

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



EVALUACION DE LAS CARACTERISTICAS MICROULTRAESTRUCTURALES
PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA FERMENTACION DE OCHO
GENOTIPOS DIFERENTES DE SEMILLAS FERMENTADAS DE *Theobroma*
cacao L.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
ANA INGRID MORAZAN CHAVEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

JULIO, 2012

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS: QUIMICA AGRICOLA

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

MAE. María Elisa Vivar de Figueroa

DOCENTES DIRECTORAS

Dra. Vianney Castañeda de Abrego

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A mis docentes directores, Dra. Vianney Castañeda de Abrego y Msc. Amy Elieth Moran Rodríguez por su orientación, paciencia y esfuerzo necesarios para llevar a cabo esta tesis.

A la coordinadora general, Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo, y a las docentes asesores MAE. Maria Elisa Vivar de Figueroa y Msc. Ena Edith Herrera Salazar.

A la Hacienda San José de La Carrera, por la apertura y comprensión mostradas a todo el personal involucrado en esta tesis.

A Ing. Juan Manuel Pérez Gómez y Lic. Guillermo Bonilla de la Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola de la Universidad Dr. José Matías Delgado por su consejo y apoyo en la realización de esta tesis.

A CENSALUD, por brindarme el espacio, el tiempo y los instrumentos necesarios para el desarrollo de mi tesis.

A todo el personal de CENSALUD, por su valiosa colaboración en el desarrollo de mi tesis.

A la Facultad de Ciencias Agronómicas, por el apoyo técnico prestado en el Laboratorio de Análisis e Investigación del Departamento de Química Agrícola.

Ana Ingrid Morazán Chávez

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a:

Mis padres, María Argelia Chávez de Morazán y Claudio Antonio Gerardo Morazán por su apoyo emocional y financiero que me brindaron durante el desarrollo de mi carrera universitaria y mi vida.

Mis hermanos, José Gerardo y Candy Jazmín por su cariño y paciencia que tuvieron conmigo durante este proceso.

Mis amigas, Claudia, Mirssa y Susana por su apoyo emocional, por los buenos tiempos que disfrutamos y por estar atentas de mí.

A Jacob, mi amigo por inspirarme a seguir cuando ya no tenía ánimos.

A mi facultad, por haberme formado en esta hermosa profesión y por la experiencia que adquirí durante mis años de estudiante.

Y a todas las personas que de una u otra me formaron, me apoyaron y me animaron durante mis estudios.

Muchísimas gracias.

-Ingrid Morazán

ÍNDICE

Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xx
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco Teórico	26
3.1 El Cacao	26
3.2 Hacienda San José de La Carrera	29
3.3 Composición Bioquímica del Cacao	30
3.4 Proceso de Beneficiado del Cacao	32
3.4.1 Recolección	32
3.4.2 Partida de Frutos	33
3.4.3 Desgranada	33
3.4.4 Fermentación	34
3.4.5 Secado	35
3.4.6 Tostado	36
3.5 Fundamentos de Determinaciones Fisicoquímicas	38
3.5.1 Contenido de Humedad	38

3.5.2	Contenido de Cenizas	39
3.5.3	Contenido de Proteína Cruda	39
3.5.4	Contenido de Grasa Cruda	39
3.5.5	Contenido de Fibra Cruda	40
3.5.6	Contenido de Azúcares Totales	40
3.5.7	Contenido Estimado de Polifenoles	41
3.5.8	Potencial de Hidrógeno	41
3.6	La Microscopía Electrónica de Barrido	41
3.6.1	El Microscopio Electrónico	42
3.6.2	La Microscopía Electrónica como Medio de Control de Calidad	42
3.6.3	Microultraestructura de la Semillas de Cacao	44
3.7	Proceso Histológico	45
3.7.1	Obtención del Tejido	46
3.7.2	Fijación	46
3.7.3	Deshidratación	48
3.7.4	Secado	48
3.7.5	Montado	50
3.7.6	Recubrimiento	50
3.7.7	Observación	51

Capitulo IV

4.0 Diseño Metodológico	53
4.1 Tipo de Estudio	53
4.2 Investigación Bibliográfica	53
4.3 Investigación de campo	54
4.3.1 Recolección de la Muestra	54
4.3.2 Tratamiento Previo de la Muestra	55
4.4 Determinaciones Físico-Químicas realizadas a semillas de Cacao Fermentadas	56
4.4.1 Determinación de Contenido de Humedad	57
4.4.2 Determinación de Contenido de Cenizas	58
4.4.3 Determinación de Contenido de Proteína Cruda	59
4.4.4 Determinación de Contenido de Grasa Cruda	61
4.4.5 Determinación de Contenido de Fibra Cruda	62
4.4.6 Determinación de Contenido de Azúcares Totales	65
4.4.7 Determinación del Contenido Estimado de Polifenoles	67
4.4.8 Determinación de pH	69
4.5 Determinaciones Microscópicas de la Semilla de Cacao	70

Capitulo V

5.0 Resultados	73
5.1 Clasificación de las muestras	73

5.2 Resultados de Determinaciones Fisicoquímicas	76
5.2.1 Determinación del Contenido de Humedad	76
5.2.1.1 Contenido de Materia Seca	78
5.2.2 Determinación del Contenido de Cenizas	79
5.2.3 Determinación de Contenido de Proteína Cruda	80
5.2.4 Determinación de Contenido de Grasa Cruda	81
5.2.5 Determinación del Contenido de Fibra Cruda	82
5.2.6 Determinación de Contenido de Azúcares Totales	83
5.2.7 Determinación de Contenido Estimado de Polifenoles	86
5.2.8 Determinación de pH	88
5.3 Interpretación de resultados de análisis físico-químicos	90
5.4 Coeficiente de Correlación entre las variables físico-químicas	92
5.4.1 Interpretación de la relación entre las variables analizadas	96
5.5 Resultados de Microscopía Electrónica de Barrido	98
5.5.1 Microfotografías del genotipo 1	99
5.5.2 Microfotografías del genotipo 2	101
5.5.3 Microfotografías del genotipo 3	104
5.5.4 Microfotografías del genotipo 4	106
5.5.5 Microfotografías del genotipo 5	109
5.5.6 Microfotografías del genotipo 6	111
5.5.7 Microfotografías del genotipo 7	113

5.5.8	Microfotografías del genotipo 8	116
5.5.9	Microfotografías de la muestra M1	119
5.6	Relación de Resultados Físico-Químicos y Microscopía Electrónica	120
Capitulo VI		
6.0	Conclusiones	122
Capitulo VII		
7.0	Recomendaciones	125
	Bibliografía	
	Anexos	

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. UBICACIÓN DE LA HACIENDA SAN JOSÉ DE LA CARRERA EN USULUTÁN
2. ESQUEMA DE PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS
3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS
4. LISTADO DE MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS
5. CLASIFICACIÓN MORFOGEOGRÁFICA DE FRUTOS DE CACAO
6. PARÁMETROS ESPERADOS PARA SEMILLA DE CACAO Y RESULTADOS INDIVIDUALES POR DETERMINACIÓN
7. NORMATIVA MEXICANA
8. CARTA DE RECIBIDO DE INFORME TÉCNICO

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°	N° Pág.
1. Parámetros de cacao y sus especificaciones.	31
2. Muestras analizadas y su respectiva codificación.	54
3. Determinaciones físico-químicas realizadas.	56
4. Resumen de clasificación morfogeográfica de las muestras de cacao para caracterización morfológica y físico-química.	73
5. Clasificación morfogeográfica basada en el fruto del genotipo.	74
6. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 1.	99
7. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 2.	101
8. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 3.	104
9. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 4.	106
10. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 5.	109
11. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 6.	111

12. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 7.	114
13. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 8.	116
14. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X y 1000X de la muestra M1.	119

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	N° Pág.
1. Morfología de hojas, flor, fruto y semilla del cacao.	26
2. Fotografía obtenida por MEB de corte transversal de semilla de <i>T. cacao</i> L.	44
3. Esquema del Proceso Histológico.	45
4. Promedio del contenido de humedad en cada muestra de semillas fermentadas y secadas.	76
5. Promedio del contenido de materia seca en cada muestra de semillas fermentadas y secadas.	78
6. Promedio del contenido de cenizas en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.	79
7. Promedio del contenido de proteína cruda en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.	80
8. Promedio del contenido de grasa cruda en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.	81
9. Promedio del contenido de fibra cruda en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.	82
10. Absorbancia vs la Concentración de Glucosa del patrón.	84
11. Promedio del contenido de azúcares totales en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.	85

12. Absorbancia vs la Concentración de Catequina del patrón.	86
13. Promedio del contenido estimado de polifenoles en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.	87
14. Promedio del pH en cada muestra de semillas fermentadas y secadas.	88
15. Gráficos que muestran los resultados promedio obtenidos en los análisis físico-químicos en BH y BS realizados en muestras de semillas de cacao fermentadas y secadas.	91

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° Pág.
1. Concentración real de Glucosa en los tubos en microgramos y su lectura en absorbancia.	83
2. Concentración real de Catequina en los tubos en microgramos y su lectura en absorbancia.	86
3. Resumen de los resultados de las determinaciones físico-químicas en base húmeda y base seca realizadas a los ocho genotipos de cacao.	90
4. Coeficiente de correlación (r) entre las variables físico-químicas del estudio.	95

RESUMEN

El presente estudio tuvo como finalidad evaluar las características microultraestructurales para el control de calidad de la fermentación de ocho genotipos diferentes de semillas fermentadas de *Theobroma cacao* L. (cacao) para lo cual se realizó una caracterización morfológica y fisicoquímica. Para la caracterización morfológica, se comparó el parénquima del mesofilo en el cotiledón de las semillas fermentadas y no fermentadas a bajo y alto aumento en el microscopio electrónico de barrido donde se determinó que la fermentación y secado produce cambios en la microultraestructura. Por tanto se podría emplear la microscopía electrónica de barrido como control de calidad de la fermentación. La caracterización físico-química se realizó en semillas fermentadas de cacao se determinó el contenido de humedad (método gravimétrico), cenizas (método gravimétrico), proteína cruda (método Kjeldahl), fibra cruda (método Weede), grasa cruda (método Soxhlet), azúcares totales (método fenol-sulfúrico), estimado de polifenoles (método Folin-Ciocalteu) y pH (método potenciométrico) dentro de los cuales la muestra F6 (Acriollado amarillo) obtuvo el valor más alto de grasa cruda y azúcares totales (68.95% y 0.64% respectivamente); mientras las demás muestras reportaron rangos similares con una desviación estándar de 8.9% (grasa cruda) y 0.08% (azúcares totales), ambos valores importantes en el mercado internacional de chocolate. Además se compararon los resultados de las dos caracterizaciones y se encontró que la microscopía electrónica de barrido brinda información parcial

respecto al contenido de lípidos, proteínas y células polifenólicas en cacao. Debido a los resultados físico-químicos y microultraestructurales obtenidos, se recomienda el uso de la microultraestructura como control de la fermentación en semillas de cacao; así como el rescate y mantenimiento del cultivar de cacao en la Hacienda San José de La Carrera en Usulután.

Esta evaluación se llevó a cabo durante el segundo semestre del año 2011 en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Laboratorio de Control de Calidad Físico Químico de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos; ambos localizados en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD-UES) y en la Unidad Química de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

El cacao es el fruto que se obtiene de la especie *Theobroma cacao* L. de este fruto se obtiene la semilla de cacao; principal constituyente en la elaboración de chocolate. En el país se cultiva la especie para la producción de cacao y sus derivados; sin embargo los cultivos generalmente involucran a varios tipos de cacao en una misma plantación lo que dificulta su caracterización y adecuada utilización de los recursos vegetales.

Un cultivo de cacao sin caracterizar no posee las herramientas para mantener y asegurar la calidad constante de su producción y puede perder o disminuir su calidad al desaprovechar un buen material genético; generando un aumento del costo de mantenimiento del cultivo y un descenso en el valor comercial del producto.

La microultraestructura es un método de control de calidad en alimentos, de carácter novedoso, que se ha empleado como control en diversos procesos tales como secado, fermentación, mezclado, cristalización, corte entre otros; con el fin de obtener imágenes de la microultraestructura con las cuales se pueda discernir si el alimento cumple las características establecidas. Anteriormente se le ha empleado en la localización de reservas nutricionales en cotiledones provenientes de cuatro especies del género *Theobroma* y sus analogías con *T. cacao* L. En todos los casos se observó una tendencia a la

disminución de reservas proteínicas y aumento de reserva lipídicas durante el desarrollo de la semilla. (26)

En el caso de la fermentación de cacao, se utilizó la microultraestructura de las semillas de cacao, es decir las características estructurales de las células comparadas antes y después del proceso de fermentación, por lo cual se evaluó la microultraestructura, que proveyó información parcial sobre la composición química en reservas celulares proteínicas, lipídicas y polifenólicas; no se encontraron características propias que permitieran diferenciar cada genotipo morfogeográficamente; pero si se determinaron las características que se pueden usar como control de calidad de una correcta fermentación de las semillas; además se analizaron las características físicas y químicas (tales como el contenido de humedad, cenizas, proteína cruda, fibra cruda, grasa cruda, pH, polifenoles y azúcares totales) de los diferentes genotipos de cacao cultivados en la Hacienda San José de La Carrera (antiguamente Hacienda Cooperativa La Carrera) en Usulután donde se determinó que la muestra F6 correspondiente genotipo acriollado amarillo reportó el valor más alto de contenido de grasa cruda 68.95% y contenido de azúcares totales 0.64%.

La evaluación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad Físico Químico de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos y en el Laboratorio de Microscopía Electrónica respectivamente; ambos localizados en el Centro de

Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD-UES) y en la Unidad Química de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. La investigación se llevó a cabo en el segundo semestre del año 2011.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2. 1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las características microultraestructurales para el control de calidad de la fermentación de ocho genotipos diferentes de semillas fermentadas de *Theobroma cacao* L.

2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Caracterizar las diferencias físico-químicas de las semillas fermentadas de ocho diferentes genotipos de cacao.
- 2.2.2. Realizar el contenido de humedad, cenizas, proteína cruda, fibra cruda, grasa cruda, pH, estimado de polifenoles, azúcares totales y la microultraestructura de semillas fermentadas y secadas de ocho diferentes genotipos de cacao.
- 2.2.3. Identificar la relación entre la microultraestructura y la calidad de la fermentación de las semillas de cacao.
- 2.2.4. Relacionar las características físico-químicas y microultraestructurales de las semillas de cacao fermentadas y secadas de ocho genotipos diferentes de cacao
- 2.2.5. Entregar un informe técnico en la Hacienda San José de La Carrera en Usulután.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3. 1. EL CACAO

El cacao, *Theobroma cacao* L., pertenece a la familia de las **Sterculiaceae** y es la única especie del género *Theobroma* que se explota comercialmente. (7)



Figura N° 1. Morfología de hojas, flor, fruto y semilla del cacao.

Este árbol es nativo de regiones húmedas tropicales del norte de Sur América y de acuerdo a algunos reportes de la América Central; esta clasificado en tres grupos morfogeográficos: criollo, forastero y trinitario, que presentan una gran variabilidad en cuanto a color, dimensiones y forma de las diferentes partes de flores, frutos y semillas. (28)(35)(39)

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

(29)

A la semilla de cacao también se le conoce por los nombres de grano y almendra. Según la norma mexicana NMX-F-352-S-1980 se define al cacao en grano fermentado como el grano entero y sano extraído de los frutos maduros de árboles de la especie ***Theobroma cacao* L.** de la familia de las Sterculiaceas, que ha sido objeto de una buena fermentación, y que ha sido secado bajo condiciones adecuadas ya sea al sol o por medios artificiales. (6)

La parte que se comercializa de la planta son las semillas, y lo que determina la calidad del cacao son las características físicas de estas y su sabor. (6) La calidad de las semillas se fundamenta en gran parte por el origen de la semilla que se usa para el cultivo.

Las semillas de cacao forasteros también se les llama amazónicos pues su origen es en la cuenca alta del río Amazonas, desde donde fueron llevados a África Occidental y a Brasil, tienden a dar cacaos comunes en términos de

calidad. Las semillas se caracterizan por la acidez, el tamaño pequeño y el sabor amargo debido al alto contenido de taninos, ⁽¹⁷⁾ el cotiledón es color violeta cuando la semilla esta recién extraída del fruto y café oscuro cuando ha sido bien beneficiado. ⁽¹⁵⁾

Los cacaos criollos fueron cultivados originariamente en las selvas húmedas mexicanas y en la cuenca del Orinoco, desde donde se propagó a los demás países en Centro América, a Venezuela y a algunas islas del Pacífico como Samoa, Timor y Java. Las semillas son más grandes que las del cacao forastero, y el cotiledón recién salido del fruto es ligeramente rosado. El cotiledón presenta un color entre marfil y parduzco o castaño muy claro cuando esta correctamente beneficiado. La semilla presenta un olor dulce y sabor agradable debido al escaso contenido en taninos, ⁽¹⁷⁾ unido a un aroma delicado, es la característica distintiva de los tipos finos. ⁽¹⁵⁾

Los cacaos trinitarios, se desarrollaron en la isla de Trinidad por el cruce entre cacaos criollos y forasteros realizado en forma natural entre los distintos tipos introducidos y también a partir de hibridaciones deliberadas a través de distintos programas de desarrollo en Trinidad. La calidad de los cacaos trinitarios corresponde a características intermedias entre los cacaos criollos y

forasteros según la cantidad de genes de uno o de otro que les hayan correspondido. (15)

3. 2. HACIENDA SAN JOSÉ DE LA CARRERA.

La Hacienda San José de La Carrera, está ubicada en el departamento de Usulután, cantón San José, Municipio de Jiquilisco (Latitud norte: 13°20', Longitud oeste: 88° 29', Elevación 75 msnm). El área total comprende 2715 manzanas; de estas 227 manzanas cultivadas de cacao, 1700 manzanas caña de azúcar, 120 manzanas patios de salineras, 300 manzanas en infraestructura, 80 manzanas de bosque (Teca, Eucalipto) y 515 manzanas de otros.

La plantación de cacao más joven oscila entre 4 y 18 años y ocupa un área estimada de 71 manzanas. En el área restante que es de 156 manzanas, el rango de edad se encuentra entre 35 y 60 años, pudiendo ser superior en algunos casos. El distanciamiento de siembra del cacao es 4 x 4 metros, se tiene una población estimada de 437 plantas/manzana.

El área de estudio donde se ubica la Hacienda San José de La Carrera, se encuentra en la planicie costera, al norte de la bahía de Jiquilisco y al sur del volcán de Usulután, esta región es plana con suelos andisoles y aluviales con cultivos anuales en los alrededores de Usulután.

La región donde se ubica la estación climática (La Carrera) se zonifica climáticamente según Koppen, Sapper y Laurer como Sabana tropical Caliente ó Tierra Caliente (0-800 msnm.) la elevación es determinante (75 msnm).

3.3. COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DEL CACAO.

La composición química de las semillas de cacao resulta importante en la formación de los compuestos precursores de sabor y aroma del cacao así como en su calidad. ⁽³⁾ En general, los componentes principales de una semilla son encontrados en las reservas alimenticias, las cuales proporcionan la energía necesaria para la germinación y crecimiento. Las grasas y proteínas son las formas principales en que estas reservas energéticas son almacenadas en las semillas de cacao. ⁽⁹⁾

Las semillas de cacao contienen un 53% de grasas y entre un 15% a 20% de proteínas sobre la base seca. La fracción proteínica esta compuesta principalmente por albúmina (52% del total proteico) y globulinas (43%). ⁽²⁶⁾

El carbohidrato más común que sirve como reserva nutricional es el almidón, aunque las hemicelulosas y oligosacáridos amiloides y rafinosos también son importantes. Entre los carbohidratos no almacenados encontramos a la celulosa, pectinas y mucilagos. ⁽⁹⁾ Las semillas de cacao contienen una baja

concentración de azúcares entre 0.8 a 1.73% además la concentración de fibras dietética soluble en insoluble es de alrededor de un 15 %. (4)

Gilabert-Escriva determinó los ácidos grasos y triacilglicerolos de las mismas especies de la misma zona geográfica y demostraron la predominancia del ácido oleico y esteárico; a la vez recalcaron la alta concentración de ácido palmítico en *T. cacao L.* en comparación con las demás especies del género *Theobroma* bajo estudio (*T. cacao*, *T. bicolor*, *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre* y *T. microcarpum*, además de la especie relacionada *Herrania mariae*). (20)

En un estudio diferente se constató la presencia de proteínas, lípidos y polifenoles en los cotiledones mesófilos de las cuatro especies y que la síntesis de estos componentes seguía un gradiente de maduración dentro de la semilla.

(26)

Cuadro N° 1. Parámetros de cacao y sus especificaciones.

Parámetro	Bajo ₍₁₅₎	Normal ₍₁₅₎	Alto ₍₁₅₎	Teórico
Contenido de humedad	6 a 6.5%	7 a 8%	>8%	-
Contenido de cenizas	-	-	-	2.8 a 3.6 % ₍₁₂₎
Contenido de fibra cruda	-	-	-	2.5 a 4.0 % ₍₂₆₎
Contenido de azúcares totales	-	-	-	0.8 a 1.73 % ₍₄₎
Contenido de grasa cruda	<52%	52 a 55%	>55%	-
Contenido de proteína cruda	-	-	-	12 a 15 % ₍₂₆₎
Contenido de polifenoles	-	-	-	7.4 a 8.5% ₍₂₆₎
pH	<5.0	5.0 a 5.5	>5.5	-

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

En el cuadro N° 1 los valores bajo, normal y alto son reportados por FEDECACAO, mientras que los valores teóricos son obtenidos de investigaciones anteriores.

3. 4. PROCESO DE BENEFICIADO DEL CACAO.

Se conoce como beneficiado del cacao a todo el proceso que las semillas sufren desde su recolección en el cultivar hasta su tostado y almacenaje para producción de chocolate y derivados. Este proceso comprende varios pasos: recolección, partida de frutos, desgranada, fermentación, secado y otros adicionales como tostado y molido.

3. 4. 1. Recolección.

El primer paso del beneficiado inicia aquí. Solo se cosechan los frutos maduros ya que las semillas provenientes de frutos no maduros ocasionan cambios desagradables en el aroma y el sabor. Esto se debe a que las sustancias azucaradas que recubren la semilla aun no han alcanzado una condición óptima para el desarrollo de los procesos bioquímicos que se producen en la fermentación. ⁽¹⁶⁾

La frecuencia de la recolección va a depender de factores como el volumen de la cosecha, la madurez de los frutos y la presencia de plagas, enfermedades o

animales dañinos. La herramienta utilizada es la tijera podadora y se realiza el corte cerca del fruto, en la base de esta para evitar dañar el cojín floral del árbol y las futuras cosechas.

3. 4. 2. Partida de Frutos.

La partida de frutos se realiza en un área adecuada que permita la recolección de las cáscaras para uso posterior. Antes de partir los frutos, se separan los frutos sanos de los enfermos y los maduros de los que no han alcanzado el grado de maduración adecuado para beneficiar únicamente las semillas provenientes de frutos sanos y maduros. Para partir los frutos se utiliza un machete corto o un ángulo de hierro y se debe evitar el daño a las semillas. Aunque se prefiere el ángulo de hierro o cualquier otra herramienta que lo simule debido a que no presenta riesgo para el operario y se reduce la posibilidad de dañar la semilla de cacao. (16)

3. 4. 3. Desgranada.

Se refiere al proceso de extracción de la semilla de la cáscara. El proceso se realiza deslizando los dedos de la mano a lo largo de la placenta o vena central del fruto, se evita mezclar la placenta con las semillas pues constituye una impureza que perjudica la calidad del cacao. (15)

3. 4. 4. Fermentación.

Este es el paso crucial en el beneficio del cacao, en este paso se desarrollan las cualidades de la semilla, agradables al gusto y al olfato. “La fermentación es un proceso complejo que consiste en una serie de cambios de carácter bioquímico y físico en todas las estructuras de la semilla, tanto en la testa o cascarilla, en el mucilago que cubre, el interior del cotiledón y en el embrión que debe morir y reabsorberse.” (16)

El proceso bioquímico implica una sucesión de reacciones químicas mediante las cuales, los azúcares contenidos en la pulpa, se transforman en otros productos tales como agua, etanol y ácido acético entre otros. Mientras que en el proceso físico se desprenden las semillas del mucilago que los rodea lo cual facilita su preservación, se provoca la muerte del embrión y se impide la germinación, todo esto origina una cadena de reacciones bioquímicas en el interior de las semillas que generan un aumento de su volumen y el cambio de color hasta alcanzar el tono chocolate característico de la semilla de cacao.

Las semillas extraídas del fruto deben depositarse en cajones de madera aunque lo más importante es que tengan orificios en el fondo y los lados para la salida de los líquidos que se desprenden del mucílago. Los cajones deben colocarse unos 10 ó 15 centímetros por encima del suelo para el fácil drenaje de estos líquidos. Los cajones deben estar colocados en sitios cubiertos para

que la temperatura sea constante y la fermentación sea completa y uniforme.

(16)

La masa de cacao fermentado se debe voltear a partir de las primeras 36 horas de fermentación y después cada 24 horas para airear la masa y lograr uniformidad en la fermentación, mediante la distribución homogénea de la temperatura la cual debe permanecer por lo menos 3 días a 50 °C, para lo cual la masa de semillas debe taparse con costales, hojas o fibras vegetales y estar en un cuarto o lugar abrigado. La fermentación debe durar entre 5 a 6 días. Así mismo se debe evitar la mezcla de cacaos recolectados en diferentes días. (15)

3. 4. 5. Secado.

Mediante este proceso se disminuye el contenido de agua, la acidez y la astringencia de la semilla, características importantes de calidad. En el proceso del secado se debe revolver la masa de cacao frecuentemente para la distribución uniforme del calor para ello deben usarse utensilios de madera. En forma práctica el punto de secado se conoce tomando un puñado de semillas y si al oprimirlos crujen es señal de que están en el grado de sequedad requerido. (15)

La semilla seca de cacao con un contenido de humedad cercana al 7%, que es la requerida y cuyo proceso de fermentación haya sido correcto, presenta estas características:

- Semilla de forma arriñonada.
- Color externo café oscuro o canela.
- Consistencia quebradiza. Cáscara fácilmente desprendible.
- Estructura interna arriñonada y con espacios dentro de la estructura de los cotiledones. Presenta unas membranas transparentes delgadas entre las grietas de la semilla.
- Color interno café marrón, violeta o simplemente chocolate.
- Olor a chocolate, agradable.
- Sabor medianamente amargo. (15)

3. 4. 6. Tostado.

El desarrollo del aroma del cacao se considera de origen térmico ya que es un fenómeno complejo que depende de los parámetros de tostadura y de la composición química de la semilla. (11)

Cualquiera que sea la técnica empleada para el tostado, los precursores de aroma desarrollados durante la fermentación y el secado participan en la formación del aroma del cacao tostado, por reacciones de Maillard, la caramelización de las proteínas y síntesis de compuestos azufrados. (27)

Las operaciones posteriores a la fabricación del chocolate sólo conducen a la eliminación de una parte de la fracción de compuestos volátiles. El sabor es la característica más importante para los fabricantes de chocolate, considerando, además, los aspectos físicos de la semilla: su tamaño, porcentaje de cascarilla, el contenido y la pureza de la manteca y; los que originan sabores extraños: el moho, el humo, la acidez y el amargor de las semillas comerciales. (15)(16)

La calidad aromática del chocolate esta relacionada con su origen, su fermentación, secado y tostado, siendo desconocidos hasta este momento, la influencia de cada uno de ellos sobre la misma. Cross afirma que el efecto de las condiciones edafo-climáticas, poco estudiadas, parece ser muy bajo al compararse con la influencia del genotipo, siendo éste y el beneficio post-cosecha, los más determinantes en la calidad de las semillas. (10)

En las semillas de cacao, la proporción de polifenoles se ve afectada además por procesos del tratamiento del cacao como el secado, el tostado y la eliminación de la cascara; así como otros tratamientos aplicados durante el procesamiento del cacao. Por la misma razón una diferencia en el grado de fermentación o diferencias dependientes de la clase de cacao producirán cambios en la calidad y las características organolépticas finales del producto.

(19)

3. 5. FUNDAMENTOS DE DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS.

A continuación se exponen los principios básicos sobre los que se basan las determinaciones fisicoquímicas que forman parte de la caracterización química de las semillas de cacao.

3. 5. 1. Contenido de Humedad.

La determinación del contenido de humedad es un parámetro muy importante en la calidad del cacao fermentado, un exceso de humedad indica un insuficiente secado y provoca disminución en la calidad del producto. (31)

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.

3. 5. 2. Contenido de Cenizas.

Llamado también como análisis de residuos orgánicos que quedan después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica de un alimento. El resultado obtenido no siempre corresponde al valor real presente en el alimento, ya que es posible que existan pérdidas por volatilización o reacciones durante el proceso. (25)

3. 5. 3. Contenido de Proteína Cruda.

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:

- Acido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de un indicador mixto.
- Acido bórico formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico. (21)

3. 5. 4. Contenido de Grasa Cruda.

Una muestra homogénea y seca, medida o pesada del alimento se somete a una extracción con éter de petróleo o éter etílico o una mezcla de ambos. Posteriormente, se realiza la extracción total de la materia grasa libre haciendo uso del extractor Soxhlet. (23)

3. 5. 5. Contenido de Fibra Cruda.

Fibra cruda es la pérdida de masa que corresponde a la incineración del residuo orgánico que queda después de la digestión con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en condiciones específicas de temperatura y tiempo. (21)

3. 5. 6. Contenido de Azúcares Totales.

Este método propuesto por Dubois se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar con el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol. (13)

Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón.

(30)

3. 5. 7. Contenido Estimado de Polifenoles.

Se determina la concentración de polifenoles por la formación de compuestos coloreados con el reactivo. La determinación se fundamenta midiendo la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del reactivo de Folin-Ciocalteu. Sin embargo, este reactivo no solo mide los fenoles totales, sino que reaccionará con cualquier sustancia reductora. En consecuencia, el reactivo mide la capacidad reductora total de una muestra, no sólo el nivel de compuestos fenólicos. Este reactivo forma parte del ensayo de proteínas de Lowry, y también reaccionará con algunos compuestos que contienen nitrógeno, como la hidroxilamina y la guanidina. (21)

3. 5. 8. Potencial de Hidrógeno.

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

3. 6. LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

A continuación se presenta el fundamento del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido así como el uso de la microultraestructura como medio de control de calidad y las características microultraestructurales de las semillas de cacao.

3. 6. 1. El microscopio electrónico.

El microscopio electrónico es aquel que utiliza electrones en lugar de luz visible para formar imágenes de objetos diminutos. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar una capacidad de aumento superior a los microscopios convencionales debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones.

Un microscopio electrónico funciona con un haz de electrones generados por un cañón electrónico, acelerados por un alto voltaje y focalizados por medio de lentes magnéticas (todo ello al alto vacío ya que los electrones son absorbidos por el aire). La técnica consiste, principalmente, en enviar un haz de electrones sobre la muestra y mediante un detector apropiado registrar el resultado de esta interacción. El haz se desplaza sobre la muestra realizando un barrido en las direcciones X e Y de tal modo que la posición en la que se encuentra el haz en cada momento coincide con la aparición de brillo, proporcionalmente a la señal emitida, en un determinado punto de una pantalla. El microscopio electrónico sólo puede generar imágenes en blanco y negro, puesto que no utiliza la luz, pero se les pueden dar colores en la computadora.

3. 6. 2. La microscopia electrónica como medio de control de calidad.

La Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) ha sido utilizada ampliamente como factor de control de calidad en diversos materiales incluyendo alimentos.

Donde se emplea como una herramienta vital que brinda información visual sobre la superficie de las muestras. (36)

Para evaluar los cambios en productos alimenticios se ha hecho uso de diferentes técnicas microscópicas y se aplican metodologías de análisis de imágenes en relación con evaluaciones físicas o químicas del producto. Las técnicas microscópicas generan información en la forma de imágenes. (14)(24)

Las características de la semilla tienen una gran incidencia en la calidad del producto elaborado con estas así pues la calidad de la semilla es un factor muy importante en la elaboración de chocolate. Además, siendo la fermentación un punto clave en el beneficio del cacao resulta importante establecer controles para la determinación de la calidad de ésta. (15)(16)

La MEB ha demostrado tener una superioridad sobre la microscopia óptica. Las ventajas de la MEB son una mayor capacidad de magnificación (hasta 100,000x) y mayor profundidad de campo. Este instrumento permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. Una desventaja de la MEB es la imposibilidad de examinar muestras que producen alta presión de vapor de agua cuando se colocan en el ambiente de vacío que requiere este

equipo. Por ello, para observar muestras biológicas deben secarse previamente para hacerlas conductoras. (14)(32)

3. 6. 3. Microultraestructura de la semilla de cacao.

La microultraestructura de las semillas de cacao proporciona información sobre la composición química y características de los tipos morfogeográficos. En un estudio realizado en Brasil con cuatro especies del género *Theobroma* se usó entre las técnicas de comparación a la MEB; como apoyo en la diferenciación micromorfológica de las cuatro especies. En el que además se compararon los cambios en la microultraestructura antes y después del proceso de maduración y en el que claramente se indica que en la maduración prevalecen las reservas de lípidos y proteínas sobre las estructuras celulares en comparación con otras estructuras como los gránulos de almidón. (26)

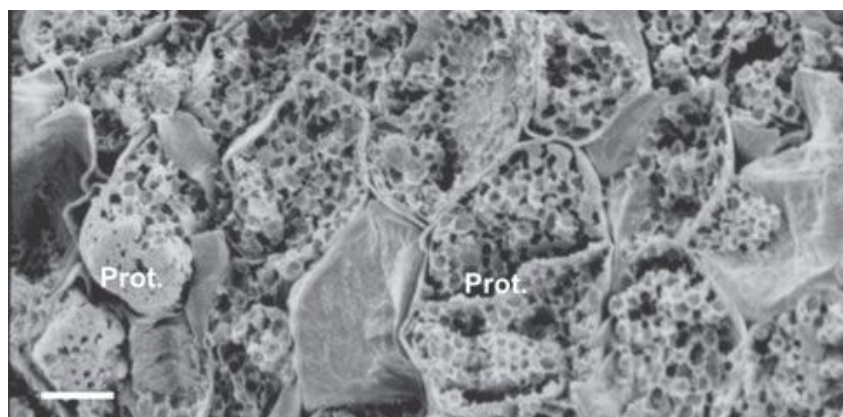


Figura N° 2. Fotografía obtenida por MEB de corte transversal de semilla de *T. cacao* L.

Como se observa en la Figura N° 2 las células mesófilas exponen las reservas proteicas mientras que las estructuras como láminas se deben a la deposición de proteínas alrededor de gotas de lípido.

3. 7. PROCESO HISTOLÓGICO.

El proceso histológico es la serie de métodos y técnicas que se emplearán para el estudio de las características morfológicas y celulares de los tejidos. (40)

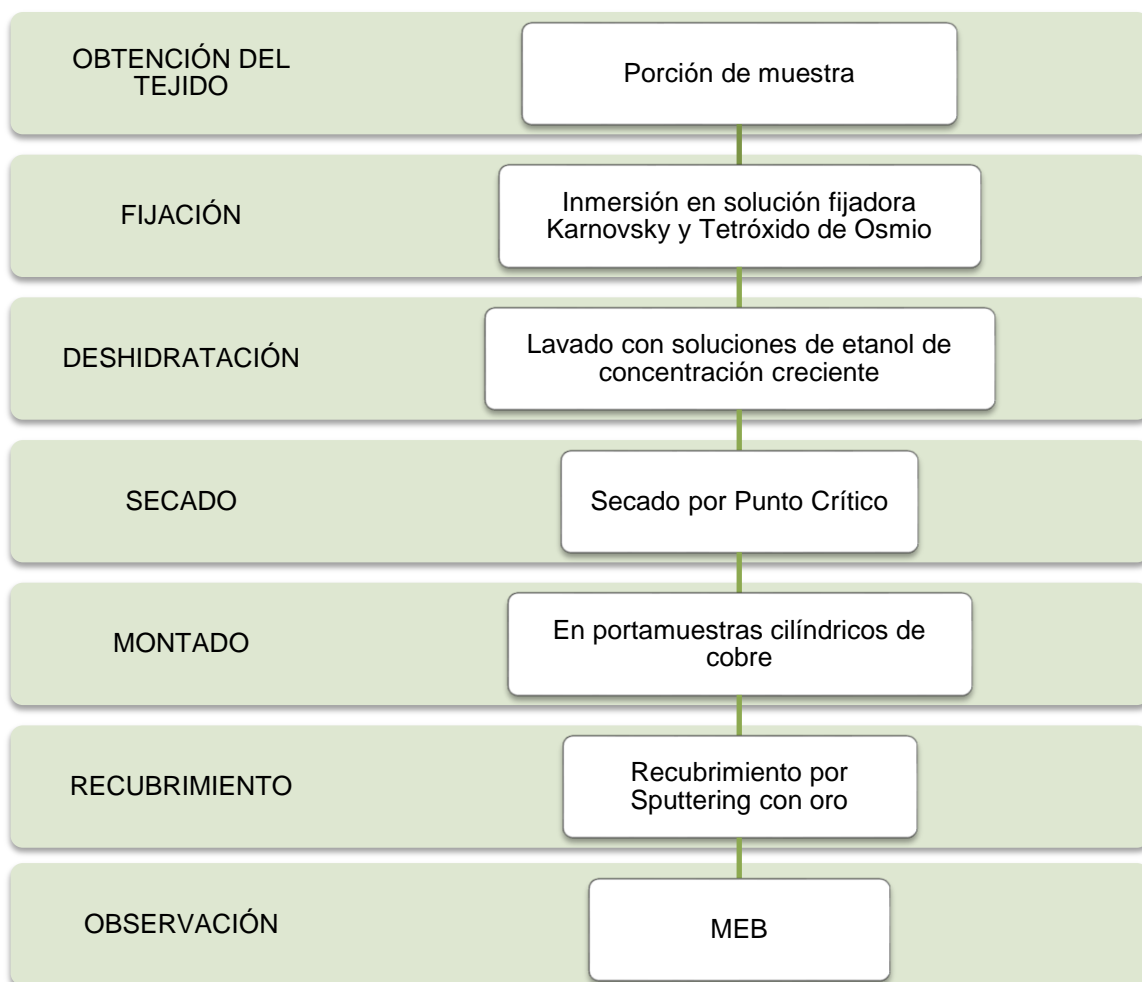


Figura N° 3. Esquema del Proceso Histológico.

3. 7. 1. Obtención del tejido.

Debido a que el interés radica en la microultraestructura de la muestra, se realizan cortes en las muestras para obtener muestras de un tamaño de pocos milímetros de largo, ancho y grosor. (40)

3. 7. 2. Fijación.

La fijación es la técnica que nos permite preservar las características morfológicas y moleculares lo más parecidos posibles a las que poseía en estado vivo. Uno de los métodos para la fijación es el método de fijación por inmersión; en este método la muestra se sumerge en la sustancia fijadora. (40)

Los fijadores empleados en la preparación histológica de las semillas de cacao pueden ser:

-Alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$). Fija por deshidratación y se usa a una concentración entre el 70 y 90 %. Es útil para preservar moléculas, como ciertas enzimas, glucógeno, pigmentos y para las extensiones citológicas. Debido a que deshidrata, a la vez que fija, se puede usar también como un conservante de las muestras. Tiene inconvenientes como el endurecimiento y la retracción de los tejidos. Carece de efecto mordiente. (40)

-Karnovsky. Consiste en una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2%. (33) Se utiliza especialmente para la fijación de muestras

destinadas al estudio con microscopio electrónico. Tiene una velocidad de penetración de tejidos bastante rápida, conserva los organelos celulares, produce escasa retracción y endurecimiento de los tejidos.

-Tetróxido de osmio (OsO_4). Forma puentes entre moléculas. Se emplea al 1 % en soluciones tamponadas. Es buen fijador de la microultraestructura de la célula por lo que se emplea habitualmente para las observaciones con el microscopio electrónico. Es un buen fijador para grasas y membranas celulares. Por su fuerte carácter oxidante no se usa para tinciones convencionales, excepto para las impregnaciones argénticas como el método de Golgi. (40)

Es habitual que los tejidos destinados a microscopía electrónica sean inicialmente fijados en glutaraldehído (1 al 3 %) y paraformaldehído (2 al 4 %), para posteriormente ser fijados en Tetróxido de osmio al 1 % en solución tamponada. Las desventajas de estos fijadores son su toxicidad y capacidad contaminante del medio ambiente. (40)

Durante el proceso de fijación hay que tener en cuenta las siguientes precauciones:

-Las piezas de tejido no deberían superar los 0.5 cm de espesor para que el fijador alcance el interior de la pieza antes de que ésta comience a deteriorarse. Esto depende de la velocidad de penetración del fijador y de las características del tejido, por ejemplo, si tiene cavidades por donde penetre la solución fijadora.

- El volumen recomendado de fijador debe ser 20 veces superior al volumen de la pieza.
- La osmolaridad entre tejido y solución fijadora deben estar equilibradas.
- El pH del fijador debe ser próximo al fisiológico.
- El tiempo de fijación depende de cada tipo de fijador, pero generalmente existe un tiempo máximo para cada uno de ellos que no debe ser excedido. (40)

3. 7. 3. Deshidratación.

Una vez fijada la muestra procedemos a sustituir el agua de los tejidos por un solvente orgánico que sea miscible con la resinas. Para ello se deshidrata el tejido mediante incubaciones sucesivas en gradaciones crecientes de etanol o acetona. (40)

3. 7. 4. Secado.

Las muestras que quieran ser investigadas mediante microscopía electrónica de barrido deben ser secadas antes de ser introducidas en el microscopio, de otro modo la baja presión en el mismo causará que el agua (y otros líquidos volátiles) se evapore saliendo violentamente del espécimen y alterando la estructura del mismo. Las muestras con una rigidez inherente como metales, rocas, huesos, etc. se pueden secar al aire o en un desecador de vacío sin que su estructura sufra alteraciones. Sin embargo, las estructuras blandas con un

alto contenido en agua se deformarán si se dejan secar al aire ya que las fuerzas de tensión superficial asociadas a la salida del agua causarán daños estructurales. Para evitar los efectos dañinos sobre la estructura de los especímenes secados al aire, durante el proceso de secado debe pasarse el límite entre la fase “líquido-gas”. Para ello, se puede usar el método del punto crítico en el que el líquido pasa directamente a la fase gaseosa. De este modo las fuerzas de deformación se evitan ya que el proceso de secado tiene lugar por encima del punto crítico del líquido, donde el límite entre la fase líquida-gaseosa no existe. (37)

El punto crítico es aquel estado particular de un gas en el cual todavía puede sufrir licuefacción. Este estado viene determinado por la presión crítica y la temperatura crítica. Por encima de este punto el gas no puede experimentar licuefacción debido a que el límite entre la fase gaseosa y la fase líquida ha desaparecido: En este punto el estado líquido y el estado gas son igualmente densos. Éste es el punto crítico. El líquido pasa a la fase gas sin pasar por el límite de fases “líquido-gas”, y la muestra se seca sin los efectos dañinos del secado en aire. (37)

Según los valores de presión y temperatura crítica del agua, 228.5 bar y 374 °C, si un espécimen contiene agua, este no puede ser secado mediante el método del punto crítico ya que los valores tan altos de presión y temperatura podrían destruirlo. Así la muestra debe ser transferida a un agente apropiado, llamado

fluido transicional, tal como es el dióxido de carbono cuyos valores de punto crítico son considerablemente más ventajosos, 73.8 bar y 31 °C. (37)

3. 7. 5. Montado.

Luego de secar las piezas se procede al montado en piezas cilíndricas metálicas especiales para microscopía usando resinas acrílicas que permitan la fijación de la muestra en el portamuestra.

3. 7. 6. Recubrimiento.

Se recubre la muestra con una película conductora, de espesor comprendido entre 10 y 25 nm. Cuando se desea visualizar una muestra en un microscopio electrónico de barrido ésta debe ser conductora ya que, de no ser así, se carga durante la irradiación por una acumulación de carga que desvía el haz electrónico y, como consecuencia de ello aparecen distorsiones en la imagen.

(37)

Entre las técnicas empleadas se encuentra la técnica de “sputtering” en la cual se deposita en la muestra una fina película de un metal pesado conductor, como el oro, haciendo uso de un gas en estado plasmático como el Argón.

3. 7. 7. Observación.

Los electrones que atraviesan la muestra inciden sobre una pantalla fosforescente que emite destellos de luz cuando recibe el impacto de un electrón y permite observar las características del tejido. Los metales pesados unidos al tejido impedirán que pasen los electrones y por tanto se verá una zona negra en la pantalla fosforescente, mientras que en aquellas zonas de la célula donde no estén estos metales provocarán áreas luminosas en dicha pantalla. Por ello todas las imágenes originales de microscopía electrónica son en blanco y negro, aunque se puedan colorear posteriormente con una computadora. (40)

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4. 1. TIPO DE ESTUDIO.

-Transversal: por que el estudio se realizó durante el segundo semestre del año 2011 e involucró una parte de la población de cacao.

-Experimental porque involucró un estudio de laboratorio realizado a las semillas fermentadas y secadas de cacao.

4. 2. INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

La recopilación de referencias bibliográficas se realizó en las bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia en la Universidad de El Salvador,

- Central de la Universidad de El Salvador,

- Hugo Lindo de la Universidad Dr. José Matías Delgado (UJMD),

- Florentino Idoate de la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas,

- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer

- Facultad de Ciencias Agronómicas.

Así como en el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA); artículos científicos e Internet.

4. 3. INVESTIGACIÓN DE CAMPO.

Universo: Todos los frutos de cacao localizados en la Hacienda San José de La Carrera en Usulután.

Muestra: dirigida puntual a los ocho genotipos de *T. cacao* L.

4. 3. 1. Recolección de la muestra.

Por cada genotipo de cacao se recolectaron de 3 a 4 frutos (equivalente a 40 g) los cuales fueron identificados por sus características morfológicas y su ubicación en el cultivar de la Hacienda San José de La Carrera localizada en el departamento de Usulután (Ubicación: +13° 18' 0.00", -88° 30' 0.00"; Altitud: 41 metros). (Ver anexo N° 1)

Los frutos de cacao se inspeccionaron para seleccionar aquellos que estuvieran libres de infecciones y de otras imperfecciones que pudieran afectar los resultados. Se clasificaron y codificaron los frutos según el procesamiento de muestra y análisis requeridos como se describe continuación:

Cuadro N° 2. Muestras analizadas y su respectiva codificación.

MUESTRA	CÓDIGO	CARACTERIZACIÓN
SEMILLA SIN FERMENTAR	DE N1 AL N8	MORFOLÓGICA
SEMILLA FERMENTADA Y SECADA	DE F1 AL F8	MORFOLÓGICA Y FÍSICOQUÍMICA
SEMILLA MAL FERMENTADA	M1	MORFOLÓGICA

4. 3. 2. Tratamiento Previo de la Muestra.

Después de la recolección los frutos se llevaron a la Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola de la UJMD en donde se cortaron con un machete corto, se les extrajeron las semillas manualmente haciendo uso de guantes e inmediatamente recibieron los diferentes tratamientos que se detallan a continuación:

Muestras de semilla sin fermentar: se eliminó la pulpa de las semillas e inmediatamente se realizaron los cortes para la caracterización morfológica. Estas muestras fueron el control pre-fermentación.

Muestras de semilla fermentada y secada: las semillas se dejaron en fermentación durante cinco días en recipientes plásticos con orificios y cubierta con una proporción 1:1 (peso masa de cacao: peso agua purificada). Luego se lavaron con agua potable para eliminar la pulpa y se secaron en un deshidratador Excalibur modelo ED 2900 durante dos días a 150 °C el cual fue proporcionado por la Universidad Dr. José Matías Delgado. Las muestras se usaron para la caracterización morfológica y físico-química.

Las muestras para caracterización físico-química fueron trituradas hasta el momento del análisis.

Muestras de semilla mal fermentada: las semillas se dejaron en fermentación durante cinco días en recipientes plásticos al aire libre. Luego se lavaron con

agua potable para eliminar la pulpa y se dejaron secar al sol durante dos días. Estas muestras fueron el control de una fermentación mal realizada para la caracterización morfológica.

4. 4. DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS A LAS SEMILLAS DE CACAO FERMENTADAS.

La caracterización físico-química se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad Físico Químico de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD-UES) y en la Unidad de Química de la Facultad de Ciencias Agronómicas en la Universidad de El Salvador. A cada genotipo bajo estudio se le realizaron las siguientes determinaciones físico-químicas las cuales se realizaron por triplicado, se promediaron los valores obtenidos y se expresaron con dos decimales, tanto en base húmeda (BH) como en base seca (BS).

Cuadro N° 3. Determinaciones físico-químicas realizadas.

Determinación	Método
Contenido de Humedad	Gravimétrico
Contenido de Cenizas	Gravimétrico
Contenido de Proteína cruda	Digestión Kjeldahl
Contenido de Grasa cruda	Gravimetría - Extracción con éter.
Contenido de Fibra cruda	Weede (Digestión ácida- Gravimetría)
Contenido de Azúcares Totales	Fenol-Sulfúrico
pH	Potenciométrico
Contenido estimado de Polifenoles	Folin Ciocalteu

4. 4. 1. Determinación del Contenido de Humedad. (21)(30)(31)

(Ver Anexo N° 2, N°3 y N° 4.)

Procedimiento.

- Preparar un recipiente de aluminio.
- 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.

Cálculos y expresión de resultados.

-Se calculó el contenido de humedad como el peso perdido de la muestra durante el secado según la siguiente fórmula:

$$\frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 = \% \text{ de humedad}$$

Donde:

P_i=Peso inicial

P_f=Peso final

% de materia seca = 100 - % de humedad.

Se reportó como pérdida por secado a 100-110 °C.

4. 4. 2. Determinación de Contenido de Cenizas. ⁽²¹⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾

(Ver Anexo N° 2, N°3 y N° 4.)

Procedimiento.

-Colocar un crisol durante 30 minutos en la mufla a una temperatura de 550° a 600°C.

-Enfriar el crisol en un desecador durante 15 a 20 minutos. Procurar no cerrar el desecador totalmente, ya que el calor de los crisoles puede provocar que la tapa se proyecte y se rompa.

-Pesar el crisol en balanza analítica e identificarlo con el número que tiene marcado en la parte inferior. Anotar el peso.

-Pesar en el crisol 1-2 gramos de la muestra seca en balanza analítica. Registrar el peso exacto.

-Pre-incinerar la muestra exponiéndola a la flama del mechero de Bunsen.

-Incinerar la muestra en la mufla precalentada entre 550° y 600°C durante 2 horas (si las cenizas están negras se debe incinerar por otra media hora).
Enfriar la muestra en desecador.

-Pesar el crisol con cenizas en la misma balanza que utilizó inicialmente. Anotar el peso.

Precaución: maneje siempre los crisoles con pinzas

Nota: numerar los crisoles para su identificación.

Cálculos y expresión de resultados.

Peso del crisol con muestra -Peso del crisol vacío = Peso de la muestra

Peso del crisol con cenizas -Peso del crisol vacío = Peso de las cenizas

$$\% \text{ de cenizas en base húmeda} = \frac{\text{Peso de cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

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

4. 4. 3. Determinación de Contenido de Proteína Cruda. (21)(30)(31)

(Ver Anexo N° 2, N°3 y N° 4.)

Procedimiento.

-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.

Cálculo y expresión de resultados.

$$\% \text{ Nitrógeno en base húmeda} = \frac{14 \times N \times V \times 100}{m \times 1000}$$

$$\% \text{ Proteína cruda en base húmeda} = \% \text{ Nitrógeno} \times 5.4$$

$$\% \text{ Proteína cruda en base seca} = \frac{\% \text{ proteína cruda en base húmeda}}{\% \text{ materia seca}} \times 100$$

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

factor: 5.4 para semillas de cacao ⁽²⁶⁾

4. 4. 4. Determinación de Contenido de Grasa Cruda. ⁽²¹⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾

(Ver Anexo N° 2, N°3 y N° 4.)

Procedimiento.

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 $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

-Pesar el matraz de extracción Registrar peso como m_1 .

-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 el solvente 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 o baño María bajo campana. 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 .

Cálculo y expresión de resultados.

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

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

Donde:

m: peso de la muestra

m_1 : tara del matraz vacío

m_2 : peso matraz con grasa.

4. 4. 5. Determinación de Contenido de Fibra Cruda. (21)(30)(31)

(Ver Anexo N° 2, N°3 y N° 4)

Procedimiento.

Preparación de la muestra:

- Utilizar la muestra libre de grasa contenida en el dedal de extracción del equipo Soxhlet.

Procedimiento:

-Pesar (con una precisión de $\pm 1\text{mg}$) de 1 a 1.5 g de muestra en un crisol poroso. La cantidad de muestra es W_0 .

-Introducir los crisoles en el Dosi-Fiber

Hidrólisis ácida en caliente:

-Asegurarse de que las válvulas están en la posición "Cerrado".

-Añadir 100-150 mL de H_2SO_4 caliente en cada columna y unas gotas de octanol.

-Abrir el circuito de refrigeración y activar las resistencias calefactores. (Potencia 90%)

-Esperar a que hierva, reducir la potencia al 30% y dejar hervir durante el tiempo de extracción (30 minutos a una hora dependiendo del material). Para una hidrólisis mas efectiva accionar la bomba de aire en la posición soplar.

-Parar la calefacción. Abrir el circuito de vacío y poner los mandos de las válvulas en posición "Absorción". Lavar con agua destilada y filtrar. Repetir este proceso tres veces.

Hidrólisis básica en caliente:

-Repetir los pasos pero utilizando KOH en lugar de H_2SO_4 .

Extracción en frio con acetona:

Este paso se realiza en el frasco kitasatos preparado con trompas de vacío.

- Preparar el frasco Kitasatos con las trompas de vacío. Situar el crisol en la entrada del Kitasatos y añadir acetona a la vez que el circuito de vacío esta absorbiendo. Repetir esta operación 3 veces.
- Poner las muestras a secar en la estufa a 150°C durante 1 hora.
- Dejar enfriar en desecador.
- Pesar con una precisión de ± 0.1 mg, la cantidad pesada es W_1 .
- Incinerar las muestras de los crisoles en el horno de mufla a 500°C durante un mínimo de 3 horas. Para evitar la rotura de los crisoles, colocar estos antes de encender el horno y dejar que alcancen la temperatura para comenzar a contar las 3 horas.
- Dejar enfriar en desecador. Teniendo cuidado de no exponer los crisoles a cambios bruscos de temperatura.
- Pesar los crisoles con una precisión de ± 0.1 mg la cantidad pesada es W_2 .
- Realizar el siguiente cálculo.

Cálculo y expresión de resultados.

$$\% \text{ Fibra cruda en base húmeda} = \frac{W_1 - W_2}{W_0} \times 100$$

$$\% \text{ Fibra cruda en base seca} = \frac{\% \text{ Fibra cruda en base húmeda}}{\% \text{ materia seca}} \times 100$$

Donde:

W_0 : Peso de crisol con muestra

W_1 : peso de crisol con muestra secada

W₂: peso de crisol con muestra incinerada

4. 4. 6. Determinación de Contenido de Azúcares Totales. (13)(21)(30)(31)

(Ver Anexo N° 2, N°3 y N° 4)

Procedimiento.

Desproteinización de las muestras.

-Pesar 2 g de muestra homogenizada y suspender en 20 mL agua desmineralizada. Homogenizar.

-Filtrar y tomar 10 mL del filtrado, a este adicionar 1 mL de una solución de Sulfato de Zinc al 10% y 1 mL de NaOH 0.5 N.

-Mantener en reposo durante 15 minutos y luego centrifugar a 200 rpm durante 15 minutos. Utilizar el sobrenadante para la cuantificación de azúcares totales.

Determinación de Azúcares Totales

NOTA. Realizar todo el procedimiento para un tubo antes de seguir con el siguiente.

-Preparar una solución o suspensión de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (10-100µg/mL).

-En tubos de ensayo perfectamente etiquetados, colocar 1 mL de la solución o suspensión acuosa de la muestra.

- Para cada tubo adicionar 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Mezclando perfectamente.
- Adicionar cuidadosamente 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado, homogeneizar.
- Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min.).
- Determinar la intensidad del color naranja obtenido en un espectrofotómetro a 490 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua desmineralizada.
- Calcular la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra a partir de una curva patrón preparada con el carbohidrato de interés en el intervalo del método (10-100µg de glucosa/mL), tratada de la misma manera que el problema.

Cálculos y expresión de resultados

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

$$y = mx + b$$

Donde “y” es la absorbancia, “x” es la concentración, “m” es la pendiente y “b” es la ordenada al origen. Despejando la ecuación en función de “x” y sustituyendo por términos.

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

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

$$\text{Concentración (g)} = \frac{\text{Concentración (ug)}}{1000 \times 1000}$$

Donde “Abs” es la absorbancia de la muestra y “FD” es el factor de dilución.

El porcentaje de azúcares totales en la muestra se calculó con la siguiente fórmula:

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

$$\text{azucares totales en base seca} = \frac{\% \text{ azucares totales en base húmeda}}{\% \text{ materia seca}} \times 100$$

4. 4. 7. Determinación del Contenido Estimado de Polifenoles. (2)(33)

(Ver Anexo N° 2, N°3 y N° 4)

Procedimiento.

- 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)

Cálculos y expresión de resultados.

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

$$y = mx + b$$

Donde “y” es la absorbancia, “x” es la concentración, “m” es la pendiente y “b” es la ordenada al origen. Despejando la ecuación en función de “x” y sustituyendo por términos.

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

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

$$\text{Concentración (g)} = \frac{\text{Concentración (ug)}}{1000 \times 1000}$$

Donde “Abs” es la absorbancia de la muestra y “FD” es el factor de dilución.

El porcentaje de polifenoles en la muestra se calculó con la siguiente fórmula:

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

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

4. 4 .8. Determinación de pH. (21)(30)(31)

(Ver Anexo N° 2, N°3 y N° 4)

Procedimiento para manejo de equipo.

Nota: la medida debe de efectuarse entre los 25 ± 2 °C.

- Pesar 1.0-1.5 g de muestra homogenizada en balanza analítica.
- Disolver la muestra en 50 mL de agua destilada y filtrar.
- Encender el pHmetro y calibrarlo con buffer pH 4 y pH 7.
- Sumergir el electrodo 2 cm dentro de la solución filtrada y mover suavemente.
- Realizar la lectura directa.
- Lavar el electrodo con agua destilada y colocar en solución buffer pH 7.
- Secar el electrodo con un paño suave después de apagar el pHmetro.

Cálculos y expresión de resultados.

Se reportó la media aritmética de las tres medidas realizadas a cada muestra.

$$\text{Promedio} = \frac{X_1 + X_2 + X_3}{3}$$

Donde X_n es la medida de pH respectiva.

4. 5. DETERMINACIONES MICROSCÓPICAS DE LA SEMILLA DE CACAO.

(40)

La caracterización morfológica en microscopía electrónica se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica (en CENSALUD-Universidad de El Salvador). Donde se realizó la comparación entre semillas de cacao correctamente fermentadas y secadas contra semillas de cacao con un mal proceso de fermentación y semillas recién extraídas del fruto.

(Ver Anexo N° 2, N°3 y N° 4)

Procedimiento.

Rehidratación de la muestra. (Sólo para muestras fermentadas y secadas)

-Colocar la muestra en Etanol puro durante 10 minutos. Repetir el procedimiento con las siguientes soluciones hidroalcohólicas: 90%, 70%, 50% y 30%.

Deshidratación, Fijación, Secado y Montaje.

-Colocar la muestra en un frasco con buffer fosfato sódico 0.1 M durante 48 horas.

-Cortar la muestra en secciones transversales de 0.5-1.0 mm de espesor.

-Colocar la muestra en fijador de Karnovsky durante 4 horas. (Se puede dejar toda la noche)

-Colocar la muestra durante 10 minutos en buffer fosfato sódico 0.1 M. Repetir este paso.

- Posteriormente fijar con Tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora.
- Colocar la muestra durante 10 minutos en buffer fosfato sódico 0.1 M. Repetir este paso.
- Colocar la muestra en Etanol al 30% durante 10 minutos. Repetir el procedimiento con las siguientes soluciones hidroalcohólicas: 50%, 70%, 90% y 100%.
- Colocar la muestra en una solución etanol-acetona (3:1) durante 10 minutos. Repetir el procedimiento con las siguientes proporciones etanol-acetona: (1:1), (1:3) y acetona pura.
- Cuidadosamente trasladar las muestras a los recipientes con microporos debidamente identificadas y mantenerlas sumergidas en acetona pura.
- Secar en un Secador de Punto Crítico usando Dióxido de carbono como líquido transicional.
- Realizar el montaje de las muestras en los portamuestras cilíndricos por medio de resina.
- Recubrir las muestras con una película de oro en el cobertor iónico por el método de sputtering, usando plasma de Argón durante 30 segundos.
- Realizar la observación en el microscopio electrónico de barrido.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

5. 1. Clasificación de las muestras.

Se recolectaron de 3 a 4 frutos de ocho diferentes genotipos de cacao, a continuación se procedió con la clasificación de los diferentes genotipos en tipos criollos, forasteros o trinitarios.





Cuadro N° 4. Resumen de clasificación morfogeográfica de las muestras de cacao para caracterización morfológica y físico-química.

CÓDIGO DE LA MUESTRA	CLASIFICACIÓN MORFOGEOGRÁFICA	UBICACIÓN
Genotipo 1 (N1 Y F1)	Acriollado verde	+13° 17' 21.54" -88° 29' 59.40"
Genotipo 2 (N2 Y F2)	Acriollado amarillo	+13° 17' 22.98" -88° 29' 56.88"
Genotipo 3 (N3 Y F3)	Acriollado amarillo	+13° 17' 22.26" -88° 29' 55.68"
Genotipo 4 (N4 Y F4)	Acriollado verde	+13° 17' 22.20" -88° 29' 54.66"
Genotipo 5 (N5 Y F5)	Trinitario	+13° 17' 23.40" -88° 29' 54.66"
Genotipo 6 (N6 Y F6)	Acriollado amarillo	+13° 17' 23.46" -88° 30' 0.90"
Genotipo 7 (N7 Y F7)	Acriollado verde	+13° 17' 55.14" -88° 29' 48.36"
Genotipo 8 (N8 Y F8)	Forastero	+13° 17' 3.90" -88° 29' 45.18"





Nota: Cada genotipo esta compuesto por dos muestras la muestra N (semillas no fermentadas) y la F (semillas fermentadas y secadas). La muestra M1 se obtuvo del genotipo 1.

Las muestras se clasificaron según las características del fruto como forma, color, presencia de constricción basal, ápice, rugosidad superficial y arreglo de semillas de cacao. (5)(16)(19)(Ver Anexo N° 5)

Cuadro Nº 5. Clasificación morfogeográfica basada en el fruto del genotipo. (5)(16)(19)

Genotipo	Características	Clasificación
	<p>Forma: ovoide Color: verde Constricción basal: ligera Ápice: mamiforme Rugosidad de la superficie: intensa Profundidad de los surcos primarios: intermedia Arreglo de semillas: Poco Ordenado</p>	<p>Acriollado verde</p>
	<p>Forma: ovoide Color: verde (inmaduro); amarillo Constricción basal: ausente Ápice: mamiforme Rugosidad de la superficie: ligera Profundidad de los surcos primarios: superficial Arreglo de semillas: Muy Desordenado</p>	<p>Acriollado amarillo</p>
	<p>Forma: ovoide Color: verde (inmaduro); amarillo Constricción basal: ligera Ápice: obtusa Rugosidad de la superficie: ligera Profundidad de los surcos primarios: intermedia Arreglo de granos: Poco ordenado</p>	<p>Acriollado amarillo</p>
	<p>Forma: ovoide Color: verde Constricción basal: ligera Ápice: mamiforme Rugosidad de la superficie: intermedia Profundidad de los surcos primarios: profundo Arreglo de semillas: Poco Ordenado</p>	<p>Acriollado verde</p>

Cuadro N° 5. Continuación.

Genotipo	Características	Clasificación
	<p>Forma: oblonga Color: verde morado (inmaduro); amarillo rojo Constricción basal: ligera Ápice: obtuso Rugosidad de la superficie: intermedia Profundidad de los surcos primarios: profundo Arreglo de semillas: Poco Ordenado</p>	<p>Trinitario</p>
	<p>Forma: ovoide Color: verde (inmaduro); amarillo Constricción basal: ausente Ápice: mamiforme Rugosidad de la superficie: ligera Profundidad de los surcos primarios: superficial Arreglo de semillas: Desordenado</p>	<p>Acriollado amarillo</p>
	<p>Forma: oblonga Color: verde Constricción basal: pronunciada Ápice: atenuada Rugosidad de la superficie: intensa Profundidad de los surcos primarios: profundo Arreglo de semillas: Ordenado</p>	<p>Acriollado verde</p>
	<p>Forma: esferoide Color: verde (inmaduro); amarillo Constricción basal: ausente Ápice: mamiforme Rugosidad de la superficie: ligera Profundidad de los surcos primarios: superficial Arreglo de semillas: Ordenado</p>	<p>Forastero</p>

5. 2. Resultados de determinaciones fisicoquímicas.

Se determinó el contenido de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, azúcares totales, estimado de polifenoles y pH de ocho diferentes genotipos de cacao previamente caracterizados genética y morfológicamente (8) en la Hacienda San José de La Carrera en Usulután. Los valores presentados en los gráficos son los promedios de las 3 valoraciones realizadas. (Ver Anexo N° 6)

5. 2. 1. Determinación del contenido de humedad.

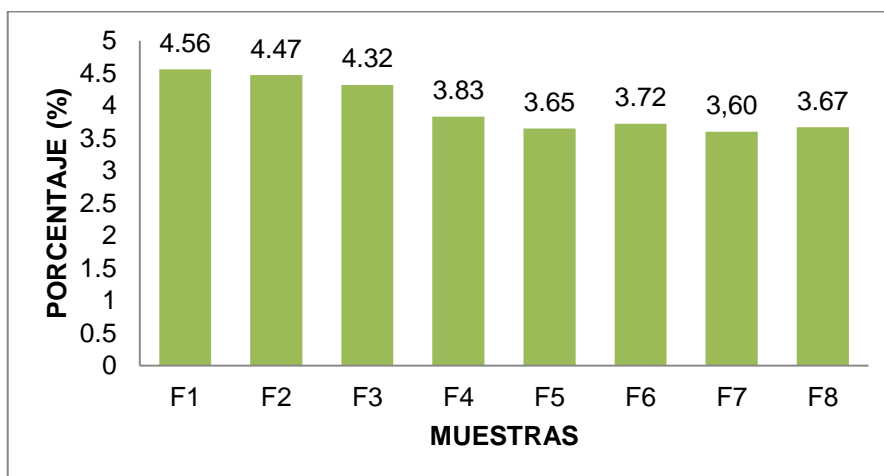


Figura N° 4. Promedio del contenido de humedad en cada muestra de semillas fermentadas y secadas.

La figura N° 4 ilustra la muestra con mayor contenido de humedad fue F1 mientras que la muestra con un menor contenido de humedad fue la muestra F7 con valores del 4.56% y 3.60% respectivamente. El promedio de contenido

de humedad fue del 3.98% según se observa en la Tabla N° 3 donde se presentan los promedios de los resultados de los análisis fisicoquímicos.

Teniendo en cuenta las especificaciones de la norma más influyente en la región, la cual corresponde a la norma mexicana NMX-F-352-S-1980 y especificaciones en estudios anteriores (6)(15), las muestras analizadas cumplen con la especificación de contenido de humedad con un máximo de 4.56% reportado en la muestra F1. Así pues, las muestras poseen una limitante al crecimiento de microorganismos siempre y cuando se mantengan estas condiciones durante toda su manipulación. (21)(30)(31)

Respecto al genotipo, las muestras acriolladas F1, F2, F3, F4 y F6 tendieron a un contenido de humedad más alto que las muestras F5 y F8 que corresponden a tipo trinitario y forastero. La única excepción fue la muestra F7 acriollada que resultó tener el valor más bajo de contenido de humedad. El genotipo del cacao tiene influencia en la cantidad de humedad de las semillas de cacao siendo el tipo criollo el que mayor contenido de humedad reporta.

5. 2. 1. 1. Contenido de materia seca.

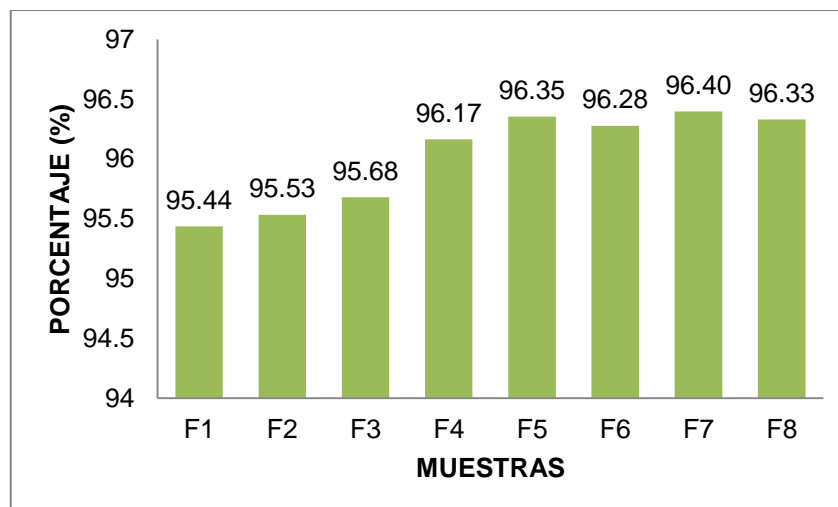


Figura N° 5. Promedio del contenido de materia seca en cada muestra de semillas fermentadas y secadas.

La figura N° 5 ilustra la muestra con mayor contenido de materia seca fue la muestra F7 mientras que la muestra con un menor contenido de humedad fue la muestra F1 con valores del 96.40% y 95.44% respectivamente. Se puede decir que el contenido de materia seca cumple con lo que se esperaba, ya que este valor es la diferencia del contenido de humedad.⁽⁶⁾⁽¹⁵⁾

Respecto al genotipo, las muestras acriolladas F1, F2, F3, F4 y F6 tienden a tener un contenido de materia seca más bajo que las muestras F5 y F8 que corresponden a tipo trinitario y forastero. La única excepción es la muestra F7 acriollada que resultó tener el valor más alto de contenido de materia seca. El genotipo influye la cantidad de materia seca en semillas de cacao fermentadas siendo el tipo criollo el que menor contenido ha reportado.

5. 2. 2. Determinación del contenido de cenizas.

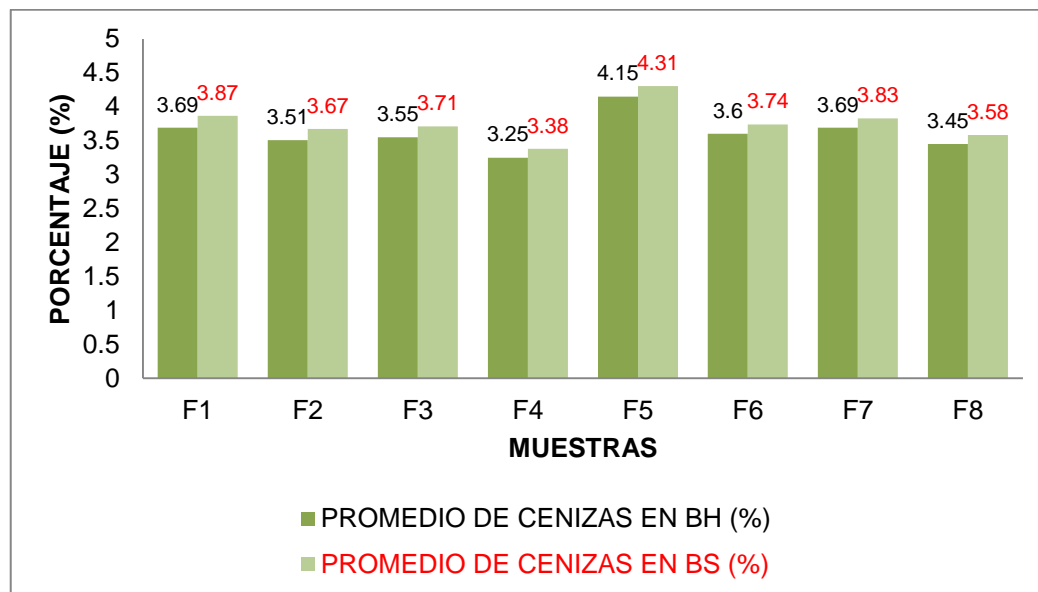


Figura N° 6. Promedio del contenido de cenizas en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.

La figura N° 6 ilustra la muestra con mayor contenido de cenizas fue F5 mientras que la muestra con un menor contenido de cenizas fue F4 con valores del 4.15% (4.31% en BS) y 3.25% (3.38% en BS) respectivamente. Los valores obtenidos se encuentran dentro de los valores esperados. (26)

Respecto a la relación con el genotipo, no se encontró ninguna diferencia entre los valores de contenido de ceniza en las muestras acriolladas F1, F2, F3, F4, F6 y F7 con la muestra forastero F8. Pero, la muestra F5 tipo trinitario obtuvo el mayor valor de contenido de ceniza. El genotipo no influye en el contenido de ceniza en las semillas de cacao.

5. 2. 3. Determinación de Contenido de Proteína Cruda.

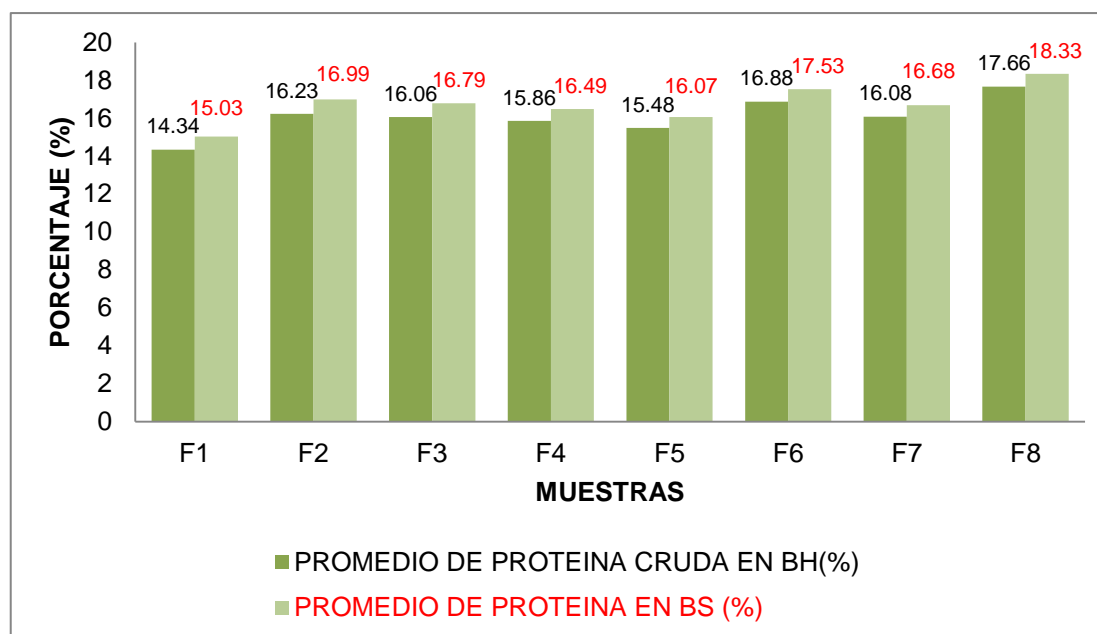


Figura N° 7. Promedio del contenido de proteína cruda en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.

La figura N° 7 ilustra la muestra con mayor contenido de proteína cruda fue F8 mientras que la muestra con un menor contenido proteína cruda fue la muestra F1 con valores del 17.66% (18.33% en BS) y 14.34% (15.03% en BS) respectivamente. Los valores obtenidos se encuentran dentro de los valores esperados. (25) El alto valor promedio de proteína cruda es indicador de la buena calidad alimenticia de la semilla.

Respecto al genotipo, las muestras acriolladas F2, F3, F4, F6 y F7 mantienen un contenido de proteína cruda similar aunque los tipos acriollados verdes tienen un valor de menor que los acriollados amarillos. Igualmente la muestra

F5 que corresponde a tipo trinitario se halla dentro de un valor similar a las de tipo acriollado. La única excepción es la muestra F1 acriollada que resultó tener el valor más bajo de contenido de proteína cruda. La muestra tipo forastero F8 tiene el mayor contenido de proteína cruda. El genotipo influencia el contenido de proteína cruda en semillas de cacao, los tipos acriollados amarillos tienen un mayor contenido de proteína que los acriollados verdes o trinitarios, mientras que los de tipo forastero tienen el mayor contenido de proteína cruda de todos.

5. 2. 4. Determinación de Contenido de Grasa Cruda.

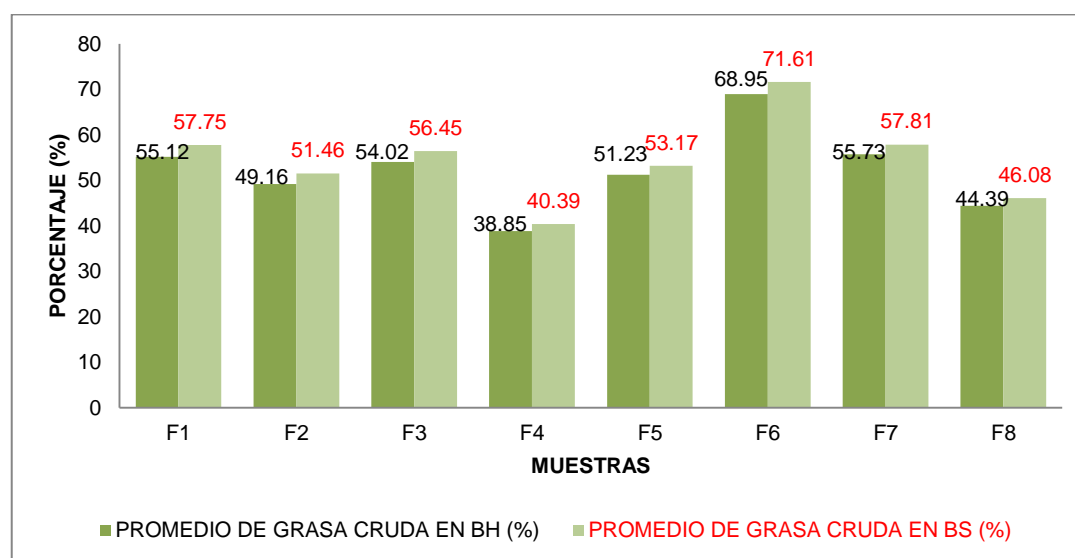


Figura N° 8. Promedio del contenido de grasa cruda en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.

La figura N° 8 ilustra la muestra con mayor contenido de grasa cruda fue F6 con valores del 68.95% (71.61% en BS), mientras que la muestra con un menor contenido de grasa cruda fue F4 y 38.85% (40.39% en BS). Los valores

obtenidos se encuentran dentro de los valores esperados. (3)(25) El alto valor promedio de grasa cruda es indicador de la buena calidad alimenticia de la semilla.

Respecto al genotipo, las muestras acriolladas F1, F2, F3, F4, F6 y F7 presentan en general un mayor contenido de grasa cruda lo cual es característico del tipo criollo; la muestra F5 de tipo forastero tiene un bajo valor de grasa cruda característico del tipo forastero mientras que la muestra F8 que corresponde al tipo trinitario tiene un valor intermedio de grasa cruda en comparación con el tipo criollo y forastero lo cual es característico del tipo trinitario. El genotipo influencia el contenido de grasa cruda en las semillas de cacao de los cuales, el tipo criollo es el que tiene los valores más altos de contenido de grasa cruda. (3)(15)(26)

5. 2. 5. Determinación de Contenido de Fibra Cruda.

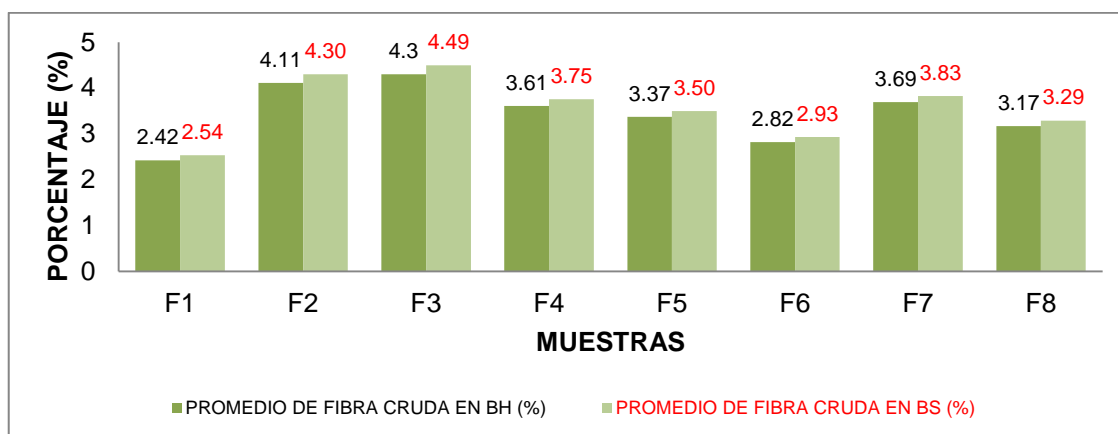


Figura N° 9. Promedio del contenido de fibra cruda en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.

La figura N° 9 ilustra la muestra con mayor contenido de fibra cruda fue F3 mientras que la muestra con un menor contenido de fibra cruda fue F1 con valores del 4.11% (4.30% en BS) y 2.42% (2.54% en BS) respectivamente. Los valores se mantienen dentro de las especificaciones de estudios anteriores. (26)

Respecto a los genotipos, no se encontraron diferencias características entre las diferentes muestras por tanto el tipo no afecta significativamente el valor de fibra cruda en las semillas de cacao.

5. 2. 6. Determinación de Contenido de Azúcares Totales.

Curva patrón de Glucosa:

Tabla N° 1. Concentración real de Glucosa en los tubos en microgramos y su lectura en absorbancia.

TUBO	CONCENTRACION (microgramos)	ABSORBANCIA
1	0.000	0.000
2	10.800	0.010
3	21.600	0.027
4	43.200	0.046
5	64.800	0.060
6	86.400	0.087
7	108.000	0.099

Con estos datos se procedió a graficar la absorbancia vs la concentración de glucosa en Excel.

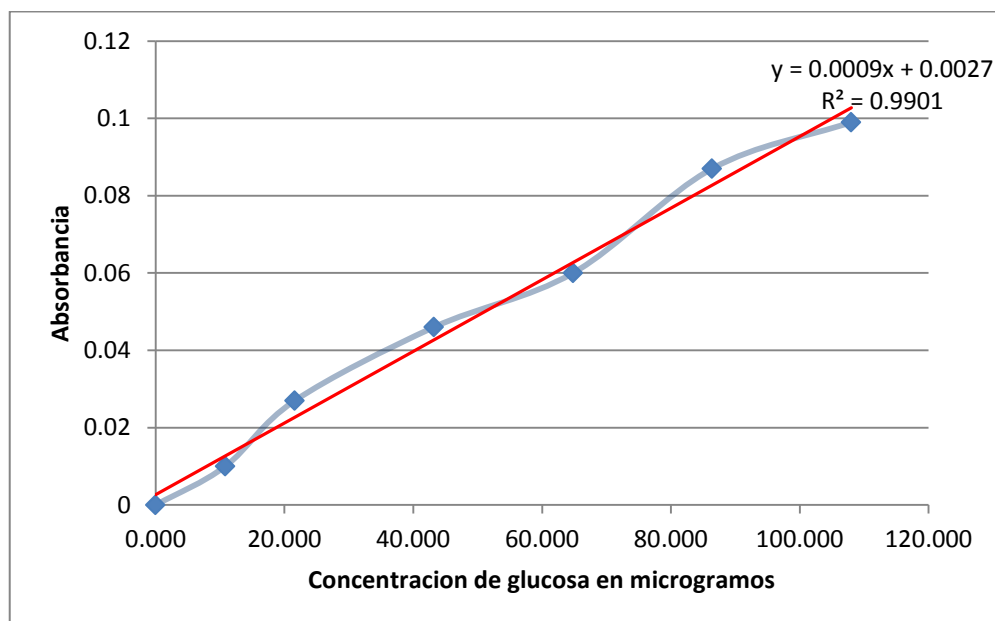


Figura N° 10. Absorbancia vs la Concentración de Glucosa del patrón.

Con el mismo programa se obtuvo la regresión lineal (en rojo) de la serie de datos (en azul) y la ecuación correspondiente es:

$$y = 0.0009x + 0.0027$$

Donde “y” es la absorbancia y “x” la concentración de glucosa.

Despejando la ecuación en función de “x” y sustituyendo por términos.

$$x = \frac{(y - 0.0027)}{0.0009}$$

$$\text{Concentración (ug)} = \frac{(\text{Abs} - 0.0027)}{0.0009} \times \text{FD}$$

Ejemplo:

$$\text{Concentración (ug)} = \frac{(2.498 - 0.0027)}{0.0009} \times 4 = 2778.556 \text{ ug}$$

$$\text{Concentración (g)} = \frac{2778.556 \text{ (ug)}}{1000 \times 1000} = 0.0111 \text{ g}$$

$$\% \text{ azúcares totales en base húmeda} = \frac{0.0111 \text{ (g)} \times 100}{2.2365 \text{ (g)}} = 0.4959\%$$

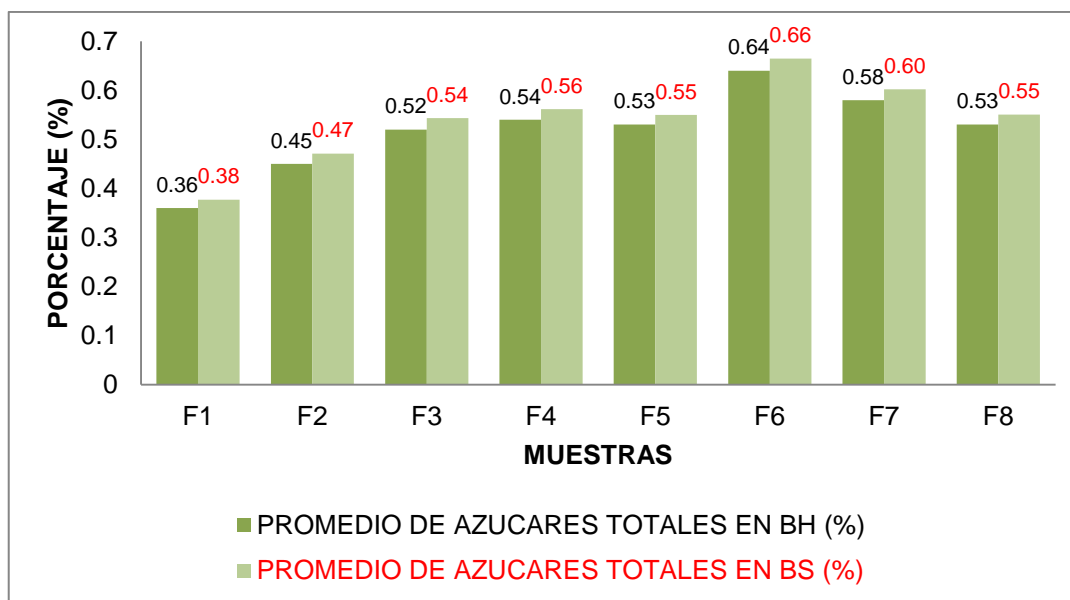


Figura N° 11. Promedio del contenido de azúcares totales en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.

La figura N° 11 ilustra la muestra con mayor contenido de azúcares totales fue F6 mientras que la muestra con un menor contenido de azúcares totales fue F1 con valores del 0.64% (0.66% en BS) y 0.36% (0.38% en BS) respectivamente. Esto concuerda con la bibliografía que reporta un rango de 0.8 a 1.73 %; es decir que las muestras se encuentran dentro de lo normal. (4)

Respecto al genotipo, las muestras acriolladas F3, F4, F6 y F7 presentan el mayor contenido de azúcares totales mientras que la muestra de forastero F5 y la muestra tipo trinitario F8 se encuentran en valores similares. Aunque las

muestras acriolladas F1 y F2 obtuvieron los contenidos más bajos por tanto, el genotipo no parece ser influyente directo en el contenido de azúcares totales.

5. 2. 7. Determinación de Contenido Estimado de Polifenoles.

Curva patrón de Catequina:

Tabla N° 2. Concentración real de Catequina en los tubos en microgramos y su lectura en absorbancia.

TUBO	CONCENTRACION (microgramos)	ABSORBANCIA
1	0	0.000
2	11.35	0.020
3	22.7	0.046
4	45.4	0.130
5	68.1	0.247
6	90.8	0.346
7	113.5	0.414

Con estos datos se procedió a graficar la absorbancia vs la concentración de Catequina en Excel.

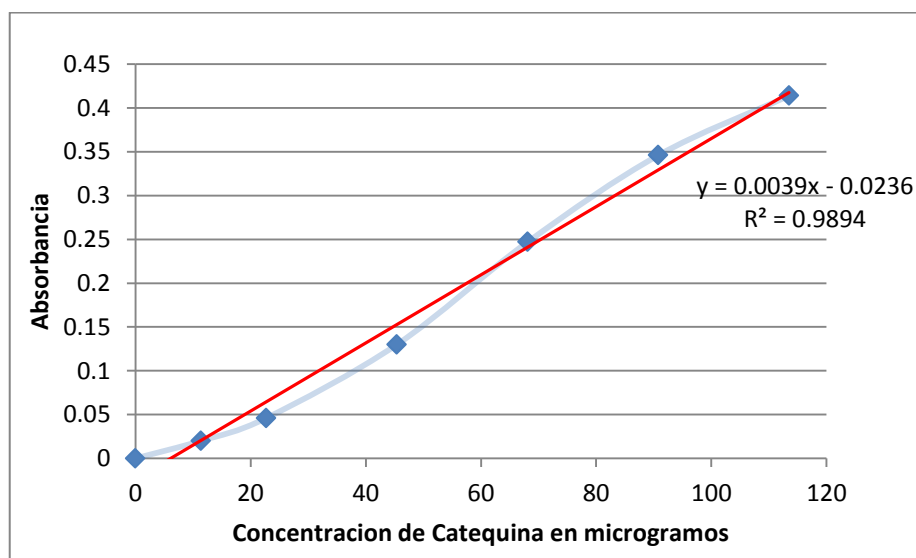


Figura N° 12. Absorbancia vs la Concentración de Catequina del patrón.

Con el mismo programa se obtuvo la regresión lineal (en rojo) de la serie de datos (en azul) y la ecuación correspondiente es:

$$y = 0.0039x - 0.0236$$

Donde “y” es la absorbancia y “x” la concentración de Catequina.

Despejando la ecuación en función de “x” y sustituyendo por términos.

$$x = \frac{(y - 0.0236)}{0.0039}$$

$$\text{Concentración (ug)} = \frac{(\text{Abs} - 0.0236)}{0.0039} \times \text{FD}$$

Ejemplo:

$$\text{Concentración (ug)} = \frac{(0.704 - 0.0236)}{0.0039} \times \frac{100}{0.3} = 186.5641 \text{ ug}$$

$$\text{Concentración (g)} = \frac{186.5641 \text{ (ug)}}{1000 \times 1000} = 0.00622 \text{ g}$$

$$\% \text{ polifenoles base húmeda} = \frac{0.00622 \text{ (g)} \times 100}{1.2833 \text{ (g)}} = 4.8659\%$$

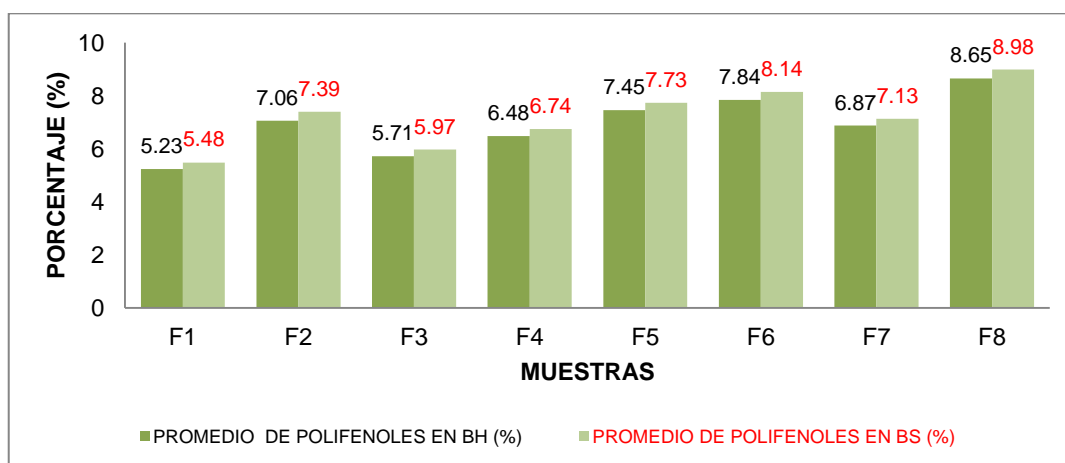


Figura N° 13. Promedio del contenido estimado de polifenoles en cada muestra de semillas fermentadas y secadas en BH y BS.

La figura N° 13 ilustra la muestra con mayor contenido de polifenoles fue F8 mientras que la muestra con un menor contenido de polifenoles fue F1 con valores del 8.65% (8.98% en BS) y 5.23% (5.48% en BS) respectivamente. Los valores se mantienen dentro de las especificaciones en estudios anteriores que reportan un rango de 7.4 a 8.5%. (15)(26)

Respecto al genotipo, las muestras acriolladas F1, F2, F3, F4, F6 y F7 mantienen el contenido de polifenoles en valores similares; mientras la muestra tipo trinitario también se mantiene dentro de estos valores; la muestra tipo forastero F8 es la que mayor porcentaje de polifenoles reportó tal y como se esperaba por su alto contenido en taninos. El contenido de polifenoles es afectado por el genotipo de las muestras. (15)

5. 2. 8. Determinación de pH.

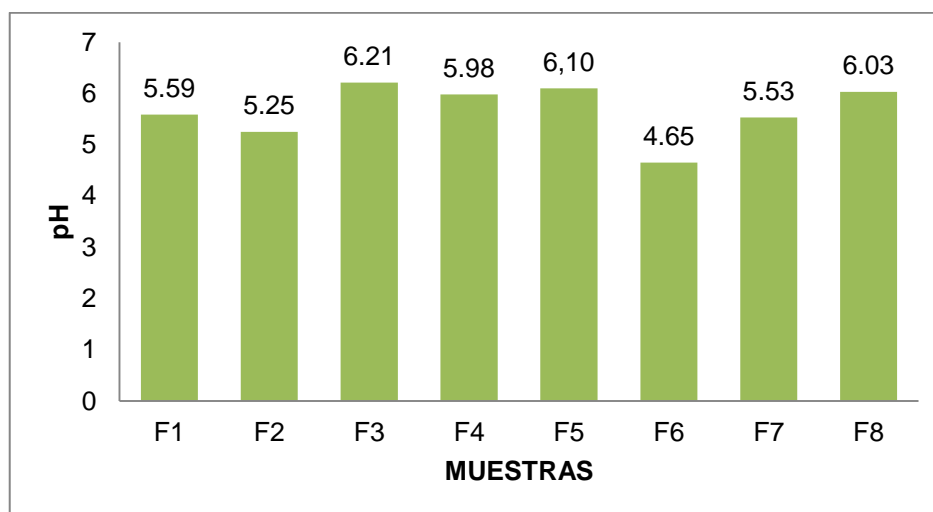


Figura N° 14. Promedio del pH en cada muestra de semillas fermentadas y secadas.

La figura N° 14 ilustra la muestra con mayor pH fue F3 mientras que la muestra con un menor contenido de pH fue F6 con valores del 6.21 y 4.65 respectivamente. Estos se consideran un valor de pH alto según las especificaciones. (5)(15)

Respecto al genotipo, el valor más alto de pH corresponde a una muestra acriollada F3 y el valor más bajo también corresponde a una muestra acriollada F6 mientras la muestra tipo forastero F8 y la muestra tipo trinitario tienen valores intermedios. Así pues, el genotipo no parece influenciar el valor de pH de las semillas de cacao fermentadas.

5. 3. Interpretación de resultados de análisis físico-químicos.

Tabla N° 3. Resumen de los resultados de las determinaciones físico-químicas en base húmeda y base seca realizadas a los ocho genotipos de cacao.

Muestra	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína Cruda (%)	Grasa Cruda (%)	Fibra Cruda (%)	Azúcares Totales (%)	Polifenoles (%)	pH
F1	4.56	3.69	14.34	55.12	2.42	0.36	5.23	5.59
F2	4.47	3.51	16.23	49.16	4.11	0.45	7.06	5.25
F3	4.32	3.55	16.06	54.02	4.30	0.52	5.71	6.21
F4	3.83	3.25	15.86	38.85	3.61	0.54	6.48	5.98
F5	3.65	4.15	15.48	51.23	3.37	0.53	7.45	6.10
F6	3.72	3.60	16.88	68.95	2.82	0.64	7.84	4.65
F7	3.60	3.69	16.08	55.73	3.69	0.58	6.87	5.53
F8	3.67	3.45	17.66	44.39	3.17	0.53	8.65	6.03
Promedio	3.98	3.61	16.07	52.18	3.44	0.52	6.91	5.67
Desviación estándar	0.40	0.26	0.97	8.90	0.63	0.08	1.11	0.53

Muestra	Materia seca (%)	Cenizas (%)	Proteína Cruda (%)	Grasa Cruda (%)	Fibra Cruda (%)	Azúcares Totales (%)	Polifenoles (%)
F1	95.44	3.87	15.03	57.75	2.54	0.38	5.48
F2	95.53	3.67	16.99	51.46	4.30	0.47	7.39
F3	95.68	3.71	16.79	56.45	4.49	0.54	5.97
F4	96.17	3.38	16.49	40.39	3.75	0.56	6.74
F5	96.35	4.31	16.07	53.17	3.50	0.55	7.73
F6	96.28	3.74	17.53	71.61	2.93	0.66	8.14
F7	96.40	3.83	16.68	57.81	3.83	0.60	7.13
F8	96.33	3.58	18.33	46.08	3.29	0.55	8.98
Promedio	96.02	3.76	16.74	54.34	3.58	0.54	7.19
Desviación estándar	0.40	0.27	0.98	9.25	0.66	0.09	1.14

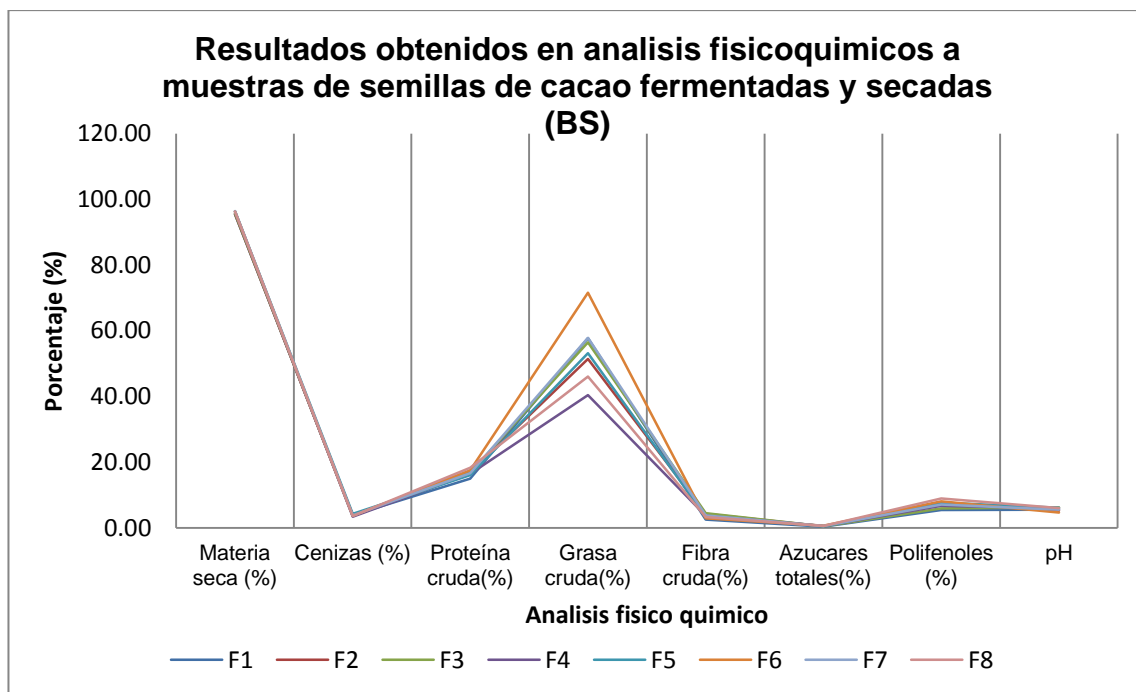
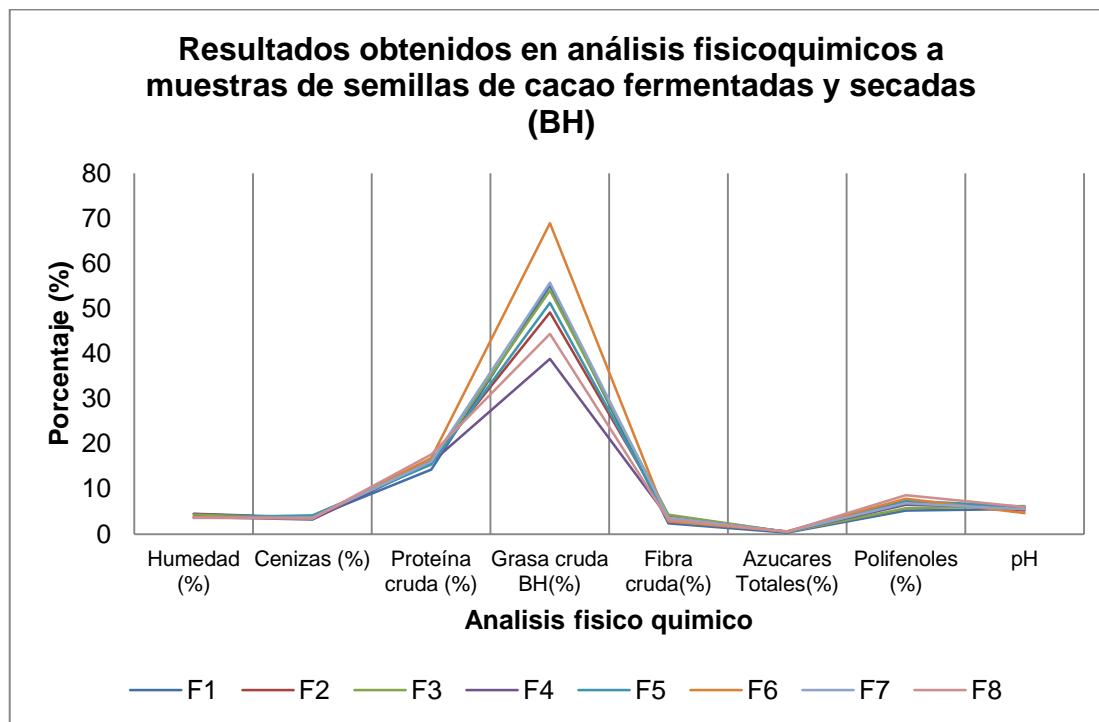


Figura N° 15. Gráficos que muestran los resultados promedio obtenidos en los análisis físico-químicos en BH y BS realizados en muestras de semillas de cacao fermentadas y secadas.

Como se observa en la Figura N° 15 los picos más altos corresponden a los constituyentes encontrados en mayor proporción en las muestras de cacao y también corresponden a los parámetros de mayor desviación entre sí (a excepción del contenido de materia seca), los cuales son el porcentaje de grasa cruda como parámetro más alto, el contenido de proteína cruda y el contenido de polifenoles. El contenido de grasa cruda y polifenoles son parámetros ampliamente descritos en estudios anteriores como caracterizadores de los tipos de cacao. (15)(16)(26)

Los parámetros de humedad y cenizas aunque no son mayoritarios, brindan información sobre la calidad de los procesos de fermentación empleados y son importantes parámetros de calidad para la exportación del producto. (6) Los demás parámetros analizados como contenido de fibra, proteínas y azúcares totales aunque no son reglamentarios para la exportación del producto proporcionan una importante información nutricional del producto para los comerciantes del cacao y fabricantes de chocolates.

Además, el tipo de cacao influye en los parámetros fisicoquímicos estudiados de la siguiente forma:

-El contenido de humedad es influido por el genotipo, siendo los criollos los que mayor porcentaje de contenido de humedad presentan, esto es importante al

momento de almacenar el producto ya que la humedad propicia el desarrollo de microorganismos.

-El contenido de materia seca es influido por el genotipo al ser dependiente del contenido de humedad.

-El contenido de cenizas no es influido por el genotipo y es un factor que depende de los factores edafo-climáticos del cultivo de cacao. Este factor informa el conjunto de nutrientes elementales en la semilla de cacao.

-El contenido de proteína cruda es influido por el genotipo, siendo el forastero el que mayor porcentaje de contenido de proteína cruda presenta, seguido del acriollado amarillo; esto es importante como factor de nutrición ya que es favorable en la alimentación consumir alimentos altos en proteínas.

-El contenido de grasa cruda es influido por el genotipo, siendo el tipo criollo el que mayor porcentaje presenta. Este factor puede ser empleado como factor de calidad ya que los chocolates provenientes de tipo criollo son de alta calidad.

(3)(15)(20)

-El contenido de fibra cruda no es influido por el genotipo sino más bien depende de los factores edafo-climáticos del cultivo de cacao.

-El contenido de azúcares totales no parece ser influido por el genotipo de cacao sino por las condiciones de fermentación y factores edafo-climáticos del cultivo siendo la influencia más importante las condiciones de fermentación ya que una semilla de cacao con un buen proceso de fermentación transforma sus

azúcares por reacciones de Maillard a pirazinas las cuales constituyen parte del aroma característico. (27)

-El contenido estimado de polifenoles es influido por el genotipo, siendo el tipo forastero el de mayor porcentaje lo cual concuerda con lo esperado y resulta importante pues entre los polifenoles se hallan los taninos, los cuales producen un sabor amargo en el chocolate que se prepare con las semillas de este cacao. (3)(15)

-El contenido de pH no parece ser influido por el genotipo de cacao sino por las condiciones de fermentación y factores edafo-climáticos del cultivo. El pH es un valor muy importante en la conservación de las semillas de cacao ya que un valor de pH bajo protege a las semillas de la proliferación de microorganismos y debido a que se obtuvieron valores altos de pH, el producto fermentado en las condiciones descritas es susceptible a la contaminación microbiológica. (3)(15)

5. 4. Coeficiente de Correlación entre las variables físico-químicas.

Tabla N° 4. Coeficiente de correlación (r) entre las variables físico-químicas del estudio.

Variables	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Fibra cruda (%)	Azúcares Totales (%)	Polifenoles (%)	pH
Humedad (%)	NA	0.1713	0.5159	0.0052	0.0995	0.8084	0.6993	0.0339
Cenizas (%)	NA	NA	0.3727	0.3751	0.2002	0.0367	0.0386	0.0680
Proteína cruda (%)	NA	NA	NA	0.0165	0.2194	0.6490	0.8251	0.1419
Grasa cruda (%)	NA	NA	NA	NA	0.3322	0.3091	0.0070	0.6981
Fibra cruda (%)	NA	NA	NA	NA	NA	0.1539	0.0785	0.3384
Azúcares Totales (%)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.5856	0.2412
Polifenoles (%)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1936
pH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Nota: NA significa No Aplica.

Adicionalmente, se realizó un estudio sobre la correlación entre las variables para determinar si había alguna relación entre las variables que se pudiera deducir. Estos datos se obtuvieron con el programa Excel utilizando la fórmula de coeficiente de correlación.

Formula empleada en Excel:

$$= \text{COEFICIENTE.R2}(\text{conocido_y}, \text{conocido_x})$$

Donde, el “conocido_y” corresponde a los ocho promedios de la variable vertical en la tabla y “conocido_x” corresponde a los ocho promedios de la variable horizontal.

$$r = \text{RAIZ}(\text{COEFICIENTE.R2})$$

Teniendo en cuenta que:

- Si $r=1$, existe una correlación positiva perfecta.
- Si $r = -1$, existe una correlación negativa perfecta.
- Si $0 < r < 1$, existe una correlación positiva.
- Si $r = 0$, no existe relación lineal.
- Si $-1 < r < 0$, existe una correlación negativa.
- Si $|r| \leq 0.3$, la correlación es muy débil.
- Si $0.3 < |r| \leq 0.5$, la correlación es débil
- Si $0.5 < |r| \leq 0.75$, la correlación es fuerte. Un valor mayor se considera como correlación muy fuerte.

5. 4. 1. Interpretación de la relación entre las variables analizadas.

La correlación positiva muestra una relación directamente proporcional entre las variables y una negativa indica una relación inversamente proporcional mientras que la fuerza de la correlación determina que tanta es la intensidad de esta relación.

Según la Tabla N° 4, se observaron dos correlaciones positivas muy fuertes correspondientes a contenido de humedad-azúcares totales y contenido de proteína cruda-estimado de polifenoles. Es decir que en las semillas fermentadas y secadas de cacao, el aumento de humedad incrementa el contenido de azúcares totales y el aumento del contenido estimado de polifenoles parece estar muy relacionado con el contenido de proteínas en las semillas.

Además, se observaron cinco correlaciones positivas fuertes que corresponden a contenido de humedad-proteína cruda, contenido de proteína cruda-azúcares totales, contenido de humedad-estimado de polifenoles, contenido de azúcares totales-estimado de polifenoles y contenido de grasa cruda-pH. Las correlaciones restantes son positivas débiles o muy débiles. Es decir que el aumento del contenido de proteína cruda, azúcares totales y polifenoles está relacionado al aumento del contenido de humedad en las semillas. Con excepción del contenido de ceniza y fibra cruda que no es afectado por ninguno de las demás factores. Mientras que el aumento del contenido de grasa cruda se relaciona al aumento de pH.

Esto concuerda con la teoría, en la cual se establece que la composición química es influida no solo por el origen del cacao (genotipo) sino también es influida por el proceso de beneficiado. La relación entre humedad y azúcares

totales se puede deber a una disminución en la caramelización de los azúcares debido a la cantidad de humedad presente en la semilla durante el secado en el proceso de beneficiado del cacao. Aunque esto no resulte realmente desfavorable hacia la calidad de cacao, se puede regular la cantidad de humedad en las semillas durante el proceso de secado para favorecer la presencia de azúcares totales o su caramelización así como de los demás constituyentes que se ven influidos por la humedad. (3)(12)(15)(16)(28)(39)

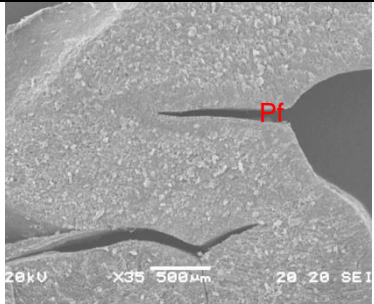
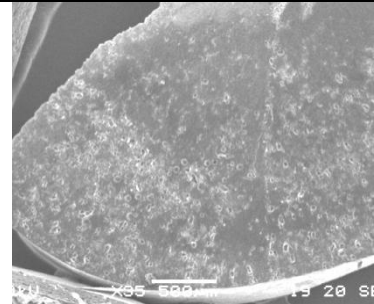
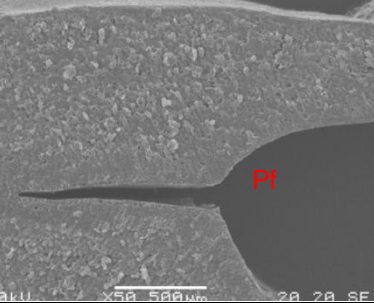
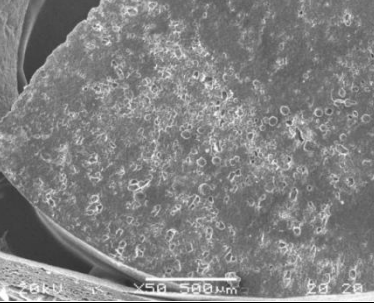
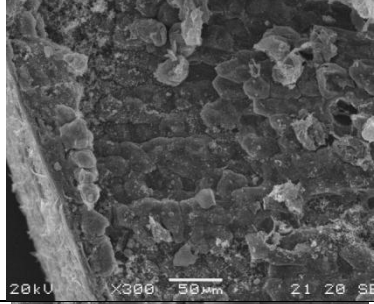
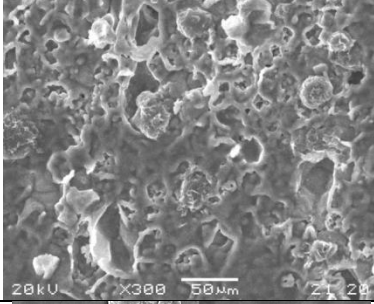
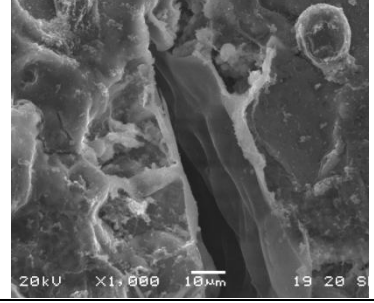
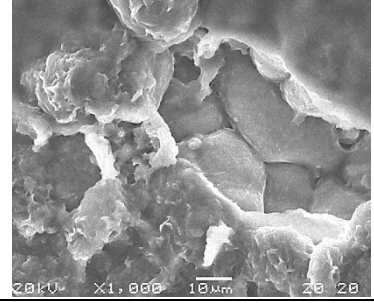
5. 5. Resultados de Microscopia Electrónico de Barrido.

Se realizó el análisis del parénquima en el mesófilo de los cotiledones de semillas no fermentadas y fermentadas de *T. cacao*. Se observó en MEB utilizando el microscopio electrónico JEOL JSM-5510 a bajo aumento (35X) y a alto aumento (4,500X). Para visualizar las características a nivel de tejido y definir tipos celulares.

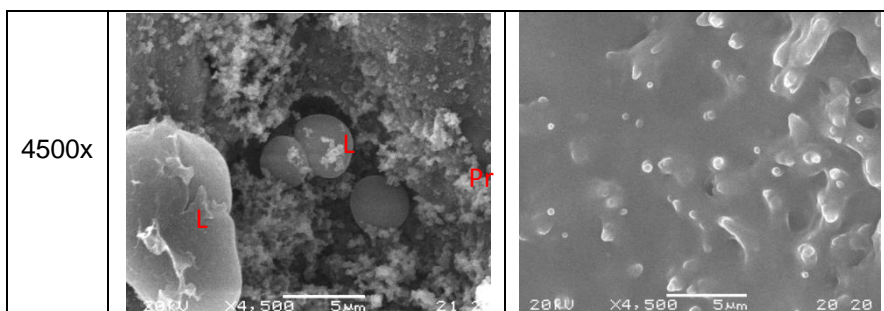
A nivel de parénquima se observaron varios tipos de células que contenían: lípidos (L), proteínas (Pr) y polifenoles (Pf); que se tuvieron en cuenta para el análisis microultraestructural y comparación con los resultados físico-químicos.

5. 5. 1. Microfotografías del genotipo 1.

Cuadro N° 6. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 1.

Aumento	No Fermentada	Fermentada
35x		
50x		
300x		
1000x		

Cuadro N° 6. Continuación.



Los aumentos a 35x y 50x corresponden a la vista panorámica de la semilla en la cual se puede apreciar su textura y conformación. En el cuadro anterior, las posiciones de las células polifenólicas (26) que se encuentran en los bordes externos se hallan alineadas de forma perpendicular, esto es más notable en las muestras de semillas no fermentadas a un aumento de 50x. Además se observó que los cortes de semillas no fermentadas presentan menos poros y células seccionadas que los cortes de las semillas fermentadas.

A un aumento de 300x, los cortes de semillas no fermentadas muestran células agrupadas y material particulado de tipo micro esférico mientras que los cortes de semillas fermentadas muestran ausencia del material micro esférico.(26) La porosidad entre el tejido celular aumentó en los cortes de semillas fermentadas.

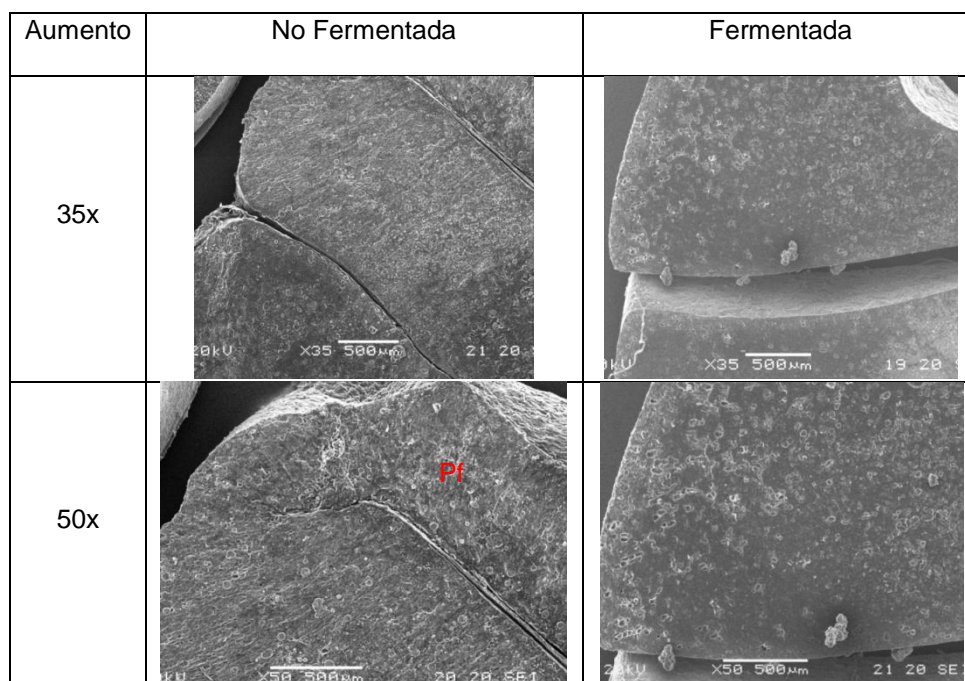
A un aumento de 1000x y 4500x, los cortes de semillas no fermentadas presentaron el material particulado micro esférico adherido a la superficie de glóbulos de 5 a 10 micras; este material particulado está ausente en las muestras de semillas fermentadas y en su lugar se encuentra una estructura

coagulada dentro de las células. Los glóbulos encontrados corresponden a glóbulos lipídicos, mientras que el material particulado micro esférico corresponde a las proteínas intercelulares. (22)(26)(38)

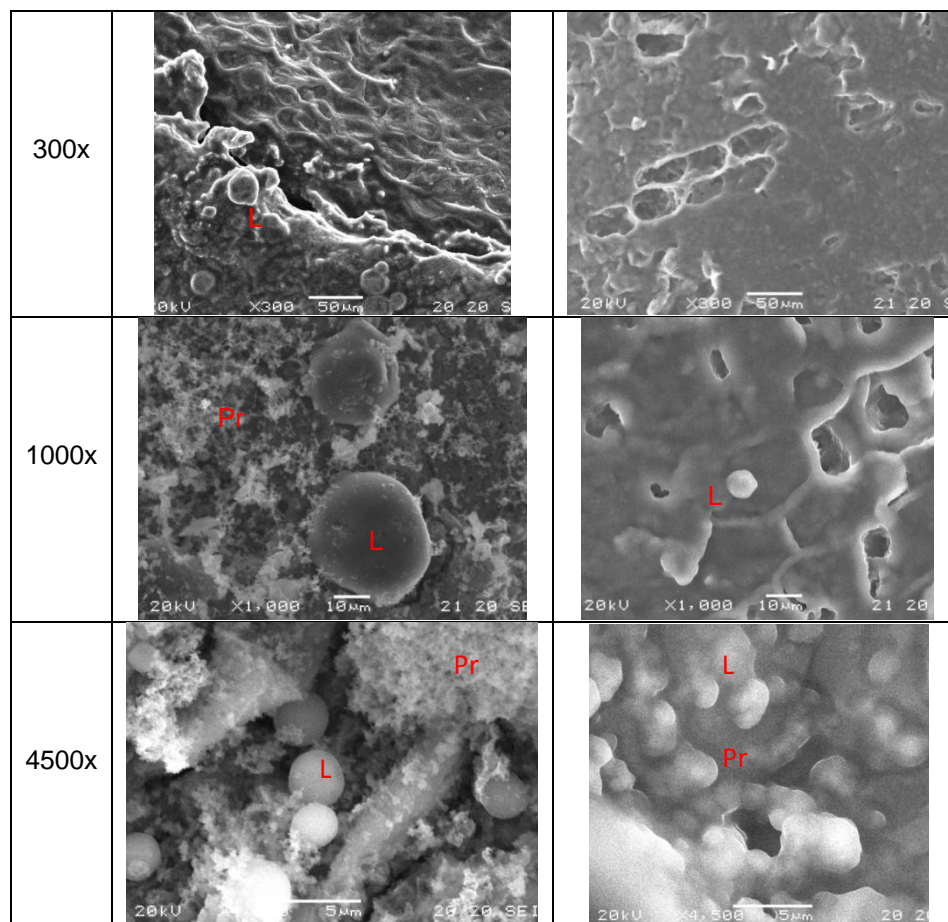
Todas las diferencias encontradas entre las semillas no fermentadas y las fermentadas se deben al proceso de beneficiado del cacao en especial a la fermentación y secado en el cual las semillas sufren reacciones químicas que deforman la estructura celular produciendo porosidad en los tejidos por la evaporación del agua intra e intercelular así como la coagulación de proteínas y globulos lipídicos. (22)(26)(38)

5. 5. 2. Microfotografías del genotipo 2.

Cuadro N° 7. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 2.



Cuadro N° 7. Continuación.



Los aumentos a 35x y 50x corresponden a la vista panorámica de la semilla en la cual se puede apreciar su textura y conformación. En el cuadro anterior, las posiciones de las células polifenólicas (26) que se encuentran en los bordes externos se hallan alineadas de forma perpendicular, esto es más notable en las muestras de semillas no fermentadas a un aumento de 50x. Además se observó que los cortes de semillas no fermentadas presentan menos poros y células seccionadas que los cortes de las semillas fermentadas.

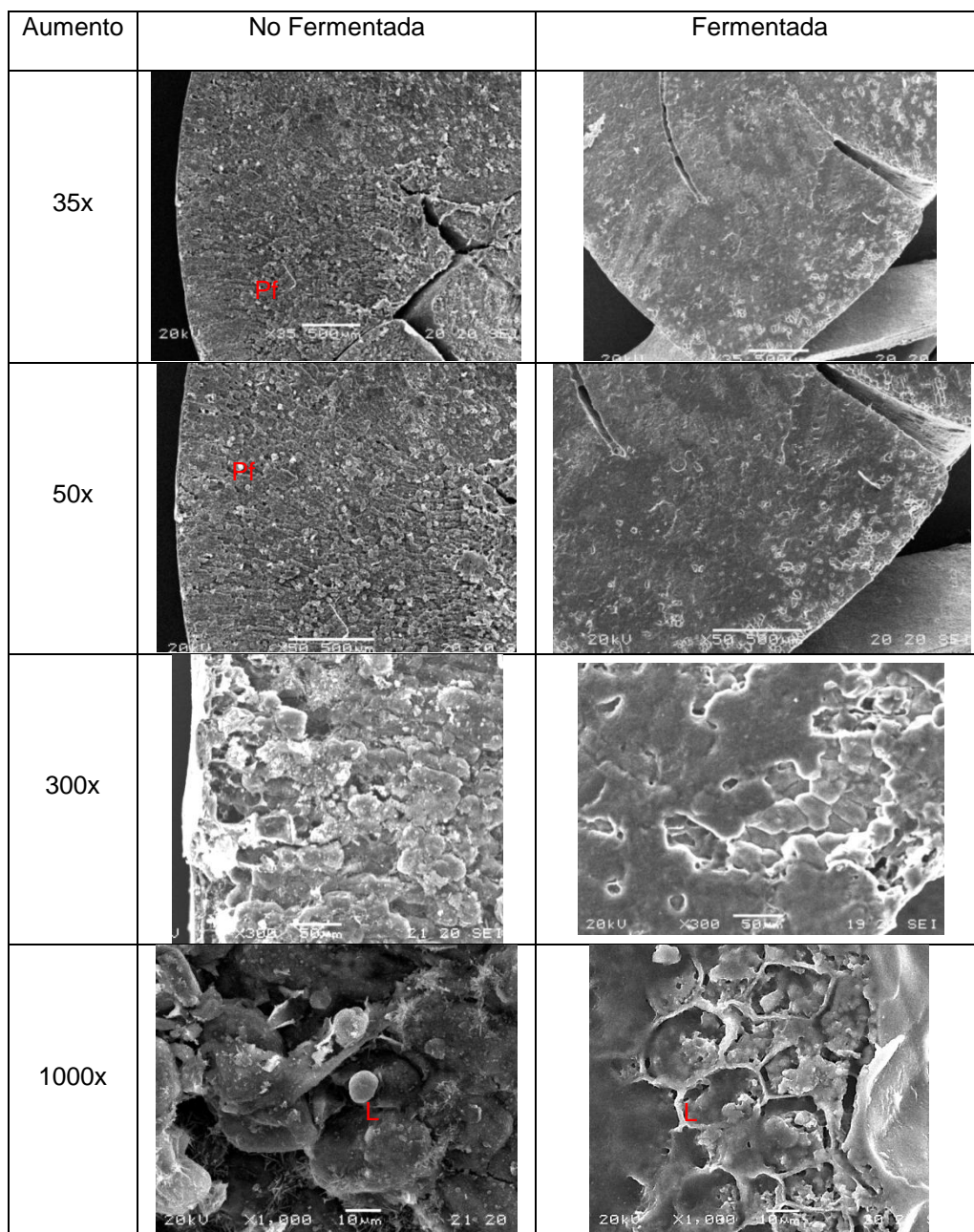
A un aumento de 300x, los cortes de semillas no fermentadas muestran células agrupadas y material particulado de tipo micro esférico mientras que los cortes de semillas fermentadas muestran ausencia del material micro esférico.⁽²⁶⁾ La porosidad entre el tejido celular aumentó en los cortes de semillas fermentadas.

A un aumento de 1000x y 4500x, los cortes de semillas no fermentadas presentaron el material particulado micro esférico adherido a la superficie de glóbulos de 5 a 10 micras; este material particulado está ausente en las muestras de semillas fermentadas y en su lugar se encuentra una estructura coagulada dentro de las células. Los glóbulos encontrados corresponden a glóbulos lipídicos, mientras que el material particulado micro esférico corresponde a las proteínas intercelulares. ⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽³⁸⁾

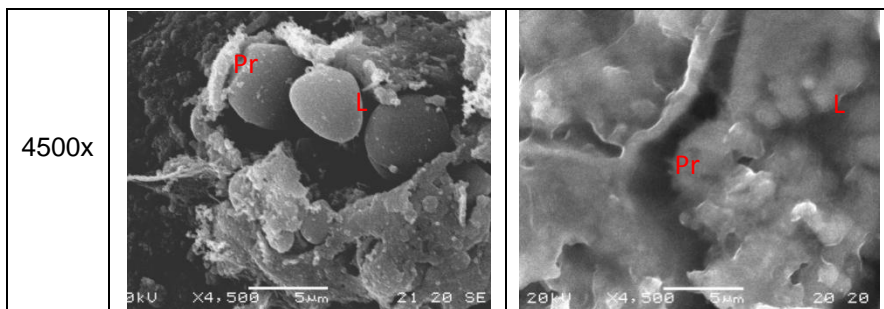
Todas las diferencias encontradas entre las semillas no fermentadas y las fermentadas se deben al proceso de beneficiado del cacao en especial a la fermentación y secado en el cual las semillas sufren reacciones químicas que deforman la estructura celular produciendo porosidad en los tejidos por la evaporación del agua intra e intercelular así como la coagulación de proteínas y globulos lipídicos. ⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽³⁸⁾

5. 5. 3. Microfotografías del genotipo 3.

Cuadro N° 8. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 3.



Cuadro N° 8. Continuación.



Los aumentos a 35x y 50x corresponden a la vista panorámica de la semilla en la cual se puede apreciar su textura y conformación. En el cuadro anterior, las posiciones de las células polifenólicas (26) que se encuentran en los bordes externos se hallan alineadas de forma perpendicular, esto es más notable en las muestras de semillas no fermentadas a un aumento de 50x. Además se observó que los cortes de semillas no fermentadas presentan menos poros y células seccionadas que los cortes de las semillas fermentadas.

A un aumento de 300x, los cortes de semillas no fermentadas muestran células agrupadas y material particulado de tipo micro esférico mientras que los cortes de semillas fermentadas muestran ausencia del material micro esférico.(26) La porosidad entre el tejido celular aumentó en los cortes de semillas fermentadas.

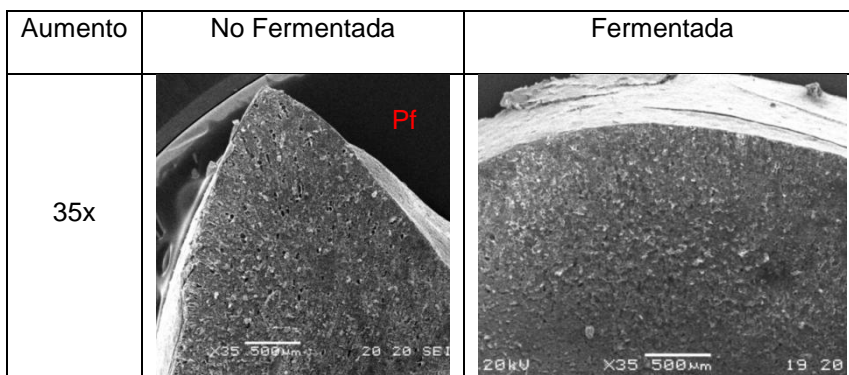
A un aumento de 1000x y 4500x, los cortes de semillas no fermentadas presentaron el material particulado micro esférico adherido a la superficie de glóbulos de 5 a 10 micras; este material particulado está ausente en las muestras de semillas fermentadas y en su lugar se encuentra una estructura

coagulada dentro de las células. Los glóbulos encontrados corresponden a glóbulos lipídicos, mientras que el material particulado micro esférico corresponde a las proteínas intercelulares. (22)(26)(38)

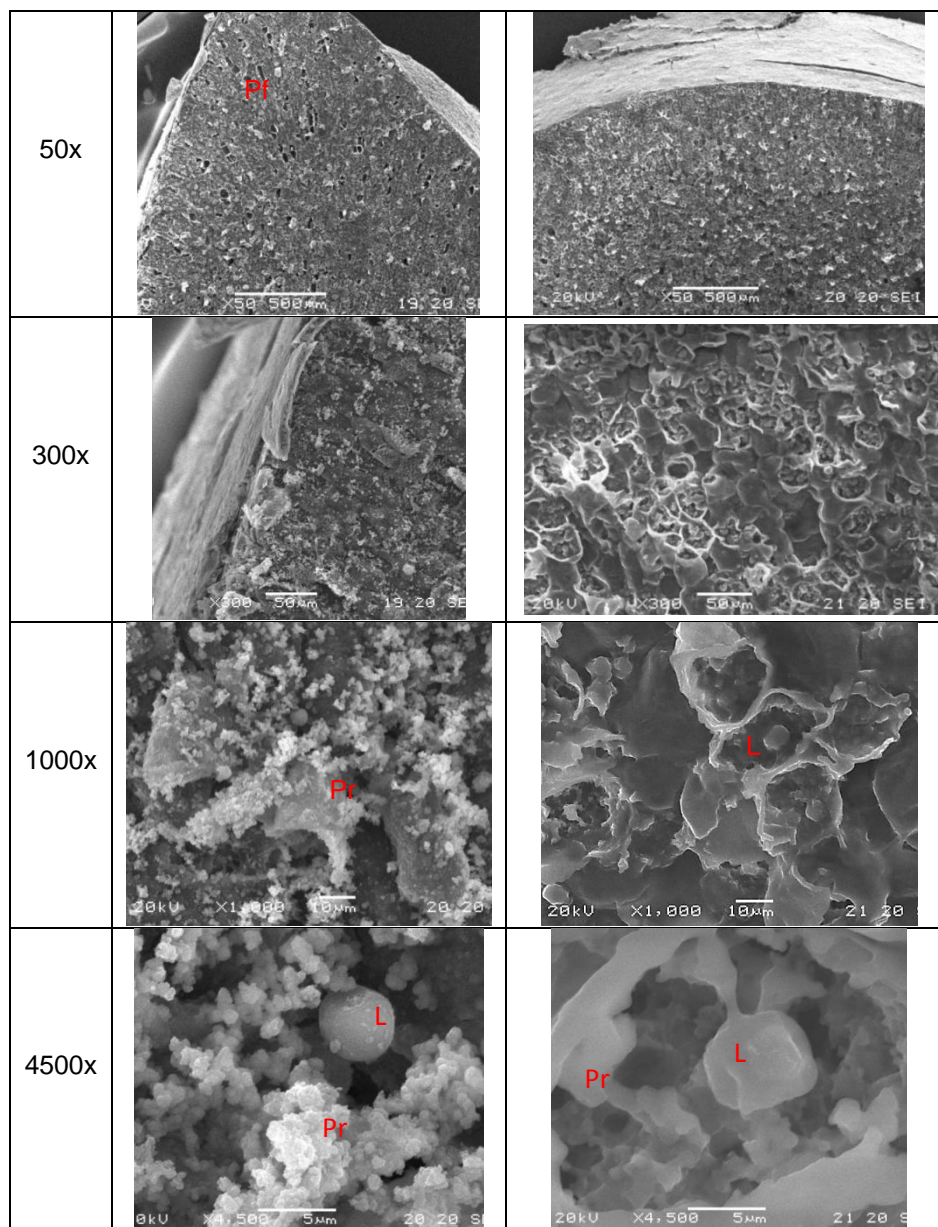
Todas las diferencias encontradas entre las semillas no fermentadas y las fermentadas se deben al proceso de beneficiado del cacao en especial a la fermentación y secado en el cual las semillas sufren reacciones químicas que deforman la estructura celular produciendo porosidad en los tejidos por la evaporación del agua intra e intercelular así como la coagulación de proteínas y globulos lipídicos. (22)(26)(38)

5. 5. 4. Microfotografías del genotipo 4.

Cuadro N° 9. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 4.



Cuadro N° 9. Continuación.



Los aumentos a 35x y 50x corresponden a la vista panorámica de la semilla en la cual se puede apreciar su textura y conformación. En el cuadro anterior, las posiciones de las células polifenólicas (26) que se encuentran en los bordes externos se hallan alineadas de forma perpendicular, esto es más notable en

las muestras de semillas no fermentadas a un aumento de 50x. Además se observó que los cortes de semillas no fermentadas presentan menos poros y células seccionadas que los cortes de las semillas fermentadas.

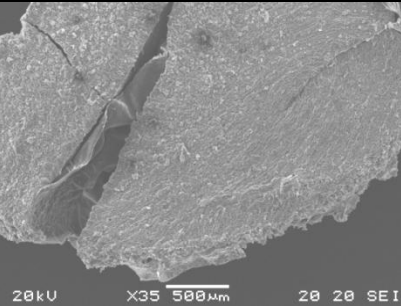
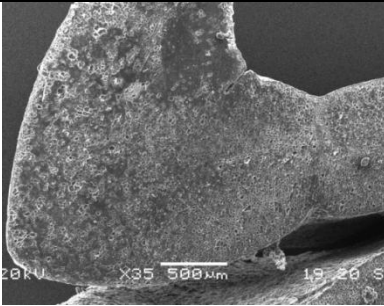
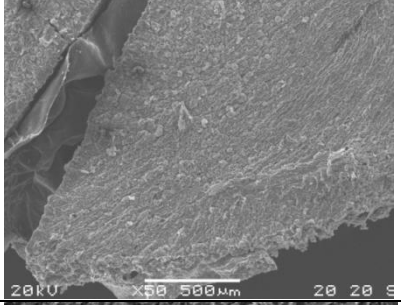
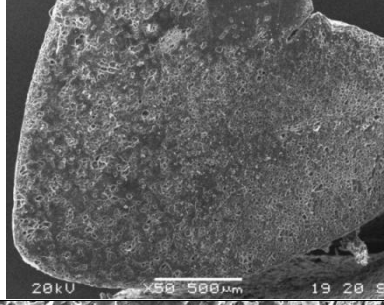
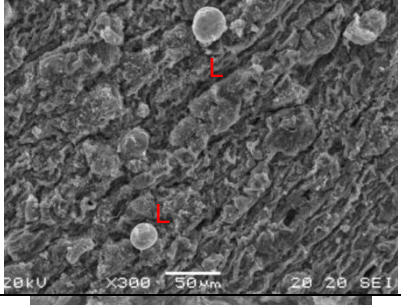
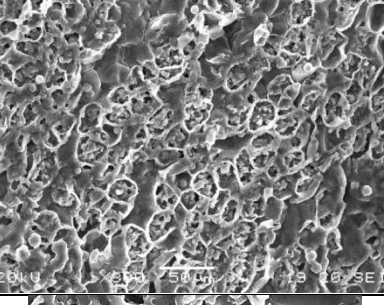
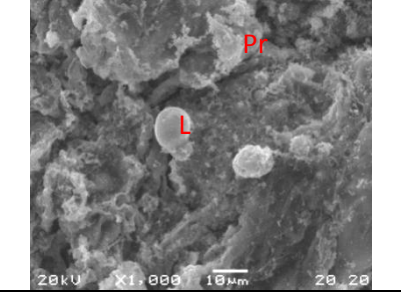
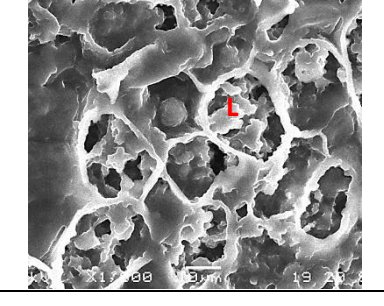
A un aumento de 300x, los cortes de semillas no fermentadas muestran células agrupadas y material particulado de tipo micro esférico mientras que los cortes de semillas fermentadas muestran ausencia del material micro esférico.⁽²⁶⁾ La porosidad entre el tejido celular aumentó en los cortes de semillas fermentadas.

A un aumento de 1000x y 4500x, los cortes de semillas no fermentadas presentaron el material particulado micro esférico adherido a la superficie de glóbulos de 5 a 10 micras; este material particulado está ausente en las muestras de semillas fermentadas y en su lugar se encuentra una estructura coagulada dentro de las células. Los glóbulos encontrados corresponden a glóbulos lipídicos, mientras que el material particulado micro esférico corresponde a las proteínas intercelulares. ⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽³⁸⁾

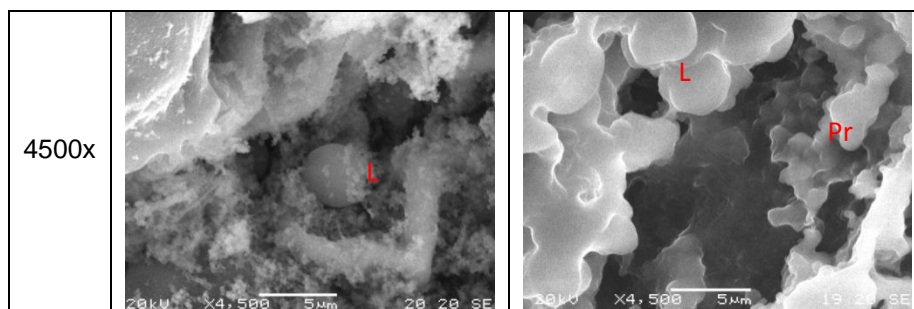
Todas las diferencias encontradas entre las semillas no fermentadas y las fermentadas se deben al proceso de beneficiado del cacao en especial a la fermentación y secado en el cual las semillas sufren reacciones químicas que deforman la estructura celular produciendo porosidad en los tejidos por la evaporación del agua intra e intercelular así como la coagulación de proteínas y globulos lipídicos. ⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽³⁸⁾

5. 5. 5. Microfotografías del genotipo 5.

Cuadro N° 10. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 5.

Aumento	No Fermentada	Fermentada
35x		
50x		
300x		
1000x		

Cuadro N° 10. Continuación.



Los aumentos a 35x y 50x corresponden a la vista panorámica de la semilla en la cual se puede apreciar su textura y conformación. En el cuadro anterior, las posiciones de las células polifenólicas (26) que se encuentran en los bordes externos se hallan alineadas de forma perpendicular, esto es más notable en las muestras de semillas no fermentadas a un aumento de 50x. Además se observó que los cortes de semillas no fermentadas presentan menos poros y células seccionadas que los cortes de las semillas fermentadas.

A un aumento de 300x, los cortes de semillas no fermentadas muestran células agrupadas y material particulado de tipo micro esférico mientras que los cortes de semillas fermentadas muestran ausencia del material micro esférico. (26) La porosidad entre el tejido celular aumentó en los cortes de semillas fermentadas.

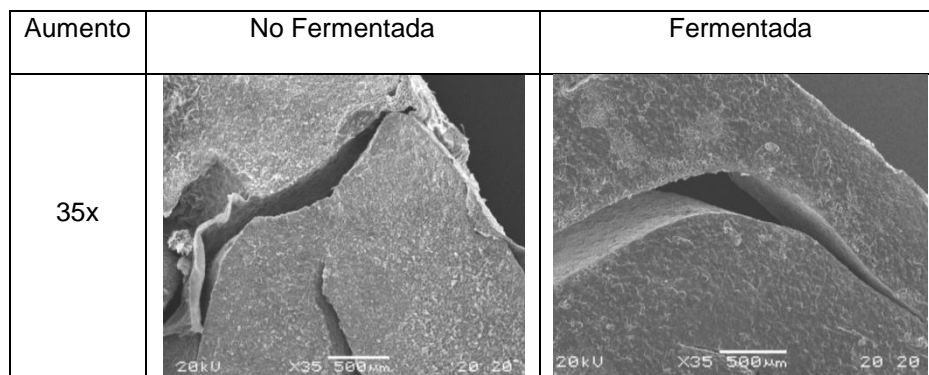
A un aumento de 1000x y 4500x, los cortes de semillas no fermentadas presentaron el material particulado micro esférico adherido a la superficie de glóbulos de 5 a 10 micras; este material particulado está ausente en las muestras de semillas fermentadas y en su lugar se encuentra una estructura

coagulada dentro de las células. Los glóbulos encontrados corresponden a glóbulos lipídicos, mientras que el material particulado micro esférico corresponde a las proteínas intercelulares. (22)(26)(38)

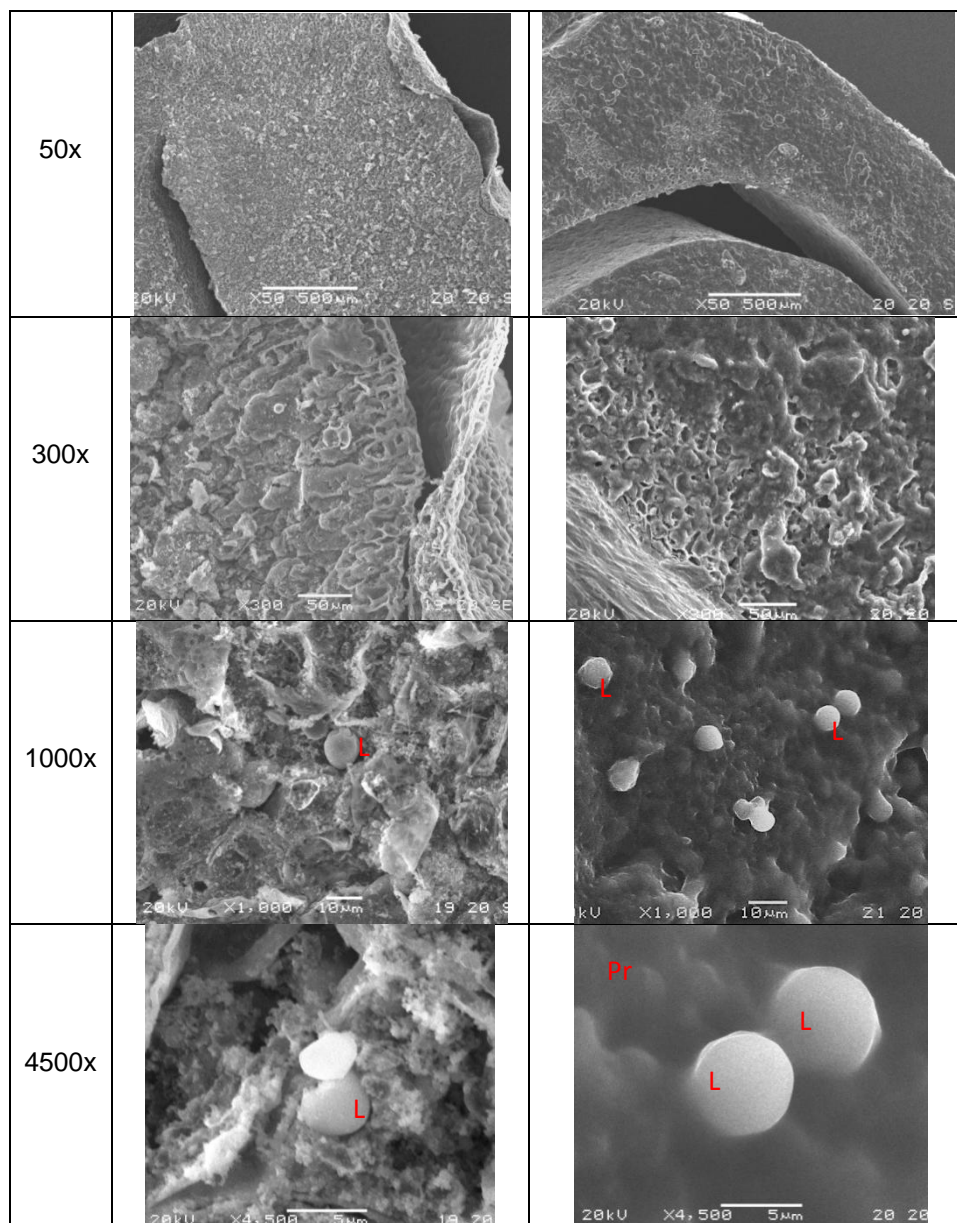
Todas las diferencias encontradas entre las semillas no fermentadas y las fermentadas se deben al proceso de beneficiado del cacao en especial a la fermentación y secado en el cual las semillas sufren reacciones químicas que deforman la estructura celular produciendo porosidad en los tejidos por la evaporación del agua intra e intercelular así como la coagulación de proteínas y globulos lipídicos. (22)(26)(38)

5. 5. 6. Microfotografías del genotipo 6.

Cuadro N° 11. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 6.



Cuadro N° 11. Continuación.



Los aumentos a 35x y 50x corresponden a la vista panorámica de la semilla en la cual se puede apreciar su textura y conformación. En el cuadro anterior, las posiciones de las células polifenólicas (26) que se encuentran en los bordes externos se hallan alineadas de forma perpendicular, esto es más notable en

las muestras de semillas no fermentadas a un aumento de 50x. Además se observó que los cortes de semillas no fermentadas presentan menos poros y células seccionadas que los cortes de las semillas fermentadas.

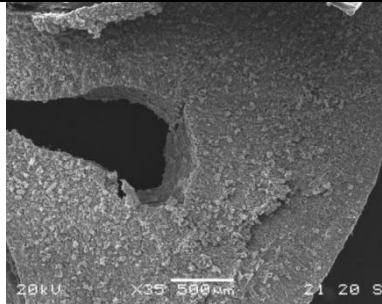
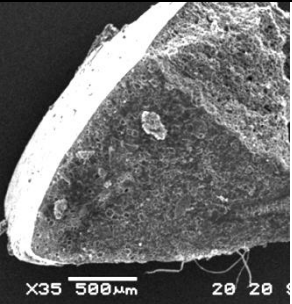
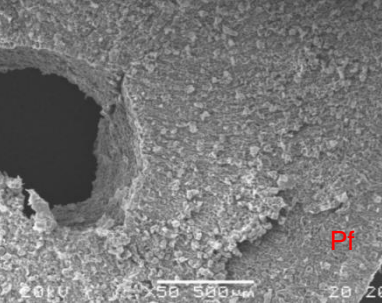
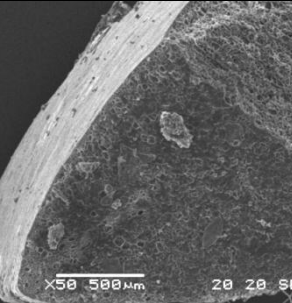
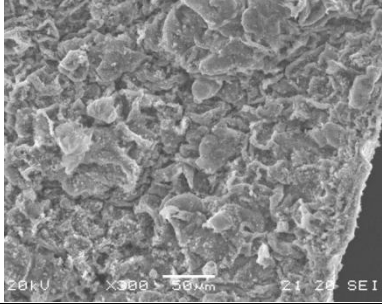
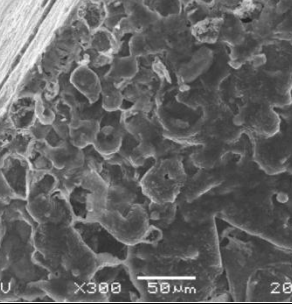
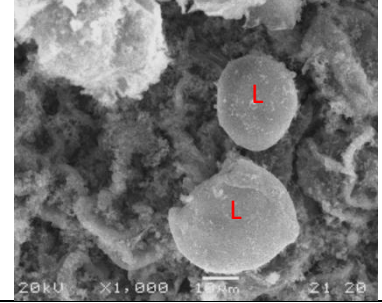
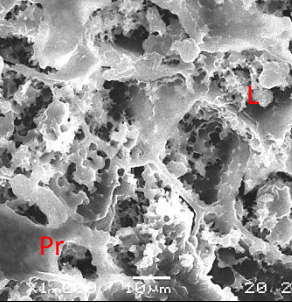
A un aumento de 300x, los cortes de semillas no fermentadas muestran células agrupadas y material particulado de tipo micro esférico mientras que los cortes de semillas fermentadas muestran ausencia del material micro esférico.⁽²⁶⁾ La porosidad entre el tejido celular aumentó en los cortes de semillas fermentadas.

A un aumento de 1000x y 4500x, los cortes de semillas no fermentadas presentaron el material particulado micro esférico adherido a la superficie de glóbulos de 5 a 10 micras; este material particulado está ausente en las muestras de semillas fermentadas y en su lugar se encuentra una estructura coagulada dentro de las células. Los glóbulos encontrados corresponden a glóbulos lipídicos, mientras que el material particulado micro esférico corresponde a las proteínas intercelulares. ⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽³⁸⁾

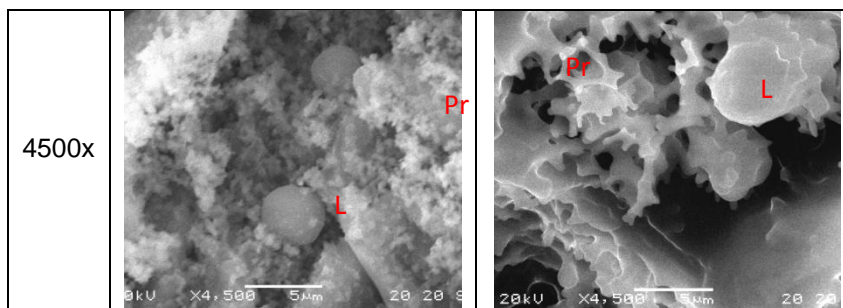
Todas las diferencias encontradas entre las semillas no fermentadas y las fermentadas se deben al proceso de beneficiado del cacao en especial a la fermentación y secado en el cual las semillas sufren reacciones químicas que deforman la estructura celular produciendo porosidad en los tejidos por la evaporación del agua intra e intercelular así como la coagulación de proteínas y globulos lipídicos. ⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽³⁸⁾

5. 5. 7. Microfotografías del genotipo 7.

Cuadro N° 12. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 7.

Aumento	No Fermentada	Fermentada
35x		
50x		
300x		
1000x		

Cuadro N° 12. Continuación.



Los aumentos a 35x y 50x corresponden a la vista panorámica de la semilla en la cual se puede apreciar su textura y conformación. En el cuadro anterior, las posiciones de las células polifenólicas ⁽²⁶⁾ que se encuentran en los bordes externos se hallan alineadas de forma perpendicular, esto es más notable en las muestras de semillas no fermentadas a un aumento de 50x. Además se observó que los cortes de semillas no fermentadas presentan menos poros y células seccionadas que los cortes de las semillas fermentadas.

A un aumento de 300x, los cortes de semillas no fermentadas muestran células agrupadas y material particulado de tipo micro esférico mientras que los cortes de semillas fermentadas muestran ausencia del material micro esférico. ⁽²⁶⁾ La porosidad entre el tejido celular aumentó en los cortes de semillas fermentadas.

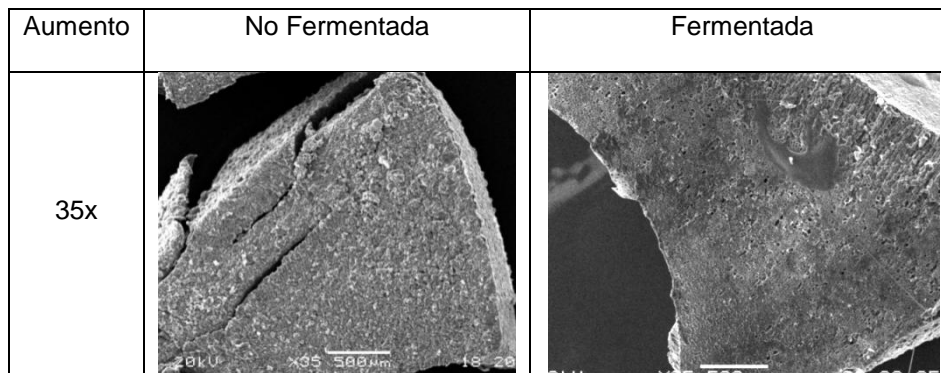
A un aumento de 1000x y 4500x, los cortes de semillas no fermentadas presentaron el material particulado micro esférico adherido a la superficie de glóbulos de 5 a 10 micras; este material particulado está ausente en las muestras de semillas fermentadas y en su lugar se encuentra una estructura

coagulada dentro de las células. Los glóbulos encontrados corresponden a glóbulos lipídicos, mientras que el material particulado micro esférico corresponde a las proteínas intercelulares. (22)(26)(38)

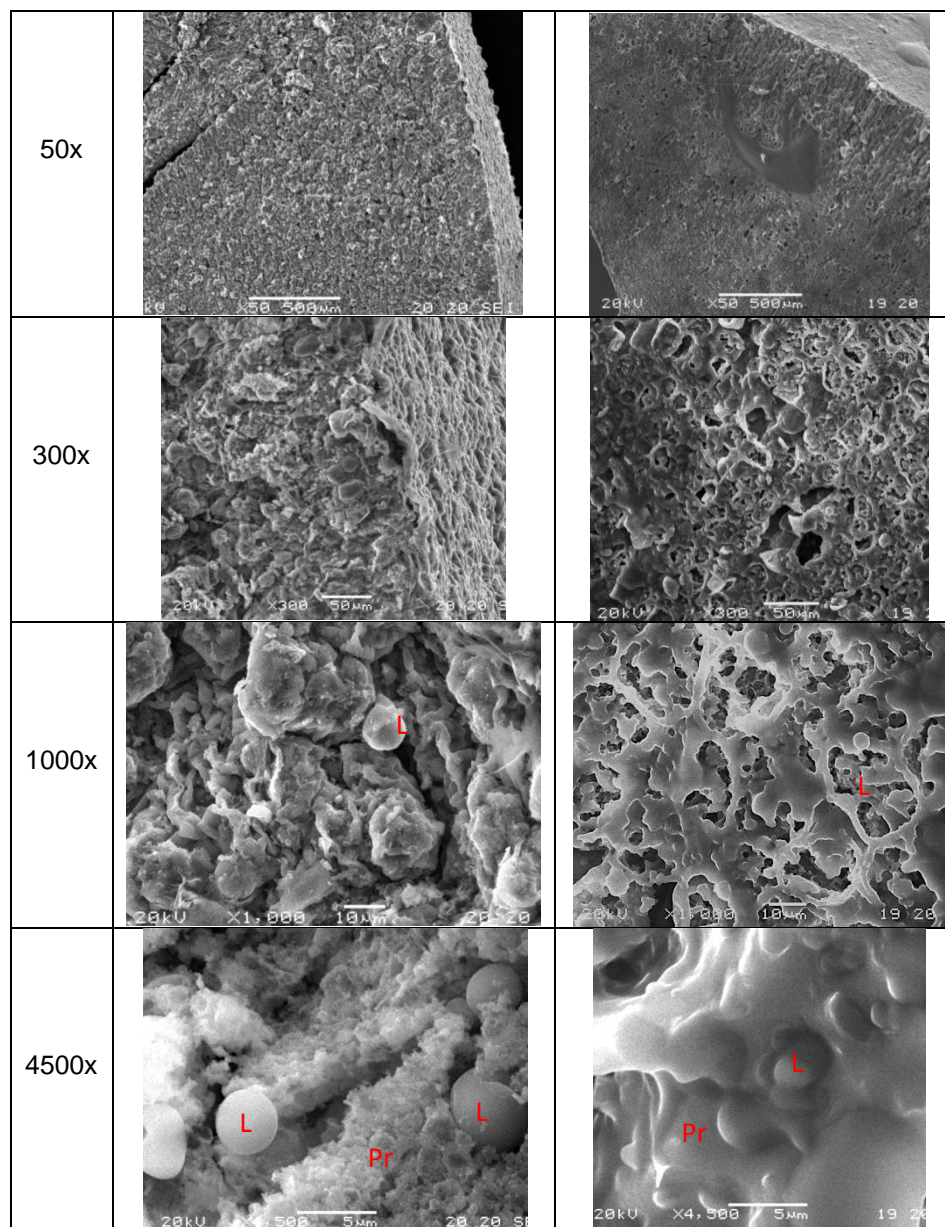
Todas las diferencias encontradas entre las semillas no fermentadas y las fermentadas se deben al proceso de beneficiado del cacao en especial a la fermentación y secado en el cual las semillas sufren reacciones químicas que deforman la estructura celular produciendo porosidad en los tejidos por la evaporación del agua intra e intercelular así como la coagulación de proteínas y globulos lipídicos. (22)(26)(38)

5. 5. 8. Microfotografías del genotipo 8.

Cuadro N° 13. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X, 1000X y 4500X del genotipo 8.



Cuadro N° 13. Continuación.



Los aumentos a 35x y 50x corresponden a la vista panorámica de la semilla en la cual se puede apreciar su textura y conformación. En el cuadro anterior, las posiciones de las células polifenólicas (26) que se encuentran en los bordes externos se hallan alineadas de forma perpendicular, esto es más notable en

las muestras de semillas no fermentadas a un aumento de 50x. Además se observó que los cortes de semillas no fermentadas presentan menos poros y células seccionadas que los cortes de las semillas fermentadas.

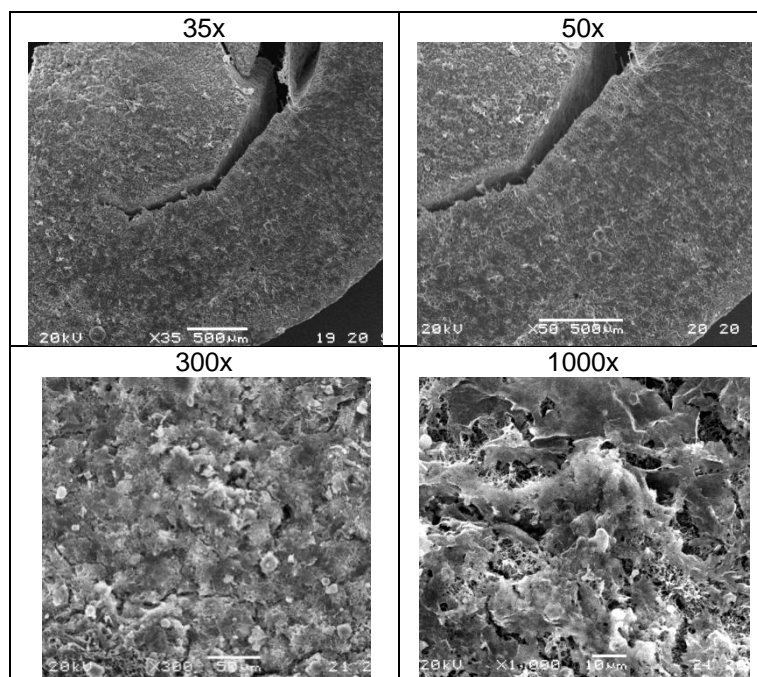
A un aumento de 300x, los cortes de semillas no fermentadas muestran células agrupadas y material particulado de tipo micro esférico mientras que los cortes de semillas fermentadas muestran ausencia del material micro esférico.⁽²⁶⁾ La porosidad entre el tejido celular aumentó en los cortes de semillas fermentadas.

A un aumento de 1000x y 4500x, los cortes de semillas no fermentadas presentaron el material particulado micro esférico adherido a la superficie de glóbulos de 5 a 10 micras; este material particulado está ausente en las muestras de semillas fermentadas y en su lugar se encuentra una estructura coagulada dentro de las células. Los glóbulos encontrados corresponden a glóbulos lipídicos, mientras que el material particulado micro esférico corresponde a las proteínas intercelulares. ⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽³⁸⁾

Todas las diferencias encontradas entre las semillas no fermentadas y las fermentadas se deben al proceso de beneficiado del cacao en especial a la fermentación y secado en el cual las semillas sufren reacciones químicas que deforman la estructura celular produciendo porosidad en los tejidos por la evaporación del agua intra e intercelular así como la coagulación de proteínas y globulos lipídicos. ⁽²²⁾⁽²⁶⁾⁽³⁸⁾

5. 5. 9. Microfotografías de la muestra M1.

Cuadro N° 14. Microfotografías vistas al MEB a 35X, 50X, 300X y 1000X de la muestra M1.



Esta muestra correspondía a un control de fermentación mal realizada, y como se observa en las imágenes del cuadro N° 14; a 35x y 50x la estructura no presenta muchos cambios superficiales notables aunque se observó una ausencia de porosidades. Las imágenes a 300x y 1000x presentaron una estructura laminada quebradiza, con presencia de glóbulos dispersos, pequeños artefactos en forma de hojuelas y una pérdida completa de la morfología histológica celular lo cual hace que el uso del aumento a 4500x sea poco significativo en la interpretación.

5. 6. Relación de resultados físico-químicos y microscopia electrónica.

Respecto a la relación entre estos resultados se puede decir que las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido proporcionaron información general respecto al contenido de grasas, proteínas y polifenoles (en células polifenólicas).

En la determinación de grasa cruda, la muestra F6 fue la de mayor contenido y F4 fue la de menor contenido de grasa cruda. A un aumento de 300x, F6 presenta una mayor cantidad de glóbulos lipídicos por superficie que F4.

Según los resultados para el análisis de proteína cruda la muestra F8 fue la de mayor contenido encontrado y F1 fue la de menor contenido de proteína cruda encontrado. A un aumento de 1000x y 4500x, F8 presentaba mayor coagulación de proteínas intracelulares comparada con F1.

Finalmente, el contenido de polifenoles totales el cual según la determinación de polifenoles estimados la muestra F8 fue la que presentó un mayor contenido y F1 fue la de menor contenido de polifenoles estimados. A un aumento de 50x, F8 presentaba una mayor cantidad visible de células polifenólicas en el borde del mesófilo y F1 mostraba una ausencia de células polifenólicas diferenciables.

De las demás determinaciones físico-químicas realizadas no se pudo encontrar una relación con las imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. De los resultados fisicoquímicos realizados a las muestras de cacao se determinó que algunas propiedades físico-químicas son dependientes del genotipo a excepción del contenido de fibra cruda y cenizas; por esto se clasifica a la muestra F6 como una muestra acriollada de muy buena calidad fisicoquímica adecuada para la producción de chocolate.
2. Las microfotografías mostraron diferencias microultraestructurales entre las muestras de semillas de cacao no fermentadas y fermentadas; siendo la diferencia más notable en aumentos de 1000x y 4500x en donde las muestras fermentadas presentan coagulación y cambios estructurales que pueden ser usados como control de calidad en la fermentación de semillas de cacao.
3. Según los resultados de las determinaciones físico-químicas, las muestras de cacao analizadas cumplen los requerimientos de la norma mexicana NMX-F-352-S-1980 y además se encuentran dentro de valores aceptables en comparación con estudios anteriores.
4. Los datos de coeficiente de correlación sugieren que la humedad de las semillas de cacao afecta su contenido de azúcares totales mientras que el contenido de proteínas afecta al contenido de polifenoles en las semillas;

pues presentan una correlación positiva fuerte. Mientras que el contenido de grasa cruda parece solamente ser influenciado por el valor de pH.

5. Las microfotografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido solo puede ser usado como un índice de comparación de contenido de grasa, proteína y polifenoles (en células polifenólicas) en semillas de cacao.
6. No se encontraron diferencias en las imágenes obtenidas por MEB de semillas de cacao fermentadas y secadas que permitan la clasificación morfogeográfica por medio de Microscopía Electrónica de Barrido.
7. Se encontraron características microultraestructurales propias de las semillas fermentadas que las diferencian de las no fermentadas y se pueden utilizar como control de calidad de la fermentación para el beneficio de la calidad del cacao producido en la Hacienda San José de La Carrera y en el resto del país.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES.

1. En futuras investigaciones realizar el estudio del cultivar de cacao con un mayor número de muestras para la obtención de una base de datos para el desarrollo del cultivar de la Hacienda San José de La Carrera.
2. Aplicar la Microscopía Electrónica de Barrido en alimentos, productos naturales y procesados como control de calidad de procesos críticos.
3. Autenticar el cacao nacional y controlar la calidad de fermentación por medio de Microscopía Electrónica de Barrido la cual es favorable por la poca cantidad de muestra que emplea.
4. Realizar obras de mantenimiento en el cultivar seleccionando árboles de cacao que posean buenas características para la futura producción así como crear controles de calidad del cacao y su fermentación por medio de análisis fisicoquímico y microultraestructural que permitan aumentar la exportación del producto al tiempo que se disminuyen los costos por pérdidas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abo-Bakr TM, Shekib LA. Studies on cocoa beans (*Theobroma cocoa* L.) Effect of some processes on the microstructure and color of beans. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A. 1987. 184(4): 271-273.
2. Aguilera Ortiz M, Reza Vargas MC, Aguilar Vargas E, Ramírez Baca P. Determinación de Polifenoles en *Ficus carica* Variedad Mission [monografía en internet]. México. Facultad de Ciencias Químicas-UJED. [acceso 9 de septiembre de 2011]. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee-08-2008/documentos/A074.pdf>
3. Álvarez C, Pérez E, Lares M. Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, Estado de Aragua. Agronomía Tropical. 2007; 57(4): 249-256.
4. Barry Callebaut Institute. Cacao y Chocolate: ¿Son realmente nutritivos? 2004. 10 p.

5. Batista L. Guía Técnica: El Cultivo de Cacao. Santo Domingo, República Dominicana. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. 2009. 250p.
6. Cacao en grano fermentado. Fermented cocoa beans. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. 1980. 6 p.
7. Cacao fino de aroma. Estudio de la producción y el comercio mundial. Manual de productos básicos. Ginebra: Centro de Comercio Interno UNCTAD/GATT; 1991.60 pp.
8. Castañeda de Abrego V, Pérez Gómez JM, Bonilla G. Caracterización Genética de los Tipos de Cacao establecidos en el Cultivar “Cooperativa Hacienda La Carrera” Usulután, El Salvador. CONACYT. Ciencia y Tecnología. 2011; 16(21): 12-18.
9. Contreras, M. The Chemistry of Seeds. [Internet]. Pontificia Universidad Católica de Chile. [Consultado 18 de agosto de 2010]. Disponible en:http://www.ag.ohio-state.edu/~seedbio/HCS631_files/7A%20Seed%20Chemistry.pdf

10. Cross E. Torréfaction In: Cacao et Chocolat - Production et caractéristiques. A publicar en: Memorias del I Congreso del Cacao y su Industria, Maracay, Estado Aragua. Paris: Lavoisier. 1997.
11. Cross E, Jeanjean N. Formation l'arôme cacao. In: Cacao et Chocolat - Production et caractéristiques. A publicar en: Memorias del I Congreso del Cacao y su Industria, Maracay, estado Aragua. Paris: Lavoisier. 1997.
12. Cubero E, Enríquez G, Hernández A, Rodríguez T. Calidad del Cacao en Cuatro Zonas Cacaoteras de Costa Rica. TURRAB. 1992. 42(3): 287-293.
13. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem. 1956; 28(3):350-356.
14. Escamilla García M, Díaz Ramírez M, Bautista Nava L, Mora Escobedo R, Farrera Rebollo R, Calderón Domínguez G. Aplicación de Microscopía Electrónica de Barrido para la Evaluación de la Microestructura de Masa para Panificación adicionada con Harina de Soya Germinada e Integral y su Fracción 7s. En: Congreso Nacional de Microscopía (10, 2010,

Morelia, MX) México: Asociación Mexicana de Microscopía A.C.; 2010.3 p.

15.FEDECACAO. El beneficio y características fisicoquímicas del cacao (*Theobromacacao*). Bogotá, Colombia: Talleres Promumedios. 2004.32 p.

16.FEDECACAO. Técnica para el cultivo de Cacao. 2 ed. Bogotá D. C: Talleres Promumedios. 2007.192 p.

17.FOMILENIO. Proyecto de desarrollo productivo. Cadena de valor frutícola. Análisis del Mercado para cacao. El Salvador. 2009. 14 p.

18.Food-Info. Países Bajos: Wageningen University;[actualizado 5 de mayo de 2011; acceso 26 de septiembre de 2010]. ¿Qué tipos de polifenoles están presentes en el chocolate y en qué porcentaje? Disponible en: <http://www.food-info.net/es/qa/qa-fp46.htm>

19.García Carrión LF. Guía de Campo: Identificación de Cultivares de Cacao. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 2007. 32 p.

20. Gilabert-Escrivá MV, Gonçalves LAG, Silva CRS, Figueira A. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behavior of fats from seeds of Brazilian Amazonian **Theobroma** species. JSFA.2002;82(13):1425-1431.
21. Horwitz W. Editor. Official methods of Analysis of AOAC International. 18^{ava} edición. Maryland, USA:AOAC International; 2005.
22. Hoskin JM, Dimick PS, Daniels RR. Scanning Electron Microscopy of the **Theobroma cacao** Seed. Journal of Food Science. 1980. 45(6): 1538-1540.
23. James CS. Analytical Chemistry of Foods. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publication. 1999.
24. Kaláb M, Allan Wojtas P, Miller SS. Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. Trends Food Sci Tech. 1995; 6(8): 177-186.
25. Kirk RS, Sawyer R. Composición y análisis de alimentos de Pearson, 2^{da} edición. México: Compañía Editorial Continental; 1996.

26. Martini MH, Lenci CG, Figueira A, De Queiroz Tavares D. 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. RevBrasil Bot. 2008; 3(1):147-154.
27. Mermet G, Cros E, Georges G. Étude préliminaire de l'optimisation des paramètres de torréfaction du cacao. Consommation des précurseurs d'arôme, développement des pyrazines, qualité organoleptique. Café Cacao Thé. 1992; 36(4):285-290.
28. Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno A, Lanaud C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. Heredity. 2002; 89(5): 380-386.
29. Mundo helado [sede Web]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina: Barrale, L; 12 de mayo del 2007 [acceso 26 septiembre 2010]. Materias Primas: Chocolate: El árbol de cacao. Disponible en: <http://www.mundohelado.com/materiasprimas/chocolate/chocolate-arbolcacao.htm>

30. Nielsen SS (ed). Food Analysis. 2^{da} edición. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publication. 1998.
31. Nielsen SS (ed). Food Analysis Laboratory Manual. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2003.
32. Orrego CE. Microestructura y Nanoestructura de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Rev Col Fis. 2002; 34(1): 214-218.
33. Pulido A, Braglia L, Rapoport H, Rodríguez MI, Olmedilla A. Búsqueda de Sistemas de Selección de Variedades Polinizantes. En: Foro del Olivar y el Medio Ambiente. España: Expoliva; 2005. 7 p.
34. Ramos G. Memorias Curso “Análisis sensorial de licores de cacao”. En: Análisis sensorial de licores de cacao. Bogotá: FEDECACAO – Fondo Nacional del Cacao y la Comercializadora Internacional C.I. Cacaos de Colombia S.A.; 2009.
35. Reyes H, Capriles de Reyes L. El Cacao en Venezuela. Venezuela, moderna tecnología para su cultivo. Caracas, Venezuela: Chocolate El Rey. 2000. 270 p.

36. Roman-Gutierrez AD, Guilbert S, Cuq B. Description of Microstructural Changes in Wheat Flour and Flour Components during Hydration by using Environmental Scanning Electron Microscopy. *LWT-Food Science and Technology*. 2002; 35(8): 730-740.
37. Servicios Técnicos de Análisis Instrumental [sede Web]. España: Universidad de Alicante: Servicios Técnicos de Investigación; [actualizado 11 de febrero de 2010; acceso 6 de octubre de 2010] Microscopía electrónica de barrido. [5 pantallas] Disponible en: http://www.ua.es/es/investigacion/sti/servicios/analisis_instrumental/microscopia/sem.html
38. Spencer GL. Tea, Coffee, And Cocoa Preparations. Washington. Authority of The Secretary Of Agriculture. 1892.
39. Soria, J. Principal Varieties of cocoa cultivated in tropical America. *Cocoa Growers' Bulletin* 1970; 15:12-21.
40. Técnicas histológicas [sede Web]. España: Facultad de Biología, Universidad de Vigo; 2009 [actualizado 27 de abril de 2009; acceso 26 agosto de 2010]. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Técnicas Histológicas. Disponible en: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/1-introduccion.php>

ANEXOS

ANEXO N° 1.

UBICACIÓN DE LA HACIENDA SAN JOSÉ DE LA CARRERA EN USULUTÁN

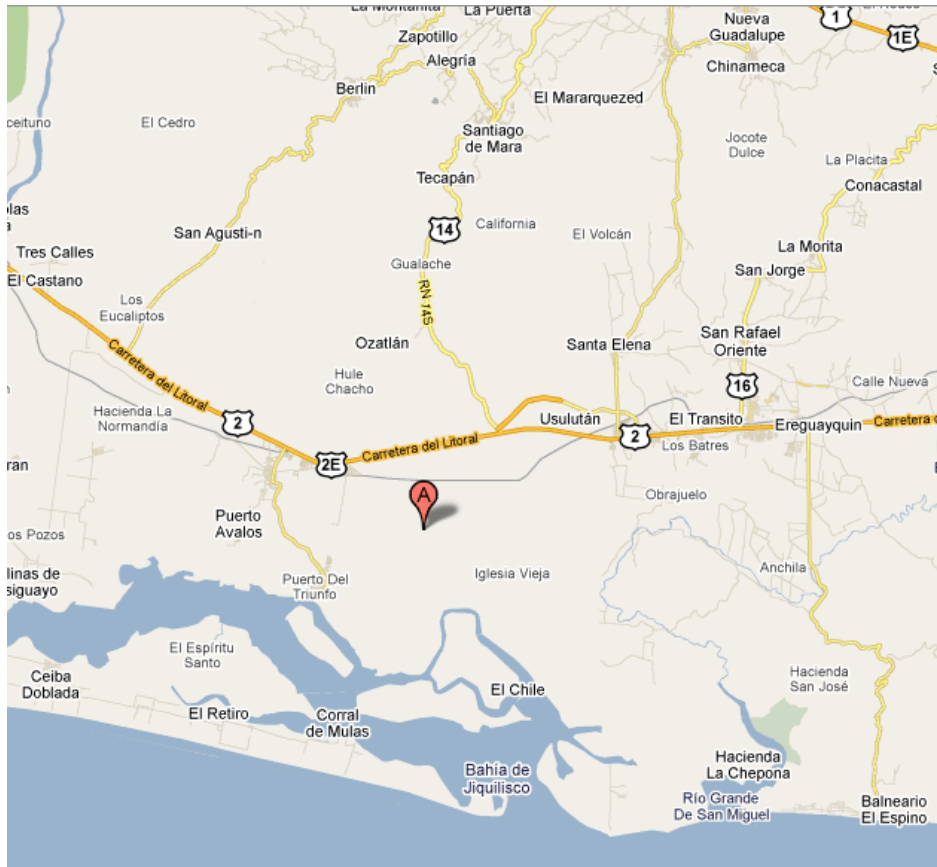
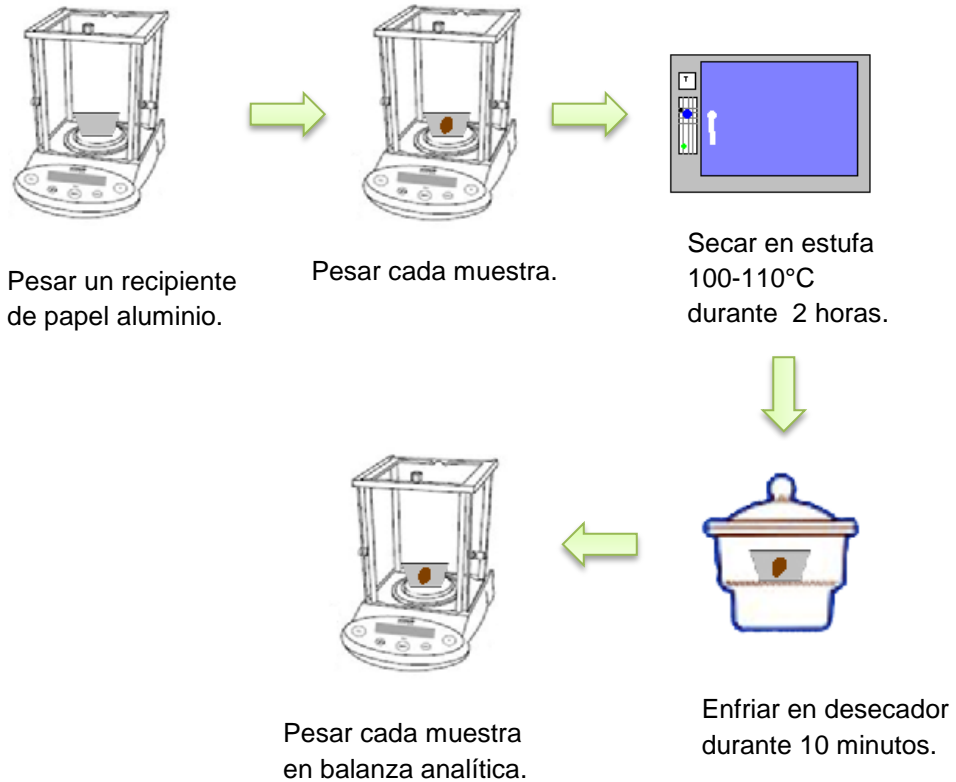


Figura N° 16. Mapa que muestra la ubicación de la Hacienda San José de La Carrera en Usulután. Marcada por la Letra "A".

ANEXO N° 2

ESQUEMA DE PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE HUMEDAD



Realizar los cálculos necesarios.

Nota: Repetir secado, enfriado y pesado hasta peso constante.

Figura N° 17. Esquema para la determinación del contenido de humedad.

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE CENIZAS

Nota: Numerar los crisoles en la parte inferior.

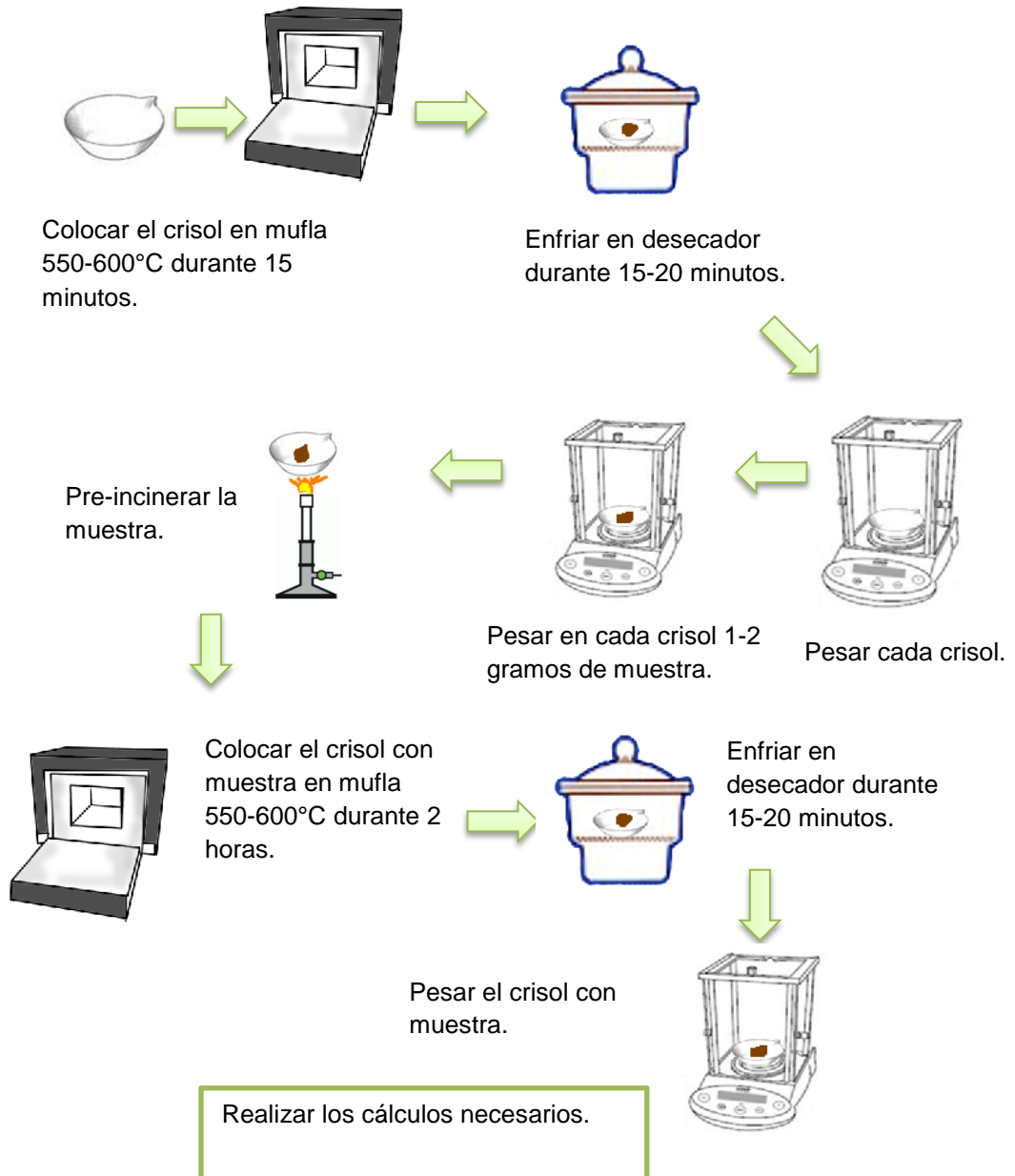
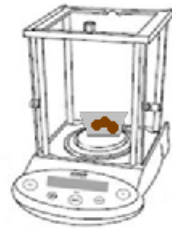


Figura N° 18. Esquema para la determinación del contenido de cenizas.

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE PROTEÍNA CRUDA

Pesar 0.1 g de muestra homogenizada.



Tubo Kjeldahl

Adicionar:

2.5 g de sulfato de potasio

0.15 g de sulfato cúprico

12 mL ácido sulfúrico concentrado



Accionar la trampa de succión de gases. NaOH (15%)



Calentar hasta destrucción de material orgánica. Dejar enfriar.



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

Figura N° 19. Esquema para la determinación del contenido de proteína cruda.

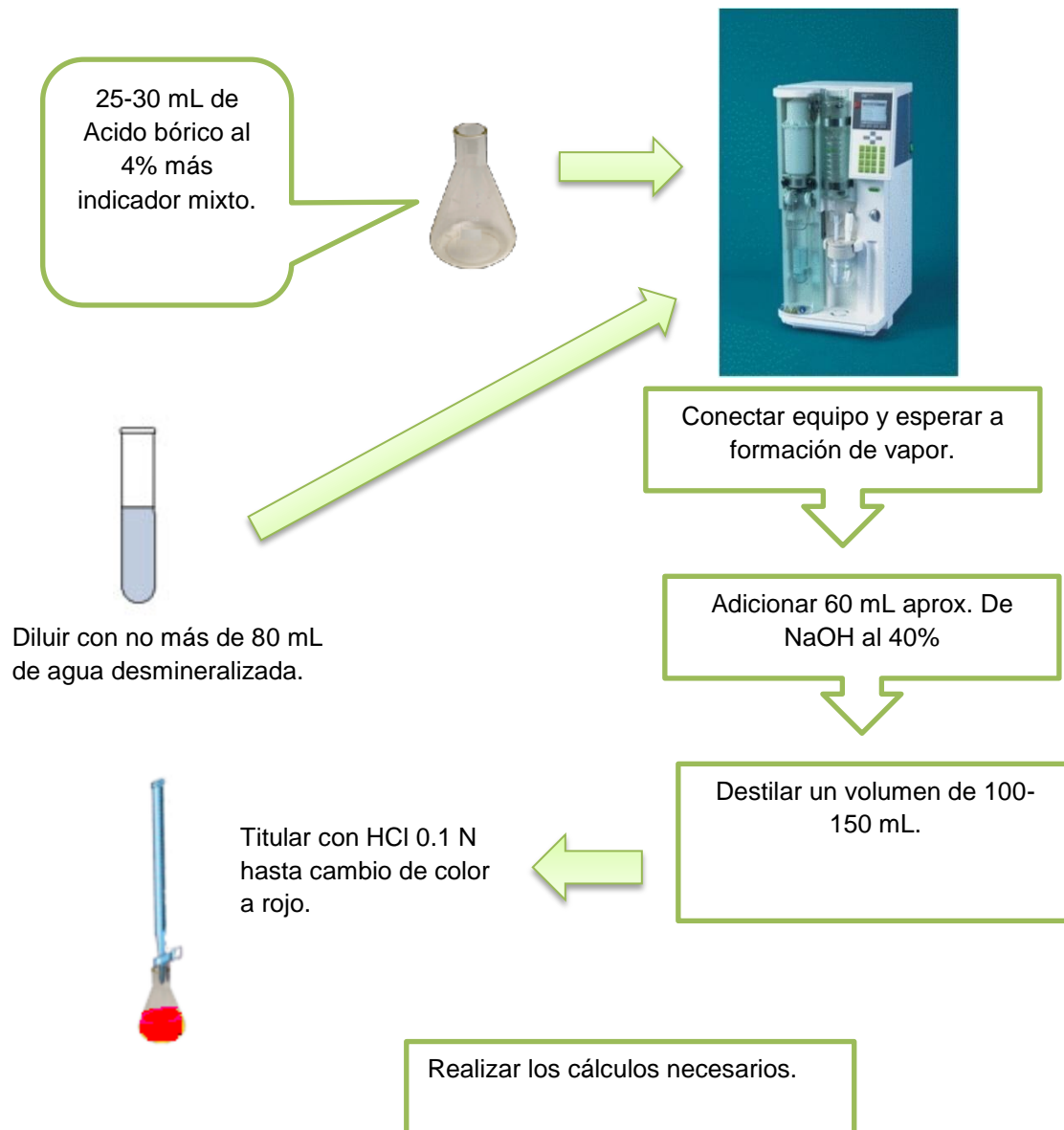
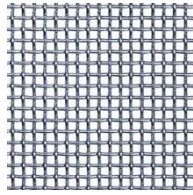


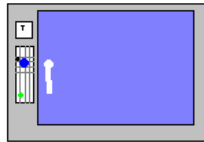
Figura N° 19. Continuación.

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE GRASA CRUDA



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

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



Secar el matraz de extracción durante 30 min a $103 \pm 2^\circ\text{C}$.



Enfriar en desecador.
Pesar el matraz de extracción.

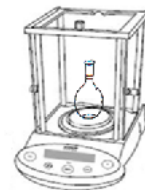
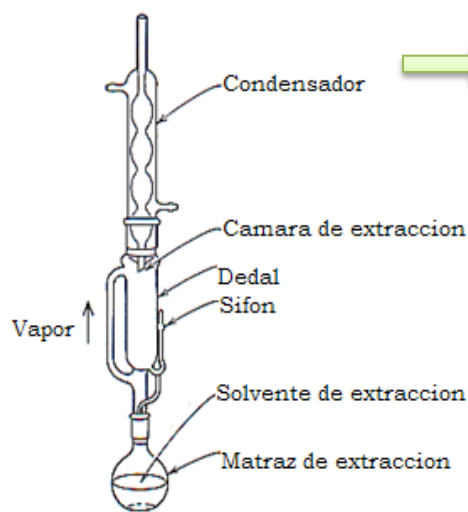


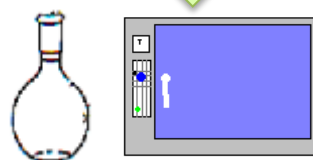
Figura N° 20. Esquema para la determinación del contenido de grasa cruda.



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

Eliminar el solvente por baño rotavapor .

Armar el equipo y adicionar el solvente en el matraz.



Secar el matraz de extracción durante 10 min a $103 \pm 2^\circ\text{C}$.

Enfriar en desecador.



Pesar el matraz de extracción con grasa.



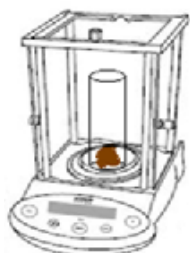
Realizar los cálculos necesarios.

Figura N° 20. Continuación

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE FIBRA CRUDA

NOTA: Utilizar la muestra tratada previamente en la determinación de grasa por método Soxhlet.

Pesar 1-1.5 g de muestra homogenizada en un crisol poroso.



Registrar el peso como W_0

Introducir el crisol poroso + muestra en el equipo dosi-fiber.



Extractor de 6 plazas

Añadir de 100-150 mL de H_2SO_4 0.128M caliente en cada columna y unas gotas de antiespumante. Calentar con una potencia del 90% hasta que hierva. Dejar hervir 30 minutos a potencia de 30%.



Lavar con 60 mL de agua destilada y filtrar. Realizar 3 lavados más.



Repetir usando KOH 0.0223M en vez de H_2SO_4

Figura N° 21. Esquema para la determinación del contenido de fibra cruda.

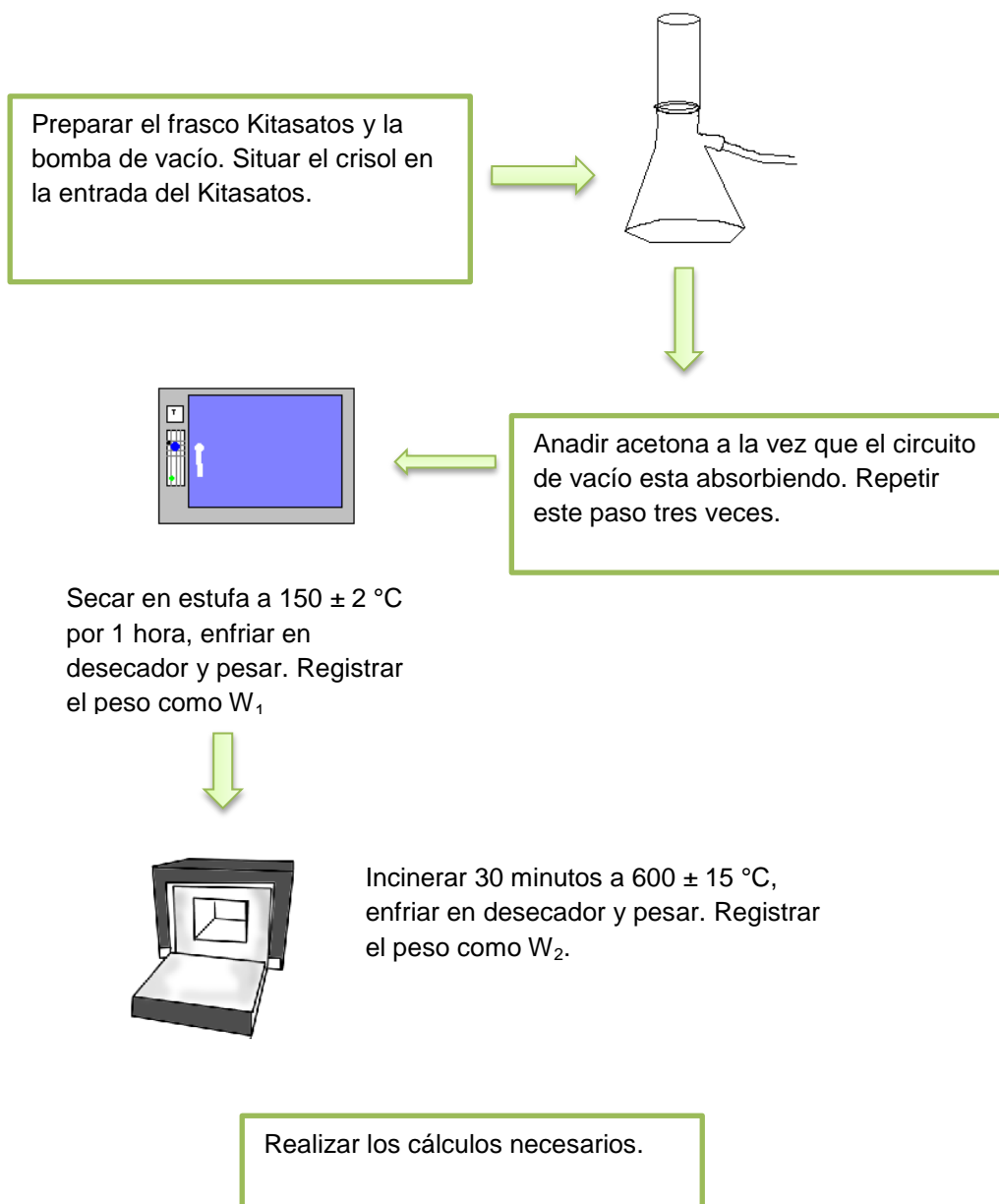


Figura N° 21. Continuación.

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE AZÚCARES TOTALES

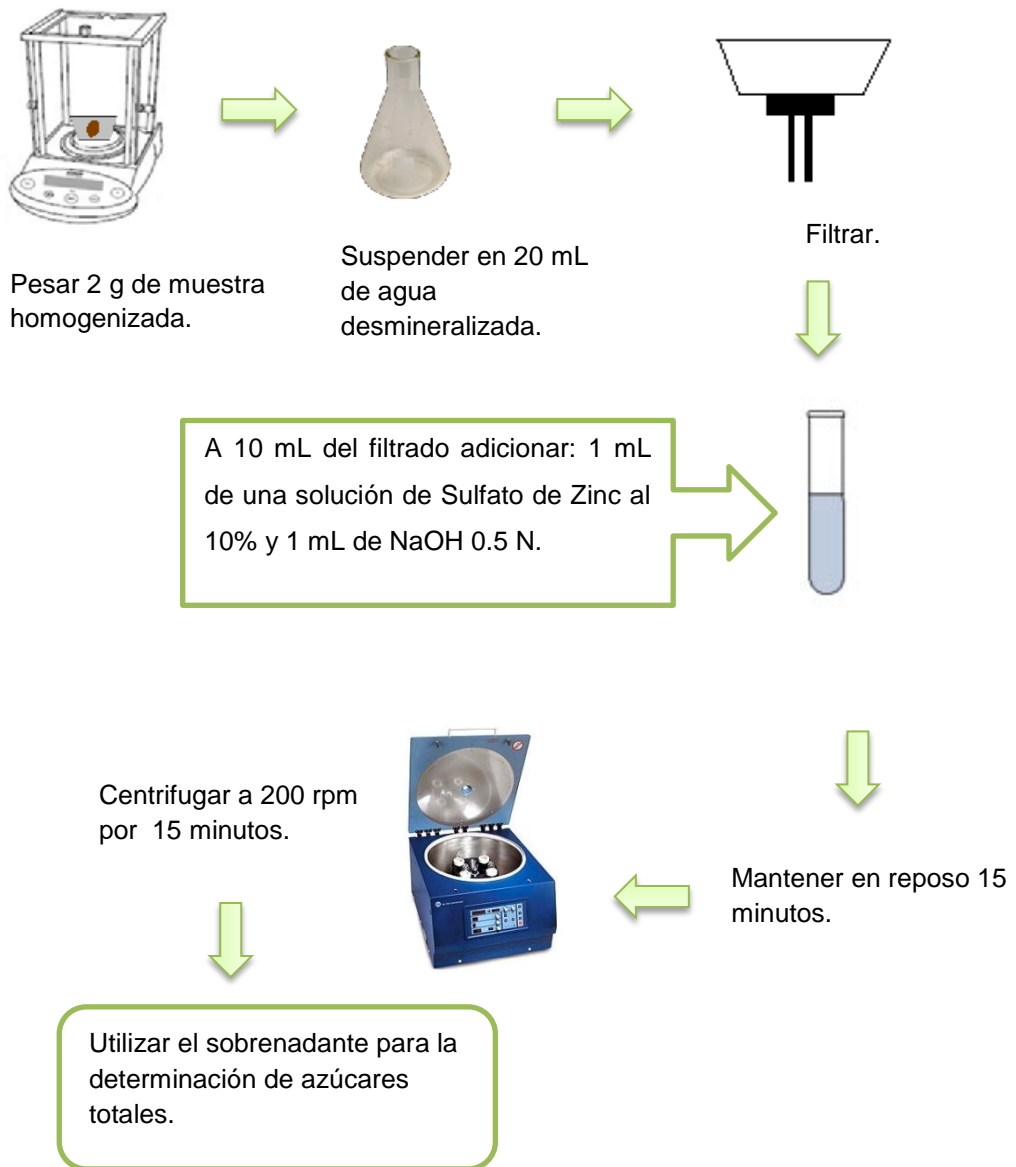


Figura N° 22. Esquema para la determinación del contenido de azúcares totales.

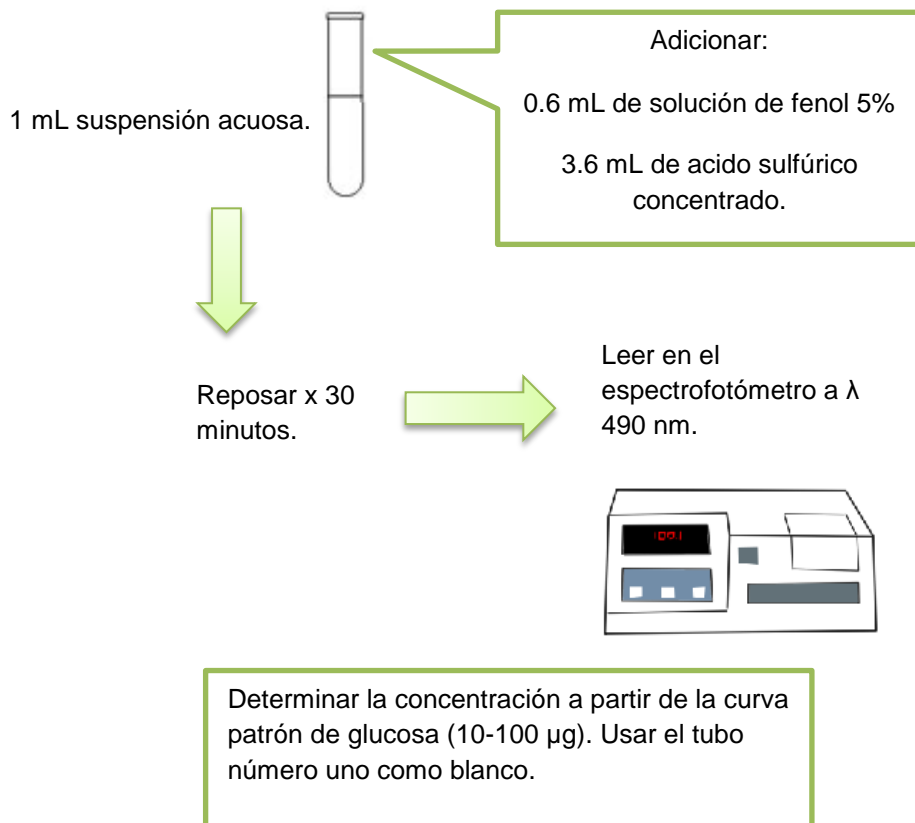
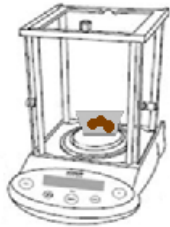


Figura N° 22. Continuación.

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO ESTIMADO DE POLIFENOLES

Pesar 1 g de muestra homogenizada.



Transferir al matraz del aparato de calentamiento de reflujo.

Agregar:

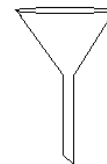
100 mL de etanol 70%

Perlas de vidrio

Reflujar durante 7 horas.



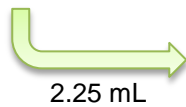
Filtrar.



Aforar a 200 mL con etanol al 70%.



Diluir 1 mL reactivo de Folin Ciocalteu en 9 mL de agua desmineralizada.



2.25 mL



0.3 mL

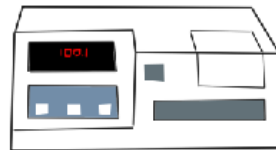


Disolver. Reposar 5 minutos a temperatura ambiente.

Figura N° 23. Esquema para la determinación del contenido estimado de polifenoles.

Adicionar 2.25 mL de solución de carbonato de sodio 2%

Agitar la mezcla y reposar x 15 min.



Realizar la lectura en espectrofotómetro a una longitud de 750 nm. Determinar la concentración mediante el empleo de una curva estándar de Catequina (10-100 μg).

Figura N° 23. Continuación.

DETERMINACIÓN DE pH.

Procedimiento para manejo de equipo.


-Conectar en el panel posterior del instrumento: el electrodo combinado de pH y el alimentador de red.

-Pulsar la tecla de encendido, luego el aparato realizara un chequeo de la pantalla, teclado y memorias.

Calibración del pH-metro.

-Encender el equipo y presionar .


-Llenar hasta la mitad un frasco pequeño con la solución tampón de pH 7 a 25 °C. Introducir el electrodo y agitar. Esperar que la lectura sea estable.

-Pulsar . El instrumento indicara el valor teórico del pH a la temperatura a que se encuentre.

-Luego colocar la siguiente solución tampón de pH 4 a 25 °C y proceder igual que en el punto anterior desde "introducir el electrodo". Realizar el mismo procedimiento usando la solución tampón de pH 10.

-Transcurrida la determinación del pH de las soluciones tampón, el equipo se encuentra calibrado con una validez de 24 horas.

Medida Por estabilidad del pH.

-Con el equipo ya encendido y calibrado, sumergir el electrodo en la muestra, agitar continuamente con un magneto. Presionar  una vez. La lectura del pH se tomara cuando la muestra sea estable.

-Lavar el electrodo con agua destilada y dejarlo en solución tampón pH 7.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

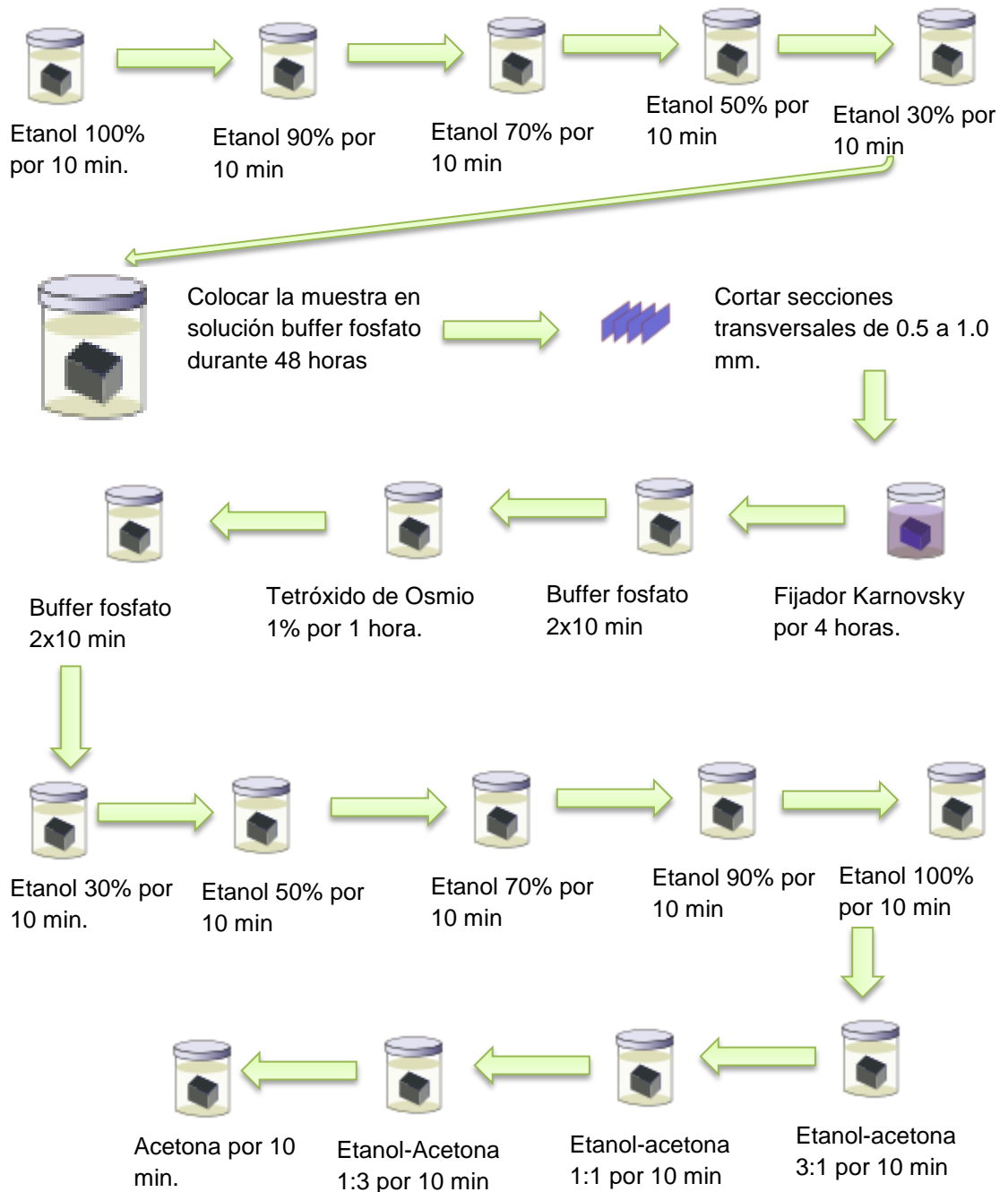


Figura N° 24. Esquema para el tratamiento de muestras para MEB.

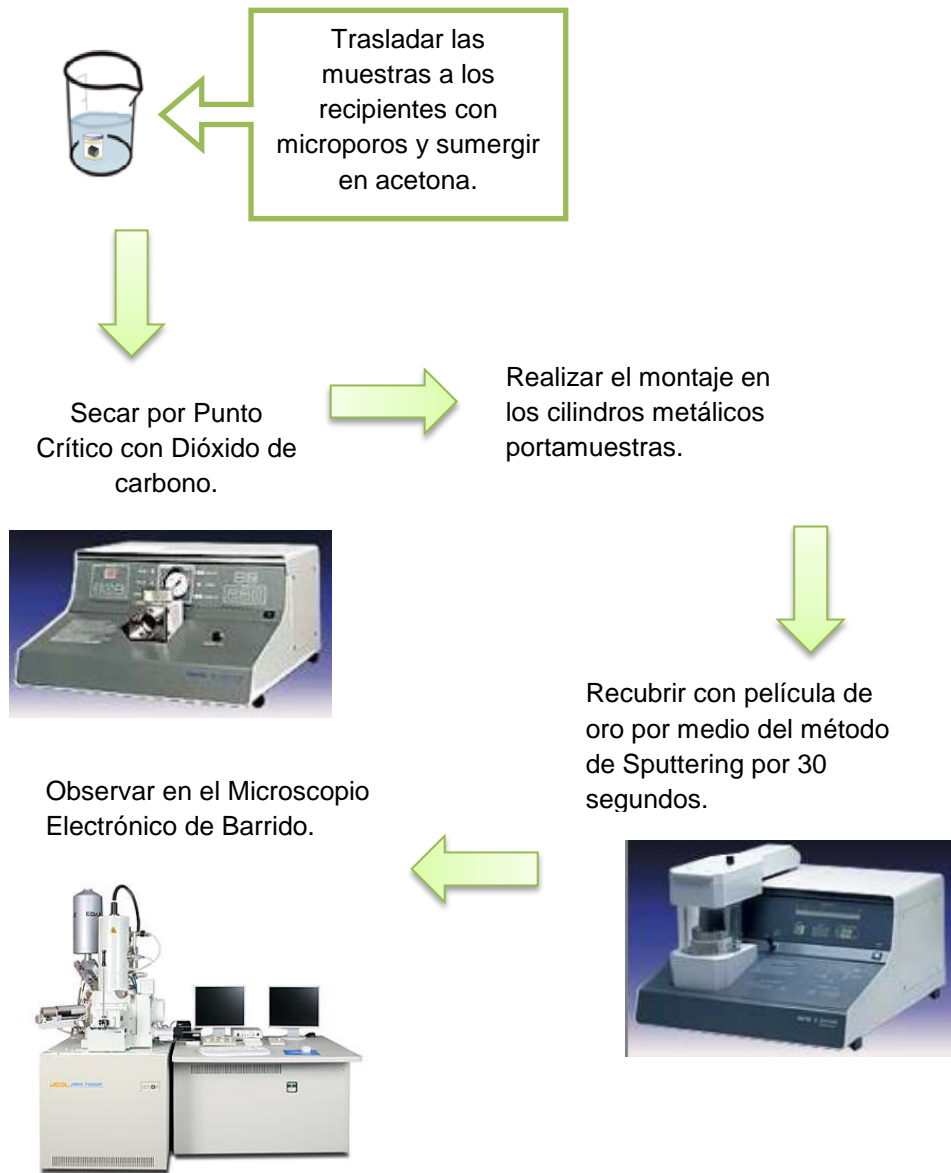


Figura N° 24. Continuación.

ANEXO N° 3
PREPARACIÓN DE REACTIVOS

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE PROTEÍNA CRUDA₍₂₁₎₍₃₀₎₍₃₁₎

- 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.
- 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.
- Acido 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 ultimo 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 Na_2CO_3 anhidro.

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE FIBRA CRUDA₍₂₁₎₍₃₀₎₍₃₁₎

-Solución de ácido sulfúrico 0.128 M: Diluir 7.1 mL de H_2SO_4 al 96% a un litro con agua destilada. La concentración debe ser chequeada por titulación.

-Solución de hidróxido de potasio 0.223 M: Disolver 12.5 g de KOH en agua libre de Na_2CO_3 y llevar a un litro. La concentración debe ser chequeada por titulación.

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE AZÚCARES TOTALES₍₁₃₎₍₂₁₎₍₃₀₎₍₃₁₎

-Solución de Sulfato de zinc 10%: Disolver 10 g en agua desmineralizada y aforar a 100 mL.

-Solución de NaOH 0.5 N: Disolver 20 g en agua desmineralizada y aforar a 100 mL.

-Solución de fenol 5%: Disolver 5 g en agua desmineralizada y aforar a 100 mL.

-Solución patrón de glucosa: Pesar 0.02 g de Glucosa anhidra en balanza analítica, disolver en agua desmineralizada y aforar a 100 mL. Preparar una serie de tubos como se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro N° 15. Serie de tubos para curva patrón de glucosa.

Tubo	Solución de glucosa (mL)	Agua desmineralizada (mL)
1	0.0	2.0
2	0.1	1.9
3	0.2	1.8
4	0.4	1.6
5	0.6	1.4
6	0.8	1.2
7	1.0	1.0

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO ESTIMADO DE POLIFENOLES₍₂₎₍₃₃₎

-Reactivo de Folin: en un matraz de 500 ml colocar 20 g de Wolframato de Sodio y 5 g de Molibdato de Sodio, disolver en aproximadamente 100 ml de agua destilada, a esta mezcla agregar 10 ml de Ácido Fosfórico y 20 ml de Ácido Clorhídrico, bajo un sistema refrigerante se hizo hervir por siete horas, una vez frío se agregaron 30 g de Sulfato de Litio y algunas gotas de Bromo, para luego ebulir nuevamente por 15 minutos. Posteriormente y una vez frío se aforó con agua destilada a 200 ml.

-Solución de etanol al 70%: Diluir 70 mL de etanol en agua desmineralizada y aforar a 100 mL.

-Solución de carbonato de sodio al 2%: Disolver 2 g de carbonato de sodio y aforar con agua desmineralizada hasta 100 mL.

-Solución patrón de Catequina: Pesar 0.02 g de Catequina anhidra en balanza analítica, disolver y aforar con agua desmineralizada hasta 100 mL.

Preparar una serie de tubos como se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro N° 16. Serie de tubos para curva patrón de Catequina.

Tubo	Solución de Catequina (mL)	Agua desmineralizada (mL)
1	0.0	2.0
2	0.1	1.9
3	0.2	1.8
4	0.4	1.6
5	0.6	1.4
6	0.8	1.2
7	1.0	1.0

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO ⁽⁴⁰⁾

-Solución de etanol 90%: Verter 180 mL de etanol puro en un balón volumétrico de 200 mL y aforar con agua desmineralizada.

-Solución de etanol 70%: Verter 140 mL de etanol puro en un balón volumétrico de 200 mL y aforar con agua desmineralizada.

-Solución de etanol 50%: Verter 100 mL de etanol puro en un balón volumétrico de 200 mL y aforar con agua desmineralizada.

-Solución de etanol 30%: Verter 60 mL de etanol puro en un balón volumétrico de 200 mL y aforar con agua desmineralizada.

-Solución de Buffer fosfato sódico 0.1 M (pH=7.4): Contiene 77.4 mL de Na_2HPO_4 0.1M y 22.6 mL de NaH_2PO_4 0.1 M; diluir a 1000 mL con agua desmineralizada.

-Fijador de Karnovsky modificado (pH= 7.3): disolver paraformaldehído en 25 mL de agua bidestilada calentado entre 60 a 70 °C. Se puede agregar 0.1 mL de una solución de hidróxido de sodio 1N para que la solución se aclare. Posteriormente se agrega 50 mL de una solución de cacodilato de sodio 0.2M, 10 mL de glutaraldehído al 25% y 15 mL de agua bidestilada. El pH se debe ajustar a 7.3 con ácido clorhídrico.

-Tetróxido de osmio en amortiguador de Zetterqvist:

Solución A: Veronal sódico 0.16M, acetato de sodio 1M. Preparar 50 mL de esta solución empleando agua bidestilada.

Solución B: Ácido clorhídrico 0.1N

Solución C: Cloruro de sodio 1.37M, cloruro de potasio 0.05M, cloruro de calcio 0.02M.

Preparar 50 mL de solución disolviendo los anteriores reactivos en agua bidestilada.

Solución D: Se obtiene una solución al 2% de Tetróxido de osmio en agua bidestilada. Los cristales de este reactivo se dejan disolver por un espacio de 24 horas.

Finalmente: Tomar 20 mL de la solución A y mezclar con 6 mL de la solución C. Agregar 22 mL de la solución B y 52 mL de la solución D. El pH se ajusta a 7.2 con hidróxido de sodio 0.1N. Este fijador se mantiene en la oscuridad a 6°C.

-Solución de Na_2HPO_4 0.1M: Disolver 42.6 g en 300 mL de agua desmineralizada.

-Solución de NaH_2PO_4 0.1 M: Disolver 36 g en 300 mL de agua desmineralizada.

-Solución de etanol –acetona (3:1): Disolver 15 mL de etanol puro con 5 mL de acetona.

-Solución de etanol –acetona (1:1): Disolver 10 mL de etanol puro con 10 mL de acetona.

-Solución de etanol –acetona (1:3): Disolver 5 mL de etanol puro con 15 mL de acetona.

ANEXO N° 4

LISTADO DE MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

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 CONTENIDO DE CENIZAS

Material y equipo.

- Crisoles o cápsulas de porcelana
- 1 desecador
- 1 pinzas largas
- 1 par de guantes de asbesto
- 1 mufla
- 1 balanza analítica
- 1 espátula
- 1 mechero de Bunsen
- Cerillos
- 1 malla de asbesto
- 1 soporte con anillo

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE PROTEÍNA CRUDA

Material y equipo.

- Balanza analítica
- Equipo Kjeldahl
- pHmetro

Reactivos.

- Acido 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.

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 CONTENIDO DE FIBRA CRUDA**Materiales y equipo.**

-Equipo Dosi-Fiber

-Balanza analítica.

-Crisoles porosos.

-Desecador con deshidratante adecuado (sílica gel con indicador u otro).

-Dispositivo de succión al vacío.

-Frasco Kitasatos.

-Estufa a 150 ± 2 °C.

-Tamiz de malla 1 mm.

Reactivos.

-Solución de ácido sulfúrico 0.128 M

-Solución de hidróxido de potasio 0.0223 M

-Octanol (antiespumante).

-Acetona.

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE AZÚCARES TOTALES**Materiales y equipo.**

-Tubos de ensayo

-Embudo de vidrio

-Papel filtro

- Pipetas volumétricas
- Pipetas mohr
- Agitador
- Gradilla
- Centrifugadora
- Baño de hielo
- Espectrofotómetro UV-Visible

Reactivos.

- Solución de sulfato de Zinc 10%
- Solución de NaOH 0.5 N
- Solución de fenol 5%
- Acido Sulfúrico concentrado
- Solución patrón de glucosa

DETERMINACIÓN DE CONTENIDO ESTIMADO 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.

DETERMINACIÓN DE pH**Materiales y equipo.**

- Baño de hielo
- Termómetro
- Vasos de precipitado de 100 mL
- Potenciómetro calibrado
- Frasco lavador con agua desmineralizada.
- Pañuelos desechables suaves.

DETERMINACIONES MICROSCÓPICAS**Materiales y equipo.**

- Vasos de precipitado de 100 mL
- Goteros
- Probetas
- Varillas de vidrio
- Cuchillas
- Microscopio electrónico de barrido
- Estufa

Reactivos.

-Etanol puro.

-Soluciones de hidroalcohólicas al 90%, 70%, 50% y 30%.

-Solución de buffer fosfato.

-Fijador Karnovsky.

-Tetróxido de osmio.

-Acetona

-Soluciones de etanol-acetona (3:1), (1:1) y (1:3)

-Agua desmineralizada.

ANEXO N° 5

CLASIFICACIÓN MORFOGEOGRÁFICA DE FRUTOS DE CACAO

Cuadro N° 17. Características de frutos de cacao según su tipo.

Tipo	Criollo <small>(5)(8)(16)(19)</small>	Forastero <small>(5)(8)(16)(19)</small>	Trinitario <small>(5)(8)(16)(19)</small>
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	Intermedio

Nota: Con un asterisco (*) se han marcado los parámetros mas importantes.

Debido a que el cacao trinitario es un híbrido que puede presentar características de criollo y forastero, se tomó el color del fruto como el factor más determinante siempre.

Cuadro N° 18. Guía de puntajes para clasificación de los frutos en tipos morfogeográficos

Característica \ Tipo	Criollo	Forastero	Trinitario
Forma	10	1	5
Color	10	1	5
Rugosidad de la superficie	10	1	5
Profundidad de surcos	10	1	5
Arreglo de semillas	10	1	5
Total	50	5	25

Tabla N° 5. Resultado de puntajes y clasificación de genotipos.

Genotipo	1	2	3	4	5	6	7	8
Forma	10	10	10	10	5	10	5	1
Color	10	10	10	10	5	10	10	1
Rugosidad de la superficie	10	1	1	5	5	1	10	1
Profundidad de los surcos	5	1	5	10	10	1	10	1
Arreglo de semillas	1	10	5	5	5	10	1	1
Total	36	32	31	40	30	32	36	5
Clasificación	Acriollado	Acriollado	Acriollado	Acriollado	Trinitario	Acriollado	Acriollado	Forastero

ANEXO N° 6

**PARÁMETROS ESPERADOS PARA SEMILLA DE CACAO Y
RESULTADOS INDIVIDUALES POR DETERMINACIÓN**

Cuadro N° 19. Parámetros de cacao y sus especificaciones.

Parámetro	Bajo	Normal	Alto	Otro	Referencia
Contenido de humedad	6 a 6.5%	7 a 8%	>8%	7.5% máx.	FEDECACAO ⁽¹⁵⁾ y Norma mexicana ⁽⁶⁾
Contenido de cenizas	-	-	-	2.8 a 3.6 %	Cubero ⁽¹²⁾
Contenido de fibra cruda	-	-	-	2.5 a 4.0 %	Martini ⁽²⁶⁾
Contenido de azúcares totales	-	-	-	0.8 a 1.73 %	Barry Callebaut Institute ⁽⁴⁾
Contenido de grasa cruda	<52%	52 a 55%	>55%	-	FEDECACAO ⁽¹⁵⁾
Contenido de proteína cruda	-	-	-	12 a 15 %	Martini ⁽²⁶⁾
Contenido estimado de polifenoles	-	-	-	7.4 a 8.5%	Martini ⁽²⁶⁾
pH	<5.0	5.0 a 5.5	>5.5	-	FEDECACAO ⁽¹⁵⁾

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

En el cuadro N° 19 los valores bajo, normal y alto son reportados por FEDECACAO, mientras que los valores teóricos son obtenidos de investigaciones anteriores.

Tabla Nº 6. Resultados individuales para contenido de humedad.

MUESTRA	PESO DE CAJA DE ALUMINIO	PESO INICIAL	PESO FINAL	%HUMEDAD	%MATERIA SECA
F1	1.1763	1.5014	1.4345	4.4558	95.5442
	1.1962	1.5373	1.4668	4.5860	95.4140
	1.1958	1.2101	1.1538	4.6525	95.3475
F2	0.9700	1.6994	1.6335	3.8778	96.1222
	1.1806	1.6410	1.5656	4.5948	95.4052
	0.9662	1.5147	1.44	4.9317	95.0683
F3	1.1911	1.4331	1.3738	4.1379	95.8621
	0.9624	1.3698	1.3128	4.1612	95.8388
	1.1868	1.2283	1.171	4.6650	95.3350
F4	0.9702	0.8953	0.8609	3.8423	96.1577
	1.1857	1.1417	1.098	3.8276	96.1724
	1.1844	1.2287	1.1816	3.8333	96.1667
F5	1.1942	1.0937	1.0566	3.3922	96.6078
	1.1964	1.1468	1.1033	3.7932	96.2068
	1.1922	1.5351	1.4775	3.7522	96.2478
F6	1.1880	1.6140	1.5518	3.8538	96.1462
	1.2083	1.0787	1.04	3.5877	96.4123
	0.9798	1.7037	1.6402	3.7272	96.2728
F7	0.9794	1.1418	1.0962	3.9937	96.0063
	1.2024	2.0347	1.9699	3.1847	96.8153
	0.9764	1.3407	1.292	3.6324	96.3676
F8	1.1912	1.1503	1.1039	4.0337	95.9663
	1.1963	1.3605	1.3137	3.4399	96.5601
	0.9831	1.3613	1.3132	3.5334	96.4666

Tabla Nº 7. Resultados individuales para contenido de cenizas.

MUESTRA	CRISOL VACÍO	CRISOL CON MUESTRA	CRISOL CON CENIZAS	PESO MUESTRA	PESO CENIZAS	%CENIZA
F1	14.1874	15.4063	14.2323	1.2189	0.0449	3.6836
	15.2570	16.6179	15.3052	1.3609	0.0482	3.5418
	15.5764	16.7347	15.6210	1.1583	0.0446	3.8505
F2	15.5290	16.6203	15.5675	1.0913	0.0385	3.5279
	15.0569	16.2280	15.0978	1.1711	0.0409	3.4924
	14.1870	15.7497	14.2419	1.5627	0.0549	3.5132
F3	15.2570	16.5676	15.3033	1.3106	0.0463	3.5327
	15.5763	16.6640	15.6151	1.0877	0.0388	3.5672
	15.5290	16.6224	15.5677	1.0934	0.0387	3.5394
F4	15.0569	16.1478	15.0942	1.0909	0.0373	3.4192
	14.1887	15.0673	14.2163	0.8786	0.0276	3.1414
	15.2578	16.3740	15.2935	1.1162	0.0357	3.1984
F5	14.7035	15.7868	14.7480	1.0833	0.0445	4.1078
	15.5768	16.7552	15.6250	1.1784	0.0482	4.0903
	15.5290	16.6416	15.5764	1.1126	0.0474	4.2603
F6	15.0574	16.7367	15.1189	1.6793	0.0615	3.6622
	15.8147	16.8318	15.8510	1.0171	0.0363	3.5690
	15.1318	16.3467	15.1753	1.2149	0.0435	3.5805
F7	14.1883	15.2522	14.2267	1.0639	0.0384	3.6094
	15.2570	16.3651	15.2981	1.1081	0.0411	3.7091
	14.7035	15.8917	14.7480	1.1882	0.0445	3.7452
F8	15.5767	16.6881	15.6152	1.1114	0.0385	3.4641
	15.5292	16.5876	15.5648	1.0584	0.0356	3.3636
	15.0570	16.1968	15.0972	1.1398	0.0402	3.5269

Tabla Nº 8. Resultados individuales para contenido de proteína cruda.

MUESTRA	PESO MUESTRA	VOLUMEN	%NITROGENO	%PROTEINA
F1	0.106	2.12	2.6289	14.1962
	0.112	2.23	2.6172	14.1328
	0.101	2.09	2.7200	14.6881
F2	0.108	2.38	2.8967	15.6421
	0.104	2.47	3.1218	16.8579
	0.100	2.28	2.9970	16.1836
F3	0.105	2.39	2.9920	16.1566
	0.101	2.32	3.0194	16.3045
	0.108	2.39	2.9089	15.7078
F4	0.100	2.30	3.0233	16.3256
	0.100	2.30	3.0233	16.3256
	0.107	2.25	2.7641	14.9259
F5	0.108	2.26	2.7506	14.8534
	0.100	2.34	3.0758	16.6095
	0.134	2.83	2.7761	14.9907
F6	0.109	2.64	3.1836	17.1917
	0.103	2.34	2.9862	16.1257
	0.116	2.83	3.2068	17.3169
F7	0.102	2.28	2.9382	15.8663
	0.100	2.36	3.1021	16.7515
	0.11	2.42	2.8918	15.6158
F8	0.100	2.46	3.2336	17.4613
	0.101	2.42	3.1495	17.0073
	0.102	2.66	3.4279	18.5107

Normalidad: 0.09389

Tabla Nº 9. Resultados individuales para contenido de grasa cruda.

MUESTRA	PESO DE MUESTRA	MATRAZ VACÍO	MATRAZ CON GRASA	% GRASA CRUDA
F1	3.3773	86.5984	88.3998	53.3385
	2.9723	120.8275	122.5608	58.3151
	5.8447	112.462	115.6004	53.6965
F2	2.3953	101.9371	103.1302	49.8100
	4.3615	88.0273	90.2797	51.6428
	2.6378	112.7758	113.9901	46.0346
F3	3.8637	88.0780	90.3380	58.4932
	4.68998	112.7831	114.9234	45.6356
	4.05772	86.6043	88.9544	57.9168
F4	3.33243	112.4684	113.6875	36.5829
	4.11374	101.9459	103.5735	39.5650
	4.83246	120.8401	122.7919	40.3894
F5	3.98798	86.6024	88.6556	51.4847
	4.09833	112.7819	115.1115	56.8427
	3.84792	119.6937	121.4396	45.3726
F6	3.86341	95.3012	97.6624	61.1170
	3.16286	120.8424	123.1917	74.2777
	3.61918	101.9453	104.5312	71.4499
F7	4.67318	112.7882	115.2911	53.5588
	6.12878	112.4724	115.7149	52.9061
	5.18359	86.6078	89.7549	60.7127
F8	4.10126	101.9519	103.4298	36.0353
	4.27186	120.8458	122.8860	47.7591
	4.56979	88.0820	90.3380	49.3677

Tabla Nº 10. Resultados individuales para contenido de fibra cruda.

MUESTRA	PESO DE CRISOL CON MUESTRA	PESO DEL CRISOL CON MUESTRA SECADA	PESO DEL CRISOL CON MUESTRA INCINERADA	%FIBRA CRUDA
F1	30.8461	30.4231	29.7584	2.1549
	31.3125	30.8521	29.8784	3.1096
	30.6198	30.335	29.7284	1.9811
F2	31.0666	30.7673	29.6786	3.5044
	32.3053	31.8738	30.2342	5.0753
	31.1509	30.8322	29.6595	3.7646
F3	31.4626	31.1323	29.7894	4.2682
	31.4222	31.0661	29.6465	4.5178
	31.8749	31.4746	30.1674	4.1010
F4	31.0224	30.7606	29.7216	3.3492
	31.054	30.8233	29.7399	3.4888
	31.3476	30.9603	29.7098	3.9891
F5	31.5907	31.0617	30.2227	2.6558
	31.3099	30.9132	29.7094	3.8448
	31.3834	30.9774	29.8406	3.6223
F6	30.9583	30.5079	29.655	2.7550
	31.5167	31.055	30.1747	2.7931
	31.0723	30.6214	29.7195	2.9026
F7	32.1477	31.4965	30.2535	3.8665
	31.3538	30.7444	29.6973	3.3396
	31.6634	31.008	29.7827	3.8698
F8	31.2178	30.6901	29.6974	3.1799
	31.2767	30.7567	29.8155	3.0093
	31.2542	30.799	29.7572	3.3333

Tabla N° 11. Resultados individuales para contenido de azúcares totales.

MUESTRA	PESO DE MUESTRA	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN	% AZÚCARES TOTALES
F1	6.0897	1.680	0.0224	0.3684
	6.0897	1.526	0.0204	0.3347
	6.0897	1.758	0.0235	0.3855
F2	6.1099	2.197	0.0293	0.4800
	6.1099	2.062	0.0275	0.4506
	6.1099	1.880	0.0251	0.4109
F3	2.2365	2.498	0.0111	0.4969
	2.2365	2.635	0.0117	0.5242
	2.2365	2.737	0.0122	0.5444
F4	2.1467	2.709	0.0121	0.5614
	2.1467	2.552	0.0114	0.5289
	2.1467	2.552	0.0114	0.5289
F5	2.4416	2.834	0.0126	0.5164
	2.4416	2.834	0.0126	0.5164
	2.4416	3.135	0.0139	0.5712
F6	1.8585	2.571	0.0114	0.6155
	1.8585	2.612	0.0116	0.6253
	1.8585	2.799	0.0125	0.6700
F7	2.3122	2.872	0.0128	0.5526
	2.3122	3.010	0.0134	0.5791
	2.3122	3.135	0.0139	0.6031
F8	2.4031	3.010	0.0134	0.5572
	2.4031	2.872	0.0128	0.5317
	2.4031	2.767	0.0123	0.5122

Tabla N° 12. Resultados individuales para contenido estimado de polifenoles.

MUESTRA	PESO DE MUESTRA	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN	% ESTIMADO DE POLIFENOLES
F1	1.2833	0.704	0.0622	4.8459
	1.2606	0.639	0.0566	4.4925
	1.4586	1.058	0.0924	6.3379
F2	1.5283	1.260	0.1097	7.1785
	1.3012	1.069	0.0934	7.1768
	1.4283	1.115	0.0973	6.8134
F3	1.1575	0.366	0.0666	5.7536
	1.0169	0.299	0.0551	5.4229
	0.9494	0.307	0.0565	5.9525
F4	1.1720	0.315	0.0579	4.9386
	1.0160	0.398	0.0721	7.0933
	1.0041	0.325	0.0745	7.4183
F5	1.1239	0.395	0.0894	7.9584
	1.6389	0.629	0.1116	6.8067
	1.4223	0.608	0.1080	7.5909
F6	1.0179	0.428	0.0772	7.5839
	1.0847	0.484	0.0868	7.9994
	1.1580	0.514	0.0919	7.9359
F7	1.0016	0.285	0.0659	6.5835
	1.1299	0.442	0.0796	7.0440
	1.0191	0.393	0.0712	6.9879
F8	1.0695	0.482	0.0864	8.0811
	1.0752	0.546	0.0974	9.0558
	1.1069	0.547	0.0975	8.8119

Tabla N° 13. Resultados individuales para pH.

Muestra	Peso	pH
F1	1.38	5.47
	1.48	5.68
	1.45	5.62
F2	1.29	5.21
	1.27	5.27
	1.25	5.26
F3	1.33	6.25
	1.25	6.15
	1.30	6.23
F4	1.44	5.94
	1.45	5.96
	1.34	6.04
F5	1.27	6.21
	1.14	5.95
	1.40	6.13
F6	1.34	4.65
	1.34	4.56
	0.86	4.75
F7	1.42	5.75
	1.17	5.19
	1.42	5.65
F8	1.02	5.91
	1.02	5.97
	1.05	6.21

ANEXO N° 7

NORMATIVA MEXICANA

NMX-F-352-S-1980

NMX-F-352-S-1980. CACAO EN GRANO FERMENTADO. FERMENTED COCOA BEANS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma participaron los siguientes Organismos:

Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

Dirección General de Sanidad Vegetal.

Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Subsecretaría de Mejoramiento del Ambiente.

Unión Nacional de Productores de Cacao.

Asociación Nacional de Fabricantes de Chocolates, Dulces y Similares, A.C.

Larín División Richardson Merrell.

Nacional de Dulces, S.A de C.V.

Lady Baltimore, S.A.

La Azteca, S.A. de C.V.

La Esperanza, S.A.

Cámara Nacional de la Industria de Transformación

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Mexicana establece las especificaciones que debe cumplir el cacao en grano fermentado, destinado para su uso en la elaboración de productos alimenticios.

2. REFERENCIAS

Para el desarrollo del muestreo y la verificación de las especificaciones que se establecen en esta Norma, se deben aplicar las siguientes Normas Mexicanas vigentes:

NMX-F-339-S Cacao en grano- muestreo

NMX-F-268 Granos de cacao - Determinación del contenido de humedad (Determinación del contenido de humedad en granos de cacao).

NMX-F-272 Granos de cacao - Prueba de corte (Prueba de corte para granos de cacao).

NMX-F-163-S Granos de cacao - Determinación de aflatoxinas. (cuatro partes).

3. DEFINICIONES

3.1 Cacao en grano fermentado: Grano entero y sano extraído de las mazorcas maduras de árboles de la especie ***Theobroma cacao* L.** de la familia de las ***Sterculiaceas***, que ha sido objeto de una buena fermentación, y que ha sido secado bajo condiciones adecuadas ya sea al sol o por medios artificiales.

3.2 Materia extraña: Materia que no es lo que se describe anteriormente como cacao en grano fermentado o fragmentos propios del mismo.

3.3 Adulteración: Modificación de la composición del grano por cualquier medio, de manera que la mezcla resultante no sea de la clase prescrita e influya perjudicialmente en la calidad y/o sabor o modifique la masa y/o el volumen del grano.

3.4 Defectos

3.4.1 Pacha: Grano de cacao que carece de cotiledones o que éstos son demasiado delgados para aplicar la prueba del corte.

3.4.2 Grano dañado por insectos: Grano de cacao cuyas partes se encuentran infestadas por insectos en cualquier etapa de desarrollo o que a simple vista muestren los daños causados por ellos.

3.4.3 Grano con hongos: Grano de cacao en cuyo interior se observan hongos a simple vista.

3.4.4 Grano pizarroso: Grano de cacao que muestra un color pizarroso en la mitad o más de la superficie expuesta, al cortarle longitudinalmente por el centro.

3.4.5 Grano violáceo: Grano de cacao cuyo vire de color debido a la fermentación no se ha alcanzado completamente, por lo que muestra un color violáceo en la mitad o más de la superficie, expuesta al cortarle longitudinalmente por el centro.

4. CLASIFICACIÓN

El cacao en grano fermentado, de acuerdo con el número de granos defectuosos que arroje la prueba de corte (véase 2) y con el número de granos contenidos en un kilogramo, se clasifican en:

Cacao fermentado clase México 1

Cacao fermentado clase de calidad inferior (CI)

5. ESPECIFICACIONES

El producto objeto de esta Norma debe cumplir con las especificaciones siguientes:

5.1 Sensoriales

El grano de cacao fermentado debe tener el aroma y sabor característico del cacao bien fermentado, sin ningún olor extraño: incluyendo el olor a petróleo y el de humos procedentes de la operación de secado, así como a tierra húmeda o a hongos resultantes de mal manejo, sobrefermentación o almacenamiento deficiente.

5.2 Físicas y Químicas

Humedad 7.5 % máx.

Aflatoxinas 20.0 microgramos por kilogramo (0.02 ppm) máx.

5.3 Microbiológicas

El cacao fermentado debe presentar ausencia de microorganismos causantes de descomposición del producto, y que puedan afectar en su uso la salud del consumidor.

5.4 Tamaño

En una cosecha normal la masa promedio debe estar entre 900 y 1200 granos por kilogramo.

4.5 Límites de defectos, después de la prueba de corte:

DEFECTOS	CACAO FERMENTADO CLASE MÉXICO 1
Pizarrosos	4.0 % máx.
Violáceos	10.0 % máx.
Grano con hongos	4.0 % máx.
Grano dañado o infestado por insectos	4.0 % máx.
Pacha	2.0 % máx.
Grano roto	2.0 % máx.
La suma de grano con hongos y de grano dañado o infestado por insectos	6.0 % máx.

1) En caso de infestación por insectos vivos, proceder a su fumigación.

Cacao fermentado clase de calidad inferior (CI):

- Todo el cacao en grano fermentado, que no cumpla con las especificaciones del cacao fermentado clase México 1.

5.6 Materia extraña

El grano de cacao fermentado debe estar regularmente libre de materia extraña adherida o suelta; así como limpio y libre de excesivas cantidades de pulpa seca o mucílago en su superficie.

- Madera, tallos, restos de mazorcas, resto de sacos, piedras y fibras: 0.5 % máx.
- Excretas de roedor: 22 mg/kg máx.

5.7 Contaminantes

Los residuos de plaguicidas autorizados, deben estar dentro de los límites que señala la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos y la Secretaría de Salubridad y Asistencia y están sujetos a modificaciones (véase A.2).

6. ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

6.1 Los locales, instalaciones y transportes que utilicen para el almacenamiento del producto objeto de esta Norma, deben hacerse en condiciones higiénicas que cumplan con el Código Sanitario, sus Reglamentos y demás disposiciones de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

6.2 Los sacos de cacao en grano fermentado, deben almacenarse en locales adecuados para el grano, aislados de otros productos que afecten su calidad y estibarse sobre tarimas de madera que los levanten no menos de

20 cm sobre el nivel del piso, conservando no menos de 60 cm entre cada estiba e igual distancia entre las estibas y la pared.

6.3 Periódicamente durante el almacenamiento e inmediatamente antes de la expedición, debe verificarse la humedad de cada lote, para cerciorarse que no exceda del 7.5 % (véase A.1).

6.4 Se deben tomar medidas para impedir la infestación por insectos, roedores y otras plagas.

6.5 Usos de plaguicidas.

Los plaguicidas usados deben ser los aprobados por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos y la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Cuando el uso de plaguicidas sea necesario para combatir una infestación, se debe tener máximo cuidado en la elección de tales productos y en su procedimiento de aplicación, para evitar que se incurra en el peligro de manchar el grano o de dejar en él residuos tóxicos (véase A.2).

7. MUESTREO

El muestreo se establece de común acuerdo entre fabricante y comprador, a falta de este acuerdo, se recomienda el siguiente método de muestreo para la aceptación de lotes de producto objeto de esta Norma, siguiendo las prescripciones indicadas en la Norma NMX-F-339-S- vigente (véase 2).

7.1 Muestreo sanitario

Para fines de control sanitario del producto, la Secretaría de Salubridad y Asistencia aplicará el sistema de muestreo y control que tiene establecido

con base en el Código Sanitario, sus Reglamentos, decretos y demás disposiciones de la misma.

8. MÉTODOS DE PRUEBA

Para la verificación de las especificaciones que se establecen en esta Norma, se deben aplicar las Normas Mexicanas que se indican en el capítulo de referencias (véase 2), así como los métodos de prueba que sean necesarios para su control.

9. ENVASE Y EMBALAJE

El producto objeto de esta Norma se debe envasar en costales nuevos y limpios, de material adecuado.

10. MARCADO

Cada saco debe de llevar una etiqueta ó impresión permanente, visible e indeleble; con los siguientes datos:

- Denominación del producto.
- Nombre o marca comercial.
- Clasificación del grano.
- Contenido neto expresado en kilogramos.
- Nombre y domicilio del productor o representante.
- Lugar de procedencia.
- Leyenda "PRODUCIDO EN MÉXICO" y el Número de lote.

APÉNDICE

A.1 Para verificar la humedad de los lotes de cacao fermentado se puede emplear el higrómetro, cuyo funcionamiento se debe comprobar aplicando la Norma NMX-F-268 vigente (véase 2).

A.2 Plaguicidas: Esta parte no se integra en la Norma, si no que es una guía que está sujeta a los cambios que indiquen la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos y la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Para el control de plagas de campo:

- Diazinón, concentrado emulsionable 25% y 60%; polvo 25% y granulado 14%.
- Malatión: polvo 4%, concentrado emulsionable ultra bajo volumen (UBV) 50%, emulsión 100%.
- Naled 50%.
- Sevín: polvo 5%, 7.5% y 10%; suspensión 30% y polvo humectable (PH) 80%.
- Dimetil dicloro vinil fosfato (DDVP) 50%.
- Para almacenamiento (aplicación al grano de cacao después de la cosecha):

PLAGUICIDAS	TOLERANCIA
Bromuro de metilo	50 mg/kg (ppm)
Piretrinas	1 mg/kg (ppm)
Butóxido de piperonilo	8 mg/kg (ppm)
Fosfuro de aluminio	0.1 mg/kg (ppm)
Diclorvos	0.5 mg/kg (ppm)

Se prohíbe el uso de insecticidas clorados: hexacloro ciclo hexano (BHC); clordano; heptacloro y dicloro difenil tricloroetano (DDT).

A.3 Las normas NMX que se mencionan en esta Norma, corresponden a las normas DGN vigentes de la misma letra y número.

10. BIBLIOGRAFÍA

CCP: CC/GWP75/1 Febrero 1975. Anexo 1 Normas Internacionales de cacao, Ordenanza Modelo y Código de procedimientos.

ISO O2451-1973 (E) Cocoa beans - Specification.

Normas para importar cacao - Normas de calidad comercial España.

Food and Drug Administration - Administrative Guidelines Manual.

Guideline 7005.03 - Commodity Code 13. Product Cocoa Beans.

Normas de classificacao de cacau exportavel - Brasil.

Fecha de aprobación y publicación: Marzo 26, 1980.

ANEXO N° 8.
CARTA DE RECIBIDO DE INFORME TÉCNICO

Ciudad Universitaria, miércoles 28 de marzo de 2012.

Estimado Ing. Marcos Antonio Chávez Cañas.

Representante de Ingenio El Ángel.

Presente.

Mediante la presente hago cumplimiento de uno de los objetivos específicos de mi tesis titulada "Evaluación de las características ultramicroestructurales como control de calidad de la fermentación de semillas fermentadas de ocho genotipos diferentes de *Theobroma cacao* L." el cual dictaba de la siguiente forma:

2.2.5. Entregar un informe técnico en la Hacienda La Carrera en Usulután.

Por tanto, se hace anexo de dicho informe técnico en el cual se encuentran la identificación de las muestras, los análisis realizados, los métodos empleados, los resultados y la conclusión de esta investigación para su disposición.

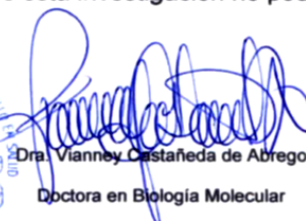
Me despido cordialmente, no sin antes agradecer la cordialidad, generosidad y apertura mostrada durante la recolecta de las muestras sin las cuales esta investigación no podría haber sido finalizada.



Br. Ana Ingrid Morazán

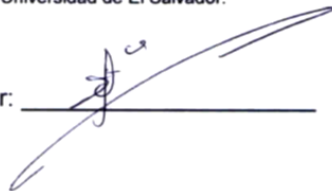
Estudiante de la Facultad de Química y Farmacia.

Universidad de El Salvador.



Dra. Vianney Castañeda de Abrego
Doctora en Biología Molecular
Universidad de El Salvador.

Recibido por: _____



Sello:

