48.47	20.98	14.86	22.3	94.52	158.68
	CCAE3	5	95	48.53	21.17	14.96	40.84	112.61	179.64
Finca La Sierra	FVAE1	4.9	95.1	57.51	20.53	12.36	4.86	44.84	131.52
	FVAE2	4.55	95.45	61.65	25.68	16.27	44.86	112.12	122.69
	FVAE3	4.95	95.05	57.06	20.33	15.95	35.72	93.43	130.37
	FAVAE1	4.4	95.6	59.59	21.77	16.07	39.09	98.03	104.96
	FAVAE2	4.55	95.45	59.92	20.98	15.54	36.88	118.33	114.82
	FAVAE3	4.7	95.3	58.22	21.46	16.11	41.05	126.9	128.37
	FAAE1	5.7	94.3	58.14	21.57	20.74	43.81	105.89	131.91
	FAAE2	6.15	93.85	55.06	19.63	16.49	47.04	125.08	122.58
	FAAE3	5.95	94.05	56.69	21.36	14.81	4.25	80.84	108.08
	CMAE1	5.5	94.5	55.98	22.85	14.07	28.07	133.58	202.13
	CMAE2	5.75	94.25	58.92	21.5	16.2	26.56	128.64	197.43
	CMAE3	5.3	94.7	62.31	22.94	21.32	32.65	138.07	188.17
Finca Concepción	TRAE1	4.48	95.52	57.75	25.83	14.57	3.25	12.92	23.24
	TRAE2	4.39	95.61	61.87	24.54	8.63	0.63	13.64	66.22
	TRAE3	5.6	94.4	55.92	23.8	15.75	33.42	113.04	126.21
	TAAE1	5.67	94.33	50.94	23.68	15.59	3.72	18.61	107.51
	TAAE2	4.98	95.02	56.29	22.92	11.47	3.4	59.78	131.41
	TAAE3	5.59	94.41	58.98	22.76	10.42	1.56	25.33	66.94
	TVAE1	5.69	94.31	58	23.28	11.4	2.9	85.33	96.77
	TVAE2	5.97	94.03	56.86	24.17	13.28	3.88	62.28	134.36
	TVAE3	4.69	95.31	58.39	24.62	11.85	0.96	14.62	65.35

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. El cacao cultivado en las tres fincas estudiadas: Cáceres, la Sierra y Concepción, poseen un bajo contenido de humedad que le provee la ventaja a la limitación de crecimiento microbiano por lo que facilita la exportación del mismo, siempre y cuando estos contenidos se mantengan durante toda su manipulación.
2. El cacao cultivado en las fincas estudiadas posee un contenido alto de grasa y proteínas, lo que le provee una calidad competitiva y valor agregado, que mejora el rendimiento para la producción de manteca de cacao y mejora la producción de chocolate y sus derivados.
3. El contenido de polifenoles del cacao cultivado en las fincas estudiadas fue alto, sobre todo en los genotipos criollo moderno y forastero (21.32 % y 20.74% respectivamente), lo que reafirma la excelente capacidad antioxidante, que previene diversas enfermedades asociadas a los radicales libres.
4. La capacidad antioxidante de las semillas de cacao es directamente proporcional a la cantidad de polifenoles contenidos en ella, y varía respecto al genotipo de cacao, ubicación geográfica y grado de madurez.
5. El comportamiento de los resultados de las diferentes determinaciones llevadas a cabo en las semillas crudas de cacao es similar independientemente de genotipos de cacao; con excepción de la cantidad de polifenoles y actividad antioxidante donde sí se observa un comportamiento específico de acuerdo al genotipo.

6. El genotipo de cacao con mayor cantidad de polifenoles y mejor capacidad antioxidante fue el cacao tipo forastero y criollo moderno provenientes de Finca La Sierra; eso se constituye en una excelente oportunidad para utilizarlos en proyectos de siembras asociadas a la producción de cacao.

7. El cacao cultivado en las fincas Cáceres, la Sierra y Concepción es muy útil para la elaboración de un alimento funcional, por el porcentaje de polifenoles alto y una capacidad antioxidante muy buena.

8. Dados los resultados de la presente investigación se puede impulsar el aprovechamiento industrial del cacao cultivado en El Salvador.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Dar seguimiento desde el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) a los resultados de este estudio con otras investigaciones referente a las propiedades físico-químicas del cacao, para reafirmar sus bondades y difundir con más base científica la calidad del cacao cultivado en El Salvador.
2. Promover el consumo del cacao a nivel nacional e internacional, en tal sentido valdría la pena que se estudien más fincas y otros genotipos, midiendo otros factores que podrían afectar los niveles de los componentes medidos en esta investigación como el grado de madurez del fruto, almacenamiento y su procesamiento.
3. En futuras investigaciones, realizar todas las determinaciones con los frutos en un grado de madurez similar y el mismo almacenamiento, para evitar interferencias por algún posible cambio en las propiedades del material genético.
4. Realizar nuevos trabajos de investigación que permitan establecer los factores que condicionan el contenido de los diferentes compuestos químicos en estudio, utilizando el mismo material genético y haciendo comparaciones en diferentes zonas y condiciones climáticas y agronómicas del cultivo.
5. Establecer un banco de germoplasma en alianza con algún productor de las fincas estudiadas con dichos materiales genéticos para que se pueda contar con planes de fitomejoramiento combinando los mejores atributos entre los genotipos estudiados (criollo, criollo moderno, forastero y trinitario).

6. Que el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud impulse la elaboración de un alimento funcional a base del cacao cultivado en El Salvador ya que se ha demostrado que el cacao es una rica fuente de polifenoles, posee una capacidad antioxidante muy buena que se podría aprovechar en la prevención de enfermedades como cáncer, enfermedades degenerativas, diabetes entre otras.
7. Divulgar los resultados de este estudio a través del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud artículos, poster, ponencias, ferias educativas, congresos nacionales e internacionales referentes a temas de cultivos, ya que las ventajas competitivas que se han determinado en el cacao cultivado en El Salvador son de mucho valor y de muy buenas prerrogativas para quienes se dedican a este cultivo.
8. Firmar una carta de entendimiento entre el Centro de Investigación y Desarrollo en salud, la Facultad de Química y Farmacia y otras entidades como el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, la Mesa Nacional del Cacao para realizar estudios más específicos en cuanto al contenido óptimo de polifenoles que proveen la capacidad antioxidante que ejerce el efecto beneficioso a la salud del ser humano.

BIBLIOGRAFIA

1. Argueta, R., Alvarenga, C. (2017). Determinación del contenido de (-)-Epicatequina, Procianidina B1 y B2 en accesiones de *Theobroma cacao* L. (CACAO), antes y después del beneficiado, del cultivar San Jose del real de la cerrera, en Usulután, El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. El Salvador.
2. Afoakwa, E.; Quao, J.; Takrama, J. (2011). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. Published by Association of Food Scientists & Technologists. India.
3. Afoakwa, E.; Ofori, E.; Budu, A.; Mensah H. and Takrama. J. (2015) Roasting Effects on Phenolic Content and Free radical Scavenging Activities of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. Volume 15, N° 1 Published by African Scholarly Science Communications Trust. P. 9637.
4. Alas, C.; Morales, A. (2015). Estandarización del Proceso de Fermentación de la Mezcla de Semillas de Tres Accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) del Cultivar San José del Real de la Carrera Ubicada en el Departamento de Usulután. Licenciatura en Química y Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. El Salvador.
5. Alvarez, M.; Burgues, M.; Colosito, J.; Galetti, V. (2007) Determinación de la actividad antioxidante en mieles mediante el método de decoloración del B- caroteno. Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos. Santa Fe. Argentina.

6. Aldana, C.; Guayasamín L. (2014) Evaluación de la Actividad Antioxidante de los Extractos (Alcohólico y Acuoso) de las Hojas de *Ficus citrifolia* y Caracterización Química de los Polifenoles. Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
7. Association of Oficial Analytical Chemists (AOAC).(1990).The Official Methods of Analysis (OMA), 15th Edition.
8. Arnao, M. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.*, P.419-421.
9. Ashwell, M. (2002). Conceptos sobre los alimentos funcionales. International Life Sciences Institute. Europa. P. 1-6.
- 10.Asuero, A.; Fett, R.; Kuskoski, M.; Troncoso, A. (2004). *Actividad* antioxidante de pigmentos antociánicos. Departamento de Análisis Químico y Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. P. 2.
- 11.Asuero, A.; Fett, R.; Kuskoski, M.; Troncoso, A. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Campinas. P.728-730.
- 12.Batista, L. (2009). Guía Técnica El Cultivo de Cacao. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal. Santo Domingo, República Dominicana.

13. Benjamín, R.; Ibáñez, G.; Lujan, R.; Martínez, G.; Martines, L.; Salcedo, Y. (2016). Fermentación, efectos de la capacidad antioxidante de Cacao del Alto Sinú y Montes de María. *Agronomía Colombiana*.
14. Bolaños, A.; Morales, J.; Sanabria, G. (2013). Determinación de la presencia de alcaloides tipo piperina y derivados en tres especies del género *piper* nativas de Mesoamérica y evaluación de su actividad antioxidante *P. amalago*, *P. jacquemontianum* y *P. retalhuleuense*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos Guatemala.
15. Bonilla De Torres, B.; Carranza, F.; Flores, J. (2012) Manual de Laboratorio de Análisis Bromatológicos. Universidad de El Salvador, Departamento de Química Agrícola.
16. C.L.H.; Cloke M.; Law C.L.; S. S., Misnawi. (2009). Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.) *Asian Journal of Food and Agroindustry*.
17. Cala, T.; Herrera, Y. (2008). Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander. P.15-19.
18. Cano, A.; Dostert, N.; La Torre, M.; Roque, J.; Weigend, M. (2011) Hoja botánica: Cacao (*Theobroma cacao* L.) primera edición, Perú.
19. Castañeda, V.; Hernández, F.; Hernández, L.; Monjaras, G.; Rodríguez, A. (2016). Guía de conceptos básicos de genética en cacao, para su

aplicación en la caracterización de germoplasma de cacao nativo de El Salvador. Mesa nacional del cacao el salvador C.A. P. 3-71.

20. Chang, J.; Moran, D.; Torres, C. (2014). Atributos físicos-químicos sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao L.*) en el Ecuador. Universidad Técnica estatal de Quevedo. Ecuador.
21. Chocolate, biscuits and confectionery of Europe/ European cocoa association/ Federation of cocoa commerce. (CAOBISCO/ECA/FCC) (2015). Cocoa Beans: Chocolate and Cocoa Industry Quality Requirements. End, M.J. and Dand, R., Editors.
22. Contreras, N.; Santos, O. (2012) Determinación del Análisis Bromatológico proximal y fitoquímico preliminar de los extractos acuosos y etanólicos de inflorescencia de *Calathea allouia (Aubl.) Lindl. (Chufle)*, frutos de *Bromelia karatas (Piñuela)* y flor de *Cucurbita pepo L. (Flor de Ayote)*. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, El Salvador, San Salvador.
23. Chávez, R.; Ordoñez, E. (2013). Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH Y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao. Perú. P. 42-50.
24. Díaz, S.; Pinoargote, M. (2012). Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador. P.5-10.

25. Domingo, G.; Guerra, F.; Zlatko, K. (Julio 1998) *Theobroma cacao* L. Un nuevo enfoque para nutrición y salud. Caracas, Venezuela. Agroalimentaria N°6. P. 23.
26. Ecodesarrollo regional Amazónico (ECORAE). (2001). Compendio de recomendaciones tecnológicas para los principales cultivos de la amazonia ecuatoriana. Quito, Ecuador. Pág. 11- 13.
27. Federación nacional de cacaoteros (FEDECACAO). (2004). El beneficio y características fisicoquímicas del cacao (*Theobroma cacao*). Bogotá, Colombia: Talleres Promumedios.
28. Fernández, I.; Fuentes, A.; Garcia, E. (2015). Determinación de Polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Departamento de Tecnología de Alimentos. ETSIAMN. Universidad Politécnica de Valencia. P.4-7.
29. Figueira, A.; Lenci, C.; Martini, M.; Queiroz, T. (2008). *Localization of the cotyledon reserves of Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. Rev Brasil Bot. P.147-154.
30. Folin, C.; Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol Chem.* P. 627-650.
31. Fowler, M. (2009). Cocoa beans: from tree to factory. Chapter 2. Industrial chocolate manufacture and use: fourth edition. Blackwell Publishing.

32. García, L. (2007). Guía de campo: identificación de cultivares de cacao. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva.
33. Gil Quintero, J. A. (2012), Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de reindustrialización. Master en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Colombia.
34. Gonzales, B.; Roble, A. (2014). Aislamiento y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* (*Monilia*) en frutos de *Theobroma cacao* L. (cacao) del Cultivar San José del Real de La Carrera, Usulután. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. El Salvador. P.26-32.
35. Haritha, K.; Kalyani, L.; Rao, L. (Julio-Agosto 2015). Beneficios saludables del chocolate amargo. Industria Alimentaria., Volumen 37, N°4, P. 17-18.
36. Holler, F.; Nieman, T.; Skoog, D. (2001). Principios de Análisis Instrumental (5° Ed). España: McGraw-Hill. Páginas: 219, 220, 322, 323, 324.
37. Horwitz, W. Editor. (2005) Official methods of Analysis of AOAC International. 18th edition. Maryland, USA: AOAC International. 0020.
38. International Cocoa Organisation (ICCO). (2008). International Cocoa Organization. Report of Cocoa Statistics. The Manufacturing Confectioner, 88(3), 39-40. Consultado en:
<http://www.gomc.com/firstpage/200803039.pdf>

39. Jovellanos, E. (2016). Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en polifenoles para el diseño de un chocolate enriquecido. Universidad de Murcia. Departamento de Tecnología de alimentos, nutrición y bromatología.
40. Márquez C.; Osorio J.; Otero C.; Rojano. (2014). Actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* S.) en poscosecha. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
41. Marroquín, M. (Julio 2011). Comparación de la actividad antioxidante, detección y cuantificación de flavonoides y compuestos fenólicos en tres especies de la familia Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora ligularis*). Universidad de San Carlos Guatemala.
42. Montesinos, E. (septiembre 2012) Caracterización de la cadena agroproductiva de cacao en El Salvador. CENTA. P. 9.
43. Mercados Centroamericanos para la Biodiversidad (CAMBio). Manual de oportunidades: Cacao amigable con la biodiversidad en América Central, Fascículo VII: Oferta de cacao amigable con la biodiversidad en Honduras y El Salvador.
44. Morazán, 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. Licenciatura en Química y Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. El Salvador.

45. Nielsen, SS. (2010). Food Analysis Laboratory Manual. (2nd ed). Springer New York Dordrecht Heidelberg London.
46. Nisao, O. (2007). El cacao. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). *Biodiversitas* 72: P. 2
47. Norma Mexicana (NMX-F-129-S-1979). Cacao en grano lavado, secado y no fermentado. normas mexicanas. Dirección general de normas.
48. Pannala A.; Pellegrini N.; Proteggente A.; Rice-Evans C.; Min Y.; Re R. (October 1998). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. International Antioxidant Research Centre, London. P. 1231-1237.*
49. Programa de Apoyo a Exportaciones de Cacao en los Países Anfinos, ACCESO. (2006). Protocolo estandarizado de oferta tecnológica para el cultivo del cacao en el Perú, Lima, Perú. Consultada en: <https://books.google.com/CLASIFICACION+DE+THEOBROMA+CACAge&q=CLASIFICACION%20DE%20THEOBROMA%20CACAO&f=false>
50. Rojano A.; Tamayo A.; Zapata S. (2015). Efecto del tostado sobre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de clones de cacao colombiano. Facultad Nacional de Agronomía Medellín. P. 7497-7507.
51. Sociedad cooperativa de productores de cacao de El Salvador de R.L. y C.V. (ES-CACAO) (2011). Granos de Cacao Fino y de Aroma en El Salvador Presentación del día nacional de cacao El Salvador. Consultado en: https://www.escacao.com/Presentation_National_Cacao_Day_El_Salvador_2.html

52. Torres Moreno, M. (2012). Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro (Tesis Doctoral). Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Universitat Rovira i Virgili. España. P. 9.
53. Vásquez, J. (2013). Evaluación de polifenoles, antocianinas, capacidad antioxidante y sensorial en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Perú.

GLOSARIO

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, compuesto químico utilizado para el ensayo colorimétrico basado en la formación del radical catión ABTS^{•+} para la medición de la capacidad antioxidante de diversas muestras. [5][15][18]

Accesión: Muestra de una planta introducida y mantenida en un banco de germoplasma para su conservación o uso. [19]

Árbol elite: Árbol que ha mostrado poseer un genotipo superior en las correspondientes pruebas de descendencia. [19]

Autóctono: En la biología se usa el término autóctono para designar a aquellos seres vivos que son propios del ecosistema en el que se hallan, en contraposición con los alóctonos. Estos seres autóctonos se suponen evolutivamente adaptados al ecosistema, y por lo tanto canalizan mejor los flujos de materia y energía del mismo que otros seres introducidos que tenderán a causar desequilibrios. [19]

Cultivar: término aceptado internacionalmente para designar una variedad de plantas cultivadas. Debe poderse distinguirse de otras variedades de su especie por determinadas características y retener sus caracteres distintivos cuando se reproduce bajo condiciones específicas. [19][35]

DPPH: Abreviación común del compuesto químico 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl que se utiliza también para ensayos colorimétricos para medición de la capacidad antioxidantes de diversas muestras. [5][15][18]

FRAP: Capacidad antioxidante de reducción del ion férrico que es uno de los ensayos donde se utiliza el mecanismo SET que a su vez son ensayos basados en reacciones de transferencia de un solo electrón que posee el potencial para reducir algún compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. ^[5] ^[15]

Genotipo: Composición alélica específica de una célula o individuo, bien para todos sus genes o, más comúnmente, para uno o pocos genes. ^[19]

ANEXOS

ANEXO N°1

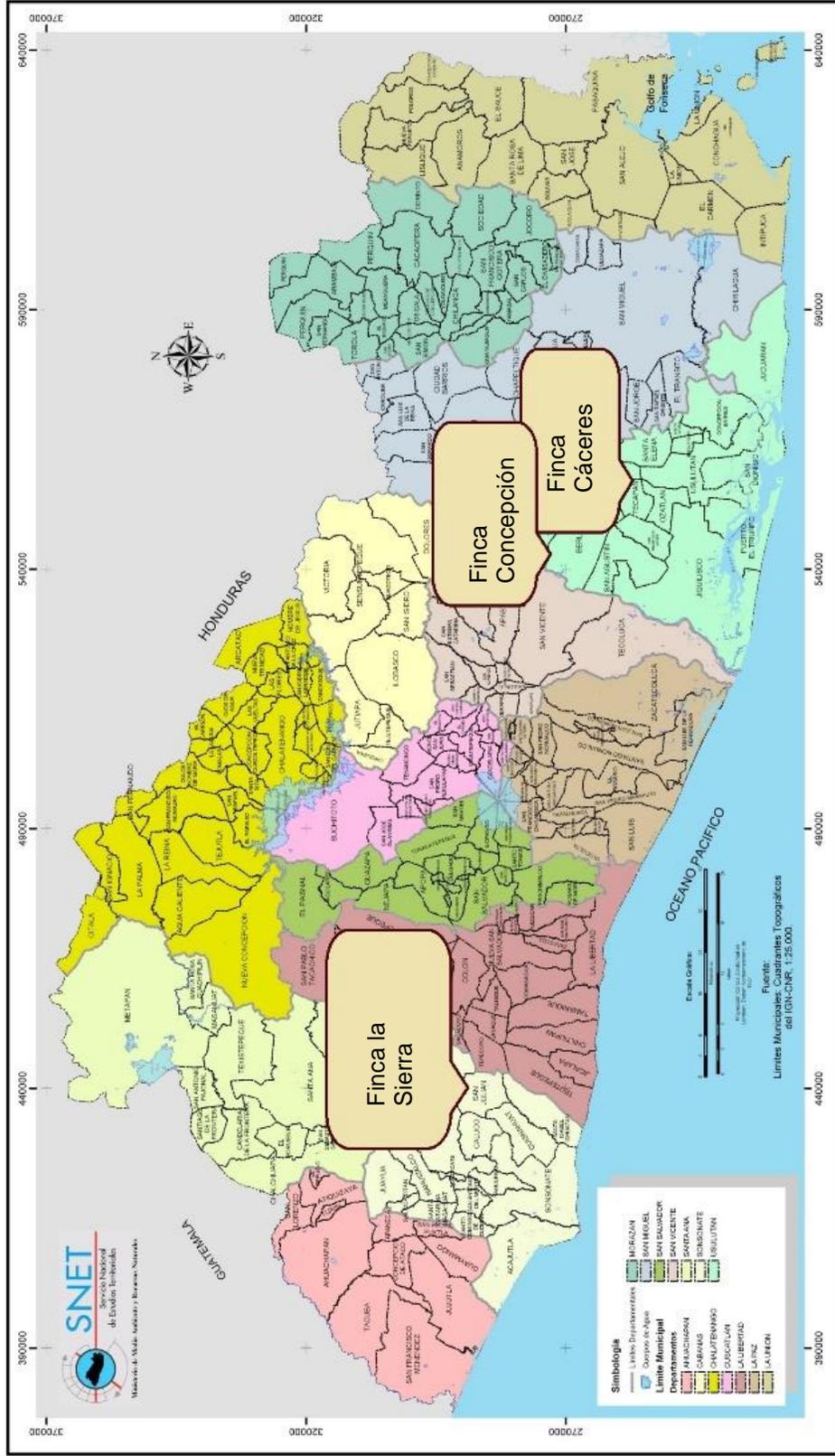


Figura N° 24. Mapa de ubicación de las fincas en las que se realizó la investigación

ANEXO N° 2
PARAMETROS PARA SEMILLAS DE CACAO

Cuadro N° 19. Parámetros y especificaciones de cacao no fermentado.

Parámetro	Bajo	Normal	Alto	Teórico	Referencia
Contenido de humedad	6 a 6.5%	7 a 8%	>8%	7.5% Máx.	CAOBISCO [10] Y NORMA MEXICANA [25]
Contenido de grasa cruda	<52%	52 a 55%	>55%	---	FEDECACAO [13]
Contenido de proteína	----	----	----	12 a 18%	AFOAKWA [1] FIGUEIRA [15]
Contenido de polifenoles	----	----	----	7.4-8.5% 12-18%	DOMINGO [12] MARTINI [15]

Nota: El signo “---“indica valores no reportados.

Los valores teóricos se han obtenido de investigaciones anteriores.

ANEXO N° 3
CODIFICACIÓN DE MUESTRAS

CÓDIGO DE MUESTRA	NOMBRE DE LA MUESTRA
CCAE1	Control criollo árbol elite 1
CCAE2	Control criollo árbol elite 2
CCAE3	Control criollo árbol elite 3
FVAE1	Forastero verde árbol elite 1
FVAE2	Forastero verde árbol elite 2
FVAE3	Forastero verde árbol elite 3
FAVAE1	Forastero amarillo anillo verde árbol elite 1
FAVAE2	Forastero amarillo anillo verde árbol elite 2
FAVAE3	Forastero amarillo anillo verde árbol elite 3
FAAE1	Forastero amarillo árbol elite 1
FAAE2	Forastero amarillo árbol elite 2
FAAE3	Forastero amarillo árbol elite 3
CMAE1	Criollo moderno árbol elite 1
CMAE2	Criollo moderno árbol elite 2
CMAE3	Criollo moderno árbol elite 3
TRAE1	Trinitario rojo árbol elite 1
TRAE2	Trinitario rojo árbol elite 2
TRAE3	Trinitario rojo árbol elite 3
TAAE1	Trinitario amarillo árbol elite 1
TAAE2	Trinitario amarillo árbol elite 2
TAAE3	Trinitario amarillo árbol elite 3
TVAE1	Trinitario verde árbol elite 1
TVAE2	Trinitario verde árbol elite 2
TVAE3	Trinitario verde árbol elite 3

ANEXO N° 4
ESQUEMAS DE PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS

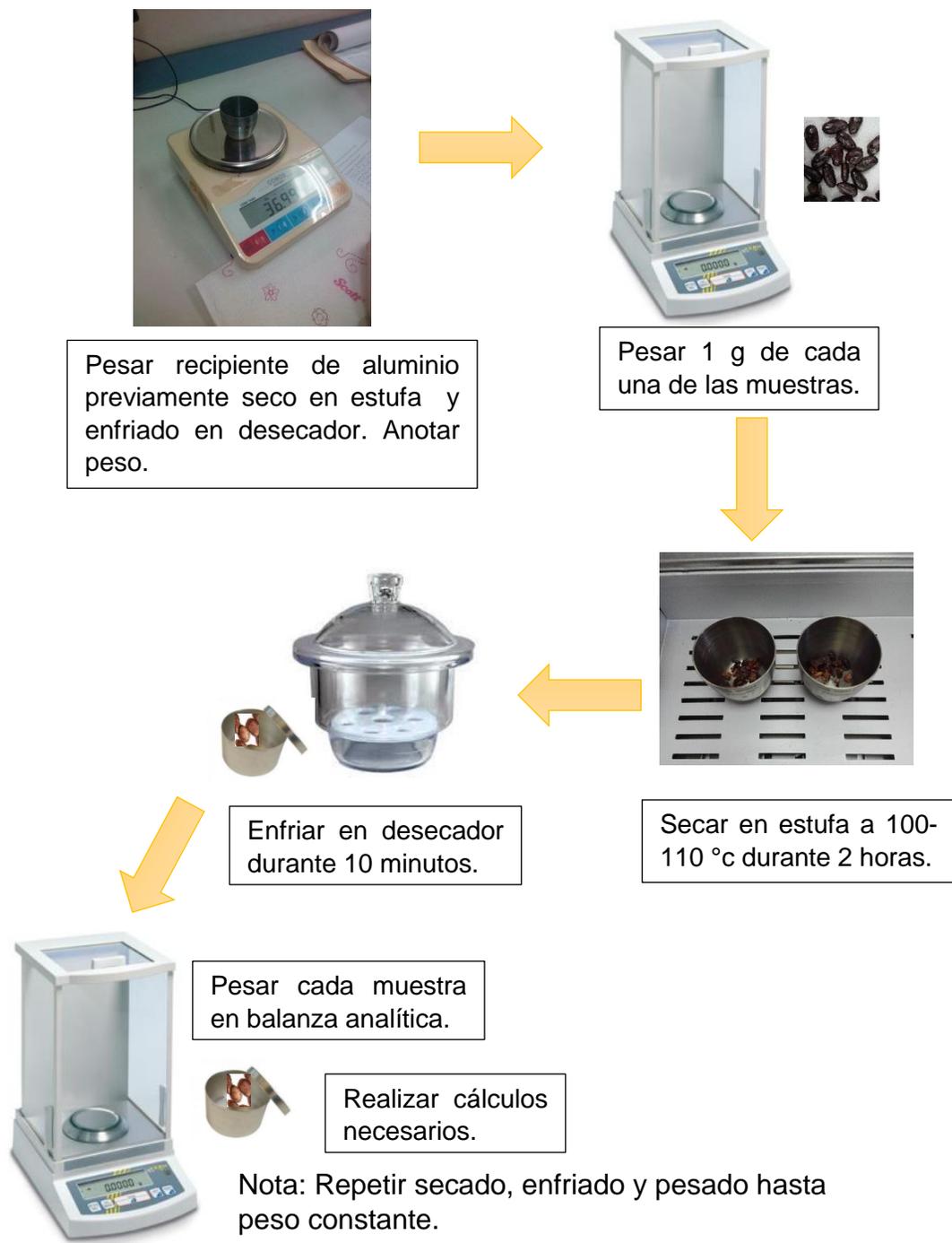


Figura N° 25. Esquema de determinación del contenido de humedad. [7, 15, 37, 45]



Triturar muestra y pasar por tamiz de malla de 1 mm.

Pesar de 2-5 g de muestra en dedal de extracción.



Enfriar matraz en desecador y pesarlo. Registrar peso como m1.



Secar matraz de extracción durante 30 minutos a 103 ± 2 °C

Figura N° 26. Esquema de determinación del contenido de grasa. [15, 36, 37, 45]



Extraer la muestra con el solvente de 6 a 8 horas. (3-6 gotas/seg.)

Armado el equipo y adicionar el solvente en el matraz.



Eliminar solvente por Baño Rotaveaporador.



Enfriar matraz con grasa en desecador y pesarlo. Registrar peso como m2.

Realizar cálculos necesarios.



Secar matraz de extracción durante 10 minutos a 103 ± 2 °C

Figura N° 26. Continuación.



Pesar 0.1 g de muestra homogenizada.



Adicionar:
-2.5 g de Sulfato de Potasio.
-0.15g de Sulfato cúprico.
-12 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Accionar la trampa de succión de gases que contiene NaOH 15%.



Calentar hasta destrucción de materia orgánica y dejar enfriar.



Precalentar el equipo a 360 °C. Colocar los tubos en el portatubos y luego en el bloque de calentamiento.

Figura N° 27. Esquema de determinación de Proteína cruda. [7, 37, 44, 45]

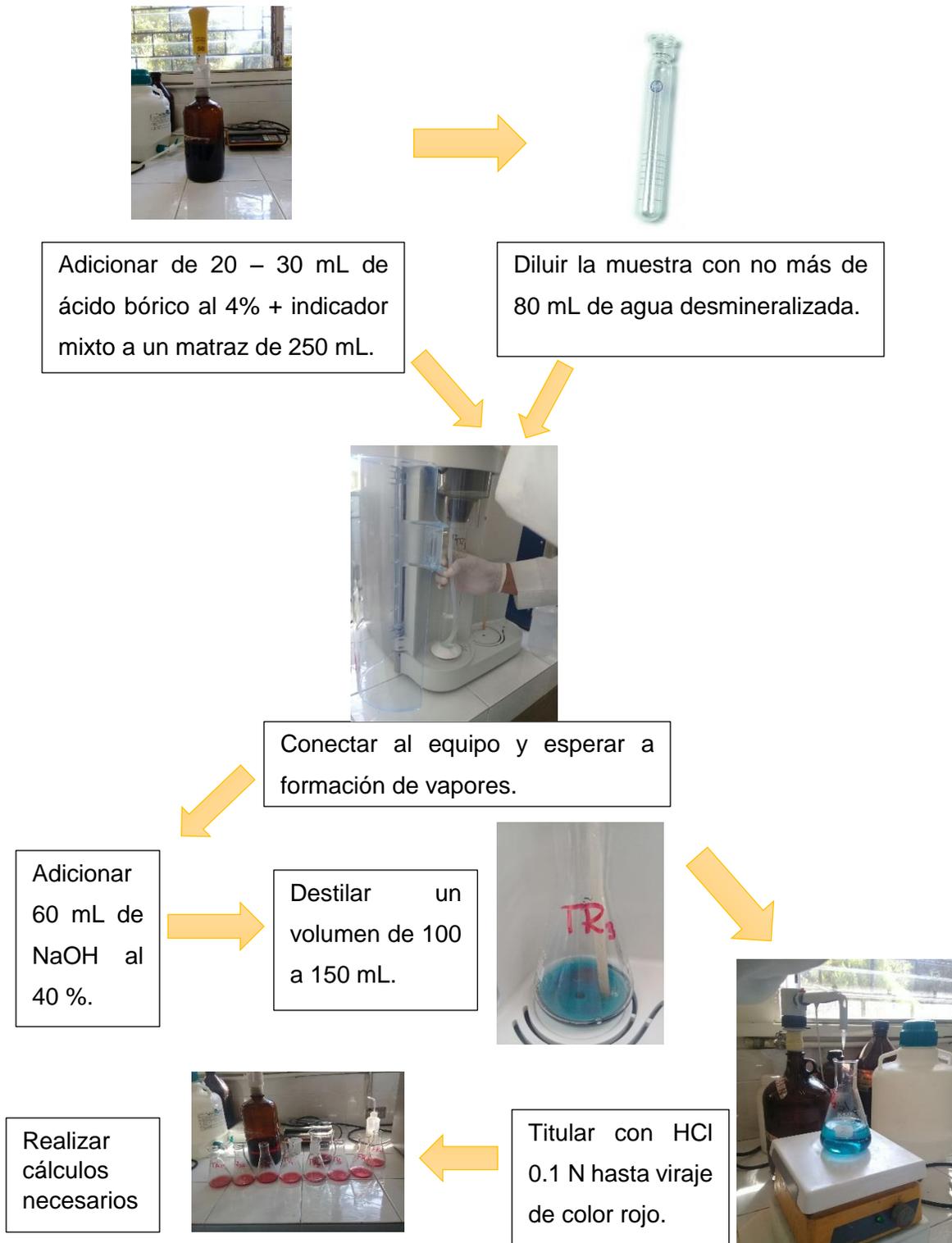


Figura N° 27. Continuación.

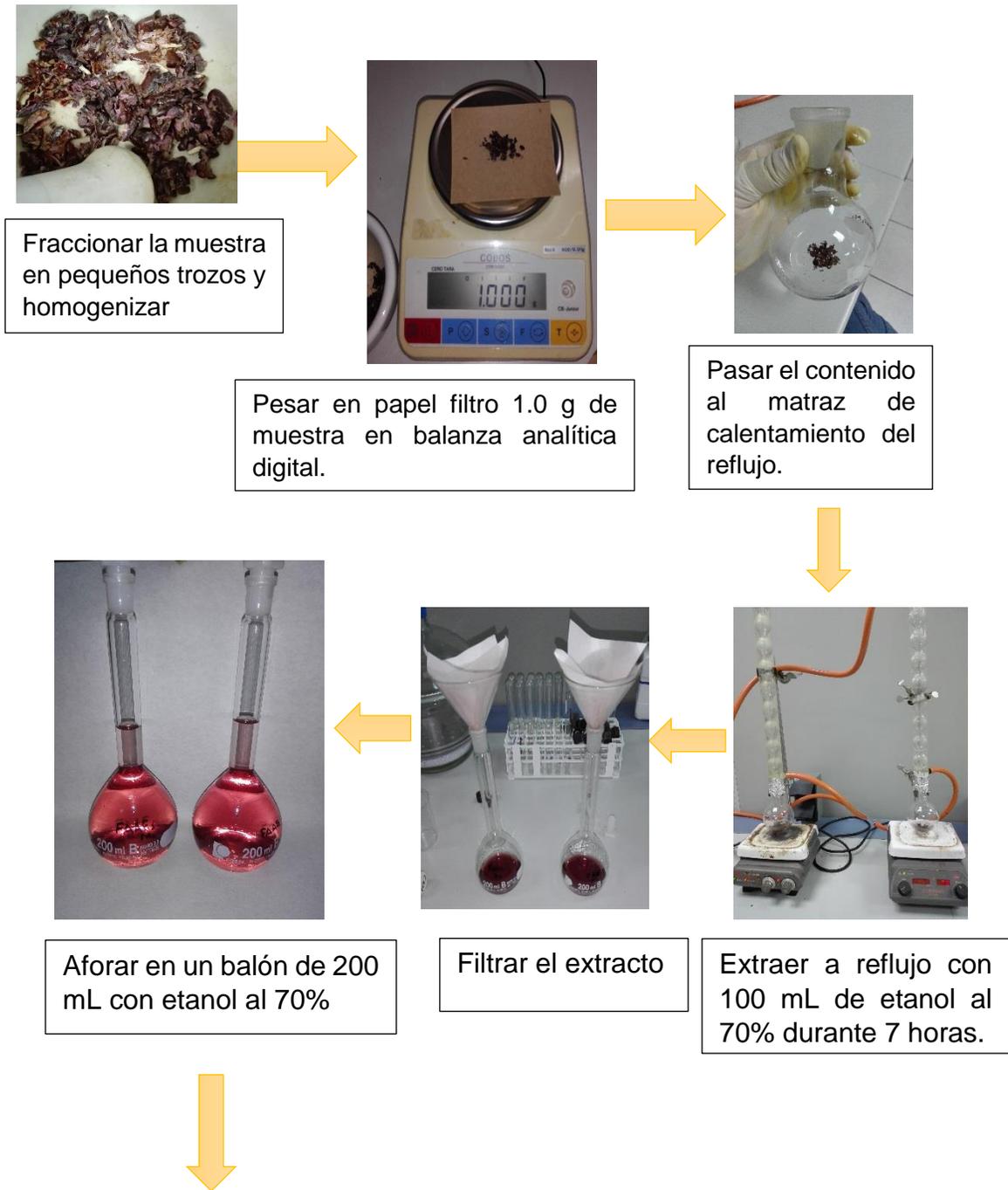


Figura N° 28. Esquema de determinación de Polifenoles Totales, método Folin-Ciocalteu. [16, 17, 28, 30, 44]

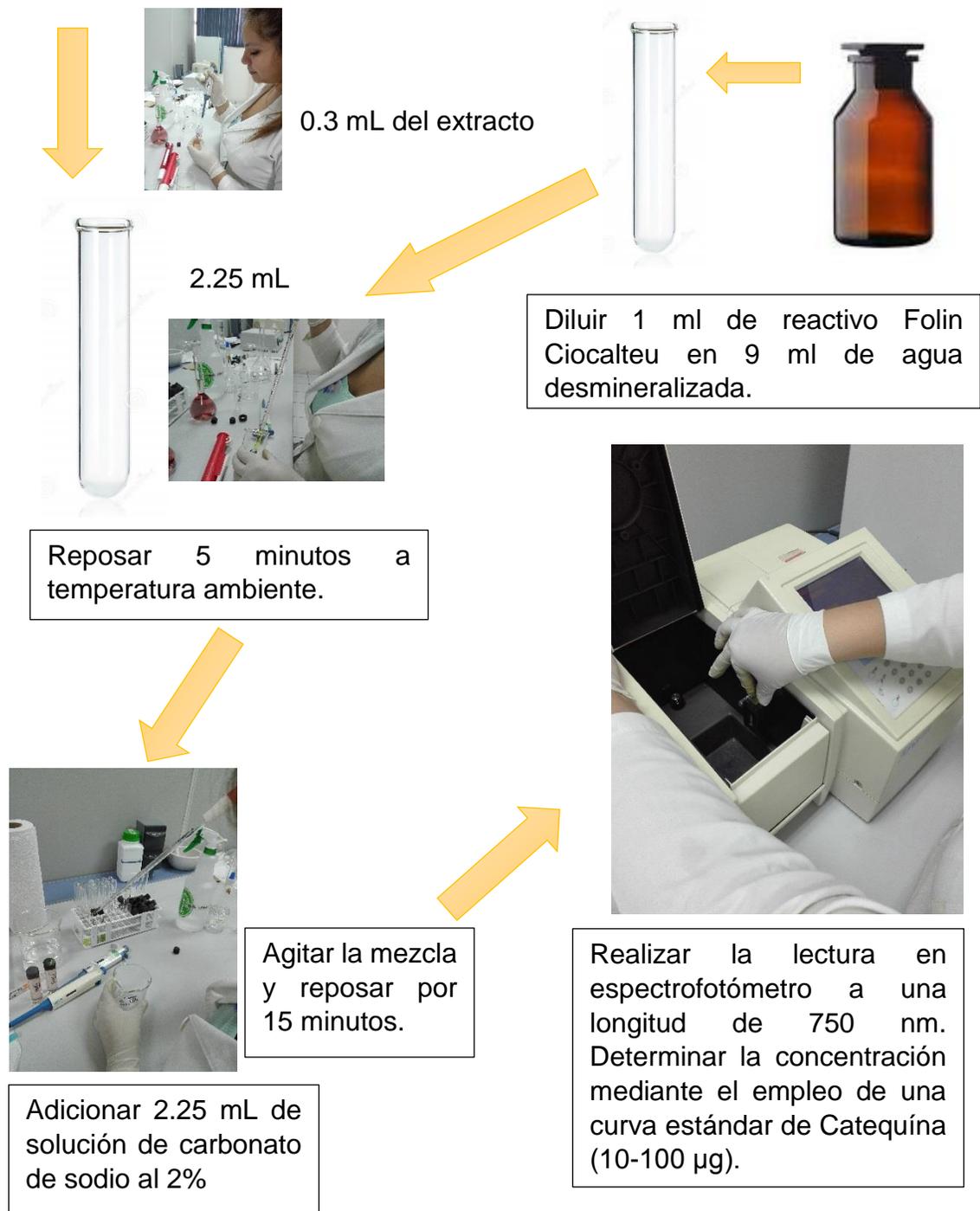


Figura N° 28. Continuación.



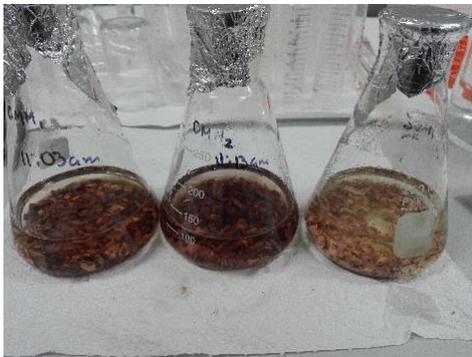
Limpiar el grano de cacao manualmente.

Colocar el grano entero y crudo en un mortero y triturar con pistilo.



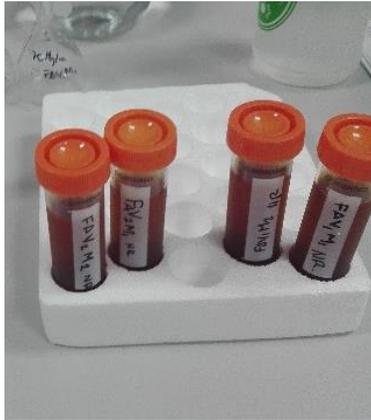
Pesar en balanza analítica en un beaker de 50 ml 10 g de muestra.

Colocar los 10 g de muestra en Erlenmeyer de 250 ml y medir 100 ml de solvente para agregar al Erlenmeyer.



Agitar, tapar y rotular. Posterior dejar reposar por 24 horas.

Figura N° 28. Esquema de determinación de la capacidad antioxidante, método ABTS^{•+}. [10, 11, 14, 23, 40, 41, 48, 50]



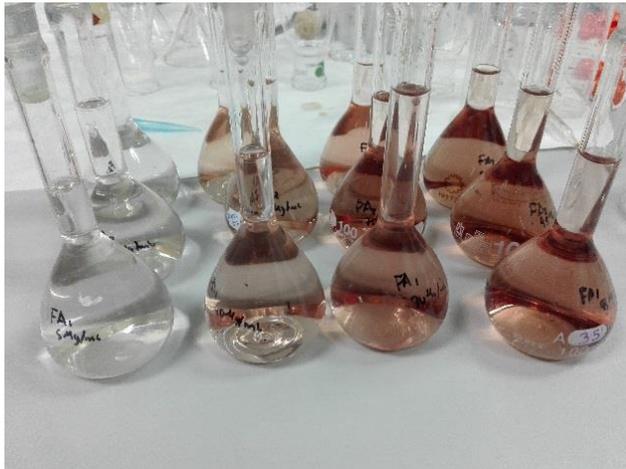
Pasar extracto a tubos de centrifuga.



Centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm.



Filtrar y rotular como solución madre.

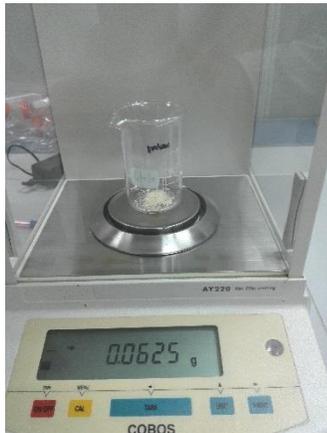


Preparar las diluciones: 5, 40, 70, 95 $\mu\text{g/ml}$.

Figura N° 28. Continuación.

Preparación de estándar

Trolox 2.5 mM, se prepara en etanol, emplear diluciones de 0-15 μ M.



Solución de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS⁺) 7 mM en agua



Pesar 109.05 mg y diluir con agua hasta 50 mL.



Figura N° 28. Continuación.

Solución de persulfato de potasio 2.45 mM en agua

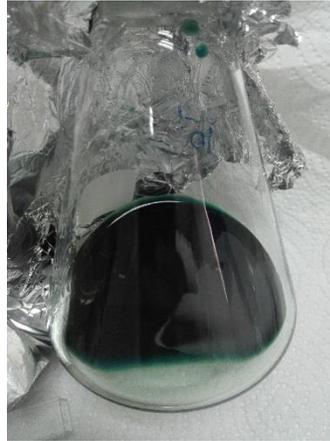


Pesar 33.1 mg y diluir con agua hasta 50 mL.



Formación del catión (ABTS⁺)

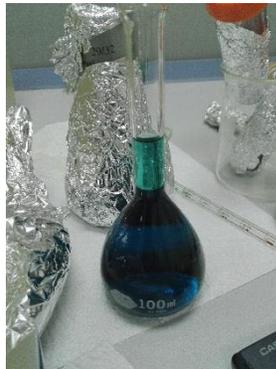
Reacción de la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.45 mM, proporción (2:1).



Dejar la mezcla en un lugar oscuro por al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso.

Preparación de la solución de uso.

Diluir la solución ABTS⁺ con etanol al 95% hasta lograr una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm.



Equilibrar temperatura a 30°C. Emplear una dilución 6/100 para obtener dicha absorbancia.

Figura N° 28. Continuación.

Preparación de los tubos de reacción



Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10 ml y recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz.

Preparar una serie de tubos. Ver en Cuadro N° 3. Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se prepara por duplicado.

Leer absorbancia a 30°C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis.

El blanco de la corrida es etanol al 95%. Tanto la solución de ABTS+ como la muestra deben haber estado en la incubadora a 37°C mínimo 30 minutos antes de mezclarlo.



Realizar cálculos necesarios.



Figura N° 28. Continuación.

ANEXO N° 5
PREPARACION DE REACTIVOS

PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA

- Solución de hidróxido de sodio al 15 %.

Disolver 150 g de NaOH en agua desmineralizada recientemente hervida y llevar a volumen de 1 litro.

- Solución de ácido sulfúrico 0.1 N.

Diluir 2.7 mL de H₂SO₄ concentrado en agua desmineralizada y llevar a volumen de 1 litro, luego estandarizar con Na₂CO₃ anhidro p.a.

- Solución de hidróxido de sodio al 40 %.

Disolver 400 g de NaOH y llevar a volumen de 1 litro de agua libre de CO₂.

- Solución indicadora de rojo de metilo al 0.1 % en etanol.

Disolver 0.1 g de rojo de metilo en 100 mL de etanol (95 %).

- Solución indicadora de azul de metileno al 0.1%.

Disolver 0.1 g de azul de metileno en 100 mL de etanol (95%).

- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

Disolver 4 g de NaOH en agua desmineralizada de recientemente hervida y enfriada y llevar a volumen de 1 litro. Valorar con ácido succínico concentrado.

- Ácido bórico al 4 % más indicador mixto.

Disolver 160 g de ácido bórico en agua desmineralizada y llevar a volumen de 4 litros. Disolver 0.1 g de indicador verde bromocresol en 100 mL de agua desmineralizada, luego disolver 0.73 g de indicador rojo de metilo; de este último tomar 70 mL y mezclar con los 100 mL de solución de verde bromocresol, luego diluir en agua desmineralizada a volumen de 1 litro. Finalmente adicionar el litro de solución de indicador mixto a la solución de ácido bórico al 4%.

- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N.

Diluir 8.3 mL de HCl concentrado en agua desmineralizada y llevar a volumen de 1 litro. Valorar con Na₂CO₃ anhidro.

PARA DETERMINACION DE CONTENIDO 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 hervir por siete horas, una vez frío agregar 30 g de Sulfato de Litio y algunas gotas de Bromo, para luego ebulir nuevamente por 15 minutos. Posteriormente y una vez frío aforar 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.

Preparar una serie de tubos como se muestra en el cuadro N°13.

Cuadro N° 13. Serie de tubos para curva patrón de Catequina.

Tubo	Solución de Catequina (mL)	Agua desmineralizada (mL)
1	0.00	2.00
2	0.10	1.90
3	0.20	1.80
4	0.40	1.60
5	0.60	1.40
6	0.80	1.20
7	1.00	1.00

**PARA DETERMINACION DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE
POLIFENOLES PRESENTES EN SEMILLAS DE CACAO.**

Preparación de solución madre

Pesar 10 g de muestra, macerar por 24 horas con 100 ml de etanol:agua (50:50 v/v) centrifugar por 10 min a 1000 rpm, filtrar y rotular.

Preparación de estándar

Trolox 2.5 mM, se prepara en etanol, emplear diluciones de 0-15 µM.

Solución de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) 7 mM en agua

Pesar 109.05 mg y diluir con agua hasta 50 mL. (para 50 mL)

Solución de persulfato de potasio 2.45 mM en agua

Pesar 33.1 mg y diluir con agua hasta 50 mL. (para 50 mL)

Formación del catión (ABTS^{•+})

Se produce por la reacción de la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.45 mM, proporción (2:1).

Dejar la mezcla en un lugar oscuro por al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso. Preparar un día antes de realizar la prueba.

Preparación de la solución de uso.

- Diluir la solución ABTS⁺ con etanol al 95% hasta lograr una absorbancia de 0.70 ±0.02 a 734 nm.
- Equilibrar temperatura a 30°C.
- Emplear una dilución 6/100 para obtener dicha absorbancia.

ANEXO N° 6
LISTADO DE MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Material y Equipo

- Balanza Analítica
- Papel filtro
- Bandejas
- Estufa
- Mortero
- Pistilo
- Soxhlet

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE HUMEDAD

Material y equipo.

- Contenedor de aluminio
- 1 espátula
- 2 frascos de vidrio con tapadera
- 1 balanza analítica
- 1 estufa
- 1 desecador

DETERMINACIÓN DE GRASA CRUDA

Material y equipo.

- Sistema extractor Soxhlet
- Balanza analítica
- Papel filtro o dedal de celulosa
- Baño termostático
- Estufa de aire $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Tamiz de malla de 1 mm
- Manto calefactor o Rotavapor

Reactivos.

- Eter de petróleo P.E. 40-60°C

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA

Material y equipo.

- Balanza analítica
- Equipo Kjeldahl
- pHmetro

Reactivos.

- Ácido sulfúrico concentrado, p.a.
- Sulfato de potasio, p.a.
- Sulfato cúprico, p.a.
- Solución de hidróxido de sodio al 15 %
- Solución de ácido bórico al 4 % más indicador mixto.
- Solución de hidróxido de sodio al 40 %.
- Solución de ácido clorhídrico al 0.1 N.

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES

Materiales y equipo.

- Espectrofotómetro UV-Visible
- Balones volumétricos de 50 mL
- Tubos de ensayo
- Pipetas volumétricas
- Pipetas mohr
- Agitador
- Gradilla

Reactivos.

- Reactivo de Folin Ciocalteu
- Solución de etanol al 70%
- Solución de carbonato de sodio al 2%.
- Solución estándar de Catequina.

DETERMINACION DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES PRESENTES EN SEMILLAS DE CACAO.

Material y Equipo

- Balanza Analítica
- Micropipetas
- Pipetas volumétricas
- Tubos de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Probeta
- Beaker
- Agitador
- Frasco ámbar
- Termómetro
- Espectrofotómetro
- Erlenmeyer 250 ml
- Viales
- Tapón plástico
- Espátula
- Tubos para centrifuga
- Centrifugadora
- Embudos

Reactivos

- Etanol 95%
- Agua desmineralizada
- Etanol
- Persulfato de Potasio
- Reactivo ABTS
- Trolox