

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
DE ALIMENTOS



**“TEOBROMINA, CAFEÍNA Y CATEQUINAS, EN GRANOS DE
CACAO DE PUCACACA Y HINGOYACU E INFLUENCIA DEL
CACAO CCN-51 Y DEL BENEFICIO”**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

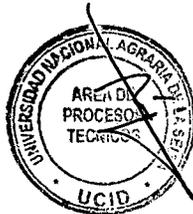
PRESENTADO POR:

LUCY JANET QUISPE HUAMÁN

PROMOCIÓN

Tingo María – Perú

2013



J10

Q09

Quispe Huamán, Lucy Janet

Teobromina, cafeína y catequinas, en granos de cacao de Pucacaca y Huingoyacu e influencia del cacao CCN-51 y del beneficio. Tingo María 2013

78 páginas; 13 cuadros; 30 figuras; 43 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero en Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

1. TEOBROMINA

2. CAFEINA

3. CATEQUINAS

4. CACAO CCN-51

5. HPLC

6. BENEFICIO.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail; fia@unas.edu.pe

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 18 de julio de 2013, a horas 5:00 p.m. en la Sala de conferencias de Posgrado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por la Bach. **QUISPE HUAMAN, Lucy Janet**, titulada:

“TEOBROMINA, CAFEINA Y CATEQUINAS, EN GRANOS DE CACAO DE PUCACACA Y HUINGOYACU E INFLUENCIA DEL CACAO CCN-51 Y DEL BENEFICIO”

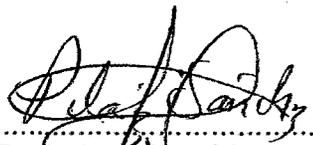
Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **MUY BUENO**; en consecuencia la Bachiller, queda apta para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51° y 52° del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 19 de julio de 2013


.....
Mag. Jorge Castro Gracey
Presidente


.....
Ing. Lauriano Zavaleta de La Cruz
Miembro


.....
Ing. Jaime Basilio Atencio
Miembro


.....
Dr. Pedro Pelaez Sánchez
Asesor

DEDICATORIA

Con eterna gratitud y profundo amor
a mi madre:

Domitila Huamán Ramos

De quien siempre estaré orgullosa,
porque de ella recibí el ejemplo de
superación, el empeño que hay que
ponerle a las cosas y la confianza, el
apoyo económico para la
culminación del presente trabajo.

Con inmenso cariño a mis
hermanos:

Elvira, Nery y Michael por su
estimulo de superación y
comprensión durante el desarrollo de
mi carrera

Con profundo amor a:

Oscar Chumbes

Por su cariño, comprensión y apoyo
incondicional que me brindo durante
su existencia

AGRADECIMIENTO

A la Cooperativa agraria ACOPAGRO y la empresa TCHO, EQUAL EXCHANGE por el apoyo económico en la ejecución del proyecto de tesis.

Al Profesor Dr. Pedro PELAEZ SANCHEZ, asesor del presente trabajo de investigación.

Al Ing. David CONTRERAS MONJARAS, apoyo técnico para la investigación del presente.

A los Ing. María de Guadalupe Días Delgado y Evil Vargas Piñan por el apoyo de asesoramiento brindado para la ejecución de la investigación

A los miembros del Jurado Calificador: Ing. Jorge Castro Gracey, Laureano Zavaleta de la Cruz, Jaime Basilio Atencio por las sugerencias brindadas.

A todos aquellas personas que colaboraron en la ejecución de la presente investigación

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue cuantificar por HPLC – FR, el contenido de teobromina, cafeína y catequinas, en granos de cacao de Pucacaca (GCP) y Huingoyacu (GCH), con tres porcentajes del híbrido CCN51; en muestras frescas, fermentadas, secos y en el licor obtenido. Para el análisis se utilizó un cromatógrafo líquido de fase reversa LC-10 AT VP Shimadzu Scientific, MD, USA a 270 nm, se determinó teobromina, cafeína (NAZARUDDIN *et al.*, 2001; F. LO COCO *et al.*, 2007) y catequinas (MINGYU DING *et al.*, 1999; RISNER, 2008). Se utilizó cacao sin desengrasar, se extrajo componentes con ácido acético 0.3 % / metanol (85:15 v/v), la fase móvil con 30.0 % metanol, 69.9 % agua, 0.1 % ácido acético; a 35 °C, con un flujo de 1 mL/min y 20 µL de muestra. La TB que prevaleció en GCH, disminuyó durante el beneficio de 1.404 ± 0.1 a 0.888 ± 0.02 g TB/100 g de grano. La CF disminuyó en las muestras de ambas localidades durante el beneficio, entre 13.24 y 40.71 %; los GCH tuvieron mayor contenido, variando entre 0.150 ± 0.01 - 0.175 ± 0.01 g CF/100 g de grano. El Índice de TB/CF indico que el GCP fue del tipo forastero y el GCH del tipo Trinitario. La C destacó en granos frescos de Huingoyacu (GFH), con valores entre 0.293 ± 0.03 - 0.403 ± 0.01 g C/100 g. La EC fue mayor en GFH y vario entre 0.701 ± 0.05 - 0.996 ± 0.05 g EC/100 g de grano, disminuyó durante la fermentación (56.07 a 87.95 %) y el secado hasta 0.12 – 0.317 g EC/100 g de granos secos. La TB, CF, C, EC disminuyó en el licor de cacao, con mayor contenido en muestras de Huingoyacu, con valores de 0.883 ± 0.02 - 1.291 ± 0.01 g TB, 0.180 ± 0.00 - 0.183 ± 0.01 g CF, 0.179 ± 0.00 - 0.246 ± 0.06 g C, 0.089 ± 0.00 - 0.273 ± 0.00 g EC; por 100 g de muestra, respectivamente.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos generales del cacao.....	3
2.1.1. Origen	3
2.1.2. Clasificación taxonómica	3
2.1.3. Cacao CCN-51.....	4
2.1.4. Composición química del grano de cacao	4
2.2. Aspectos Químicos.....	6
2.2.1. Metilxantinas	6
2.2.2. Flavonoides.....	8
2.3. Beneficio del cacao	11
2.3.1. Cosecha.....	11
2.3.2. Quiebra	11
2.3.3. Fermentación.....	11
2.3.4. Secado.....	12
2.3.5. Almacenamiento.....	12
2.4. Licor de cacao	12
2.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	13
2.5.1. Definición	13
2.5.2. Partes del equipo	14

III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Lugar de ejecución	15
3.2. Material vegetal	15
3.3. Equipos, materiales y reactivos	16
3.3.1. Equipos de laboratorio	16
3.3.2. Materiales	16
3.3.3. Reactivos y solventes	17
3.4. Métodos de análisis.....	18
3.5. Metodología experimental	18
3.5.1. Preparación de las muestras de granos de cacao.....	18
3.5.2. Análisis cromatográfico.....	22
3.5.3. Optimización de la extracción de teobromina, cafeína y catequinas de los granos de cacao.....	24
3.5.4. Cuantificación de teobromina, cafeína y catequinas en granos de cacao y en el licor de cacao.....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1. Desarrollo del método analítico para la identificación y cuantificación de teobromina, cafeína y catequinas presentes en los granos de cacao.....	30
4.2. Contenido de teobromina, cafeína, relación TB/CF vs CF y catequinas en granos de cacao de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu.....	41
4.2.1. Teobromina.....	41
4.2.2. Cafeína	44

4.2.3. Relación TB/CF vs CF	48
4.2.4. Catequina	50
4.2.5. Epicatequina	54
4.3. Determinación de teobromina, cafeína y catequinas en el licor de cacao de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu	58
V. CONCLUSIONES.....	66
VI. RECOMENDACIONES.....	68
VII. ABSTRACT	69
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	70
IX. ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Composición química de las almendras de cacao.....	5
2. Parámetros cromatográficos propuestos para el análisis de teobromina, cafeína y catequinas por HPLC.	23
3. Estándares utilizados y características obtenidas en el HPLC.....	31
4. Datos para obtener la curva estándar de Teobromina.	34
5. Datos para obtener la curva estándar de cafeína.....	34
6. Datos de la curva estándar de catequina.	35
7. Datos de la curva estándar de epicatequina.....	35
8. Contenido de teobromina (TB) en los granos de cacao, frescos, fermentados y secos, en la localidad de Pucacaca y Huingoyacu, a diferentes porcentajes de CCN51, expresado en base seca ¹	43
9. Contenido de cafeína en los granos frescos, fermentados y secos, en la localidad de Pucacaca y Huingoyacu con diferentes porcentajes de CCN51 ¹	47
10. Variación de la relación TB/CF en los granos frescos de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu a diferentes porcentajes de CCN51.....	49
11. Contenido de catequina en los granos frescos, fermentados y secos de la localidad de Pucacaca y Huingoyacu con diferentes porcentajes de CCN51 ¹	52

12. Contenido de epicatequina en los granos frescos, fermentados y secos, de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu, con diferentes porcentajes de CCN51 ¹	56
13. Contenido de teobromina, cafeína, catequina y epicatequina en el licor de cacao elaborado con granos de cacao de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu a diferentes porcentajes de CCN51 ¹	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Formula química de la teobromina.	6
2. Formula química de la cafeína.	7
3. Estructura general de las catequinas.	9
4. Estructura química de las catequinas.....	10
5. Flujograma para la obtención de muestras de granos de cacao.	20
6. Preparación del material vegetal en estudio, para el análisis por HPLC.....	21
7. Flujograma para la obtención del licor de cacao.	22
8. Diseño experimental para determinar teobromina, cafeína y catequinas, en granos de cacao fresco, fermentado y seco.	27
9. Perfil Cromatográfico del estándar de teobromina (TB)	31
10. Perfil Cromatográfico del estándar de Epigallocatequina (EGC).....	31
11. Perfil Cromatográfico del estándar de Catequina (C)	32
12. Perfil Cromatográfico del estándar de Epigallocatequina galato (EGCG).....	32
13. Perfil Cromatográfico del estándar de Cafeína (CF).....	32
14. Perfil Cromatográfico del estándar de Epicatequina (EC)	32
15. Perfil Cromatográfico del estándar de Epicatequina gallate (ECG).....	33
16. Linealidad y curva de calibración de a) Cafeína, b) Teobromina c) Catequina y d) Epicatequina.....	37

17. Perfil Cromatográfico de los estándares de teobromina (TB), catequina(C), cafeína (CF) y epicatequina (EC) a 5 concentraciones.	39
18. Evolución del sistema cromatográfico para la evaluación de teobromina, catequina, cafeína y epicatequina del cacao por variaciones en el tipo de extracción.1) cacao desengrasado, solución de extracción acetona/ agua/ ácido acético (70/ 28/ 2) 2) cacao desengrasado, extracción con agua hervida .3) cacao sin desengrasar, extracción acuosa 4) cacao sin desengrasar, extracción ácido acético 0.3 %/metanol (85:15 v/v).....	40
19. Gráfico de interacción de localidad y beneficio en la cuantificación de teobromina.....	44
20. Gráfico de interacción de localidad y beneficio en el contenido de cafeína.....	48
21. Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de catequina.....	53
22. Gráfico de interacción de localidad y la etapa de Beneficio en la cuantificación de catequina.	53
23. Gráfico de interacción de CCN51 y la etapa de Beneficio en la cuantificación de catequina.	54
24. Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de epicatequina.	57
25. Gráfico de interacción de localidad y la etapa de Beneficio en la cuantificación de epicatequina.....	57

26.	Gráfico de interacción de CCN51 y la etapa de Beneficio en la cuantificación de epicatequina.....	58
27.	Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de teobromina.....	64
28.	Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de cafeína.....	64
29.	Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de catequina.....	65
30.	Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de catequina.....	65

I. INTRODUCCIÓN

La calidad de las almendras de cacao depende de factores, tales como el genotipo, el manejo agronómico, las características de suelo, las condiciones climáticas, la tecnología postcosecha y proceso de industrialización de los granos.

En este sentido, la calidad de las almendras de cacao, en cuanto al sabor, aroma, dependerán de la experiencia y el buen cuidado que tenga el técnico encargado de su producción y manejo (PORTILLO *et. al.*, 2011).

El manejo postcosecha del cacao, denominado beneficio, constituye un aspecto de máxima importancia que permite presentar al mercado un producto de calidad, garantizando que el grano sea, requerido por la industria y asegure su comercialización, justificando un mejor precio (PINZÓN *et. al.*, 2008).

La fermentación es el paso fundamental en el beneficio del cacao. En este proceso se desarrolla el sabor y el aroma del producto y contribuye a formar un grano hinchado, de color marrón y de buena apariencia. Una adecuada fermentación da origen a un cacao que al ser convertido en chocolate, es agradable al paladar y al olfato; por el contrario un manejo

inadecuado de este proceso, afecta la calidad del producto de manera notable (PINZÓN *et. al.*, 2008). La fermentación, también llamada cura del cacao o avinagrada, es un proceso complejo que consiste en una serie de cambios de carácter bioquímicos y físico en todas las estructuras del grano, tanto en la testa o cascarilla, en el mucílago que lo cubre, el interior del cotiledón y en el embrión que debe morir y reabsorberse. El proceso implica la ocurrencia de reacciones químicas mediante las cuales las metilxantinas (teobromina, cafeína) y catequinas se van transformando.

Con el objetivo de aportar conocimientos sobre las propiedades del cacao de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu, departamento de San Martín, se inició el estudio relacionado con la evaluación del contenido de metilxantinas y catequinas en las almendras de cacao producidas; en tal sentido la presente investigación planteo el siguiente objetivo general:

Cuantificar por HPLC - FR el contenido de teobromina, cafeína y catequinas, en granos de cacao fresco, fermentado y seco de las zonas de Pucacaca y Huingoyacu, considerando tres áreas agrícolas en cada caso, con diferente porcentaje de la variedad CCN51, de igual modo analizar el licor de cacao obtenido.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales del cacao

2.1.1. Origen

El cacao es una especie originaria del bosque húmedo tropical en América del sur. Geográficamente en el mundo las mayores áreas cacaoteras están concentradas entre los 10° de latitud Norte y Sur del Ecuador, distribuida en el Oeste Africano, América Latina y Sur Este de Asia (ARÉVALO, 2004).

2.1.2. Clasificación taxonómica

El cacao obedece a la siguiente clasificación taxonómica (LEÓN, 1968).

División : Fanerógamas.
Clase : Angiospermas.
Subclase : Dicotiledónea.
Orden : Málvales.
Familia : Sterculiáceae.
Género : Theobroma.
Sección : Eutheobroma.
Especie : *Theobroma cacao* L.

2.1.3. Cacao CCN-51

CCN-51 significa Colección Castro Naranjal, porque es una colección de clones, su autor se apellida Castro y fue creada en la población de Naranjal. El número 51 es la secuencia de los clones que investigó hasta llegar al 51 que es la variedad que obtuvo éxito y brindó las características requeridas. Es una variedad ecuatoriana que crece en la zona tropical del país, es conocida como clon de alta calidad, y de excelente productividad y tolerancia a enfermedades como la escoba de bruja y *ceratoystis fimbriata* (CRESPO E., CRESPO F., 1997).

Entre las características de este clon podemos citar su excelente índice de mazorca: 8 mazorcas/libra de cacao seco en comparación con el índice promedio de 12 mazorcas/libra; excelente índice de semillas: 1.45 gr/semilla seca y fermentada comparado con el índice promedio de 1.2 gr/semilla seca; adaptabilidad: es un clon cosmopolita que se adapta a casi todas las zonas tropicales; alto porcentaje de manteca (54%), lo que lo hace cotizado por las industrias (DÍAZ, 2012).

2.1.4. Composición química del grano de cacao

La composición química de los granos de cacao depende de varios factores entre los que se pueden citar: tipo de cacao, origen geográfico, grado de madurez, calidad de la fermentación y el secado. El beneficio postcosecha también influye sobre su composición química. Los principales constituyentes químicos del cacao son: agua, grasa, compuestos fenólicos,

materia nitrogenada (proteínas y purinas), almidón y otros carbohidratos (WAKAO, 2002). La composición y el valor nutricional del cacao varían de acuerdo a la variedad y otros factores (suelo, condiciones climáticas y labores culturales) tal como se presenta en el siguiente Cuadro.

Cuadro 1. Composición química de las almendras de cacao.

Componentes	Composición (% peso fresco)
Pulpa	
– Agua	82 – 87
– Azúcares	10 – 13
– Pentosas	2 – 3
– Ácido cítrico	1 – 2
– Sales	8 – 10
Cotiledón	
– Agua	32 – 39
– Celulosa	2 – 3
– Almidón	4 – 6
– Pentosas	4 – 6
– Sacarosa	2 – 3
– Grasa	30 – 32
– Proteínas	8 – 10
– Teobromina	2 – 3
– Cafeína	1
– Ácidos	1
– Polifenoles	5 – 6

Fuente: Hill *et. al.*, (2009).

2.2. Aspectos Químicos

2.2.1. Metilxantinas

Teobromina

La teobromina ($C_7H_8N_4O_2$, de nombre químico 3,7-dimetilxantina o 3,7-dihidro-3,7-dimetil-1H-purina-2,6-diona) es un alcaloide de la familia de las metilxantinas, familia que incluye también a la teofilina y la cafeína. En estado puro, es un polvo blanco. Es soluble en ácidos y bases, poco soluble en agua y alcohol etílico, y prácticamente insoluble en éter etílico

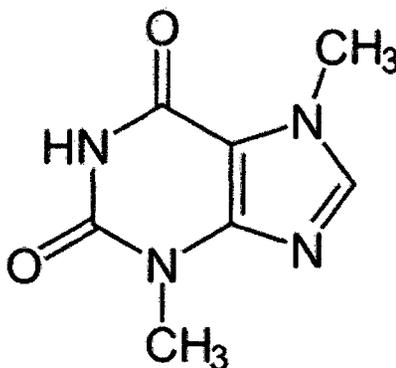


Figura 1. Formula química de la teobromina.

Esta sustancia se encuentra en la planta del cacao (*Theobroma cacao*), principalmente en las semillas, las cuales contienen entre un 1% a un 4% de ésta. Al fermentar y secar las semillas, y luego procesar el extracto obtenido, se obtiene el chocolate. El chocolate negro contiene aproximadamente 1,5% de teobromina, esto es diez veces más que el chocolate con leche común.

Cafeína

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, sólido cristalino, blanco y de sabor amargo, que actúa como una droga psicoactiva y estimulante. La cafeína fue descubierta en 1819 por el químico alemán Friedrich Ferdinand Runge: fue él quien acuñó el término Koffein, un compuesto químico en el café, el cual pasaría posteriormente al español como cafeína (CALLE, 2011)

Este alcaloide actúa como estimulante del sistema nervioso central y se encuentra presente también en forma natural en el té y el cacao (GOTTELAND M., SATURNINO V., 2007)

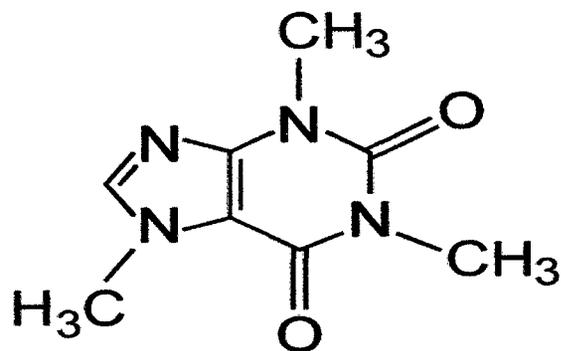


Figura 2. Formula química de la cafeína.

La teobromina y la cafeína pertenecen a la familia de las purinas y representan más del 99% de los alcaloides presentes en el cacao. La concentración final de ambos, está determinada por el genotipo, el grado de maduración de las almendras y el nivel de fermentación (WAKAO, 2002).

2.2.2. Flavonoides

Entre los polifenoles, los flavonoides constituyen el grupo más importante representando el 60% de éstos. Se han identificado más de 5000 variedades de flavonoides.

El cacao que se obtiene de las semillas de *Theobroma Cacao*, es una importante fuente dietética de antioxidantes dado su elevado contenido en flavonoides, principalmente flavanoles.

Catequinas

Catequinas son compuestos fenólicos clasificados como “flavonoides del tipo 2-fenilbenzopirano”, presentan un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$, es decir, dos anillos aromáticos enlazados por un heterociclo oxigenado que tiene tres átomos de carbono y, debido al grado de oxidación en su estructura, se conocen también como “flavan-3-oles”. Estructuralmente están constituidas por dos sistemas, producto de las rutas biosintéticas a través de las cuales tienen origen, la del shikimato y la del acetato. Estos sistemas son: sistema benzoilo (anillo A) y el sistema cinamoilo (anillo B) (Figura 1). Además, las catequinas tienen dos carbonos quirales (C_2 , C_3), razón por la cual presentan el fenómeno de rotación óptica, dando lugar a cuatro formas ópticamente activas (dos racémicas), dependiendo de los sustituyentes que las conforman (CALA *et. al.*, 2011).

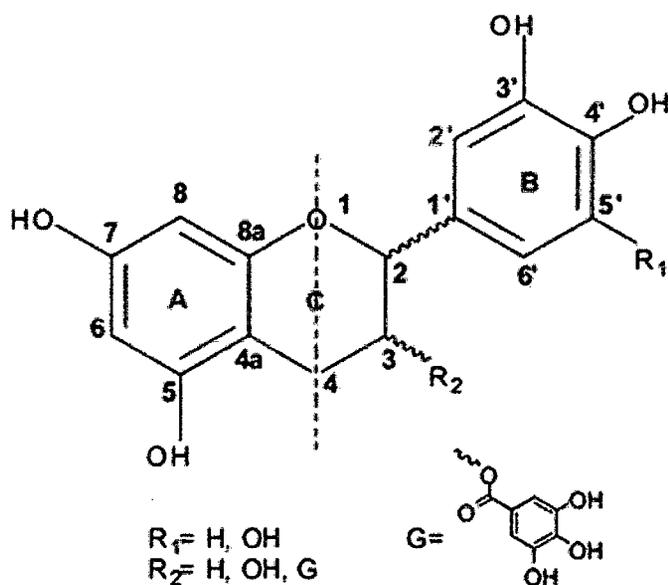


Figura 3. Estructura general de las catequinas.

Las catequinas se caracterizan por ser sólidos blancos a temperatura ambiente, de relativamente elevado peso molecular (> 250 g/mol), puntos de fusión altos y son solubles en solventes polares. El espectro de absorción UV-Vis es característico para los flavonoides en general, presenta dos bandas de mayor intensidad, la primera entre 210 – 240 nm, a razón del sistema benzoilo y otra banda entre 280 – 350 nm, debido al sistema cinamoilo.

Las catequinas se encuentran de manera exclusiva en las plantas como metabolitos secundarios, que las protegen de los potenciales daños ocasionados por los radicales generados durante el proceso de fotosíntesis, y actúan como antioxidantes (CALA *et. al.*, 2011).

Entre las catequinas de mayor distribución en las diferentes matrices figuran las siguientes: (\pm)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-

epigalocatequina, (-) epicatequina galato y (-)-epigalocatequina galato (Figura 4).

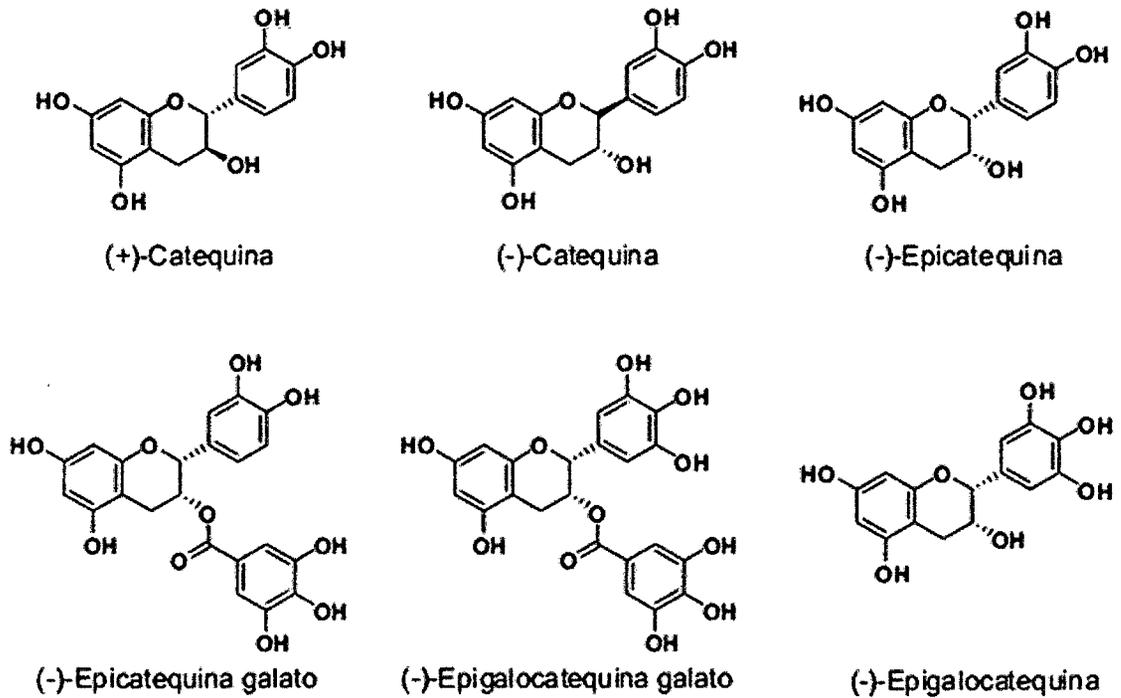


Figura 4. Estructura química de las catequinas.

Las catequinas aisladas del cacao tienen fuertes propiedades antioxidantes *in vitro*, como lo demuestra al comparar las catequinas del chocolate con las del té, con respecto a las cuales muestran un efecto antioxidante 4 veces mayor 12 siendo las catequinas y sus oligómeros unidos por enlace $C_4 \rightarrow C_8$ las de mayor efecto (GUTIERREZ, 2011).

2.3. Beneficio del cacao

2.3.1. Cosecha

Cuando las vainas de cacao están maduras, se cortan el árbol con machetes o cuchillo similar fijo a una larga pértiga que alcance las ramas más altas (DESROSIER, 2007).

La cosecha frecuente evita la sobre maduración de las mazorcas y germinación de las almendras en su interior. La presencia de almendras germinadas, es un grave defecto porque los hongos invaden estas almendras, influyendo negativamente sobre el sabor del chocolate y poniendo en riesgo su inocuidad (DIAZ, 2011).

2.3.2. Quiebra

La quiebra es la segunda etapa del beneficio de cacao que consiste en partir los frutos y extraer los granos; debe realizarse antes de los 5 días después de la cosecha (ARÉVALO, 2004). La quiebra de las mazorcas se debe realizar con un machete sin filo y tener cuidado de no causar daño a las almendras (ACEBY G., RODRIGUEZ A., 2002).

2.3.3. Fermentación

Los granos se fermentan para ayudar a la eliminación de la pulpa adherida a ellos y prepararlos para el secado. Sin embargo, los cambios químicos y biológicos que se llevan a cabo durante la fermentación son

esenciales para el desarrollo adecuado del sabor a chocolate en la etapa de tostación (DESROSIER, 2007).

Sin este tratamiento, los granos de cacao son excesivamente amargos, ácidos y astringentes, y cuando son procesados no desarrollan el aroma y sabor característico del chocolate (DIAZ, 2011).

2.3.4. Secado

El secado de las almendras de cacao fermentadas se realiza mejor al sol. Pero la lluvia, la estación o el clima, pueden requerir del uso de secado mecánico (DESROSIER, 2007).

2.3.5. Almacenamiento.

Los granos de cacao secos, se guardan en sacos de yute y almacenan en ambientes techados de blanco o de colores claros y secos, bien ventilados acomodados y apilados sobre parihuelas de madera alejada de productos que emanen olores fuertes (servicios higiénicos, pesticidas, combustibles, detergentes, humo) (ICT, 2003).

2.4. Licor de cacao

El licor de cacao se produce por medio de la molienda de los nibs de cacao. La finura a la cual la masa necesita ser molida depende de su uso final (DIAZ, 2012).

El licor de cacao es el producto obtenido del cacao sin cáscara ni germen que se obtiene de vainas de cacao de calidad comerciable, sin quitar ni añadir ninguno de sus elementos (CODEX STAN 141-1983, 2001).

El licor o pasta de cacao puede servir para la producción de chocolates, manteca y polvo de cacao.

2.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

2.5.1. Definición

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC, de sus siglas en inglés) es la técnica de separación más ampliamente utilizada en separaciones analíticas. Las razones de su popularidad de esta técnica es su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general (SKOOG, LEARY, 1994). En alimentos, es utilizado como un método confirmatorio para la determinación de aditivos, contaminantes y compuestos naturales (BOVANOVA, BRANDSTETEROVÁ, 2000), además para separar, aislar, identificar y cuantificar compuestos desconocidos tales como vitaminas, proteínas y compuestos activos como flavonoides, alcaloides y esteroides en una muestra (HORIE, KOHATA, 2000), también aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos y esteroides

(SKOOG, 1994). Para la cuantificación de estos compuestos se utiliza estándares específicos para cada uno de ellos (HORIE, KOHATA, 2000).

2.5.2. Partes del equipo

Consta de los siguientes componentes principales (KAZAKEVICH, 2007):

Bomba: Son dispositivos de alta tecnología que tiene por función de entregar la fase móvil a través del sistema, a un flujo variado (1mL/min.) en cantidades exactas y de manera precisa.

Inyector: El fin del proceso de inyección es introducir la muestra en un reservorio sujeto a acción de la bomba para luego ser llevado a la columna.

Columna: La columna es considerada como una herramienta para la separación de las moléculas presentes en la muestra que está siendo analizado.

Detector: El detector por lo general es ultravioleta (UV) o visibles (VIS), detecta la presencia de las moléculas motivo de análisis. Una vez que la muestra sale de la columna es presentada al detector que identifica en función a la absorbancia la cantidad presente de un determinado analito; luego el detector convierte esta interacción en señal electrónica que es enviada al sistema de datos. La magnitud de esta señal es graficada contra el tiempo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía– CIDBAM, en el área de HPLC, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco; a una altitud de 660 m.s.n.m. a 09° 17' 08" de Latitud Sur, a 75° 59' 52" de Latitud este ,con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 84 % y temperatura media anual de 24oC. y el proceso (recepción, fermentación y secado) se realizó en los micro fermentadores que cuenta la cooperativa en la ciudad de Juanjui a una altitud 302 m.s.n.m a 7°.10'53.0". de Latitud Sur a 76°.44'06.9" de Latitud Oeste.

3.2. Material vegetal

Las muestras de granos de cacao fueron obtenidas de La Cooperativa Agraria Cacaotera ACOPAGRO, procedentes de los comités descentralizados de Pucacaca a una altitud 240m.s.n.ma 6°.53'16" de Latitud Sur a 76°.19'26" de Latitud Oeste y Huingoyacu, a una altitud 418m.s.n.m a 6°.51'43.0" de latitud sur a 76°.39'38.0" de Latitud Oeste, se contó con 103

productores de los cuales se seleccionaron aleatoriamente 30 productores para la obtención de muestra.

3.3. Equipos, materiales y reactivos

3.3.1. Equipos de laboratorio

- Equipo HPLC (Shimadzu Scientific, MD, USA.).
- Balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión).
- Estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS HeatingDrying Oven)
- Congelador FFV-2065FW (Frigidaire, USA)
- Desionizador modelo D 7035 (Barnstead)
- Agitador magnético modelo 625 standard (VWR™ hotplate/stirrer)
- Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industries SITM)
- Bañomaria modelo YCW-010E (Associated With Cannic, Inc, USA).
- Refrigeradora Icebeam Door Cooling LG GR-5392QLC.

3.3.2. Materiales

Materiales de vidrio

- Matraces erlenmeyer de 150, 250 mL.
- Vasos de precipitación de 50, 80, 100, 250 y 1000 mL.

- Pipetas graduadas de 10 mL.
- Micropipetas 0.5-10 μ L, 10 – 50 μ L, 10– 100 μ L, 20– 200 μ L y 100– 1000 μ L.
- Tubos de ensayo Gene Mate® de 10 mL.
- Fiolas de 10, 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Probetas graduadas de 10, 100, 250, 500 y 1000mL.

Otros materiales

- Tips, FISHERBRAND® (1000 y 200 \square)
- Microtubos (1,5 -2,00 mL)
- Filtro de membrana de 0,2 μ m
- Microfiltro de jeringas de 0.2 μ m
- Pinzas.
- Espátulas.
- Gradillas.

3.3.3. Reactivos y solventes

- Theobromine \geq 99.0%, solido, sigma.
- Caffeine meets USP testing specifications, anhydrous X 250GR. Sigma.
- (+)-Catequina hydrate, \geq 98% (HPLC), powder, sigma.
- (-)-Epicatechingallate, \geq 98% (HPLC), from green tea, sigma-aldrich.

- (-)-Epigallocatechingallate, $\geq 80\%$ (HPLC), from green tea, sigma.
- (-)-Epigallocatechin, $\geq 95\%$ (HPLC), from green tea, sigma-aldrich.
- (-)-Epicatechin, $\geq 90\%$ (HPLC) (Sigma).
- Etanol (grado HPLC), Sigma Chemical
- Metanol (grado HPLC), Sigma Chemical
- Etanol al 99,99% Merck KGaA.
- Ácido acético glacial
- Agua destilada desionizada (H₂O dd).

3.4. Métodos de análisis

Determinación de teobromina y cafeína (NAZARUDDIN *et. al.*, 2001; F. LO COCO *et. al.*, 2007).

Determinación de catequina, epicatequina galato, epigallocatequina galato, epigallocatequina, epicatequina (MINGYU DING *et. al.*, 1999; RISNER, 2008).

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Preparación de las muestras de granos de cacao

Para la obtención de las muestras se siguió el Flujograma que se muestra en la Figura 5, para los granos frescos y fermentados se tomaron 2 kg

que fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio y secadas gradualmente en estufa a 35°C /8 horas y 65°C /18 horas, hasta una humedad del 6 %.

La muestra de cacao seco se obtuvo mediante un secado solar hasta 6 % de humedad.

Los granos frescos, fermentados y secos fueron pelados manualmente, molidos en un molinillo, luego se realizó la extracción de los compuestos teobromina, cafeína y catequinas, se centrifugó y microfiltró, quedando la muestra lista para ser inyectado al HPLC, tal como se indica en la Figura 6.

La muestra de licor fue preparada según los parámetros establecidos en la Figura 7. Por la propia empresa. Todas las muestras fueron envasadas en empaques trilaminados y almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis.

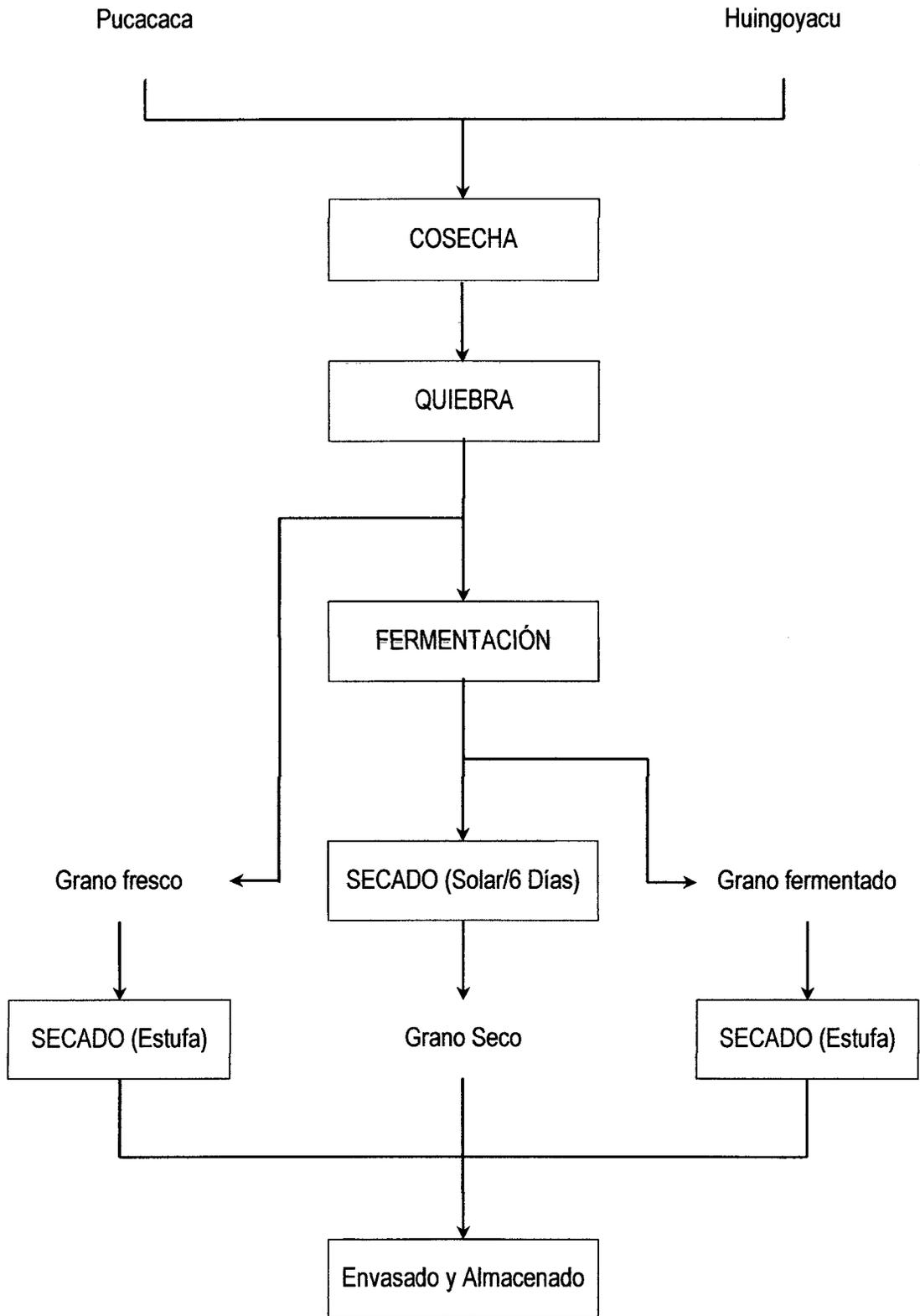


Figura 5. Flujograma para la obtención de muestras de granos de cacao.

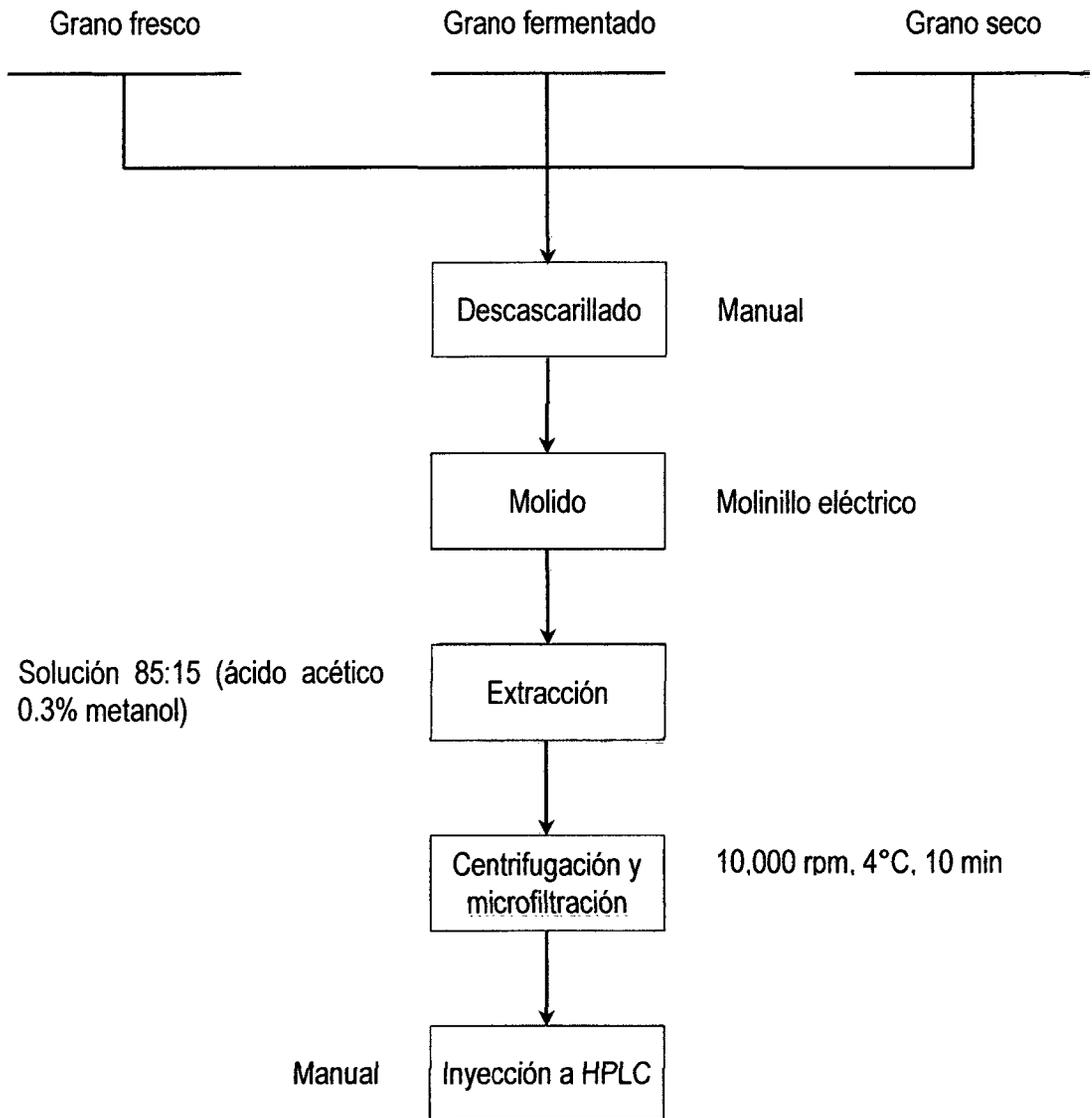


Figura 6. Preparación del material vegetal en estudio, para el análisis por HPLC.



Figura 7. Flujograma para la obtención del licor de cacao.

3.5.2. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se realizó usando un cromatógrafo líquido de fase reversa LC-10 AT VP Shimadzu Scientific, MD, USA., que consta de un desgasificador Shimadzu, DGU – 14A; un inyector manual Rheodyne 7725; un módulo de administración de solvente que incluye una bomba cuaternaria, Shimadzu LC – 10 AT; un horno columna Shimadzu CTO – 10AS; un detector UV-Vis Shimadzu, SPD_10AV, usado para determinar la pureza del pico cromatográfico; interfase SCL 10AV. La identificación e integración de picos se realizó a través del software Shimadzu, Class – VP, versión 6.13 SP2.

La separación cromatográfica se realizó con un con un guarda columna, cartucho Ultra C18, 20mm x 4mm, Marca: Restek, Código: 917450220 y una columna Cromatografica Ultra C18, Dimensiones: 150mm x 4.6mm x 5um, Marca: Restek, Código: 9174565 La temperatura de la columna se mantuvo en 35°C.

La detección de la teobromina, cafeína y catequinas fue realizada a una longitud de onda de 270 nm. La fase móvil seleccionada fue una mezcla de dos solventes, como se indica en el Cuadro 2, empleándose agua destilada desionizada y sonicada; la solución se microfiltró con un microfiltró nylon de 0.2µm y se sónico.

Cuadro 2. Parámetros cromatográficos propuestos para el análisis de teobromina, cafeína y catequinas por HPLC.

Parámetro	Especificaciones
Fase móvil	30.0 % metanol grado HPLC
	69.9 % agua grado HPLC
	0.1 % Ácido acético
Temperatura	35 °C
Flujo	1 mL/min
Volumen de muestra	20 µL

3.5.3. Optimización de la extracción de teobromina, cafeína y catequinas de los granos de cacao

Para la cuantificación de los compuestos: teobromina, cafeína y catequinas se preparó muestras desengrasadas y sin desengrasar para determinar la mejor forma de extracción.

Muestra desengrasada

Para la eliminación de la grasa se pesó 0.5g de muestra de cacao molido que fue trasferido a un tubo Falcon (50mL) con 15mL de hexano y se agitó en un vortex por 1min, luego se sonicó (10 min, 38 ± 2 °C) y centrifugo (5min, 38°C, 3000 rpm, usando una tabletop centrifugue), luego se secaron las muestras desengrasadas, preparándose extractos en agua y en una solución acetona/agua/ácido acético.

Para la extracción acuosa se empleó 0.5 g de cacao desengrasado, luego se hirvió en 60 mL de agua desionizada por 1 hora, con agitación manual cada 10 minutos; luego se enrazo a 50 mL.

Para la extracción con la solución acetona / agua / ácido acético se empleó 0.25 g de cacao desengrasado, se disolvió con 2.5 mL de acetona/agua/ácido acético(70:28:2.v/v/v) y se agitó en un vortex por 15min luego se sonicó (10 min, $38 \pm 2^\circ\text{C}$) se centrifugó (5 min, 38°C, 3000 rpm).

Muestra sin desengrasar

Para la extracción acuosa se utilizó 0.02 g de muestra de cacao en 5 mL de agua, se agitó con un vortex por 15 min, microfiltró y preparó a una solución de 500 µg/mL para su posterior inyección. Para la extracción con la solución ácido acético/ metanol se empleó 0.02g de cacao molido sin desengrasar en 5 mL de una solución 85:15 ácido acético 0.3% y metanol y se agitó en un vortex por 15 min, se microfiltró y preparó una solución de 500 µg/mL.

3.5.4. Cuantificación de teobromina, cafeína y catequinas en granos de cacao y en el licor de cacao

Preparación del estándar de teobromina

Antes de inyectar las muestras en el HPLC se calibró el instrumento con estándares individuales de teobromina. El estándar fue disuelto en agua de calidad HPLC, se prepararon soluciones de teobromina (2.004, 6.012, 12.024, 23.94, 47.98 µM) que fueron usadas para levantar la curva estándar.

Preparación del estándar de cafeína

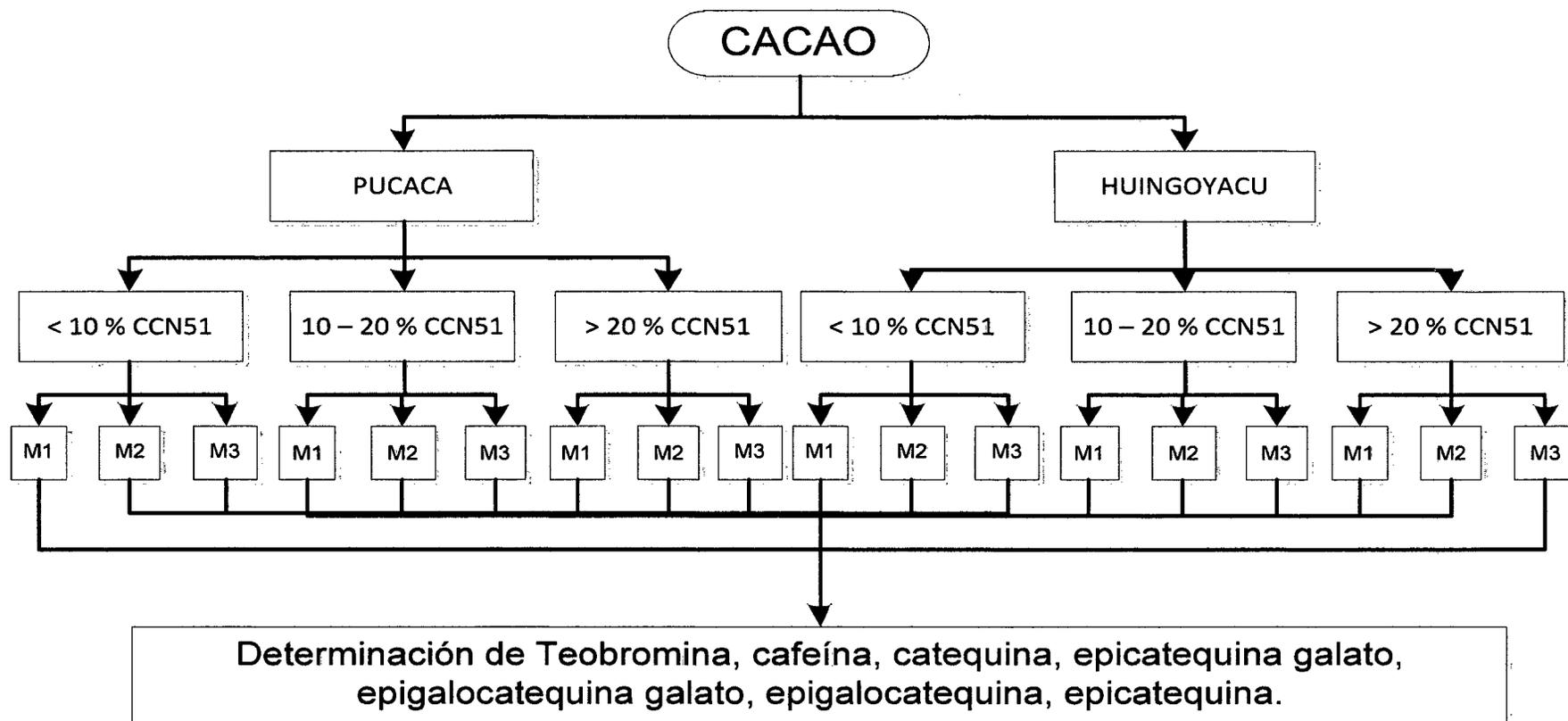
Se preparó una solución stock de 1030 µM de cafeína la cual se diluyó a diferentes concentraciones para levantar la curva estándar. El estándar fue disuelto en agua destilada desionizada, sonicada.

Preparación de los estándares de catequinas

Para el caso de las catequinas las soluciones stock fueron de 410 μM , epicatequina 447 μM , Epigallocatequina 1142 μM , epicatequina galato 340 μM , epigallocatequina galato 436 μM . Los estándares fueron disueltos en agua de calidad HPLC.

Para hacer las curvas estándares se tomaron 5 concentraciones, además del cero y se evaluó por triplicado. Las alícuotas de la solución stock fueron almacenadas a -20°C para preservar su estabilidad y calidad.

M1 = Muestreo en la recepción, M2 = Muestreo después de la fermentación, M3 = Muestreo después del secado.



M1 = Muestreo en la recepción, M2 = Muestreo después de la fermentación, M3 = Muestreo después del secado.

Figura 8. Diseño experimental para determinar teobromina, cafeína y catequinas, en granos de cacao fresco, fermentado y seco.

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un modelo estadístico diseño completo al azar con arreglo factorial de $2 \times 3 \times 3$, con mínimo tres repeticiones, para lo cual se empleó el siguiente modelo matemático (LOPEZ B. E. A., 2008; DAZA P. J. F., 2006).

$$Y_{ijk} = U + A_i + B_j + C_k + A_i \times B_j + A_i \times C_k + B_j \times C_k + A_i \times B_j \times C_k + E_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} : Determinación de Teobromina, cafeína, catequina, epicatequina galato, epigalocatequina galato, epigalocatequina, epicatequina.

U : Efecto de la media general de las muestras

A_i : Efecto de la zona de producción.

B_j : Efecto de la operación en evaluación.

– M_1 = En la recepción de las almendras

– M_2 = Después de la fermentación

– M_3 = Después del secado.

C_k : Efecto del % de CCN51.

$A_i \times B_j$: Efecto de la zona de producción y operación.

$A_i \times C_k$: Efecto de la zona de producción y del % de CCN51.

$B_j \times C_k$: Efecto de la operación y del % de CCN51.

$A_i \times B_j \times C_k$: Efecto de la interacción entre la zona de producción, la operación y el efecto del % de CCN51.

E_{ijk} : Error experimental.

Para evaluar la diferencia estadística se empleó la prueba de Tuckey, con un nivel de significación del 5%, el análisis se realizó utilizando el software STATGRAPHICS Centurión XV, versión 15.2.06.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Desarrollo del método analítico para la identificación y cuantificación de teobromina, cafeína y catequinas presentes en los granos de cacao

Para la implementación de la metodología de análisis de teobromina, cafeína y catequinas por HPLC, se seleccionó la longitud de onda para el máximo de absorbancia de 270 nm, coincidiendo con lo reportado en investigaciones de catequinas en hojas de té (DING *et. al.*, 1999). Para la cuantificación de teobromina, cafeína y catequinas durante las etapas de beneficio del cacao, fue necesario establecer las características de los estándares y de la fase estacionaria, con el fin de obtener cromatogramas adecuados y conocer el orden de elusión de cada uno.

En el Cuadro 3, se presentan los estándares utilizados, concentración, área, absorbancia y tiempo de retención (TR), se observó que la teobromina eluyó primero, seguida de la Epigallocatequina (EGC), catequina (C), Epigallocatequina galato (EGCG), cafeína (CF), epicatequina (EC) y epicatequina galato (ECG). El orden de elución de los estándares es igual al que reporta la literatura para el caso del té (DING *et. al.*, 1999), pero los tiempos de retención variaron.

Cuadro 3. Estándares utilizados y características obtenidas en el HPLC.

Estándares	Concentración (μM)	Área mUA*s	Absorbancia mUA* 10^{-3}	TR min
Teobromina	12.0	160392	22975	2.99
Epigalocatequina	39.0	105360	12373	3.20
Catequina	20.0	64432	6945	4.24
Epigalocatequina galato	1.0	219449	18116	4.66
Cafeína	18.0	302411	25551	6.44
Epicatequina	32.4	114734	7904	8.01
Epicatequina galato	16.0	946303	38000	10.65

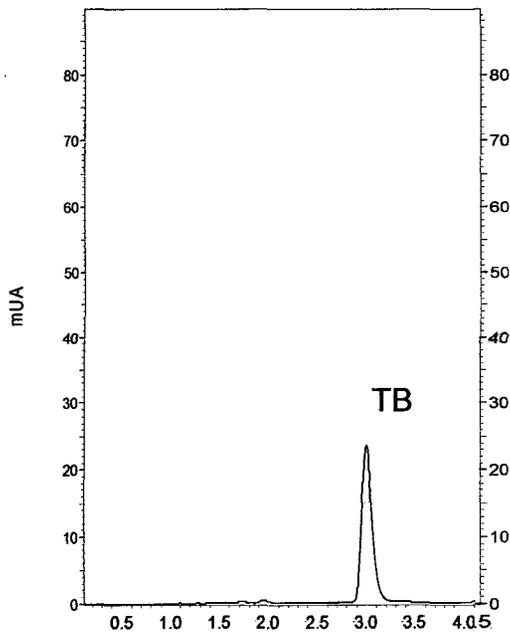


Figura 9. Perfil Cromatográfico del estándar de teobromina (TB)

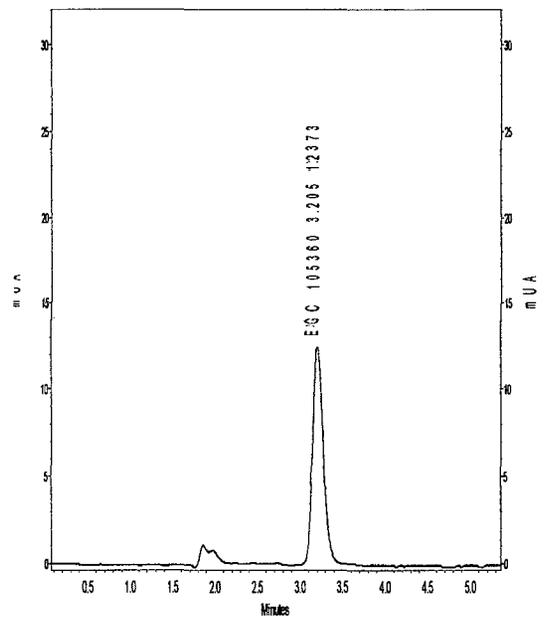


Figura 10. Perfil Cromatográfico del estándar de Epigalocatequina (EGC)

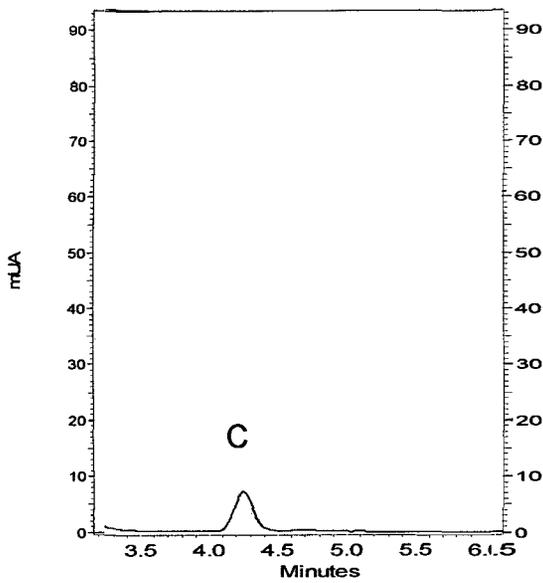


Figura 11. Perfil Cromatográfico del estándar de Catequina (C)

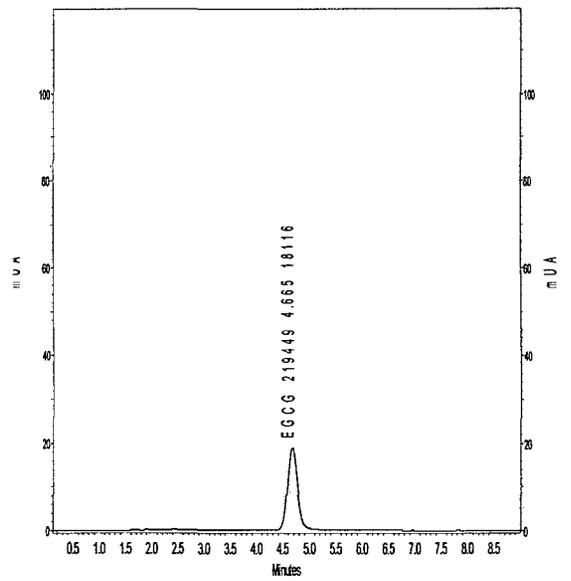


Figura 12. Perfil Cromatográfico del estándar de Epigallocatequina galato (EGCG)

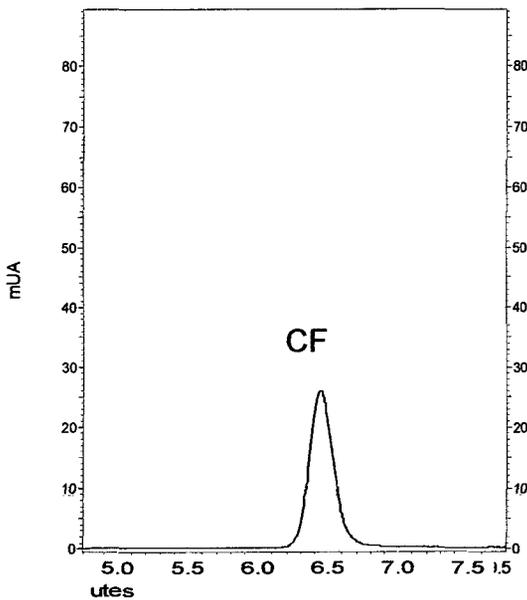


Figura 13. Perfil Cromatográfico del estándar de Cafeína (CF)

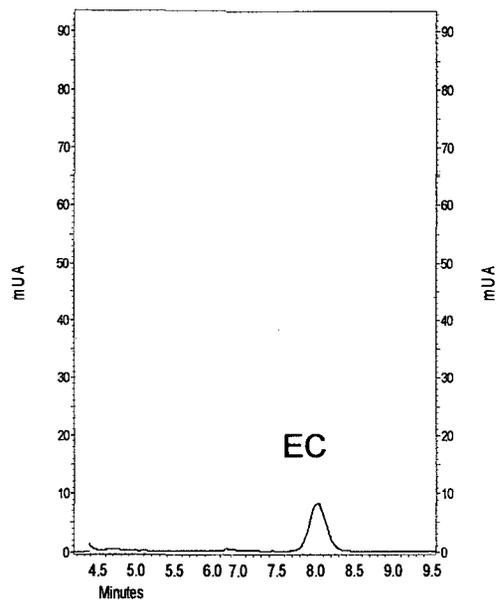


Figura 14. Perfil Cromatográfico del estándar de Epicatequina (EC)

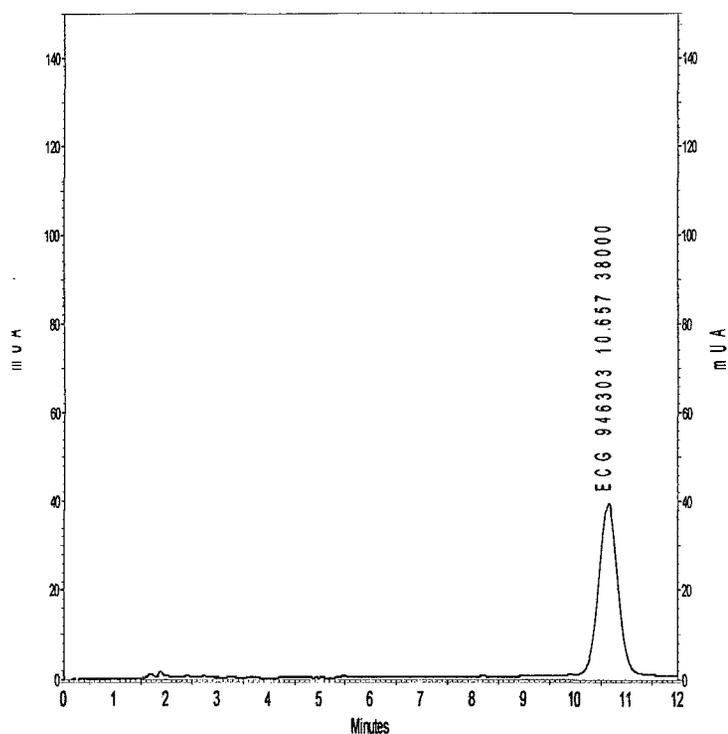


Figura 15. Perfil Cromatográfico del estándar de Epicatequina gallate (ECG)

En las Figuras 9 - 15, se observa los perfiles cromatográficos de cada estándar, estos son similares a los reportados en diversos trabajos realizados con muestras de cacao, con el fin de determinar catequinas (CALA *et. al.*, 2011) y en muestras de hojas de té (DING *et. al.*, 1999).

Los resultados para obtener las curvas estándares de teobromina, cafeína, catequina y epicatequina, se presentan en los Cuadros 4 - 7 y la representación gráfica en la Figura 16.

Cuadro 4. Datos para obtener la curva estándar de Teobromina.

Concentración (μM)	Área ¹ mUA*s	Absorbancia (mUA*10 ⁻³)	Tiempo de retención (min)
2	44,528 \pm 2102	6,065 \pm 673	2.815
6	102,317 \pm 1009	14,633 \pm 146	2.813
12	207,438 \pm 10130	29,698 \pm 675	2.812
24	403,789 \pm 6068	57,830 \pm 910	2.815
48	756,063 \pm 2106	108,553 \pm 3473	2.813

¹Indica los valores representativos del área debajo de la curva (picos HPLC) de 3 repeticiones por cada concentración de teobromina (TB), realizada en el sistema HPLC en fase reversa.

Cuadro 5. Datos para obtener la curva estándar de cafeína.

Concentración (μM)	Área ¹ mUA*s	Absorbancia (mUA*10 ⁻³)	Tiempo de retención (min)
1	19,265 \pm 1084	1,878 \pm 264	5.657
2	39,427 \pm 321	3,702 \pm 472	5.653
7	111,860 \pm 6202	10,019 \pm 76	5.652
18	313,827 \pm 10059	28,371 \pm 2448	5.648
36	603,070 \pm 31532	54,863 \pm 5842	5.652

¹Indica los valores representativos del área debajo de la curva (picos HPLC) de 3 repeticiones por cada concentración de Cafeína (CF), realizada en el sistema HPLC en fase reversa.

Cuadro 6. Datos de la curva estándar de catequina.

Concentración (μM)	Área ¹ mUA*s	Absorbancia (mUA*10 ⁻³)	Tiempo de retención (min)
1	3,757 \pm , 212	395 \pm , 12	3.738
5	16,144 \pm 1058	1,828 \pm 130	3.742
10	30,243 \pm 1626	3,332 \pm 346	3.742
15	46,312 \pm 2026	5,390 \pm 132	3.743
20	63,087 \pm 1169	7,302 \pm 310	3.742

¹Indica los valores representativos del área debajo de la curva (pico HPLC) de 3 repeticiones por cada concentración de catequina (C), realizada en el sistema HPLC en fase reversa.

Cuadro 7. Datos de la curva estándar de epicatequina.

Concentración (μM)	Área ¹ mUA*s	Absorbancia (mUA*10 ⁻³)	Tiempo de retención (min)
1	3821 \pm 291	306 \pm 14	6.573
3	9806 \pm 804	782 \pm 56	6.583
8	312118 \pm 1553	2478 \pm 116	6.577
16	60791 \pm 696	4837 \pm 40	6.568
32	124344 \pm 1588	9869 \pm 96	6.577

¹Indica los valores representativos del área debajo de la curva (pico HPLC) de 3 repeticiones por cada concentración de catequina (EC) realizada en el sistema HPLC en fase reversa.

Los datos se han presentado conforme se expresan en trabajos similares (AGUILERA C. *et. al.*, 2010) y según los resultados de la Figura 15, las ecuaciones encontradas son de primer orden teniendo como variables “y” (área) y “x” (concentración), al respecto se indica que la forma de estudio de la

asociación entre las variables "x" e "y" es la regresión (CORDOVA, 2003). Los valores R² variaron entre 0,9986 – 0.9998, indicando que existe una relación positiva muy fuerte o casi perfecta esto concuerda con lo mencionado en otras investigaciones (HERNÁNDEZ *et. al.*, 2001).

Los valores de los coeficientes de correlación permiten señalar una buena linealidad entre la concentración de analito y su área asociada de respuesta. La linealidad del método, corresponde a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Además, con estos cálculos se obtiene un rango lineal, en el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado (AGUILERA C. *et. al.*, 2010; QUATTROCHI O. *et. al.*, 1992).

Los resultados obtenidos para la repetibilidad mostraron un coeficiente de variación de 1.87 % para epicatequina. Este valor es inferior a 4%, el cual es normalmente aceptado para la precisión de acuerdo a lo propuesto (AOAC, 2002).

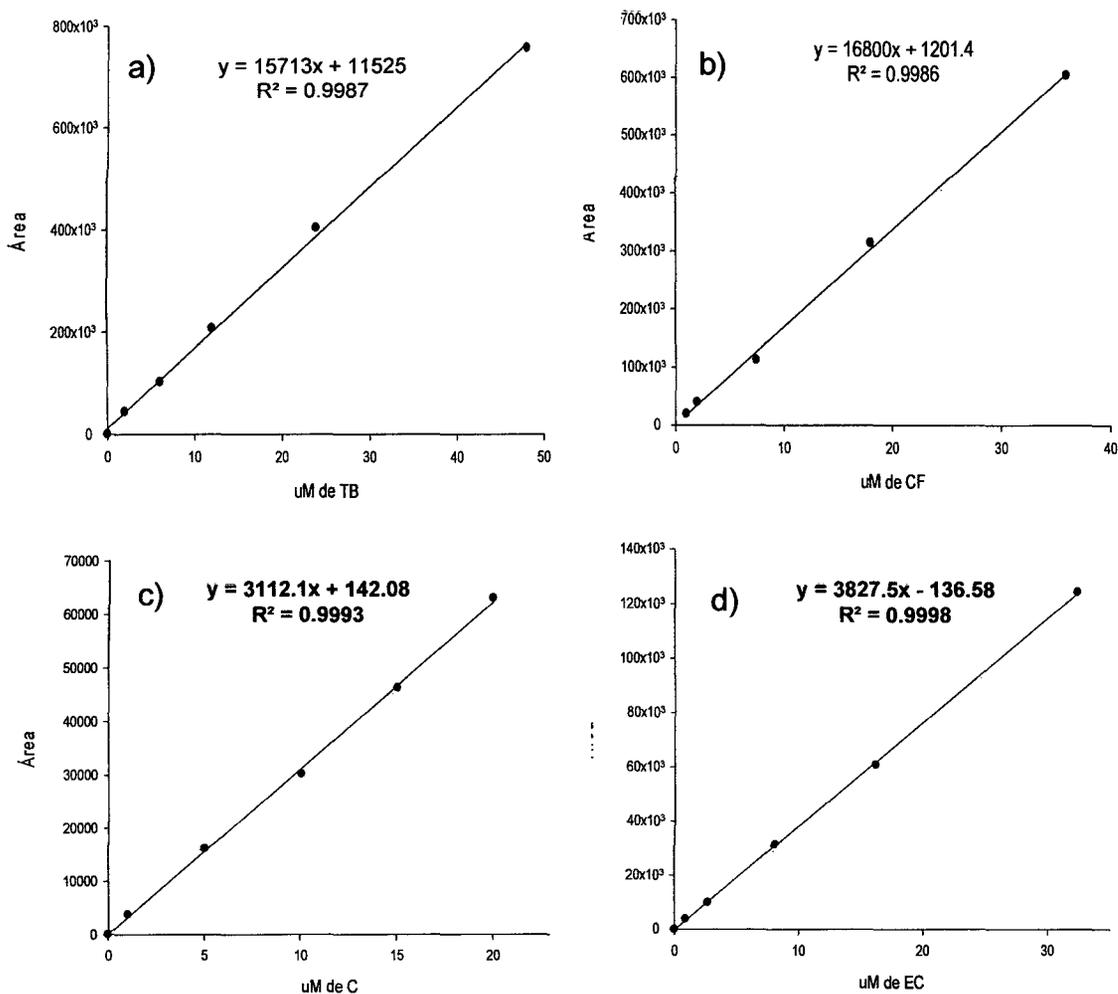


Figura 16. Linealidad y curva de calibración de a) Cafeína, b) Teobromina c) Catequina y d) Epicatequina.

En la Figura 17, se muestran los perfiles cromatográficos de los estándares utilizados TB, C, CF y EC; en esta figura se aprecia que se han realizado cinco corridas de soluciones conteniendo los cuatro estándares a la vez y a diferentes concentraciones. Se aprecia que los tiempos de retención para cada estándar coinciden cuando varían las concentraciones.

Para la estandarización de la metodología analítica y determinación del perfil de compuestos presentes en muestras de cacao, se realizaron diversos ensayos en procura de obtener las mejores condiciones cromatográficas. Inicialmente, se inyectaron muestras preparadas a partir de la extracción de granos de cacao desengrasado, solución de extracción acetona / agua / ácido acético (70 / 28 / 2) (LANGER *et. al.*, 2011); cacao desengrasado, extracción con agua hervida (DING *et. al.*, 1999); cacao sin desengrasar, extracción acuosa; cacao sin desengrasar, extracción ácido acético 0.3 % / metanol (85:15 v/v) (RISNER, 2008).

En la Figura 18, se observa la evolución del sistema cromatográfico, el Cromatograma 1 indica que no hay presencia de los compuestos en estudio, en el Cromatograma 2, se observa la elusión de 3 picos; en el Cromatograma 3 y 4 se observa la salida de 4 picos, los que indican que se realizó un mejor procedimiento de extracción de los compuestos en estudio.

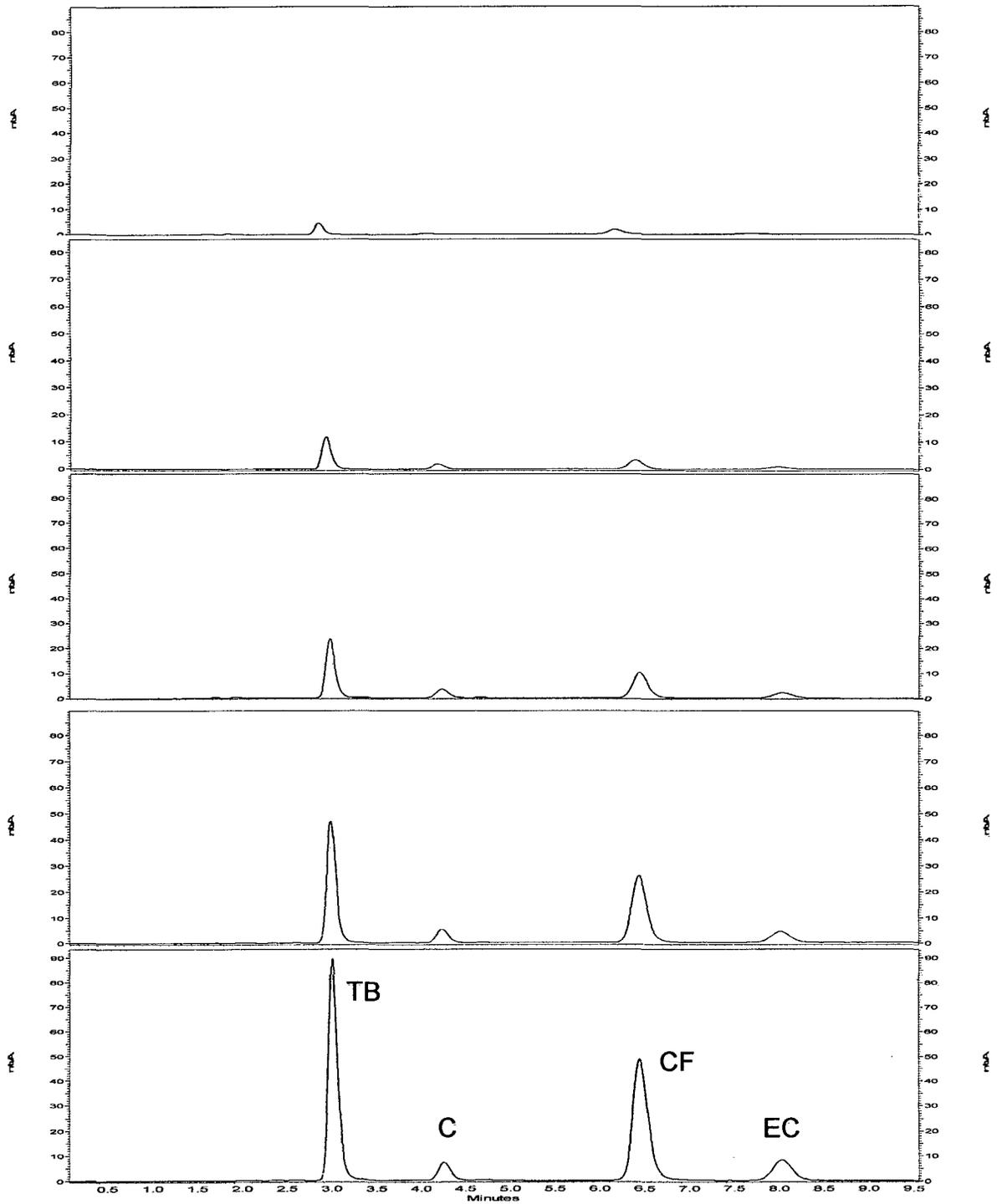


Figura 17. Perfil Cromatográfico de los estándares de teobromina (TB), catequina(C), cafeína (CF) y epicatequina (EC) a 5 concentraciones.

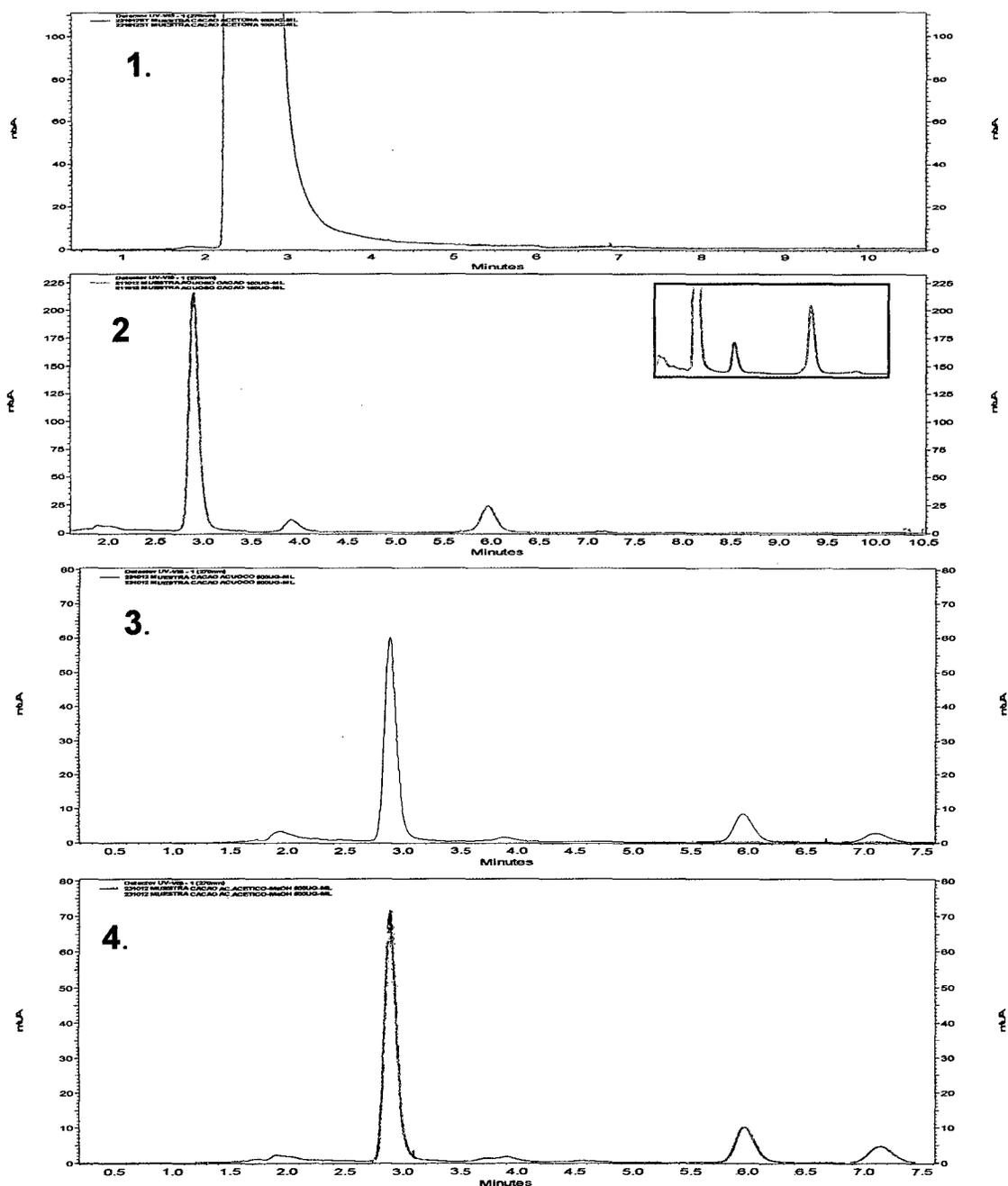


Figura 18. Evolución del sistema cromatográfico para la evaluación de teobromina, catequina, cafeína y epicatequina del cacao por variaciones en el tipo de extracción. 1) cacao desengrasado, solución de extracción acetona/ agua/ácido acético (70/28/2) 2) cacao desengrasado, extracción con agua hervida .3) cacao sin desengrasar, extracción acuosa 4) cacao sin desengrasar, extracción ácido acético 0.3 %/metanol (85:15 v/v).

Por lo tanto los resultados de la Figura 18, permitieron establecer que las condiciones más adecuadas para la extracción de los componentes de la muestra fueron: cacao sin desengrasar, extracción ácido acético 0.3 % / metanol (85:15 v/v), coincidiendo con investigaciones anteriores (RISNER, 2008).

4.2. Contenido de teobromina, cafeína, relación TB/CF vs CF y catequinas en granos de cacao de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu

4.2.1. Teobromina

En el Cuadro 8, se presentan los resultados del contenido de teobromina (TB), considerando los factores en estudio, localidad, efecto del porcentaje de la variedad CCN51 (CCN51) y el beneficio.

Los resultados demuestran que los granos de cacao fresco presentaron mayor cantidad de TB, variando estos contenidos entre 1.040 - 1.404 g TB/100 g, destacando el contenido en los granos frescos de la localidad de Huingoyacu; los contenidos de TB encontrados, son mayores a lo reportado (RISNER, 2008) indicando que varía entre 0.8622 – 0.8909 g TB / 100 g, variando las condiciones de extracción. Según el análisis estadístico para los resultados de TB (Anexo A-Ia), se puede apreciar que existe diferencia estadística, influyendo en el contenido de TB el factor localidad, la variación de CCN51, beneficio y la interacción de los factores localidad y beneficio. Se sabe que cuando existe interacción de factores entonces el análisis debe orientarse

en este sentido, tornándose más importante que los efectos de los factores individuales; entonces el análisis no se puede realizar por factores y niveles separados (DAZA, 2006).

La prueba de Tukey (Anexo A-Ib) aplicada al efecto de las localidades, establece que Huingoyacu produce granos de cacao frescos con mayor contenido de teobromina; al aplicarse al efecto del beneficio (Anexo A-Ic), destaca que el grano de cacao fresco presentó mayor contenido de teobromina y que no existió diferencia estadística entre las muestras fermentadas y secas, lo indicado se aprecia gráficamente en la Figura 19. Se conoce que durante la etapa de beneficio disminuye la teobromina (GIL, 2012), pero por otro lado, la calidad química mejora con la reducción de la concentración de compuestos alcaloides y polifenoles, lo que repercute sobre las características organolépticas del cacao (RIVERA et al., 2011). Durante la fermentación el contenido de teobromina para Pucacaca y Huingoyacu se redujo en 11 y 21% respectivamente; al respecto se ha reportado que la teobromina se reduce en 20% durante la fermentación, disminuyendo el nivel de amargor de los granos, atribuyéndole a la teobromina, la expresión de este rasgo sensorial (AMORES *et. al.*, 2007).

Cuadro 8. Contenido de teobromina (TB) en los granos de cacao, frescos, fermentados y secos, en la localidad de Pucacaca y Huingoyacu, a diferentes porcentajes de CCN51, expresado en base seca¹.

Etapas Beneficio	PUCACACA			HUINGOYACU		
	% CCN51			% CCN51		
	(g TB /100 g)			(g TB/100 g)		
	≤10%	10-20%	>20%	≤10%	10-20%	>20%
Fresco	1.109 ± 0.05 ^a	1.040 ± 0.02 ^a	1.093 ± 0.02 ^a	1.404 ± 0.1 ^a	1.316 ± 0.04 ^a	1.386 ± 0.05 ^a
Fermentado	0.938 ± 0.02 ^b	0.897 ± 0.04 ^c	0.888 ± 0.02 ^c	1.201 ± 0.2 ^b	1.11 ± 0.08 ^b	1.144 ± 0.2 ^b
Seco	0.968 ± 0.05 ^b	0.960 ± 0.03 ^b	0.964 ± 0.04 ^b	1.120 ± 0.08 ^b	1.069 ± 0.04 ^b	1.052 ± 0.09 ^b

¹ La cantidad de teobromina esta expresada en g / 100g de granos de cacao fresco, fermentado y seco, en materia seca. Los valores representan el promedio ± DE, n= 6 repeticiones, se utilizó la prueba de Tukey (p<0.05) y los valores en una misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

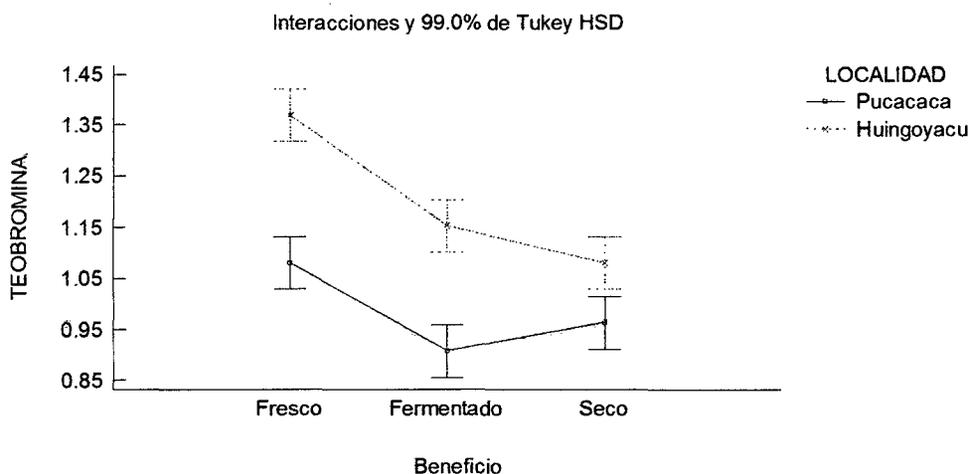


Figura 19. Gráfico de interacción de localidad y beneficio en la cuantificación de teobromina.

Concluyendo se puede decir que el contenido de TB fue afectada por la interacción de los factores localidad y beneficio, destacando los granos frescos de la localidad de Huigoyacu por su el mayor contenido en TB y que este contenido disminuyó durante el beneficio, variando entre 1.404 ± 0.1 hasta 0.888 ± 0.02 g TB/100 g de grano, no existiendo diferencia estadística entre los granos fermentados y secos.

4.2.2. Cafeína

En el Cuadro 9, se presentan los resultados del contenido de cafeína (CF), considerando los factores en estudio, localidad, efecto del porcentaje de la variedad CCN51 (CCN51) y el beneficio. Los resultados fueron expresados en g de cafeína por 100 g de muestra.

Los resultados demuestran que los granos de cacao fresco presentaron mayor cantidad de CF, variando estos contenidos entre 0.129 ± 0.01 - 0.253 ± 0.07 g CF/100 g, destacando el contenido en los granos frescos de la localidad de Huingoyacu; los contenidos de CF encontrados, son mayores a lo reportado (RISNER, 2008) indicando que varía entre 0.0827 – 0.0908 g CF / 100 g, variando las condiciones de extracción.

El análisis estadístico de los resultados de CF (Anexo A-IIa), demostró que existe diferencia estadística, influyendo en el contenido de CF el factor localidad, beneficio y la interacción de los factores localidad y beneficio y localidad y porcentaje de CCN51. Al existir interacción de factores el análisis debe realizarse en este sentido, tornándose más importante que los efectos de los factores individuales (DAZA, 2006).

La Prueba de Tukey (Anexo A-IIb) aplicada al efecto de las localidades, establece que Huingoyacu produce granos de cacao frescos con mayor contenido de CF; al aplicarse al efecto del beneficio (Anexo A-IIc), destaca que el grano de cacao fresco presentó mayor contenido de CF y que existió diferencia estadística entre las muestras fermentadas y secas, lo indicado se aprecia gráficamente en la Figura 20.

Durante el beneficio el contenido de cafeína para Pucacaca y Huingoyacu se redujo entre 13.24 y 40.71 %, pérdida que excede a lo reportado de un 30% durante la fermentación (AMORES *et. al.*, 2007).

Se conoce que el sabor amargo del cacao está influenciado en gran parte por el contenido de las purinas (teobromina y cafeína) y en menor grado por los compuestos fenólicos y que los cacaos Criollos poseen menor índice de amargor, en respuesta a una menor concentración de teobromina, comparados con otros grupos genéticos. La reducción de las purinas causada por la fermentación, es similar en porcentaje para la teobromina y cafeína (AMORES *et. al.*, 2007). Se ha demostrado también, que los distintos tipos de cacao presentaron diferencias en el contenido de cafeína y de teobromina, sugiriendo su posible utilidad para la diferenciación de genotipos (WAKAO, 2002).

Como conclusión de esta parte se puede decir que el contenido de CF fue afectada por la interacción de los factores localidad y porcentaje de CCN51 y la interacción de los factores localidad y beneficio, disminuyendo el contenido de CF de ambas localidades durante el beneficio entre 13.24 y 40.71 %; destacando los granos secos de la localidad de Huingoyacu por su mayor contenido, variando entre 0.150 ± 0.01 á 0.175 ± 0.01 g CF/100 g de grano, existiendo diferencia estadística entre los granos fermentados y secos.

Cuadro 9. Contenido de cafeína en los granos frescos, fermentados y secos, en la localidad de Pucacaca y Huingoyacu con diferentes porcentajes de CCN51¹.

Etapas Beneficio	PUCACACA			HUINGOYACU		
	% CCN51			% CCN51		
	(g CF/100g)			(g CF/100g)		
	≤10%	10-20%	>20%	≤10%	10-20%	>20%
Fresco	0.136 ± 0.00a	0.143 ± 0.01a	0.129 ± 0.01a	0.228 ± 0.01a	0.224 ± 0.02a	0.253 ± 0.07a
Fermentado	0.119 ± 0.00b	0.124 ± 0.01b	0.110 ± 0.00b	0.190 ± 0.01b	0.176 ± 0.03b	0.193 ± 0.01b
Seco	0.118 ± 0.01b	0.121 ± 0.01b	0.104 ± 0.01b	0.175 ± 0.01c	0.163 ± 0.01b	0.150 ± 0.01b

¹ La cantidad de cafeína esta expresada en g/ 100g de granos de cacao fresco, fermentado y seco, en materia seca. Los valores representan el promedio ± DE, n= 6 repeticiones, se utilizó la prueba de Tukey (p<0.05) y los valores en una misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

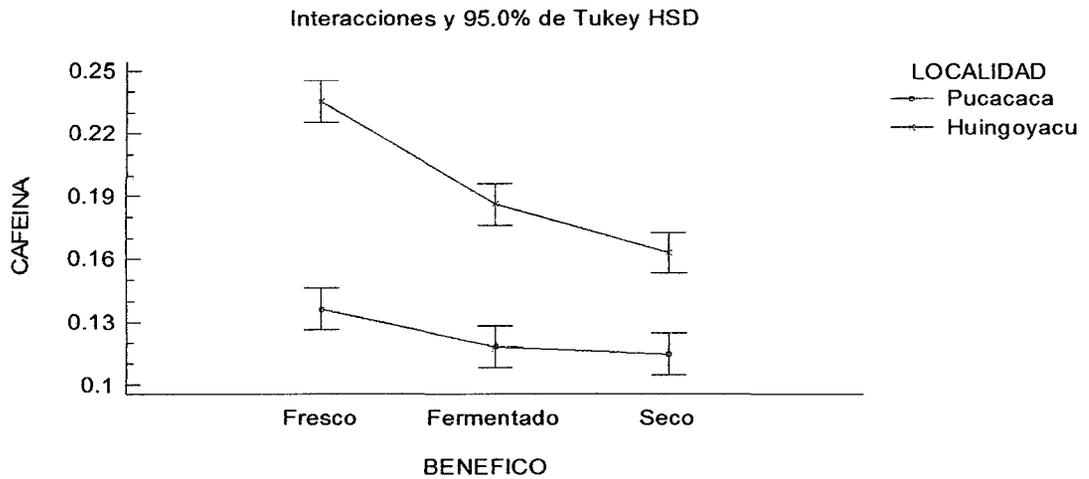


Figura 20. Gráfico de interacción de localidad y beneficio en el contenido de cafeína.

4.2.3. Relación TB/CF vs CF

En el Cuadro 10, se presentan los contenidos de TB y CF y la relación TB/CF, de granos frescos de cacao, la muestra que alcanzó el contenido más alto de cafeína 0,253 % en la localidad de Huigoyacu, con un porcentaje del híbrido CCN51 mayor a 20 %, ninguna alcanzó una proporción TB/CF de 1-2, como es característico en el antiguo cacao Criollo. Las muestras de la localidad de Pucaca presentaron una proporción TB / CF mayor a 5, con un contenido de cafeína < a 0,143 %, como es característico para el cacao tipo Forastero (TROGNITZ *et. al.*, 2013), también se ha reportado que el índice para ser considerado cacao tipo forastero debe estar por encima de 6 (ZAMBRANO *et. al.*, 2010); considerando esta opción, las zonas de Huigoyacu estudiadas, contaría con áreas que producen cacaos que pueden

ser considerados tipo Trinitario, y estas serían las que contiene por encima de 10 % del híbrido CCN51.

Los resultados mostrados en el Cuadro 9, sugieren entonces que el cacao de la localidad de Pucaca es del tipo forastero y el cacao de Huíngoyacu del tipo Trinitario. Los valores encontrados de la relación TB/CF vs CF, son un medio útil para visualizar la discriminación de las variedades comerciales Forastero, Trinitario y Criollo. Niveles elevados de contenidos de cafeína son característicos de cacaos de calidad Criollo (TROGNITZ *et. al.*, 2013).

Cuadro 10. Variación de la relación TB/CF en los granos frescos de las localidades de Pucacaca y Huíngoyacu a diferentes porcentajes de CCN51.

Componente	PUCACACA			HUINGOYACU		
	% CCN51			% CCN51		
	(g CF/100g)			(g CF/100g)		
	≤10%	10-20%	>20%	≤10%	10-20%	>20%
Teobromina	1.109	1.040	1.093	1.404	1.316	1.386
Cafeína	0.136	0.143	0.129	0.228	0.224	0.253
TB/CF	8.15	7.27	8.47	6.16	5.88	5.48

4.2.4. Catequina

En el Cuadro 11, se presentan los resultados del contenido de catequina (C), considerando los factores en estudio, localidad, efecto del porcentaje de la variedad CCN51 (CCN51) y el beneficio. Los resultados fueron expresados en g de catequina por 100 g de muestra.

Los resultados demuestran que los granos de cacao fresco procedentes de la localidad de Huingoyacu, presentaron mayor cantidad de C, variando estos contenidos entre 0.293 ± 0.03 - 0.403 ± 0.01 g C/100 g; los contenidos de C encontrados, son mayores a lo reportado (RISNER, 2008) indicando que varía entre 0.0388 – 0.0434 g C / 100 g de muestra, variando las condiciones de extracción; en otra investigación se reporta una variación entre $0,007$ - $0,079$ g C/100 g de muestra (CALA *et. al.*, 2011).

El análisis estadístico de los resultados de C (Anexo A-IIIa), demostró que existe diferencia estadística, influyendo en el contenido de C los factores localidad, beneficio y la interacción de los factores localidad y CCN51, localidad y beneficio, CCN51 y beneficio. Al existir interacción de factores el análisis debe realizarse en este sentido, tornándose más importante que los efectos de los factores individuales (DAZA, 2006). La prueba de Tukey (Anexo A-IIIb) aplicada al efecto de las localidades, establece que Huingoyacu produce granos de cacao frescos con mayor contenido de C; al aplicarse al efecto del beneficio (Anexo A-IIIc), destaca que el grano de cacao fresco presentó mayor contenido de C y que no existió diferencia estadística variable entre las

muestras fermentadas y secas, lo indicado se aprecia gráficamente en las Figuras 21 - 23.

En una investigación realizada, la catequina presentó un comportamiento inesperado, su concentración aumentó, específicamente; durante la fermentación se observó un incremento marcado en la concentración, cercano al 68% (0.29 a 0.49 mg/g); luego disminuyó hasta 0.24 mg/g en la etapa final del secado al sol (GIL, 2012), también se reportó una disminución del contenido de catequina desde 0.58 ± 0.10 mg/g en granos maduros, hasta 0.07 ± 0.00 en granos fermentados y secos (HURST *et. al.*, 2011). En la presente investigación, existe un comportamiento variable en la etapa de fermentación y secado.

Concluyendo esta parte, se puede decir que el contenido de C fue afectada por los factores localidad, beneficio y la interacción de los factores localidad y CCN51, localidad y beneficio, CCN51 y beneficio; destacando los granos de cacao fresco procedentes de la localidad de Huingoyacu, por su mayor contenido de C, variando estos contenidos entre $0.293 \pm 0.03 - 0.403 \pm 0.01$ g C/100 g y no existió diferencia estadística variable entre las muestras fermentadas y secas.

Cuadro 11. Contenido de catequina en los granos frescos, fermentados y secos de la localidad de Pucacaca y Huingoyacu con diferentes porcentajes de CCN51¹.

Etapas Beneficio	PUCACACA			HUINGOYACU		
	% CCN51			% CCN51		
	(g C /100g)			(g C /100g)		
	≤10%	10-20%	>20%	≤10%	10-20%	>20%
Fresco	0.198 ± 0.01a	0.231± 0.04a	0.252 ± 0.01a	0.356 ± 0.01a	0.293 ± 0.03a	0.403 ±0.01a
Fermentado	0.199 ± 0.03a	0.257 ± 0.02a	0.229 ± 0.04a	0.314 ± 0.01a	0.274 ± 0.01a	0.137 ± 0.04b
Seco	0.203 ± 0.01a	0.181 ± 0.01b	0.216 ± 0.02a	0.255 ± 0.05b	0.192 ± 0.04b	0.282 ± 0.02c

¹La cantidad de catequina esta expresada en g / 100g de granos de cacao fresco, fermentado y seco, en materia seca. Los valores representan el promedio ± DE, n= 6 repeticiones, se utilizó la prueba de Tukey (p<0.05) y los valores en una misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

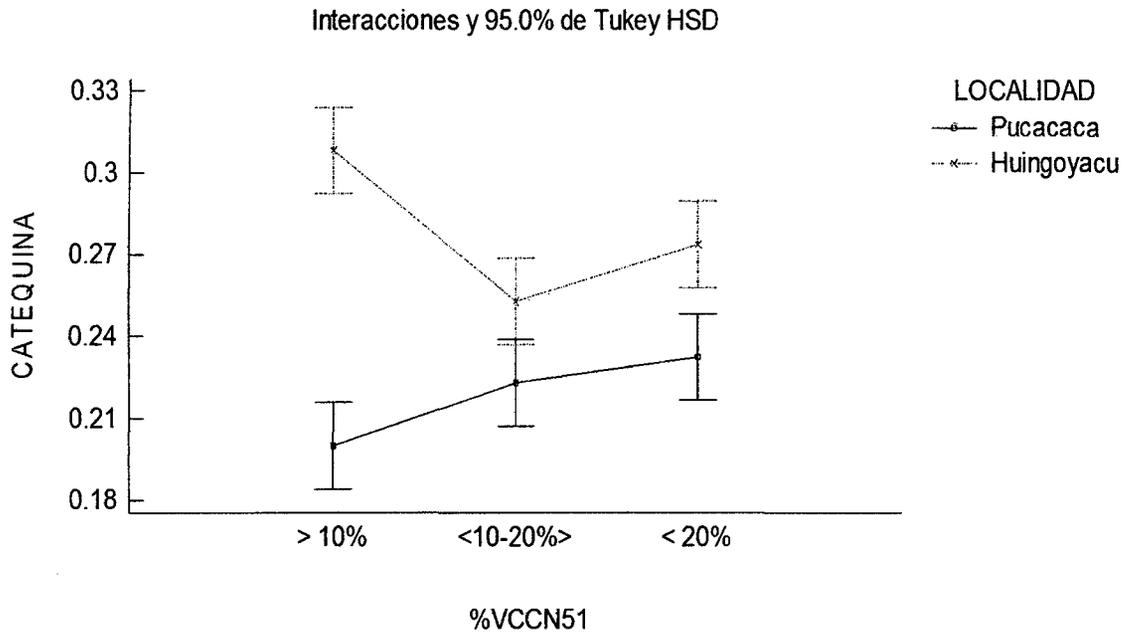


Figura 21. Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de catequina.

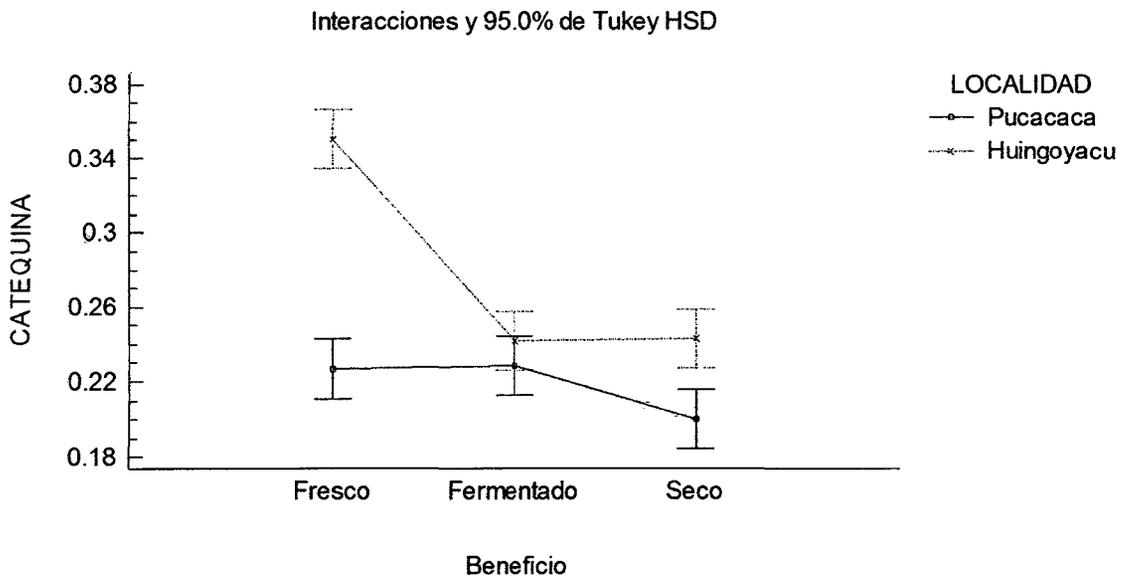


Figura 22. Gráfico de interacción de localidad y la etapa de Beneficio en la cuantificación de catequina.

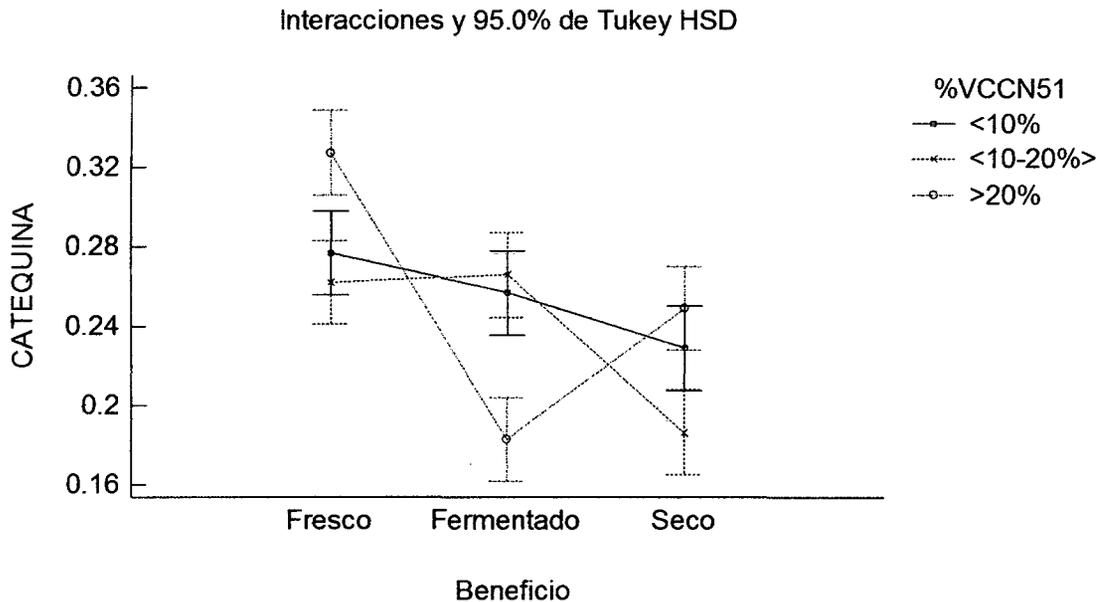


Figura 23. Gráfico de interacción de CCN51 y la etapa de Beneficio en la cuantificación de catequina.

4.2.5. Epicatequina

En el cuadro 12, se presentan los resultados del contenido de epicatequina (EC), considerando los factores en estudio, localidad, efecto del porcentaje de la variedad CCN51 (CCN51) y del beneficio.

Los resultados demuestran que los contenidos de EC fueron mayores en las muestras de granos de cacao fresco, procedentes de la localidad de Huingoyacu; variando entre 0.701 ± 0.05 - 0.996 ± 0.05 g EC/100 g de grano; estos valores son menores a 1.27 g EC/100 g, reportados en un trabajo previo (GIL, 2012). En términos generales se apreció que el contenido de EC disminuyó durante la fermentación y el secado, alcanzando valores entre 0.12 – 0.317g EC/100 g de granos secos, resultados que difieren, pero incluyen

al contenido reportado de 0.184 g EC/100 g (RISNER, 2008); pero el valor de 0.317g EC/100 g es casi igual al reportado en un trabajo similar (GIL, 2012). En términos de porcentajes la pérdida de EC durante la fermentación y el secado se encuentra entre los valores de 56.07 – 87.95. El análisis estadístico de los resultados de EC (Anexo A-IVa), demuestra que existe diferencia estadística, considerando la interacción de los factores localidad, CCN51 y beneficio, pasando a ser más importante la interacción de los factores (LÓPEZ, 2008). La prueba de Tukey (Anexo A-IVb, Anexo A-IVc) aplicada indicó, que cuando se comparan el efecto de las localidades, destaca Huingoyacu, en el efecto del beneficio destaca el grano de cacao fresco, ambos por un mayor contenido de EC; no existió diferencia estadística entre el contenido de EC de los granos de cacao fermentado y seco, estos efectos se pueden apreciar gráficamente en las Figuras 24 – 26. Concluyendo podemos indicar que los contenidos de EC fueron mayores en las muestras de granos de cacao fresco, de la localidad de Huingoyacu; variando entre 0.701 ± 0.05 - 0.996 ± 0.05 g EC/100 g de grano y que este contenido disminuyó durante la fermentación y el secado, alcanzando valores entre 0.12 – 0.317g EC/100 g de granos secos; alcanzando la pérdida de EC durante la fermentación y el secado valores de 56.07 – 87.95 %.

Cuadro 12. Contenido de epicatequina en los granos frescos, fermentados y secos, de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu, con diferentes porcentajes de CCN51¹.

Etapas	PUCACACA% CCN51(g EC/100g)			HUINGOYACU% CCN51(g EC/100g)		
	≤10%	10-20%	>20%	≤10%	10-20%	>20%
Fresco	0.609 ± 0.03a	0.611± 0.02a	0.708 ± 0.06a	0.869 ± 0.07a	0.996 ± 0.05a	0.701 ±0.05a
Fermentado	0.201 ± 0.03b	0.208 ± 0.02b	0.249 ± 0.02b	0.258 ± 0.01b	0.320 ± 0.07b	0.183 ± 0.02b
Seco	0.231 ± 0.03b	0.229 ± 0.01b	0.311 ± 0.03b	0.317 ± 0.06b	0.120 ± 0.01c	0.213± 0.06b
Perdida EC (%)	62.07	62.52	56.07	63.52	87.95	69.61

¹La cantidad de epicatequina esta expresada en g/100g de granos de cacao fresco, fermentado y seco, en materia seca. Los valores representan el promedio ± DE, n= 6 repeticiones, se utilizó la prueba de Tukey (p<0.05) y los valores en una misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

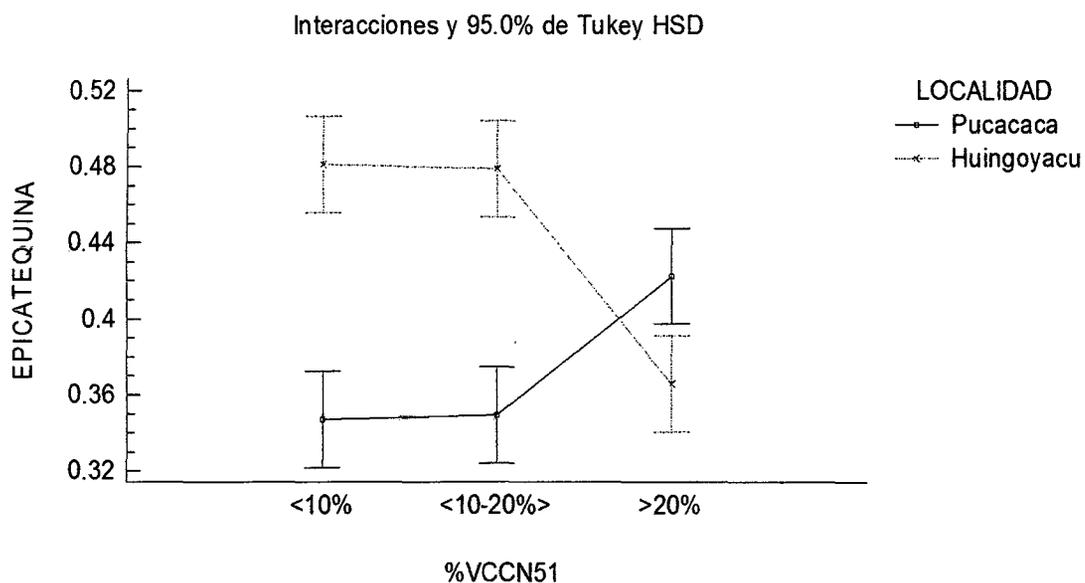


Figura 24. Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de epicatequina.

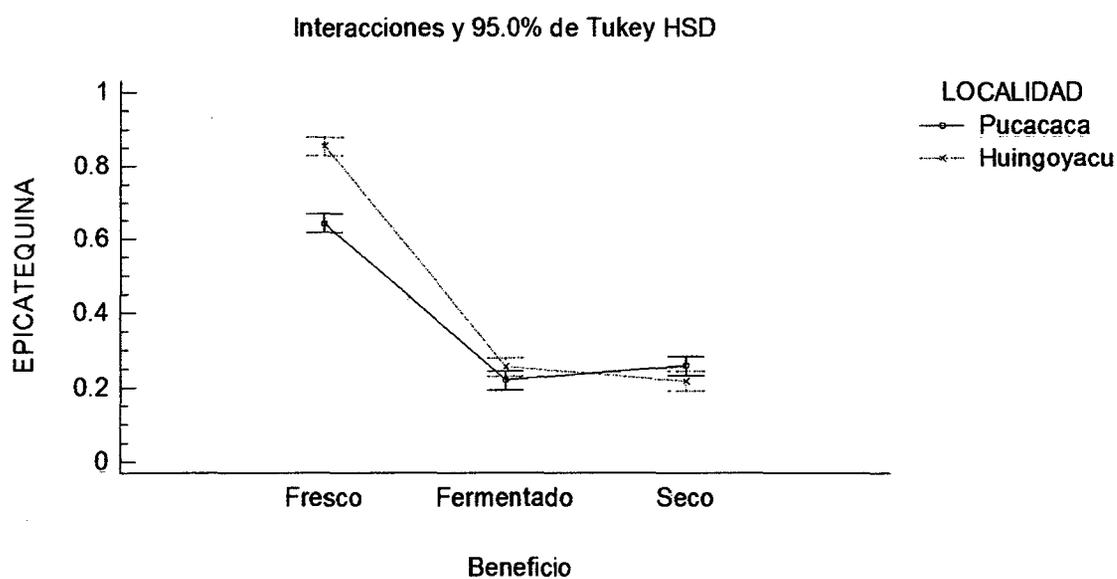


Figura 25. Gráfico de interacción de localidad y la etapa de Beneficio en la cuantificación de epicatequina.

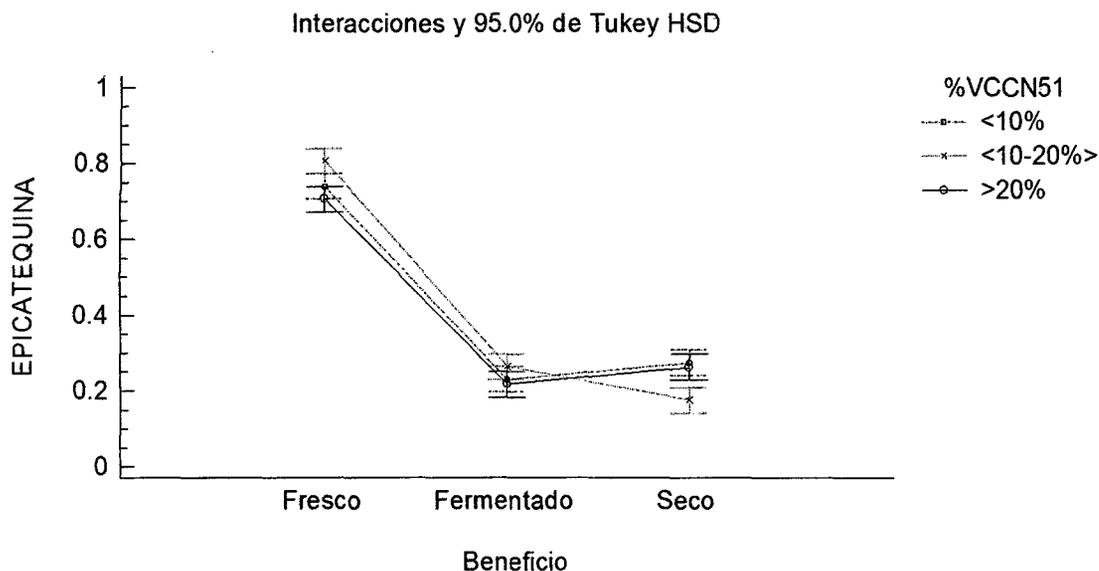


Figura 26. Gráfico de interacción de CCN51 y la etapa de Beneficio en la cuantificación de epicatequina.

4.3. Determinación de teobromina, cafeína y catequinas en el licor de cacao de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu

En el Cuadro 13, se presentan los resultados del contenido de teobromina, cafeína, catequina y epicatequina en el licor de cacao, considerando la localidad y concentración de CCN51. En forma general se puede apreciar que los granos de cacao de Huingoyacu, presentaron un mayor contenido de todos los componentes enunciados. Se hace evidente también de que las metilxantinas evaluadas (TB y CF) disminuyeron durante el proceso postcosecha y elaboración de licor.

Según el análisis estadístico para los resultados de TB (Anexo A-Va), se pudo apreciar que existió diferencia estadística, influyendo en el

contenido de TB los factores localidad y concentración del híbrido CCN51 (Figura 27). Se pudo apreciar que el contenido de TB fue mayor en la localidad de Huingoyacu y conforme aumento la concentración del híbrido CCN51, alcanzando valores entre 0.883 ± 0.02 - 1.291 ± 0.01 g TB/100g de muestra; pero al comparar el contenido de TB del grano fresco de las dos localidades vs el licor, se pudo apreciar una disminución que vario entre 5.85 – 20.38 %, reportándose en una investigación anterior una reducción de un 30 % (GIL, 2012). Los resultados encontrados son concordantes con los contenidos de TB reportados para barras de chocolates comerciales, con valores que variaron entre 0.53 ± 0.08 - 1.64 ± 0.05 % (LANGER *et. al.*, 2011).

Según el análisis estadístico de los resultados de CF en licor de cacao (Anexo A-VIa), se pudo apreciar que existió diferencia estadística, influyendo en el contenido de CF el factor localidad, CCN51 y la interacción localidad y CCN51 (Figura 28). Se pudo apreciar que el contenido de CF fue mayor en la localidad de Huingoyacu, alcanzando valores entre 0.180 ± 0.00 - 0.183 ± 0.01 g CF/100g de muestra; pero al comparar el contenido de CF del grano fresco de las dos localidades vs el licor, se pudo apreciar una disminución que vario entre 24.31 – 52.77 %, reportándose en una investigación anterior una reducción de un 29 % (GIL, 2012). Los resultados encontrados se encuentran en el rango de contenidos reportados para CF, en barras de chocolates comerciales, variando entre 0.03 ± 0.01 - 0.24 ± 0.04 % (LANGER *et. al.*, 2011).

Según el análisis estadístico para los resultados de C en licor de cacao (Anexo A-VIIa), se pudo apreciar que existió diferencia estadística, influyendo en el contenido de C el factor localidad, CCN51 y la interacción localidad y CCN51 (Figura 29). Se pudo apreciar que el contenido de C fue mayor en la localidad de Huingoyacu, alcanzando valores entre 0.179 ± 0.00 - 0.246 ± 0.06 g C/100g de muestra; pero al comparar el contenido de C del grano fresco de las dos localidades vs el licor, se pudo apreciar una disminución que vario entre 13.64 – 55.58 %, reportándose en una investigación anterior la presencia de catequinas en valores que fueron menores a los encontrados en chocolates comerciales y que variaron entre 15.9 ± 3.1 - 205.7 ± 33.6 mg C/100 g (LANGER *et. al.*, 2011); éste comportamiento de reducción de la C, no es coincidente con los resultados encontrados en una investigación reciente que indica el incremento de la C durante la fermentación, una disminución durante el secado y un incremento en la obtención de licor de cacao en un valor cercano al 175 %, con un contenido de C de 66 mg/100 g de muestra (GIL, 2012), valor inferior al determinado en la presente investigación; en forma opuesta se indica que la temperatura de tostado puede cambiar el contenido de C en las semillas de cacao ya que puede desencadenar la oxidación, la degradación, epimerización y la interacción con la proteína (KENDARI *et. al.*, 2009), reduciendo así la actividad antioxidante. Esta situación deja abierta la posibilidad de desarrollar una investigación que demuestre el comportamiento de la C, durante el proceso postcosecha y durante el proceso de elaboración de licor de cacao.

Concluyendo podemos decir que en las semillas frescas de la localidad de Huingoyacu y en el licor de cacao elaborado con estas, la presencia de C, fue más elevada que en los diversos trabajos de investigación consultados (KENDARI *et. al.*, 2009; LANGER *et. al.*, 2011; GIL, 2012), y que su contenido disminuyó entre 16.04 – 55.58 %; a pesar de esta disminución el licor de cacao obtenido presentó contenidos mayores a los reportados, dejando abierta la posibilidad de realizar investigaciones que confirmen el comportamiento de la C, considerando la variedad de cacao, efecto de la fermentación, secado y efecto del proceso de elaboración de licor de cacao.

Según el análisis estadístico para los resultados de EC en licor de cacao (Anexo A-VIIIa), se pudo apreciar la existencia de diferencia estadística, influyendo en el contenido de EC los factores localidad, porcentaje de CCN51 y la interacción localidad y porcentaje de CCN51 (Figura 30). Se pudo apreciar que el contenido de EC fue mayor en la localidad de Huingoyacu, alcanzando valores entre 0.187 ± 0.00 - 0.273 ± 0.00 g EC/100g de muestra; al comparar el contenido de EC del grano fresco de las dos localidades vs el licor, se pudo apreciar una disminución, que varió entre 67.48 – 87.43 %; se ha reportado una pérdida de epicatequina de 88.2% (12.7 a 1.5mg/g), desde el inicio de la fermentación de los granos hasta la obtención del licor a nivel industrial, a medida que pasa por todas las etapas de su procesamiento (GIL, 2012); también se ha reportado un contenido de EC en barras de chocolates, en el intervalo de 29.8 ± 2.6 - 253.2 ± 29.4 mg EC/100 g de producto (LANGER *et. al.*, 2011), los valores de EC encontrados en esta investigación son mayores a los reportados.

Es conocido la capacidad antioxidante que presentan los granos de cacao y su relación con la actividad enzimática de polifenol oxidasa (PFO), la cual afecta el contenido de polifenoles totales; se ha reportado que la polifenol oxidasa de granos de cacao oxida la C y la EC, presentando mayor reactividad frente a la epicatequina, sustentado en una menor K_m , una mayor V_m , y una especificidad de sustrato tres veces superior en comparación con la C (GIL, 2012).

En la zona de investigación no se han reportado aún trabajos de investigación que correlacionen la capacidad antioxidante en las etapas postcosecha y en la elaboración de licor, quedando abierta esta posibilidad. Concluyendo podemos indicar que la EC durante las etapas postcosecha y de elaboración de licor de cacao, se pierde en mayor cantidad que la C, llegando hasta un 87.43 %, con contenidos finales en el licor de cacao de las dos localidades, que variaron en el intervalo de 0.089 ± 0.00 - 0.273 ± 0.00 g EC/100 g de muestra.

Cuadro 13. Contenido de teobromina, cafeína, catequina y epicatequina en el licor de cacao elaborado con granos de cacao de las localidades de Pucacaca y Huingoyacu a diferentes porcentajes de CCN51¹.

% CCN-51	PUCACACA				HUINGOYACU			
	TB	CF	C	EC	TB	CF	C	EC
	(g TB/100g)	(g CF/100g)	(g C/100g)	(g EC/100g)	(g TB/100g)	(g CF/100g)	(g C/100g)	(g EC/100g)
< 10%	0.883±0.02 ^a	0.117±0.00 ^c	0.171±0.001 ^c	0.172±0.01 ^a	1.246±0.02 ^a	0.181±0.00 ^a	0.238±0.00 ^a	0.187±0.00 ^a
10-20%	0.911±0.01 ^b	0.110 ± 0.00 ^b	0.153±0.00 ^b	0.097±0.00 ^b	1.239±0.03 ^{bc}	0.183±0.01 ^a	0.246±0.06 ^c	0.273±0.00 ^c
> 20%	0.962±0.01 ^c	0.104 ±0.00 ^a	0.134±0.00 ^a	0.089±0.00 ^b	1.291±0.01 ^c	0.180±0.00 ^a	0.179±0.00 ^b	0.228±0.02 ^b

¹Las cantidades están expresadas en g/ 100g de granos de cacao fresco, fermentado y seco, en materia seca. Los valores representan el promedio ± DE, n= 6 repeticiones, se utilizó la prueba de Tukey (p<0.05) y los valores en una misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

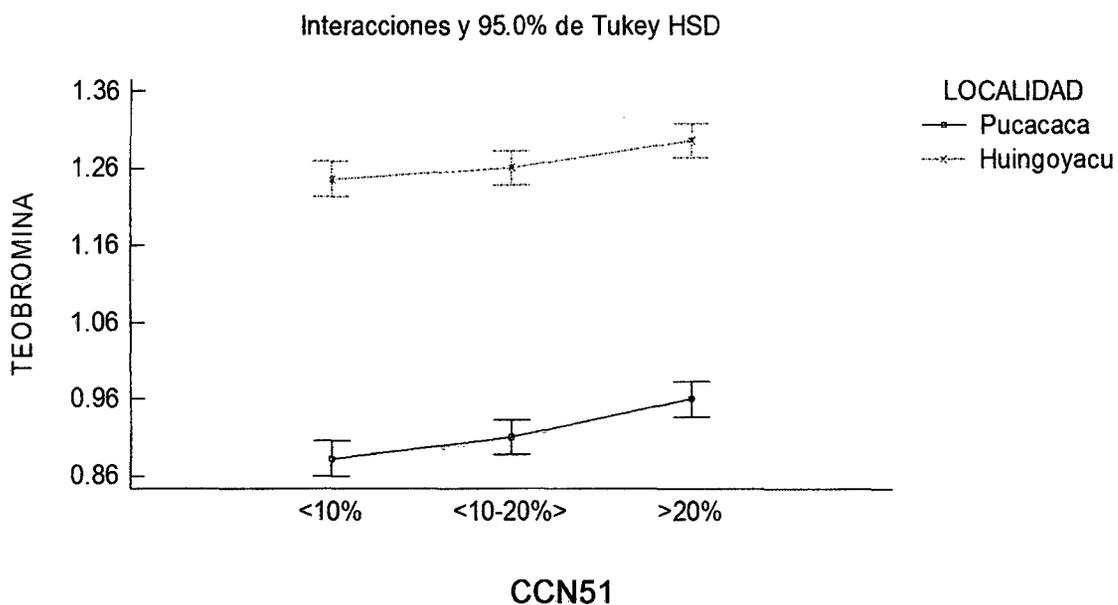


Figura 27. Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de teobromina.

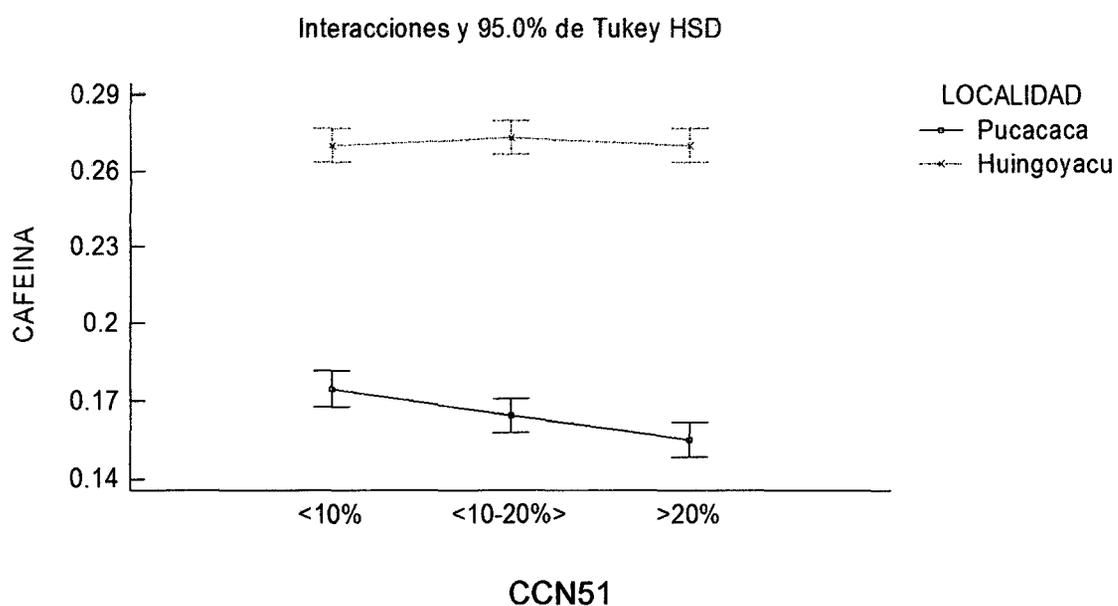


Figura 28. Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de cafeína.

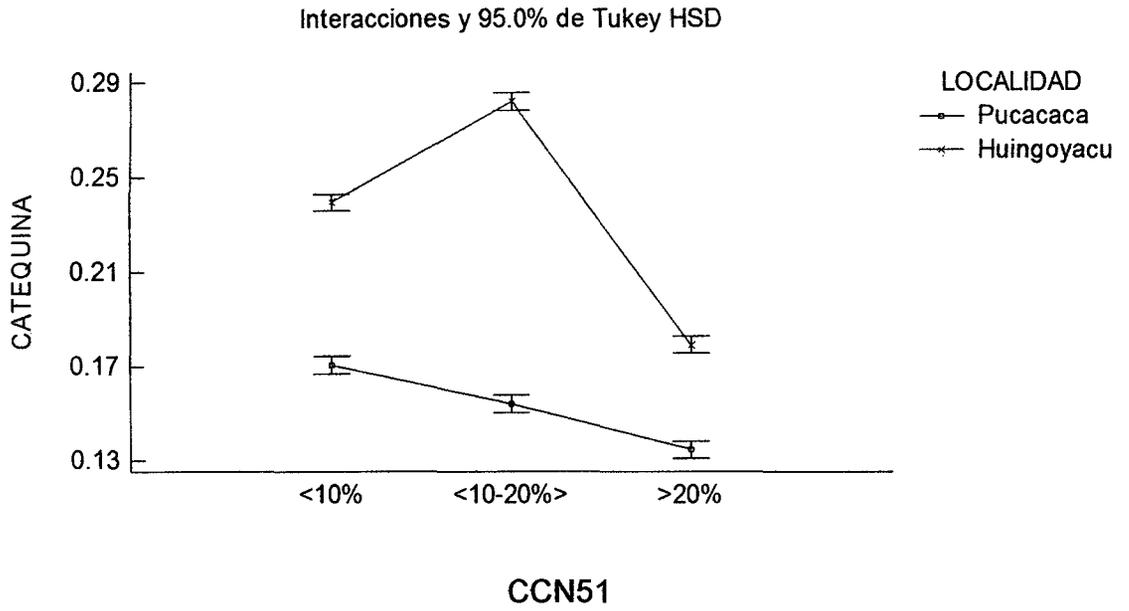


Figura 29. Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de catequina.

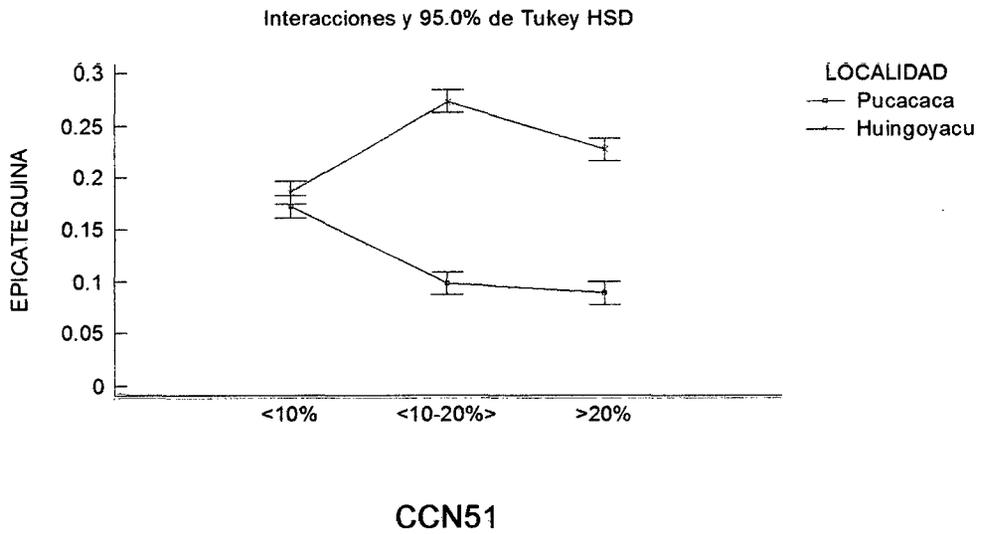


Figura 30. Gráfico de interacción de localidad y CCN51 en la cuantificación de catequina.

V. CONCLUSIONES

Los resultados y discusiones de la presente investigación han permitido las siguientes conclusiones:

1. En el análisis por RP-HPLC se utilizó cacao sin desengrasar y la extracción de componentes se realizó con ácido acético 0.3 % / metanol (85:15 v/v), utilizando como fase móvil 30.0 % metanol, 69.9 % agua, 0.1 % ácido acético; a 35 °C, con un flujo de 1 mL/min y un volumen de muestra 20 μ L.

2. El contenido de TB fue afectada por la interacción de los factores localidad y beneficio, destacando los granos frescos de la localidad de Huigoyacu por su mayor contenido, disminuyendo durante el beneficio, variando entre 1.404 ± 0.1 hasta 0.888 ± 0.02 g TB/100 g de grano y no existió diferencia estadística entre los granos fermentados y secos.

3. El contenido de CF fue influenciada por la interacción de los factores localidad - porcentaje de CCN51 y localidad - beneficio, disminuyendo en ambas localidades durante el beneficio, entre 13.24 y 40.71 %; destacando los granos frescos de Huigoyacu por su mayor contenido, variando entre

0.150±0.01 á 0.175±0.01 g CF/100 g de grano y existió diferencia estadística entre los granos fermentados y secos.

4. El Índice de TB/CF sugirió que el cacao de la localidad de Pucacaca fue del tipo forastero y el de Huingoyacu del tipo Trinitario y que el contenido de C fue afectada por la interacción de los factores localidad y CCN51, localidad y beneficio, CCN51 y beneficio; destacando los granos frescos de la localidad de Huingoyacu, por su mayor contenido de C, variando entre 0.293 ± 0.03 - 0.403 ±0.01 g C/100 g, y existió diferencia estadística variable entre las muestras fermentadas y secas.

5. Los contenidos de EC fueron mayores en las muestras de granos de cacao fresco, procedentes de Huingoyacu; variando entre 0.701 ±0.05 - 0.996 ± 0.05 g EC/100 g de grano y este contenido disminuyo durante la fermentación y el secado, alcanzando valores entre 0.12 – 0.317g EC/100 g de granos secos; con pérdidas de EC durante la fermentación entre 56.07 – 87.95 %.

6. Los contenidos de TB, CF, C, EC disminuyeron en el licor de cacao, y fueron mayores en las muestras de Huingoyacu, alcanzando valores 0.883±0.02 á 1.291 ± 0.01 g TB/100g de muestra, 0.180±0.00 - 0.183±0.01 g CF/100g de muestra, 0.179 ± 0.00 - 0.246 ± 0.06 g C/100g de muestra; perdiéndose más EC que C, llegando hasta un 87.43 %, con contenidos en el licor de cacao entre 0.089±0.00 - 0.273±0.00 g EC/100 g de muestra.

VI. RECOMENDACIONES

Los resultados y discusiones de la presente investigación, permitieron hacer las siguientes recomendaciones:

1. Investigar el comportamiento de la C, durante el proceso postcosecha y durante el proceso de elaboración de licor de cacao.

2. Investigar la variación de la capacidad antioxidante de los granos de cacao en las etapas postcosecha y en la elaboración de licor

3. Es posible investigar mediante análisis RP HPLC, la elusión de catequinas variando los componentes y su concentración en la fase móvil, con el fin de poder eluir y analizar una mayor cantidad de compuestos.

4. Cuando se requiera comercializar granos de cacao con mayor contenido de metilxantinas, catequina y epicatequina se recomienda utilizar el cacao procedente de Huingoyacu, caso contrario el cacao procedente de Pucacaca.

VII. ABSTRACT

The research objective was quantify by RP - HPLC, theobromine, caffeine and catechins in cocoa beans from Pucacaca (GCP) and Huingoyacu (GCH) with three percentages of hybrid CCN51, in fresh samples, fermented, dry and in the liquor obtained. For the analysis we used a PR - HPLC LC-10 AT VP Shimadzu Scientific, MD, USA at 270 nm, was determined theobromine, caffeine (NAZARUDDIN *et. al.*, 2001; F. LO COCO *et. al.*, 2007) and catechins (MINGYU DING *et al.* 1999; RISNER, 2008). Cocoa was used without degreasing, extracted components with 0.3 % acetic acid / methanol (85:15 v/v), mobile phase with 30.0% methanol, 69.9% water, 0.1% acetic acid at 35 ° C, with a flow of 1 mL / min and 20 L of sample. TB prevailed in GCH, decreased during the benefit from 0.1 to $0.888 \pm 1.404 \pm 0.02$ g TB/100 g of grain. CF fell during the samples benefit in both locations, between 13.24 and 40.71%, the GCH had higher content, ranging from 0.150 ± 0.01 to 0.175 ± 0.01 g fc/100 grain. The index TB / CF indicated that the GCP was Stranger type and GCH was Trinitario. The C highlighted in Huingoyacu fresh grains (GFH), with values ranging from 0.293 ± 0.03 to 0.403 ± 0.01 g C/100 g. EC was higher in GFH and varied between 0.701 ± 0.05 - 0.996 ± 0.05 g EC/100 grain, declined during fermentation (56.07 to 87.95%) and dried to 0.12 - 0.317g EC/100 g of dried beans. TB, CF, C, EC decreased in cocoa liquor, Huingoyacu samples had more contents with values of 0.883 ± 0.02 to 1291 ± 0.01 g TB, 0.180 ± 0.00 - 0.183 ± 0.01 g CF, 0.179 ± 0.00 - 0.246 ± 0.06 g C, 0.089 ± 0.00 to 0.273 ± 0.00 g EC, per 100 g samples, respectively.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ACEBY G., RODRIGUEZ A. 2002. Manual sobre el manejo post cosecha del cacao. Confederación Nacional de Cacaocultores Dominicanos. CONACADO. República Dominicana. p. 57 – 61.
- AGUILERA C., HERRERA C., PONCE J. 2010. Implementación, validación y aplicación de un nuevo método para la determinación de oxitetraciclina por HPLC en tejido muscular de salmonídeos. Lat. Am. J. Aquat. Res., 38(2): 227-233.
- AMORES, F. PALACIOS, A. JIMENEZ, J. 2009. Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nororiente de la provincia de esmeraldas. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Boletín Técnico N° 135. Ecuador.
- AOAC. 2002. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.
- ARÉVALO, E. 2004. Cacao manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonía peruana. Ed. Del Castillo. Chiclayo-Perú. p. 115 – 127.
- BARRAGAN, A. REY, L. 2004. Establecimiento de núcleos productivos de Cacao (theobroma cacao) en torno a Microcentrales de beneficio para mejorar

la Calidad del grano en la región del distrito agroindustrial del Magdalena Caldense. Universidad Nacional De Colombia

BOVANOVA L; BRANDSTETEROVA E. 2000. Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 880, 149-168.

CALA, M. VÁSQUEZ, A. GARCÍA, A. MARTÍNEZ, J. STASHENKO, E. 2011. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 35(136): 371-379, 2011. ISSN 0370-3908.

CALLE, S. 2011. Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales. Barcelona. UPC

CODEX STAN 141-1983, Rev. 1-2001. Norma para el cacao en pasta y torta de cacao. [en línea]:

(<http://www.ipffsaph.org/cdsupload%5Ckopopdata%5Ccodex0%5Cescxs1415.pdf>, documento, 18 Oct. 2010).

CRESPO E., CRESPO, F. 1997. Cultivo y beneficio del cacao CCN-51. Ed. El Conejo. 94 p.

DAZA P. J.F. 2006. Estadística aplicada con Microsoft Excel. Ed. Megabyte S.A.C. Lima, Perú. p.p. 485 – 516.

DESROSIER, N. 2007. Elementos de tecnología de alimentos. Ed. Continental. Mexico. p.585-606.

DÍAZ, S. PINOARGOTE, M. 2012. Análisis de las Características Organolépticas del Chocolate a partir de Cacao CCN51 Tratado

- Enzimáticamente y Tostado a Diferentes Temperaturas.”Guayaquil – Ecuador.
- DING, M., H. YANG, S. XIAO. 1999. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 849, 637-640.
- GIL Q. J. A. 2012. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacao colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Tesis de postgrado, Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia. 119 p.
- GUERRERO, 2007. Diagnóstico y propuesta de parámetros para la estandarización y homogenización del tratamiento poscosecha de cacao Unidad de Coordinación de Préstamos Sectoriales – UCPS Ministerio de economía y finanzas - MEF
- GUTIÉRREZ, A. 2002. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. Departamento de Ciencias Médicas “Zerafín Ruíz de Zárate Ruíz”, Carretera de Acueducto y Circunvalación, Santa Clara, Cuba. *Acta farm. Bonaerense* 21 (2): 149 – 152.
- GOTTELAND, M. SATURNINO, V. 2007. Algunas verdades sobre el café. *Rev. chil. nutr.* v.34 n.2 Santiago jun. 2007.
- HII, C., LAW, C., SUZANNAH, S., MISNAWI AND CLOKE, M. 2009. Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *As. J. Food Ag. Ind.* Bangkok, Thailandia. 2(4):702-722.

- HORIE, KOHATA, K. 2000. Analysis of tea components by high performance liquid chromatography and high – performance capillary electrophoresis. *J. Chrom A* 881: 4725 – 4738.
- HURST W. J., KRAKE S. H., BERGMEIER S. C., PAYNE M. J., MILLER K. B., STUART D. A. 2011. Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chemistry Central Journal* 2011, 5:53 [on line]: <http://journal.chemistrycentral.com/content/5/1/53>.
- ICT. 2003. Informe anual de proyecto de renovación y rehabilitación de plantaciones de cacao en la Cuenca del Huallaga. Instituto de cultivos Tropicales. Tarapoto, Perú. 122 p
- KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley- Interscience. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. Canada.
- KENDARI T, HARIJONO, YUWONO SS, ESTIASIH T, SANTOSO U. 2012. The Change of Catechin Antioxidant during Vacuum Roasting of Cocoa Powder. *J Nutr Food Sci* 2:174. doi:10.4172/2155-9600.1000174.
- LANGER S., MARSHALL L. J., DAY A. J., MORGAN M. R. A. 2011. Flavanols and methylxanthines in Commercially Available Dark Chocolate: A Study of the Correlation with Nonfat Cocoa Solids. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 8435–8441.
- LEON, J. 1968. Fundamentos Botánicos de los Cultivos Tropicales IICA, San José, Costa Rica. 375 – 384 p.

- LÓPEZ B. E.A. 2008. Diseño y análisis de experimentos, fundamentos y aplicaciones en agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 176 p.
- LO COCO, F.LANUZZA, F. MICALI, G. CAPPELLANO, G.2007. Determination of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in by-Products of Cupuacu and Cacao Seeds by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatographic Science, Vol. 45,
- NAZARUDDIN ,R. 2000. HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Levels In Cocoa and Chocolate Products. Malaysian Journal of Analytical Science, Vol. 7, No. 2 (2001) 377-386.
- PORTILLO, E. FUENMAYOR, D. RODRÍGUEZ, B. DÍAZ, R. 2011. Efecto de la fermentación sobre el contenido de purinas en cacao Criollo e Híbrido (*Theobroma cacao*L.) del Sur del Lago de Maracaibo. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2011, 28 Supl. 1: 228-237
- PINZÓN, J. ARDILA, J. ROJAS, F. 2008. Guía Técnica para el Cultivo del Cacao. Tercera Edición. 152-164.
- QUATTROCHI O., S. ABELAIRA, R. LABA. 1992. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, 422 pp.
- RISNER, C. 2008. Simultaneous Determination of Theobromine, (+)-Catechin, Caffeine, and (-) - EPicatechin in Standard Reference Material Baking Chocolate 2384, Cocoa, Cocoa Beans, and Cocoa Butter. Journal of Chromatographic Science, Vol. 46.
- RIVERA, R. MECÍAS, F. GUZMÁN, A. PEÑA, M. MEDINA, H. CASANOVA, L. BARRERA, A. NIVELA, P.2011. Efecto del tipo y tiempo de fermentación

en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao* L.) Tipo nacional

Ciencia y Tecnología. 2011. 5(1): 7-12

SAMEE, W.; VORARAT, S. 2007. Simultaneous determination of gallic acid, catechin, rutin, ellagic acid and quercetin in flower extracts of *Michelia alba*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Nelumbo nucifera* by HPLC. Srinakharinwirot University. Thailand. Health Science Journal. 2:131-137 p.

SKOOG, D., LEARY, J. 1994. Análisis instrumental. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. 935 p.

TROGNITZ B., CROS E., ASSEMAT S., DAVRIEUX F., FORESTIER-CHIRON N., AYESTAS, E. KUANT A., SCHELDEMAN X., HERMANN M. 2013. Diversity of Cacao Trees in Waslala, Nicaragua: Associations between Genotype Spectra, Product Quality and Yield Potential. PLoS ONE 8(1): e54079. doi:10.1371/journal.pone.0054079.

VALVERDE, P. 2007. La epicatequina, un flavonoide para recordar. Revisión en nutrición preventiva.

WAKAO, H. 2002. Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional, durante el proceso de beneficio. Tesis de Licenciatura en ciencias químicas, especialidad Química analítica. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de ciencias exactas y Naturales. Departamento de ciencias químicas. Quito, Ecuador. EC. 91 p.

- W. JONFIA-ESSIEN, G. WEST, P. ALDERSON, G. TUCKER, G. 2008.
Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans.
Food Chemistry 108 : 1155-1159.
- ZAMBRANO A., ROMERO C., GÓMEZ Á., RAMOS G., LACRUZ C.,
BRUNETTO M., MÁXIMO G., GUTIÉRREZ L., DELGADO Y. 2010.
Evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao criollo
merideño durante la fermentación en dos condiciones edafoclimáticas.
Agronomía Trop. 60(2): 211-219.
- ZÚÑIGA, M. M. 2005. Caracterización de la fibra dietaria en orujo y capacidad
antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Ingeniero en Ciencias
Agrarias Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Chile. 68 p.

IX. ANEXOS

A-la. Análisis de varianza de los contenidos de teobromina (g TB./100g muestra) en granos de cacao, considerando los factores, localidad, porcentaje de CCN51 y beneficio

FV	GL	SC	CM	F.cal	P valor
A:localidad	1	1.26036	1.26036	161.8	0.0000
B:porcentaje CCN51	2	0.061182	0.030591	3.93	0.0232
C:beneficio	2	0.945576	0.472788	60.69	0.0000
Interacciones					
AB	2	0.006084	0.003042	0.39	0.6778
AC	2	0.143756	0.071878	9.23	0.0002
BC	4	0.017736	0.004434	0.57	0.6856
ABC	4	0.004806	0.001202	0.15	0.9606
Residuos	90	0.701062	0.00779		
Total	107	3.14056			

A-lb. Prueba de Tukey de teobromina por efecto localidad

LOCALIDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Pucacaca	36	0.984111	0.0120105	X
Huingoyacu	36	1.20017	0.0120105	X

A-lc. Prueba de Tukey de teobromina por efecto beneficio

Benefico	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Seco	36	1.02208	0.0147098	X
fermentado	36	1.02994	0.0147098	X
Fresco	36	1.22439	0.0147098	X

A-Id. Prueba de Tukey de teobromina por efecto de variación del porcentaje del CCN-51 en las parcelas.

%VCCN51	CASOS	MEDIA LS	SIGMA LS	GRUPOS HOMOGÉNEOS	
2	36	1.0655	0.0147098	X	
3	36	1.08764	0.0147098	X	X
1	36	1.12328	0.0147098		X

A-IIa. Análisis de varianza cuantificación de cafeína (g CF./100g muestra), localidades, porcentaje de CCN51 por etapas de beneficio.

FV	GL	SC	CM	F.cal	P valor
A:localidad	1	0.139321	0.139321	335.98	0.0000
B:porcentaje CCN51	2	0.000354	0.000177	0.43	0.6538
C:proceso	2	0.042161	0.021081	50.84	0.0000
Interacciones					
AB	2	0.0031520	0.00157603	3.80	0.0260
AC	2	0.0118265	0.00591325	14.26	0.0000
BC	4	0.0029031	0.00072578	1.75	0.1459
ABC	4	0.0015911	0.00039777	0.96	0.4339
Residuos	90	0.0373205	0.00041467		
Total	107	0.23863			

A-IIb. Prueba de Tukey de Cafeína por efecto localidad.

LOCALIDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Pucacaca	54	0.12287	0.00277112	X
Huingoyacu	54	0.194704	0.00277112	X

A-IIc. Prueba de Tukey de cafeína por efecto beneficio.

BENEFICIO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Seco	36	0.138667	0.00339392	X
Fermentado	36	0.152056	0.00339392	X
Fresco	36	0.185639	0.00339392	X

A-IIIa Análisis de varianza cuantificación de catequina(g C./100g muestra), localidades, porcentaje de CCN51 por etapas de beneficio

FV	GL	SC	CM	F.cal	P valor
A:localidad	1	0.0644405	0.0644405	93.51	0.0000
B:porcentaje CCN51	2	0.00380769	0.00190385	2.76	0.0721
C:beneficio	2	0.0605097	0.0302548	43.9	0.0000
Interacciones					
AB	2	0.0215556	0.0107778	15.64	0.0000
AC	2	0.0392021	0.019601	28.44	0.0000
BC	4	0.0640515	0.0160129	23.24	0.0000
ABC	4	0.0365201	0.00913002	13.25	0.0000
Residuos	54	0.037212	0.00068911		
Total	71	0.327299			

A-IIIb. Prueba de Tukey de Catequina por efecto localidad

LOCALIDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Pucacaca	36	0.218472	0.00437515	X
Huingoyacu	36	0.278306	0.00437515	X

A-IIIc Prueba de Tukey de catequina por efecto beneficio

BENEFICIO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Seco	24	0.221458	0.00535845	X
fermentado	24	0.235083	0.00535845	X
Fresco	24	0.288625	0.00535845	X

A-IVa. Análisis de varianza cuantificación de Epicatequina (g EC./100g muestra), localidades, porcentaje de CCN51 por etapas de beneficio

FV	GL	SC	CM	F.cal	P valor
A:localidad	1	0.085629	0.085629	49.03	0.0000
B:porcentaje CCN51	2	0.00634686	0.00317343	1.82	0.1723
C:beneficio	2	4.19874	2.09937	1202.15	0.0000
Interacciones					
AB	2	0.141948	0.0709739	40.64	0.0000
AC	2	0.202821	0.10141	58.07	0.0000
BC	4	0.0914581	0.0228645	13.09	0.0000
ABC	4	0.0985992	0.0246498	14.12	0.0000
Residuos	54	0.0943028	0.00174635		
Total	71	4.91985			

A-IVb. Prueba de Tukey de epicatequina por efecto localidad

LOCALIDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Pucacaca	36	0.372917	0.00696489	X
Huingoyacu	36	0.441889	0.00696489	X

A-IVc. Prueba de Tukey de epicatequina por efecto beneficio

PROCESO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
fermentado	24	0.236542	0.00853021	X
seco	24	0.23675	0.00853021	X
Recepción	24	0.748917	0.00853021	X

A-Va. Análisis de varianza cuantificación de teobromina (g TB./100g muestra) en licor de cacao efecto localidades y VCCN51

FV	Gl	S C	C M	Razón-F	Valor-P
A:Localidad	1	0.548454	0.548454	2047.32	0.0000
B: VCCN51	2	0.0125028	0.00625139	23.34	0.0001
AB	2	0.000533444	0.000266722	1.00	0.3981
RESIDUOS	12	0.00321467	0.000267889		
TOTAL	17	0.564704			

A-Vb. Prueba de Tukey de teobromina en licor de cacao por efecto localidad

LOCALIDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Pucacaca	9	0.9180	0.00545577	X
Huingoyacu	9	1.26711	0.00545577	X

A-Vc Prueba de Tukey de teobromina en licor de cacao por efecto VCCN51

VCCN51	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10% >	6	1.0645	0.00668193	X
10-20%	6	1.08533	0.00668193	X
20% <	6	1.12783	0.00668193	X

A-VIa Análisis de varianza cuantificación de cafeína(g CF./100g muestra) en licor de cacao efecto localidades y VCCN51

FV	Gl	S C	C M	Razón-F	Valor-P
A:Localidad	1	0.050923	0.050923	2076.09	0.0000
B: VCCN51	2	0.000297018	0.000148509	6.05	0.0152
AB	2	0.000303284	0.000151642	6.18	0.0143
RESIDUOS	12	0.00029434	0.0000245283		
TOTAL	17	0.0518177			

A-VIb. Prueba de Tukey de cafeína en licor de cacao por efecto localidad

LOCALIDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Pucacaca	9	0.164667	0.00165087	X
Huingoyacu	9	0.271044	0.00165087	X

A-VIc. Prueba de Tukey de cafeína en licor de cacao por efecto VCCN51

VCCN51	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
3	6	0.2125	0.00202189	X	
2	6	0.218733	0.00202189	X	X
1	6	0.222333	0.00202189		X

A-VIIa Análisis de varianza cuantificación de catequina(g C./100g muestra) en licor de cacao efecto localidades y VCCN51

FV	Gl	S C	C M	Razón-F	Valor-P
A:Localidad	1	0.0194408	0.0194408	5981.77	0.0000
B: VCCN51	2	0.0083315	0.00416575	1281.77	0.0000
AB	2	0.0036845	0.00184225	566.85	0.0000
RESIDUOS	6	0.0000195	0.00000325		
TOTAL	11	0.0314762			

A-VIIb. Prueba de Tukey de catequina en licor de cacao por efecto localidad

LOCALIDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
Pucacaca	6	0.153	0.00073598	X	
Huingoyacu	6	0.2335	0.00073598		X

A-VIIc. Prueba de Tukey de catequina en licor de cacao por efecto VCCN51

VCCN51	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	4	0.15675	0.000901388	X
1	4	0.205	0.000901388	X
2	4	0.218	0.000901388	X

A-VIIIa Análisis de varianza cuantificación de epicatequina (g EC./100g muestra) en licor de cacao efecto localidades y VCCN51

FV	Gl	S C	C M	Razón-F	Valor-P
A:Localidad	1	0.0357521	0.0357521	1188.43	0.0000
B: VCCN51	2	0.0016205	0.00081025	26.93	0.0000
AB	2	0.0142512	0.00712558	236.86	0.0000
RESIDUOS	6	0.0001805	0.0000300833		
TOTAL	11	0.0518043			

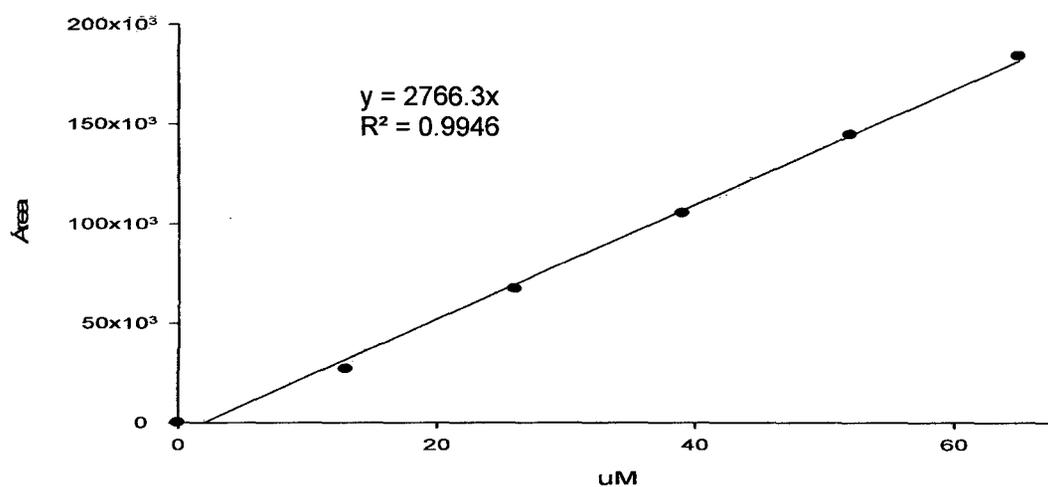
A-VIIIb. Prueba de Tukey de epicatequina en licor de cacao por efecto localidad

LOCALIDAD	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Pucacaca	6	0.119667	0.00223917	X
Huingoyacu	6	0.228833	0.00223917	X

A-VIIIc. Prueba de Tukey de epicatequina en licor de cacao por efecto VCCN51

VCCN51	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	4	0.15825	0.00274241	X
1	4	0.179	0.00274241	X
2	4	0.1855	0.00274241	X

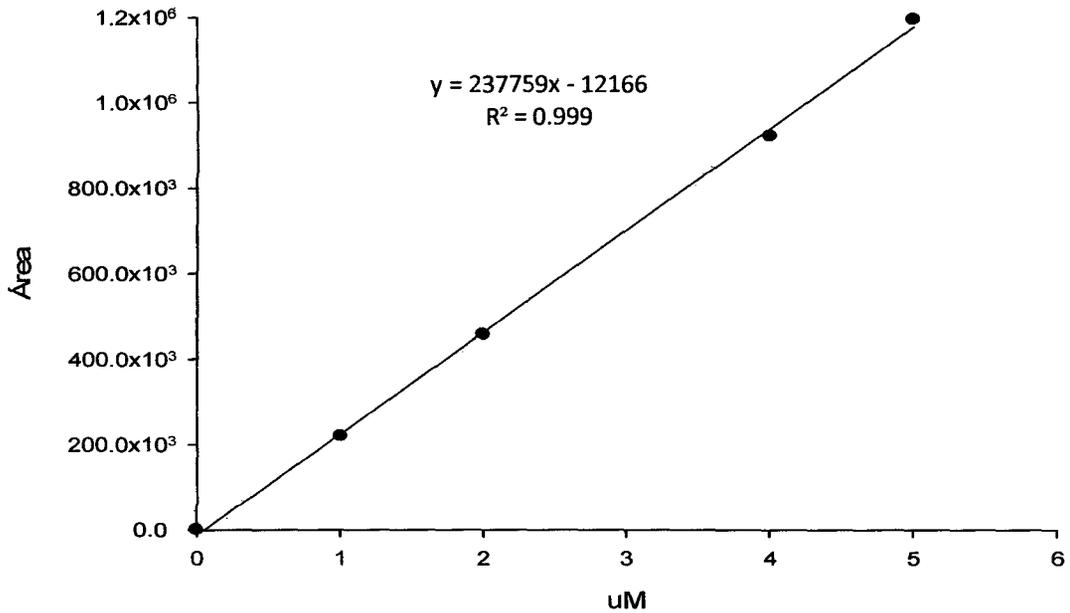
A-IXa. Representación gráfica de la curva estándar Epigallocatequina (EGC)



A-IXb. Datos para obtener la curva estándar de EGC.

Concentración (μM)	Área mUA*s	Absorbancia (mUA*10 ⁻³)	Tiempo de retención (min)
13	26862	3166	3.208
26	67039	7857	3.207
39	105360	12373	3.205
52	144772	17020	3.203
65	184359	21630	3.208

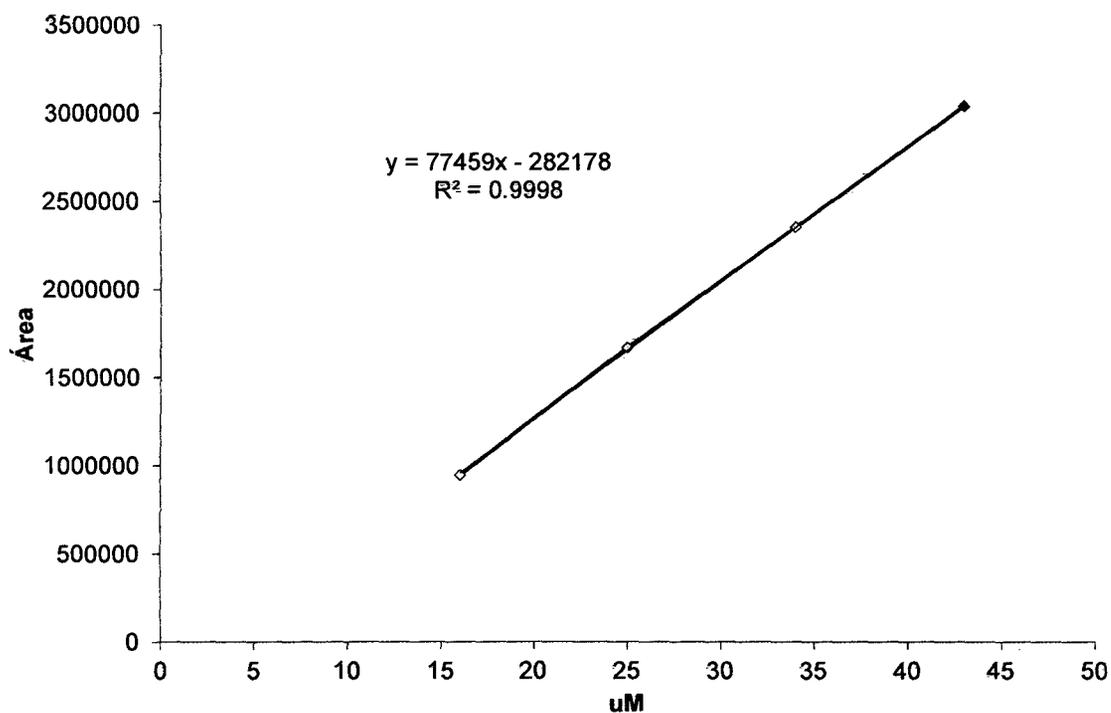
A-Xa. Representación gráfica de la curva estándar Epigallocatequina galato (EGCG).



A-Xb. Cuadro 12. Datos para obtener la curva estándar de EGCG.

Concentración (μM)	Área mUA*s	Absorbancia (mUA*10 ⁻³)	Tiempo de retención (min)
0	0	0	0
1	219449	4.665	4.665
2	457157	4.667	4.667
4	921199	4.67	4.67
5	1194469	4.673	4.673

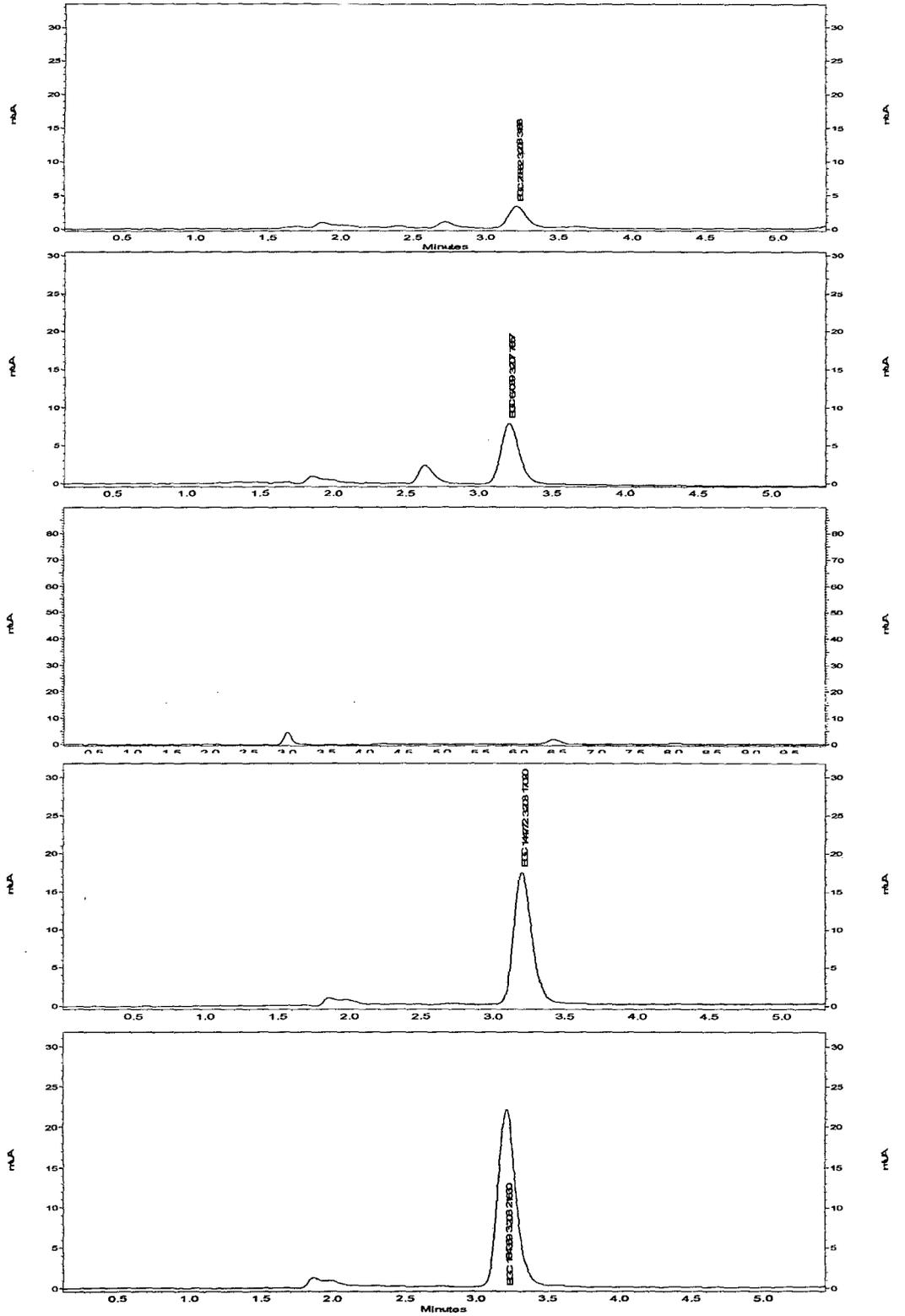
A-XIa. Representación gráfica de la curva estándar Epicatequina galato (ECG).



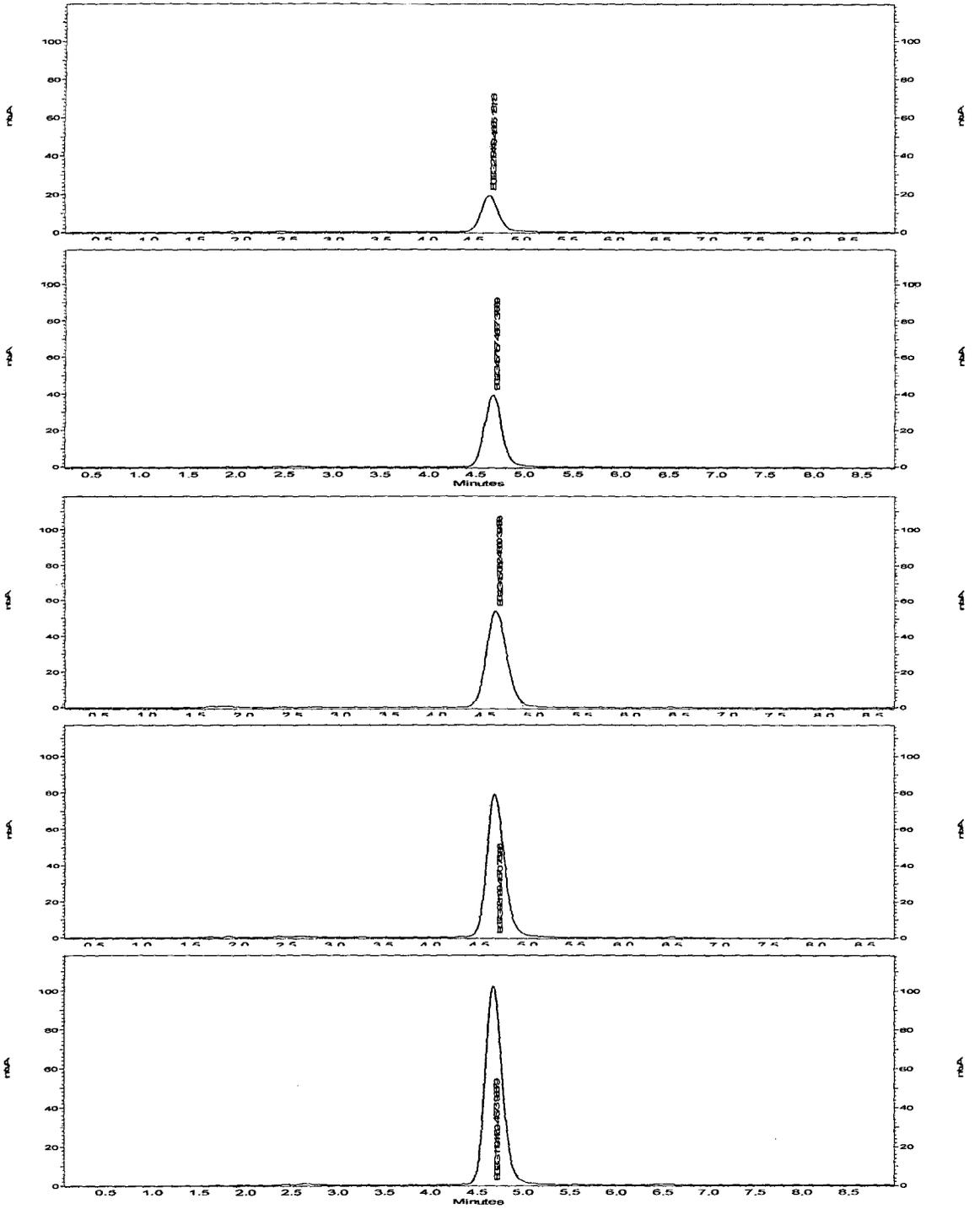
A-XIb. Datos para obtener la curva estándar de ECG

Concentración (μM)	Área mUA*s	Absorbancia (mUA* 10^{-3})	Tiempo de retención (min)
16	946303	38000	10.657
25	1669321	67467	10.652
34	2353908	95144	10.645
43	3041864	123490	10.64

A-XII. Perfil Cromatográfico del estándar de Epigallocatequina (EGC).



A-XIII. Perfil Cromatográfico del estándar de Epigallocatequina galato (EGCG).



A-XIV. Perfil Cromatográfico del estándar de Epicatequina galato (ECG).

