

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



SELECCIÓN DE CACAOS (*Theobroma cacao* L.) SEGÚN ÍNDICE DE
TEOBROMINA – CAFEÍNA, DETERMINACIÓN DE METILXANTINAS,
CATEQUINAS EN GRANO FRESCO, FERMENTADO, SECO, LICOR Y
ANÁLISIS SENSORIAL DEL LICOR

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Presentado por:

MARÍA INÉS BARDÓN CENTURIÓN

PROMOCIÓN 2011 - II

Tingo María – PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Dios por la vida que me brinda, por darme salud y sabiduría para el logro de mi formación profesional.

A mi madre Inés Centurión de Bardón a la cual agradeceré por siempre y de quien estoy orgullosa del esfuerzo y sacrificio que hizo por sacarnos adelante, por darme una carrera para mi futuro y por creer en mi capacidad, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre me ha brindado su comprensión, cariño y amor.

A mi novio Juan Ronald Robles Vega por su amor y amistad incondicional, por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos, con mucho cariño y amor.

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

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de tesis quiero agradecer en primer lugar a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, y en especial a mi profesor de Investigación y de Tesis el Dr. Pedro Peláez Sánchez por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que ayudan a formarte como persona e investigador.

Agradezco también a la Cooperativa Agraria Cafetalera Divisoria. Ltda. Por su apoyo económico en la ejecución del presente trabajo de investigación.

Agradezco al Ing. Pedro Camasca por el apoyo técnico brindado durante la investigación.

Agradezco al Ing. Darlym Reátegui por su apoyo incondicional para la realización y culminación de la tesis.

Y por último a mi madre, hermanos y toda mi familia la cual me ha motivado durante mi formación profesional. Son muchas las personas que han formado

parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones. Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L)	3
2.1.1. Variedades según su origen	3
2.1.2. Composición química	4
2.1.3. Metilxantinas.....	5
2.1.4. Polifenoles	7
2.2. Comportamiento de los alcaloides durante la fermentación.....	10
2.2.1. De los granos de cacao al chocolate: Alteraciones en la composición y contenido de catequinas.....	10
2.3. Características organoléptica del Licor del cacao	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Lugar de ejecución.....	16
3.2. Materia prima	16
3.3. Materiales de laboratorio.....	17
3.4. Equipos	18
3.5. Métodos de análisis	18
3.5.1.Determinación de teobromina y cafeína, reportado por NAZARUDDIN (2000) y LO COCO <i>et al.</i> (2007)	18
3.5.2.Determinación y cuantificación de catequinas (±)-C, epicatequina (-)-EC, epigallocatequina (-)-EGC,	

epicatequina galato (-)-ECG y epigallocatequina galato (-)-EGCG, reportado por CALA <i>et al.</i> , 2011	18
3.5.3.Evaluación sensorial del licor de cacao, según lo descrito por APP CACAO, 2012	18
3.6. Metodología experimental.....	19
3.6.1.Obtención de muestra	19
3.6.2.Análisis cromatográfico por HPLC	22
3.6.3. Extracción de teobromina, cafeína y catequinas de los granos frescos, fermentados, seco y licor de cacao	24
3.6.4. Selección de cacaos, según el índice de teobromina y cafeína	25
3.6.5. Variación del contenido de metilxantinas, catequinas, en grano fresco, durante la fermentación, grano seco y licor de cacao.....	28
3.6.6. Análisis sensorial del licor de cacao de las muestras seleccionadas.....	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1.Selección de cacaos, según el índice de teobromina y cafeína...	
4.1.1.Curva estándar de teobromina y cafeína	33
4.1.2.Índice de teobromina y cafeína.....	33
4.2.Variación del contenido de metilxantinas, catequinas, en grano fresco, durante la fermentación, grano seco, licor de cacao.....	38
4.2.1. Curva estándar de teobromina, cafeína, catequina y epicatequina.....	38

4.2.2. Variación del contenido de Teobromina, Cafeína, Catequina y Epicatequina	42
4.3. Análisis sensorial del licor de cacao de las muestras seleccionadas	51
V. CONCLUSIONES	61
VI. RECOMENDACIONES	63
VII. ABSTRACT	64
VIII. BIBLIOGRAFÍA	66
IX. ANEXOS	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1 Composición química de los granos fermentados y secos del cacao ..	5
2 Parámetros de análisis de teobromina y cafeína por HPLC.....	23
3 Parámetros de análisis de teobromina, cafeína y catequinas por HPLC	23
4 Resultados del contenido y índice de teobromina y cafeína de las 3 mejores muestras de Tingo María, San Alejandro y Curimana.....	34
5 Estándares utilizados y características obtenidas en el HPLC.....	39
6 Contenido de teobromina (Tb) y cafeína (Cf) en grano fresco, fermentado (48, 96 y 120 horas), seco y licor de cacao, de Tingo María, San Alejandro y Curimana, expresado en base seca ¹	47
7 Contenido de catequina (C) y epicatequina (EC) en granos fresco, fermentado (48, 96 y 120 horas), seco y licor de cacao, de Tingo María, San Alejandro y Curimana, expresado en base seca ¹	49
8 Resultados de los atributos sensoriales del licor de cacao de Tingo María, San Alejandro y Curimana.....	52

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	9
5 Flujograma de obtención de muestra de granos fresco – seco de cacao.....	20
6 Flujograma de obtención de muestras de granos frescos, fermentados y seco de cacao	21
7 Extracción de teobromina, cafeína y catequinas de los granos fresco fermentado, seco y licor de cacao.....	25
8 Diseño experimental para determinar el genotipo de los granos de cacao fresco, según el índice de teobromina y cafeína	27
9 Diseño experimental de la variación del contenido de metilxantinas, catequinas, en grano fresco, durante la fermentación, grano seco, licor y evaluación sensorial del licor de cacao	30
10 Proceso de obtención de licor de cacao	32
11 Índice de teobromina y cafeína de Tingo María (a), San Alejandro (b) y Curimana (c).....	35
12 Perfil Cromatográfico del grano fresco de Tingo María a 210 nm	36
13 Perfil Cromatográfico del grano fresco de San Alejandro a 210 nm...	37
14 Perfil Cromatográfico del grano fresco de Curimana a 210 nm.....	37

15 Curva estándar de teobromina (a), catequina (b), cafeína (c) y epicatequina (d)	40
16 Perfil Cromatográfico de los estándares de teobromina, epigallocatequina, catequina, cafeína, epigallocatequina galato, epicatequina y epicatequina galato.....	42
17 Cromatograma de muestra de cacao de Tingo María (1), San Alejandro (2) y Curimana (3).....	51
18 Perfil sensorial del licor de cacao de Tingo María	59
19 Perfil sensorial del licor de cacao de San Alejandro	59
20 Perfil sensorial del licor de cacao de Curimana	60

RESUMEN

Se cuantificó mediante HPLC, el contenido de metilxantinas y catequinas en grano de cacao fresco, fermentado, seco y en licor de cacao, de tres zonas, en las regiones de Huánuco (Tingo María), Ucayali (San Alejandro) y Curimaná, (oriente del Perú). Se determinó ($p \leq 0,05$), que el contenido de Teobromina (Tb) y cafeína (Cf) en grano fresco es afectado por la zona de producción ($5,735 \pm 0,09 - 7,606 \pm 0,043$ g Tb/100 g de grano y $1,208 \pm 0,018 - 2,083 \pm 0,025$ g Cf/100 g de grano), encontrándose los índices de teobromina y cafeína entre $3,10 \pm 0,053 - 6,30 \pm 0,057$. El nivel zona – proceso afecta el contenido de Teobromina y Cafeína; disminuye durante la fermentación y el secado de los granos ($0,854 \pm 0,011 - 1,156 \pm 0,005$ g Tb/ g de grano seco y $0,87 \pm 0,00 - 0,200 \pm 0,01$ g Cf/g de grano seco respectivamente). El contenido de Catequina (C) y epicatequina (EC) es afectado por el nivel zona - proceso, encontrándose mayor concentración en grano fresco de la zona de Tingo María ($0,065 \pm 0,01 - 0,020 \pm 0,00$ g C/100 g de grano y $1,855 \pm 0,20 - 0,055 \pm 0,01$ g EC/100 g de grano). El contenido de C y EC disminuyó durante la fermentación, secado y en licor, alcanzando valores entre $0,001 \pm 0,0 - 0,013 \pm 0,0$ g C/100 g de licor; mientras que la EC, varió entre $0,022 \pm 0,01 - 0,139 \pm 0,01$ g EC/100 g de licor y no existió diferencia estadística entre las muestras fermentadas y secas. Existe diferencia estadística ($P \leq 0,05$), para los atributos, acidez, astringencia, sabor a cacao, frutas y flores y no hay diferencia estadística en los atributos amargor y sabor a nuez en los granos seleccionados.

I. INTRODUCCIÓN

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.

El consumo de productos a base de cacao, principalmente el chocolate, no ha sido considerado como una práctica de estilo de vida saludable por su alto valor calórico; sin embargo, siendo consistentes con las nuevas tendencias en el mercado de alimentos, estudios recientes sugieren que el cacao y sus derivados además de tener gran aceptación por parte de los consumidores, presentan múltiples beneficios para la salud debido a que son una fuente rica en polifenoles, capaces de modular eventos oxidativos vinculados con la aparición de enfermedades cardio y cerebrovasculares. Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante como los polifenoles, siendo las catequinas uno de los fenoles con capacidad anti radical muy acentuada, estos provienen de metabolitos secundarios de las plantas que protegen del daño por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, polución ambiental y otras sustancias.

Sin embargo, para la obtención del chocolate, es relevante el beneficio del cacao, ya que ello conlleva a modificaciones bioquímicas, que

generan los precursores del sabor y aroma característico a chocolate, de igual manera en el tostado se da las reacciones no enzimáticas que complementan éstos compuestos. Son numerosos los estudios que han tratado el tema de la composición química del cacao o de sus subproductos, desafortunadamente estos estudios han trabajado con variedades de cacao que en su mayoría no son cultivadas en Perú, y esto nos sitúa en un lugar de completo desconocimiento acerca de las características de nuestro cacao. Además, la pérdida de catequinas y en general de polifenoles, que se presenta durante los procesos de postcosecha en preindustrialización e industrialización, conduce a la generación de productos de menor calidad en comparación con los actualmente ofertados en mercados internacionales,

. Estos compuestos en los procesos a los que son sometidos los granos de cacao, sufren degradaciones considerables, de allí el interés despertado para realizar la investigación en granos de cacao fresco, fermentado, seco y licor; para ello se plantearon los siguientes objetivos.

- Seleccionar cacaos de Tingo María, San Alejandro y Curimaná, según el índice de Teobromina y cafeína.
- Determinar la variación del contenido de metilxantinas, catequinas, en grano fresco, durante la fermentación, en grano seco y licor de cacao.
- Analizar sensorialmente el licor de cacao de las muestras seleccionadas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Cacao (*Theobroma cacao* L)

2.1.1. Variedades según su origen

Se reconocen tres grandes grupos genéticos de cacao llamados Criollos, Forasteros y Trinitarios (es la mezcla de los dos anteriores), (PALACIOS,. 2008),

- Cacaos criollos

Esta variedad de cacao se caracteriza por tener mazorcas alargadas de colores verde y rojizo en estado inmaduro, tornándose amarillas y anaranjadas rojizas cuando están maduras, las almendras son de color blanco marfil. el chocolate obtenido de este cacao es apetecido por el sabor a nuez y fruta. Estos requieren de dos a tres días para fermentar, es muy aromático y se lo designa comercialmente como “Cacao Fino”, (NAVIA y PAZMIÑO, 2012).

- Cacaos forasteros o amazónicos

Los cacaos forasteros presentan estaminoides de color violeta, las mazorcas son amarillas cuando están maduras, presentan surcos y rugosidad poco notables; son lisas y de extremos redondeados. La cáscara es algo grueso y el mesocarpio lignificado, los granos son más o menos aplanados con cotiledones de color púrpura, (PALACIOS, 2008)

De esta variedad de cacao se obtiene un chocolate con sabor

básico de cacao, (BORBOR y VERA 2007), y

- **Cacaos trinitarios**

. Es un cruce natural (híbrido) entre el forastero y criollo, posee un aroma muy fino pero poco intenso. Es más resistente y productivo que el cacao “criollo”, pero de inferior calidad. El trinitario del centro del Perú tiene un alto contenido de grasa (56,6%) y un sabor suave. Dentro de los trinitarios se encuentra el clon CCN-51, se estima que la producción de cacao trinitario está entre 10 y un 15% (ICT, 2004), su calidad es intermedia, (NAVIA y PAZMIÑO, 2012).

2.1.2. Composición química

La composición química de los granos de cacao y sus subproductos es muy compleja y varia dependiendo de varios factores entre los que se cita, variedad de mazorca, origen geográfico, grado de madurez, calidad de la fermentación, secado y del posterior procesamiento del mismo, (CUELLAR, 2010; WAKAO, 2002).

El cacao presenta alcaloides de base púrica, de la familia de las metilxantinas (teobromina, cafeína y teofilina), compuestos que le confieren un pequeño poder estimulante, la teobromina representa entre el 0,8 y el 2% del contenido total de los granos secos de cacao. El cacao presenta compuestos bioactivos como los polifenoles, (TORRES, 2012).

La catequina es un componente de los taninos del cacao (compuestos responsables de su color y astringencia), y es soluble en etanol, (ZURIDAY, 2007).

Cuadro 1. Composición química de los granos fermentados y secos del cacao.

Componentes	% en peso
Agua	5,0
Grasa	54,0
Cafeína	0,2
Teobromina	1,2
Polihidroxifenoles	6,0
Proteína bruta	11,5
Mono y oligosacaridos	1,0
Almidon	6,0
Pentosas	1,5
Celulosa	9,0
Ácidos carboxílicos	1,5
Cenizas	2,6
Otras sustancias	0,5

Fuente. CUELLAR, (2010)

2.1.3. Metilxantinas

La teobromina y la cafeína pertenecen a la familia de las purinas y constituyen más del 99% del contenido de los alcaloides en cacao, y los restantes son trazas de teofilina y salsolinol, (CUELLAR, 2010). El contenido de

alcaloides está determinado por el genotipo, la maduración de las almendras, el nivel de fermentación y secado de las almendras del cacao, (WAKAO, 2002).

Las metilxantinas como la teobromina y la cafeína son compuestos típicos en el café, té, chocolate y productos hechos a base de ellos. La teobromina conocido también como 3,7-dimetilxantina es el principal compuesto de las metilxantinas de *Theobroma cacao* L. El sabor amargo del cacao está influenciado en gran parte por el contenido de purinas (teobromina, cafeína) y en menor grado por los compuestos fenólicos, estas metilxantinas tienen efectos farmacológicos ya que la cafeína estimula el sistema nervioso y la teobromina es diurético, (NAZARUDDIN *et al.*, 2000; AMORES *et al.*, 2009).

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), 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. La teobromina es el responsable del sabor amargo de este fruto, (CUELLAR, 2010).

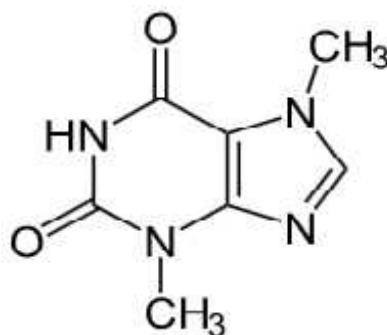


Figura 1. Formula química de la teobromina.

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, (CALLE, 2011). La cafeína variara en cantidad según la variedad del grano, la especie de la planta y el grado de fermentación, (CUELLAR, 2010).



Figura 2: Formula química de la cafeína.

2.1.4. Polifenoles:

En los granos de cacao se destaca la presencia de compuestos bioactivos como los polifenoles, el contenido de estos compuestos en los granos de cacao difiere sustancialmente del que hay en sus derivados del cacao. Los granos de cacao son ricos en flavonoides, principalmente en flavanoles, seguidos en mucha menor proporción de flavonoles, flavonas, antocianos y otros compuestos fenólicos, (TORRES, 2012).

El cacao ha sido identificado como un alimento con un alto contenido de polifenoles. Los granos de cacao contiene 4 tipos de catequinas, de las cuales la (-)-epicatequina constituye el 92% del total de las mismas. El color café y morado en los granos de cacao se atribuye a los productos de una alteración compleja entre catequinas y taninos. Otros polifenoles en menores

proporciones se han identificado en el cacao tales como quercetina, isoquercitrina (quercetina 3 - O - glucosido), hiperosida (quercetina 3-O-galactosido), naringenina, luteolina, y apigenina (CUELLAR, 2010).

Catequinas:

La (+)-catequina y (–)-epicatequina son las formas más comunes encontradas en el cacao. Sin embargo, sus respectivos enantiómeros, tales como la (–)-catequina y la (+)-epicatequina no son comúnmente encontrados en la naturaleza (CUELLAR, 2010). Las catequinas son compuestos fenólicos clasificados como “flavonoides del tipo 2 – fenil benzopirano”, presentan un esqueleto carbonado C6-C3-C6, 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). Además, las catequinas tienen dos carbonos quirales (C2, C3), 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).

La catequina representa un número de compuestos que pertenecen a la familia de los flavonoides y este se divide en cuatro compuestos primarios epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina (EGC), epicatequina (EC). La EGCG constituye (10 a 50%) de catequinas, siendo el más potente debido a su grado de gallation y la

hidroxilación. La catequina es el tema principal de estudio científico con respecto a sus posibles efectos sobre la salud. Los polifenoles tienen propiedades funcionales ya que son excelentes eliminadores de radicales libres, debido a que poseen moléculas activas que actúan como antioxidantes, anticancerígenas, anti – propiedades mutagénicas, así como ejerce efecto protector contra enfermedades cardiovasculares entre otras. Con respecto a la toxicidad de catequinas, los estudios no han mostrado efectos tóxicos en animales (ATOMSSA y GHOLAP. 2014).



Figura 3: Estructura general de las catequinas.

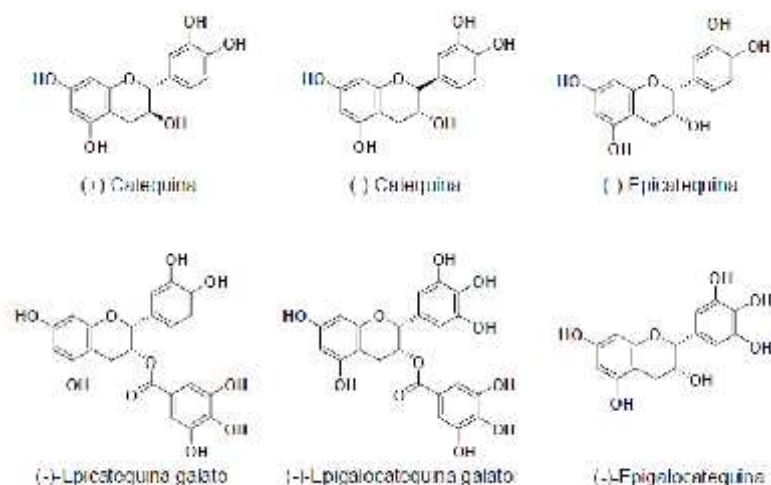


Figura 4: Estructura química de las catequinas.

2.2. Comportamiento de los alcaloides durante la fermentación

NAZARUDDIN *et al.*, (2000), mencionó que el contenido de los alcaloides depende del genotipo y del nivel de maduración de los frutos y reportaron contenidos de teobromina, cafeína para grano fresco de 27 y 6,1 mg/g, respectivamente, mientras que para el grano de cacao fermentado los contenidos de ambas purinas se ubicaron en 21 y 4 mg/g, respectivamente. Por su parte, MATISSEK, 1997, encontró contenidos de teobromina de 31 mg/g y 22 mg/g de grano de cacao fresco y fermentado respectivamente. Los alcaloides no sufren transformaciones químicas durante la fermentación, sin embargo se elimina cerca del 30% de su contenido por difusión y migración hacia el exterior del grano. Lo cual produce una reducción del gusto amargo de los granos de cacao fermentado (CUELLAR, 2010).

2.2.1. De los granos de cacao al chocolate: Alteraciones en la composición y contenido de catequinas

En el proceso de preindustrialización, la mayor parte de los granos de cacao destinados a la producción de chocolate, son sometidos en el lugar de cultivo a los primeros pasos para el procesamiento. Específicamente los procesos de fermentación y secado al sol toman lugar en esta etapa del proceso de producción (preindustrialización), y son importantes para el desarrollo de aromas en el chocolate, (GIL, 2012).

Luego que las mazorcas son cosechadas, se realiza la extracción de los granos de cacao en forma manual, separándolo de la placenta, los

granos de cacao son removidos y transferidos a cajas de madera donde es llevada a cabo la fermentación, durando de 2 a 3 días cuando se trata de granos de cacao Criollo, y de 5 a 7 días para granos de cacao forastero. Durante el primer día de fermentación, el mucílago adherido a la semilla comienza a drenar líquidos con un aumento constante en la temperatura. Bajo condiciones anaerobias, los microorganismos producen ácido acético y etanol. Estos procesos inhiben la germinación de las semillas y contribuyen a cambios estructurales durante la fermentación de los granos tales como la remoción de enzimas y sustratos compartimentalizados. Los líquidos celulares se mueven a través de la pared celular y se esparcen sobre el grano de cacao, esto ocurre generalmente entre las 24 y 48 horas de la fermentación. Al tercer día, la temperatura del grano aumenta generalmente hasta 45° C, y alcanza los 50° C cuando la fermentación ha terminado (GIL, 2012).

- Cambios bioquímicos que ocurren en la fermentación

Durante la fermentación de los granos de cacao, los polifenoles difunden desde los compartimientos celulares y se oxidan para producir taninos insolubles de alto peso molecular. Las reacciones de oxidación son catalizadas por la enzima polifenol oxidasa, no obstante, esta enzima es fuertemente inactivada durante el primer día de fermentación, pasando de una actividad enzimática del 50% al 6% durante los días 1 y 2. La ocurrencia de reacciones de condensación es confirmada por la disminución drástica en el contenido de epicatequina durante el segundo y tercer día de la fermentación, (GIL, 2012).

Una vez terminado el proceso de fermentación, los granos son puestos en bandejas y secados al sol en las zonas de cultivo donde la cosecha coincide con una estación seca, mientras que en zonas lluviosas se utiliza secado artificial. El objetivo principal del secado es disminuir la humedad de los granos hasta un 5-7%, para permitir su almacenamiento y transporte, ya que un contenido de humedad superior al 8%, incrementa la probabilidad de contaminación fúngica, (GIL, 2012).

Además de la oxidación enzimática durante la fermentación, se ha propuesto que el incremento de temperatura durante el secado en campo es un factor importante vinculado a la pérdida de polifenoles. En general, se ha encontrado que el contenido de polifenoles disminuye drásticamente hasta cerca de un 80% durante esta etapa del procesamiento, es necesario enfatizar que estos procesos de preindustrialización no están estandarizados a nivel mundial, generando alta variación en la concentración de catequinas de cacaos provenientes de diferentes procedencias, (GIL, 2012).

2.3. Características organoléptica del Licor del cacao

Un punto dominante en la calificación del cacao de exportación se basa en la características organoléptica (sabor y aroma), tales como el amargor y la astringencia, que están intrínsecas en los granos de cacao, requisito fundamental para la elaboración de chocolates finos, (CALDERÓN, 2002).

- Aspectos que influyen en el aroma y sabor de los granos.

Según SÁNCHEZ, (2007), menciona que un grano de cacao de calidad debe tener la capacidad para desarrollar un buen chocolate, aroma a

cacao y debe estar libre de sabores secundarios, especialmente humo, moho y acidez excesiva. La calidad aromática de un chocolate está relacionada con el origen de los granos, la fermentación, secado y con el tostado. El aroma del cacao incluye varias fracciones determinadas en los granos frescos; una fracción constitutiva (presente en los granos frescos), de una fracción desarrollada durante la fermentación y secado y por último, por una fracción formada durante el tostado.

La finalidad principal del secado de los granos del cacao es la de retener el sabor a chocolate adquirido en el proceso de fermentación y eliminar el exceso de agua. La almendra fermentada tiene más del 50% de humedad que debe ser reducida por lo menos a 8%, límite considerado como humedad crítica para el almacenamiento, (SULLCA, 1992).

- **Licor de cacao.**

DIAZ y PINOARGOTE. 2012. Señala que el licor de cacao se produce por medio de la molienda de los granos de cacao. La finura a la cual la masa necesita ser molida depende de su uso final

El licor de cacao es el producto obtenido de los granos de 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.

Para el fabricante, la evaluación sensorial es la única prueba confiable para determinar si puede utilizar determinado granos de cacao para

sus productos. Esta prueba permite medir, analizar e interpretar reacciones de las características de los alimentos, los cuales son percibidos por los sentidos de la vista, olfato y gusto es decir sabor y aroma (JIMÉNEZ, 2003).

Para conocer la aceptación del consumidor se deben realizar ensayos que permiten la medición, el análisis y el reconocimiento de las reacciones características de los alimentos; percibidos por la vista, el olfato y el gusto. En la elaboración de chocolates finos, el amargor y astringencia bajos son dos características organolépticas fundamentales para la valoración del cacao de exportación y para el fabricante se constituye en la prueba más confiable para saber si puede utilizar un cacao determinado para elaborar sus productos. El análisis sensorial del cacao se realiza mediante la catación de sus licores y se establece que la temperatura promedio para la evaluación del licor debe ser de 45°C..La Catación es una labor que practican personas que tienen la capacidad de grabar en su mente las características de los alimentos que prueban y que deben saber identificarlo según su olor, textura y sabor para evaluar una muestra y reconocer un producto de calidad. A través de este proceso, el catador identifica con precisión un sabor a nuez, sabor a caramelo y el amargor que puede tener un licor de cacao. Todo ello se logra al seguir procedimientos establecidos para la identificación (LOAYZA, 2014)

- **Procedimiento seguido durante la catación**

Son un conjunto de fases, incluidas en la norma de APP CACAO (2012):

Fase olfativa: Consiste en la inhalación, desde una distancia de 3 cm del envase, de los aromas que se desprenden cuando el catador mezcla el licor

con una espátula. Esta evaluación la puede repetir varias veces hasta identificar los aromas.

Fase gustativa: Usando una cuchara, el catador coloca 3 mL de licor sobre la lengua, los distribuye en toda la cavidad bucal y aprecia la textura o finura de las partículas, la viscosidad de la muestra, la evolución de su acidez y consistencia.

Fase retronasal: Ejercicio de aspiraciones, cortas y sucesivas, que permiten identificar aromas específicos; al expulsar el aire por la nariz para percibir información por vía retronasal.

Evaluación del sabor: Permite detectar los perfiles de sabor, al revelar sensaciones que se perciben en las papilas gustativas de la lengua, estimuladas por sustancias solubles. Estas sensaciones son detectadas al combinar los sentidos del gusto y el olfato. El 80% de lo que se detecta como sabor procede de las sensaciones del olor. En estos ensayos, también, se encuentran particularidades derivadas de los tipos de sabores: básicos (dulce, salado, ácido, amargo, unami), sabores específicos (a cacao, frutas, floral, nueces, panela/malta, caramelo), sabores defectuosos (ahumado, mohoso y crudo/Habas verdes)

Astringencia: Se manifiesta porque la producción de la saliva aumenta y entre la lengua y la campanilla, se siente la sequedad en la boca. Ambas sensaciones son percibidas debido a una falta de fermentación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se desarrolló 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, región de Huánuco; a una altitud de 660 m.s.n.m. a 09° 18' 46,3" de Latitud Sur, a 75° 59' 46,4" de Latitud Oeste, con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 82% y temperatura media anual de 24° C, en conjunto con la Cooperativa Agraria Cafetalera Divisoria. Ltda.

3.2. Materia prima

Se emplearon granos de cacao fresco, fermentado y seco de la variedad forastero y trinitario, provenientes de Tingo María (TM) a una altitud de 660 m.s.n.m. San Alejandro (SA) a una altitud de 217 m.s.n.m. y Curimana (CU) a una altitud de 180 m.s.n.m. las coordenadas de las mazorcas de cacao utilizadas para este trabajo se muestran en el anexo A-X a.

Las mazorcas maduras y libres de daño fueron cosechadas con el apoyo del equipo técnico de la CAC Divisoria. Ltda de los fundos de los agricultores asociados.

3.3. Materiales de laboratorio

- **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 5 – 10 μ L, 10 – 100 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 y 500 mL.

- **Otros materiales**

- Tips, FISHERBRAND® (1000 y 200 μ L).
- 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.

- **Reactivos y solventes**

- Theobromine $\geq 99.0\%$, solid, sigma.
- Caffeine meets USP testing specifications, anhydrous X 250GR. Sigma.
- (+)-Catechin hydrate, $\geq 98\%$ (HPLC), powder, sigma.
- (-)-Epicatechin gallate, $\geq 98\%$ (HPLC), from green tea, sigma-aldrich.
- (-)-Epigallocatechin gallate, $\geq 80\%$ (HPLC), from green tea, sigma.

- (-)-Epigallocatechin, $\geq 95\%$ (HPLC), from green tea, sigma-aldrich.
- (-)-Epicatechin, $\geq 90\%$ (HPLC) (Sigma).
- Metanol (grado HPLC), Sigma Chemical
- Etanol al 99,99 % Merck KGaA.
- Ácido acético glacial.
- Agua destilada desionizada (H₂O_{dd}).

3.4. Equipos

- Equipo HPLC (Shimadzu Scientific, MD, USA.).
- Balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión).
- Estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS Heating Drying Oven)
- Desionizador modelo D 7035 (Barnstead)
- Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industries SITM)
- Refrigeradora Icebeam Door Cooling LG GR-5392QLC.

3.5. Métodos de análisis

3.5.1. Determinación de teobromina y cafeína, reportado por NAZARUDDIN (2000) y LO COCO *et al.* (2007).

3.5.2. Determinación y cuantificación de catequinas ($\pm$)-C, epicatequina (-)-EC, epigallocatequina (-)-EGC, epicatequina galato (-)-ECG y epigallocatequina galato (-)-EGCG, reportado por CALA *et al.*, 2011.

3.5.3. Evaluación sensorial del licor de cacao, según lo descrito por APP CACAO, 2012.

3.6. Metodología experimental

3.6.1. Obtención de muestra.

Para la obtención de las muestras usadas para la selección del cacao, según el índice de teobromina/cafeína (Tb/Cf) vs cafeína (Cf), se siguió el flujograma que se muestra en la Figura 5,

Para la obtención de las muestras empleadas en la variación del contenido de metilxantinas, catequinas durante la fermentación, licor de cacao y evaluación sensorial del licor, se siguió el flujograma que se muestra en la Figura 6,

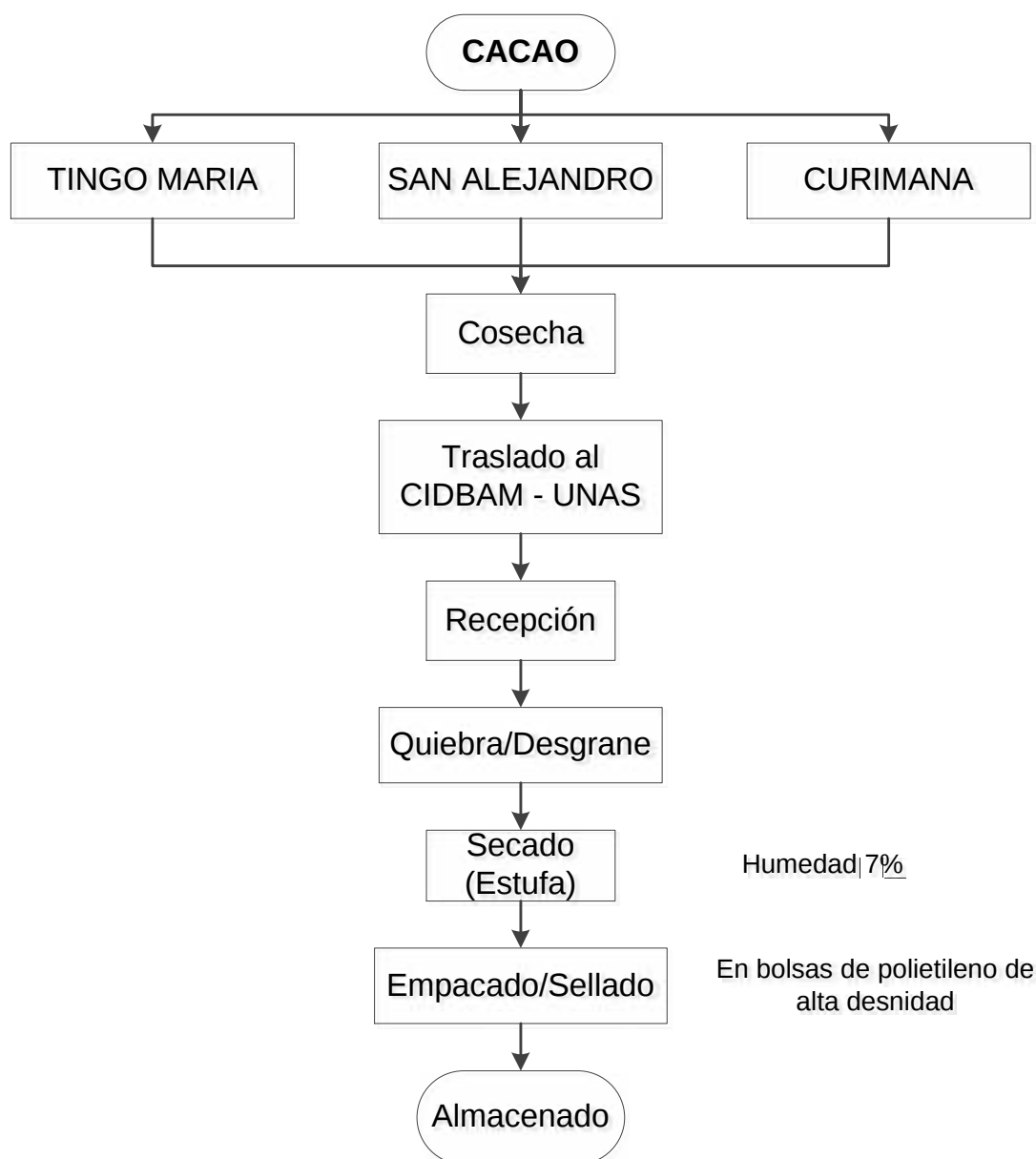


Figura 5: Flujograma de obtención de muestra de granos fresco – seco de cacao

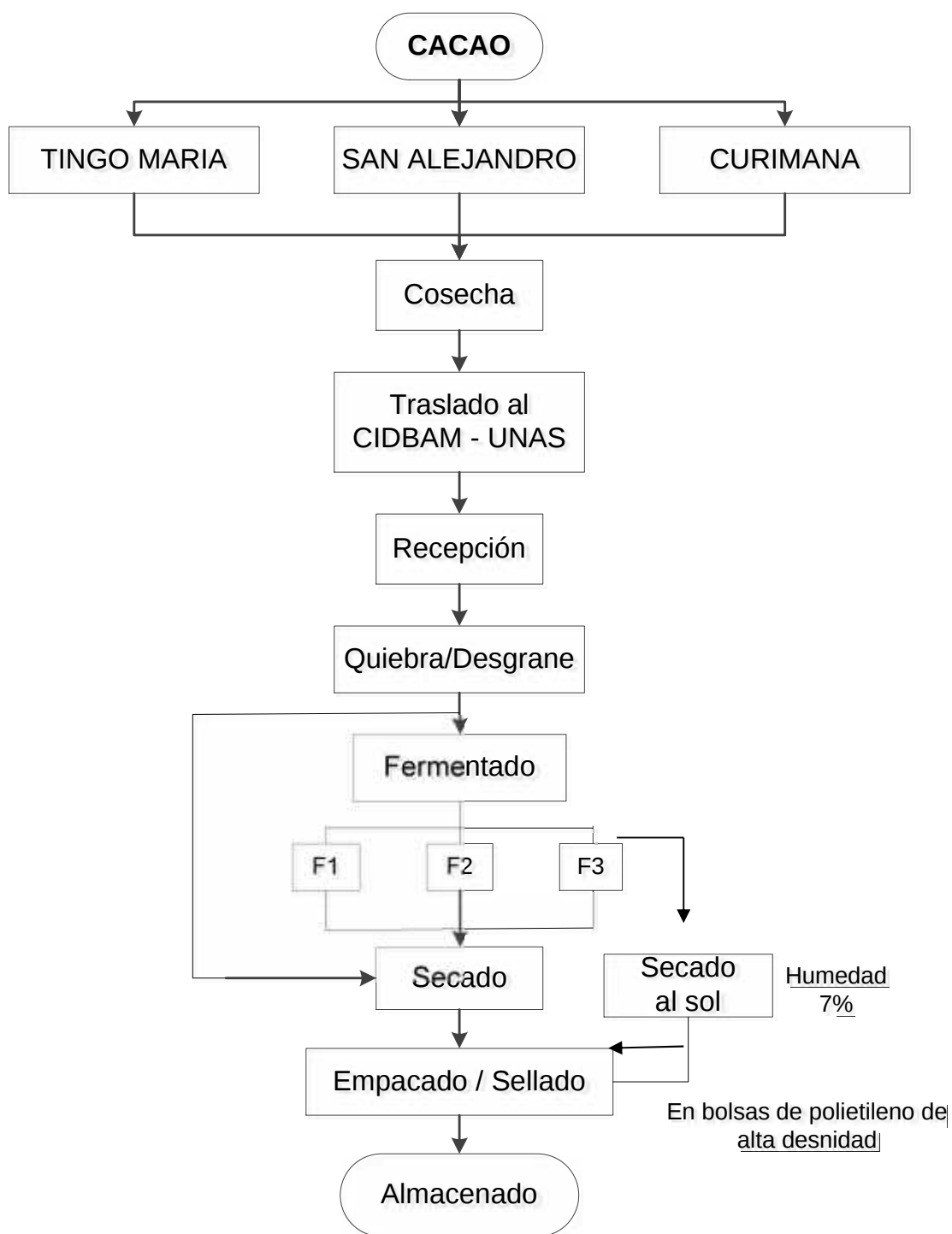


Figura 6: Flujograma de obtención de muestra de granos frescos, fermentados y seco de cacao.

Dónde: F= Fermentación; 1,, 2,3 = Tiempo (48, 96 y 120 horas)

3.6.2. Análisis cromatográfico por HPLC:

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 7725i; 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 guarda columna, cartucho Ultra C18, 20 mm x 4 mm, Marca: Restek, Código: 917450220 y una columna cromatográfica Ultra C18, Dimensiones: 150 mm x 4.6 mm x 5 μ m, Marca: Restek, Código: 9174565 La temperatura de la columna se mantuvo en 35°C.

La detección de teobromina y cafeína en grano fresco – seco, para la selección de muestras según el índice de Tb/Cf, se realizó a una longitud de onda de 210 nm. La fase móvil seleccionada fue una mezcla de dos solvente como se indica en el cuadro 2, empleándose agua destilada, desionizada, la solución se microfiltro con un microfiltro de nylon de 0.2 μ m.

Cuadro 2: Parámetros de análisis de teobromina y cafeína por HPLC.

Parámetro	Especificaciones
Fase móvil	24,9 % metanol grado HPLC 75,0 % agua grado HPLC 0,1 % Ácido acético
Temperatura	35 °C
Flujo	1 mL/min
Volumen de muestra	20 µL

Fuente: Elaboración propia.

Para el análisis cromatográfico de HPLC de Tb, Cf, (±)-C, (-)- EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, de las muestras seleccionadas, se implementó un método por HPLC donde se probó la siguiente condición de análisis (Cuadro 3)

La detección de Tb, Cf, (±)-C, (-)- EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG fue realizada a una longitud de onda de 210 nm. La fase móvil seleccionada fue microfiltrada con un microfiltro de nylon de 0.2 µm.

Cuadro 3: Parámetros de análisis de teobromina, cafeína y catequinas por HPLC.

Parámetro	Especificaciones
Fase móvil	20,0 % metanol grado HPLC 80,0 % agua, ácido acético (100:0,1)
Temperatura	35 °C
Flujo	1 mL/min
Volumen de muestra	20 µL

Fuente: Elaboración propia.

3.6.3. Extracción de teobromina, cafeína y catequinas de los granos frescos, fermentados, seco y licor de cacao.

Para la extracción de los compuestos se utilizó una solución de ácido acético al 0,3% y metanol grado HPLC (85:15), se empleó 0,02 g de cacao molido en 5 mL de esta solución, se agitó en un vortex por 15 min, se dejó reposar y el sobrenadante se vertió en microtubos de 2 mL, se centrifugo (10000 RPM / 10 min. a 4°C), a partir de esta solución se diluyo a una concentración de 500 µg/mL y se microfiltro, quedando lista para ser inyectada al HPLC.

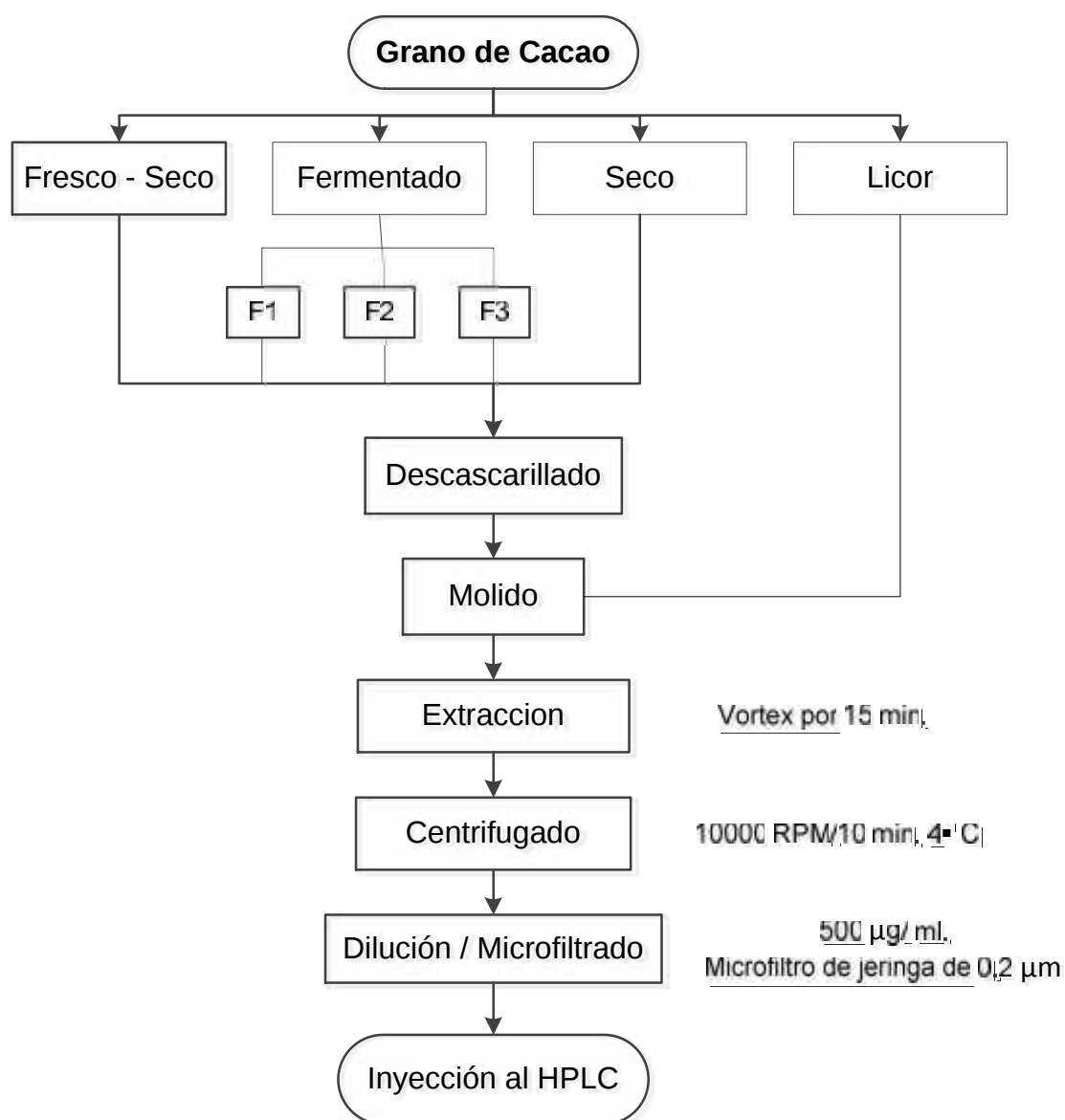


Figura 7: Extracción de teobromina, cafeína y catequinas de los granos fresco, fermentado, seco y licor de cacao.

3.6.4. Selección de cacaos, según el índice de teobromina y cafeína.

La selección de cacaos de Tingo María (TM), San Alejandro (SA) y Curimaná (CU), se determinó mediante el índice de teobromina / cafeína (Tb/Cf) vs Cafeína (Cf), que nos indica el genotipo de cacao, esto se realizó de acuerdo a la metodología descrita en diversos trabajos de investigación (CALA,

2011; NAZARUDDIN *et. al.* 2000 y LO COCO *et. al.*, 2007), donde se establece que los cacaos con índice de Tb/Cf menores a 2 son de la variedad criollo, los cacaos con índices entre 2 a 5 son de la variedad trinitario y los cacaos con índice mayor a 5 son de la variedad forastero.

La evaluación se realizó en grano fresco – seco, las muestras fueron descascarilladas manualmente, molidas en un molinillo eléctrico, luego se realizó la extracción de los compuestos teobromina y cafeína, se centrifugó, diluyo y microfiltró, quedando la muestra lista para ser inyectado al HPLC.

Preparación del estándar de teobromina

Antes de inyectar las muestras en el HPLC se calibró el instrumento con estándares de teobromina. Se preparó una solución stock de 1 mM, el estándar fue disuelto en agua destilada, desionizada y microfiltrada, se prepararon soluciones de teobromina (3; 6; 12; 24; 36; 48 y 60 μM) que fueron usadas para levantar la curva estándar.

Preparación del estándar de cafeína

Se preparó una solución stock de 3 mM de cafeína la cual se diluyo a diferentes concentraciones para levantar la curva estándar. El estándar fue disuelto en agua destilada desionizada y microfiltrada, se prepararon soluciones de cafeína (1,5; 3; 6; 12; 18; 24 y 30 μM), que se usaron para levantar la curva.

Las alícuotas de la soluciones stock de teobromina y cafeína fueron almacenadas a -20°C para preservar su estabilidad y calidad

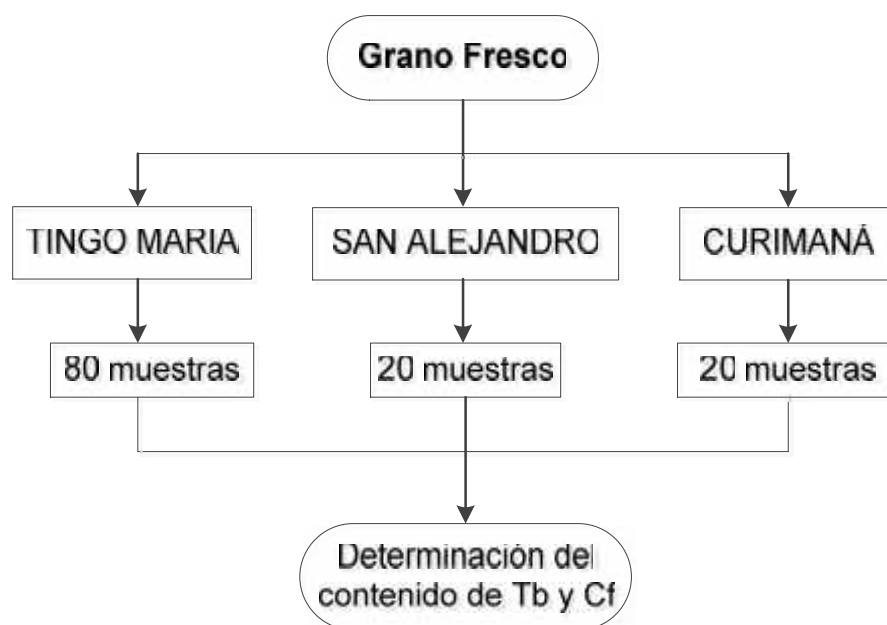


Figura 8: Diseño experimental para determinar el genotipo de los granos de cacao fresco, según el índice de teobromina y cafeína

Los resultados del diseño experimental que se muestra en la Figura 8, serán evaluados estadísticamente empleado un diseño completo al azar DCA, con tres repeticiones, para lo cual se empleará el siguiente modelo matemático (LÓPEZ, 2008; DAZA, 2006).

Modelo matemático:

$$X_{im} = \mu + t_i + E_{im}$$

Dónde:

X_{im} = Resultados del contenido de Tb y Cf.

μ = Media general

t_i = Es el efecto del i – ésimo nivel del factor zona de producción

E_{im} = Error experimental.

3.6.5. Variación del contenido de metilxantinas, catequinas, en grano fresco, durante la fermentación, grano seco y licor de cacao.

De las muestras seleccionadas de cada zona se realizó el análisis por HPLC de la variación del contenido de Tb, Cf, ($\pm$)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG, como se muestra en la figura 10, para ello se empleó los métodos de análisis indicados en el ítem (3.5).

Preparación del estándar de teobromina

Antes de inyectar las muestras en el HPLC se calibró el instrumento con estándares de teobromina. Se preparó una solución stock de 1 mM, el estándar fue disuelto en agua desionizada y microfiltradas con un microfiltro de nylon de 0,2 μ m, se prepararon soluciones de teobromina (0.36; 0.72; 1.44; 2.88; 5.76 ppm) que fueron usadas para levantar la curva estándar.

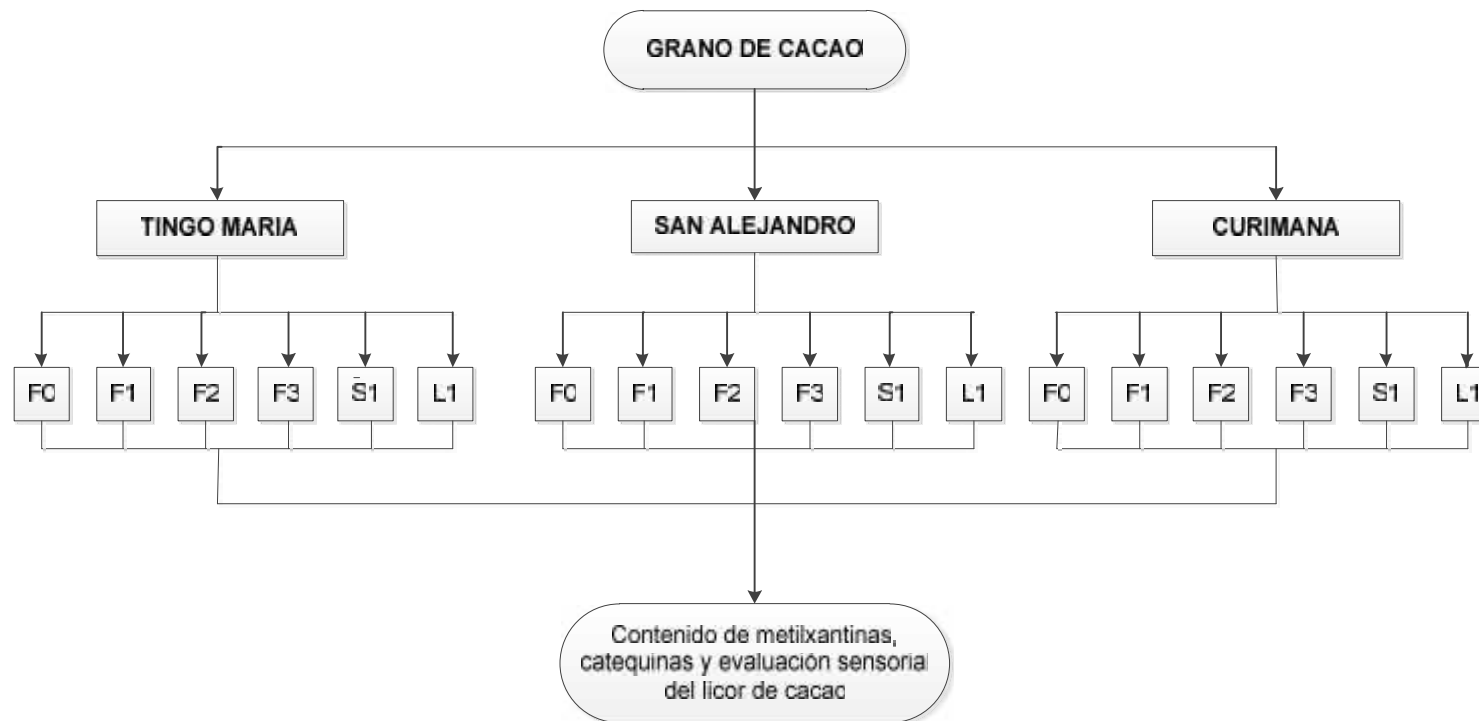
Preparación del estándar de cafeína

Se preparó una solución stock de 3 mM de cafeína la cual se diluyo a diferentes concentraciones para levantar la curva estándar. El estándar fue disuelto en agua destilada desionizada y microfiltrada, se prepararon soluciones de cafeína (0.291; 0.582; 1.164; 2.328; 4.656 ppm), que se usaron para levantar la curva.

Preparación de los estándares de catequinas

Para el caso de las catequinas las soluciones stock fueron de catequina 500 ppm, epicatequina 500 ppm, epigalo catequina 418 ppm, epicatequina galato 500 ppm y epigalo catequina galato 500 ppm. Los estándares fueron disueltos en agua desionizada y microfiltrada con un microfiltro de nylon de 0,2 μ m.

Para hacer las curvas estándares se tomaron 5 concentraciones y se evaluó por triplicado. Las alícuotas de la soluciones stock de teobromina cafeína y catequinas fueron almacenadas a -20° C para preservar su estabilidad y calidad.



F0 = Grano Fresco, F = Fermentación. 1, 2 y 3 = Horas de fermentación (48, 96 y 120 horas); S1 = Grano seco y L1 = Licor de cacao

Figura 9. Diseño experimental de la variación del contenido de metilxantinas, catequinas, en grano fresco, durante la fermentación, grano seco, licor y evaluación sensorial del licor de cacao.

El resultado del diseño experimental de la Figura 9, se evaluará estadísticamente empleando un diseño completo al azar DCA, con tres repeticiones, para lo cual se empleará el siguiente modelo matemático (LÓPEZ, 2008; DAZA, 2006).

Modelo matemático.

$$X_{im} = \mu + t_i + E_{im}$$

Dónde:

X_{im} = Resultados del contenido de Tb, Cf, (±)-C, (-)-EC, (-)-EGC, (-)-ECG y (-)-EGCG.

μ = Media general

t_i = Es el efecto del i – ésimo nivel zona - proceso

E_{im} = 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.

3.6.6. Análisis sensorial del licor de cacao de las muestras seleccionadas.

El análisis sensorial del licor de cacao se realizó con la colaboración de los catadores entrenados de la CAC Divisoria. Ltda., este análisis se hizo según lo descrito por APP CACAO, 2012. Los parámetros para la obtención del licor de cacao se realizaron según la CAC Divisoria, como se indica en el Flujograma de la Figura 10.

Para la evaluación sensorial del licor de cacao de la Figura 10, se utilizó el modelo estadístico no paramétrico de Kruskal – Wallis (BERLANGA Y RUBIO. 2012)

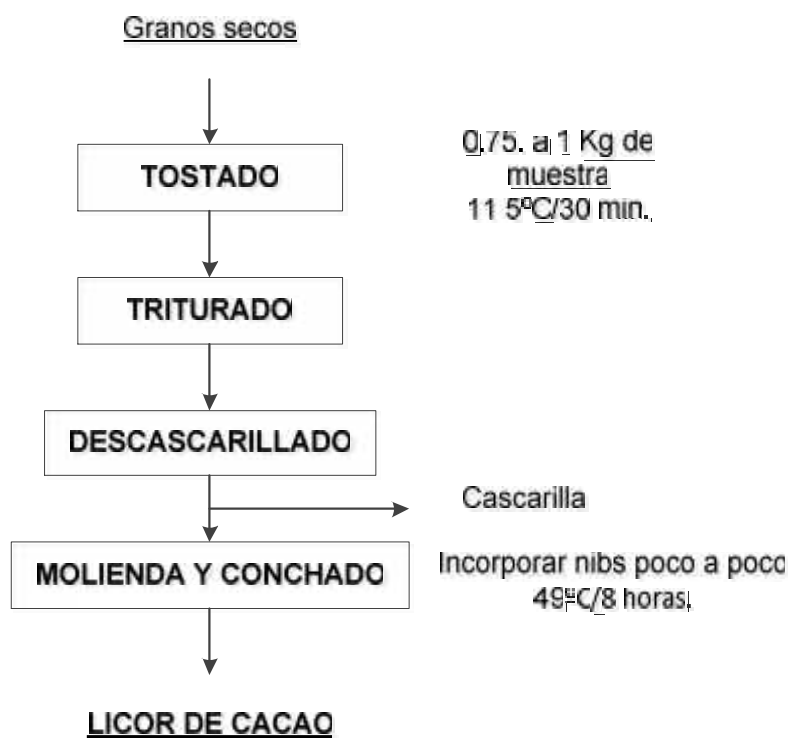


Figura 10. Proceso de obtención de licor de cacao.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección de cacaos, según el índice de teobromina y cafeína.

4.1.1. Curva estándar de teobromina y cafeína

Para la implementación de la metodología de análisis de teobromina y cafeína por HPLC, se seleccionó la longitud de onda para el máximo de absorbancia de 210 nm. Para la cuantificación de teobromina, cafeína, fue necesario establecer las características de los estándares y de la fase móvil, con el fin de obtener cromatogramas adecuados y conocer el orden de elusión de cada uno.

En los anexos A-I a y A-I b, se presentan los resultados de los estándares utilizados, concentración, área, absorbancias y tiempo de retención (TR), se observó que la teobromina (Tb) eluyó primero, luego la cafeína (Cf), como se muestra en la figura del anexo A-I c y la representación gráfica en el anexo A-I d.

4.1.2. Índice de teobromina y cafeína.

.Los resultados del índice de teobromina y cafeína versus cafeína (Tb/Cf vs Cf), de las muestras de TM, SA y CU se muestran en la Figura 11, mientras que en el Cuadro 4 se presenta el contenido de teobromina (Tb),

cafeína (Cf) y la relación del índice de Tb/ Cf vs: Cf, de las tres mejores muestras de las zonas TM, SA y CU.

Cuadro 4: Resultados del contenido y índice de teobromina y cafeína de las 3 mejores muestras de Tingo María, San Alejandro y Curimana.

Zona de producción	Código	Contenido en g / 100 g de grano		Índice de Tb/Cf vs Cf
		Tb	Cf	
TM	OC1	6,195 ± 0.189	1,706 ± 0.108	3,65 ± 0.132
	JC0	6,811±0.129	1,465 ± 0.051	4,66 ± 0.149
	TN2	7,359±0.203	1,526 ± 0.045	4,83 ± 0.137
	TMG1	6,460±0.029	2,083 ± 0.025	3,10 ± 0.053
SA	CCM1	5,774±0.109	1,055 ± 0.016	5,47 ± 0.020
	GCZ6	7,606±0.043	1,208 ± 0.018	6,30 ± 0.057
	VCM4	6,025±0.217	1,804 ± 0.054	3,34 ± 0.108
CU	VCM2	6,879±0.125	1.778 ± 0.014	3.87 ± 0.051
	CMA4	5,735±0.09	1.476 ± 0.020	3.89 ± 0.058

Los valores representan el promedio ± SEM, n= 3 inyecciones de HPLC. El volumen de cada inyección (20 µL). En cacao fresco, expresado en materia seca.

Se observa en el cuadro 4, la relación del índice de Tb/Cf vs Cf, con valores entre 3,10 – 6,30; se conoce que los valores entre dos y seis corresponden al cacao trinitario, mientras que valores menores a dos son típicos del cacao criollo y el cacao forastero tiene valores superiores a seis; en estudios similares DAVRIEUX *et al.*, 2004 y ZAMBRANO *et al.*, 2010, muestran que existe relación entre el contenido de teobromina y cafeína y el genotipo del cacao.

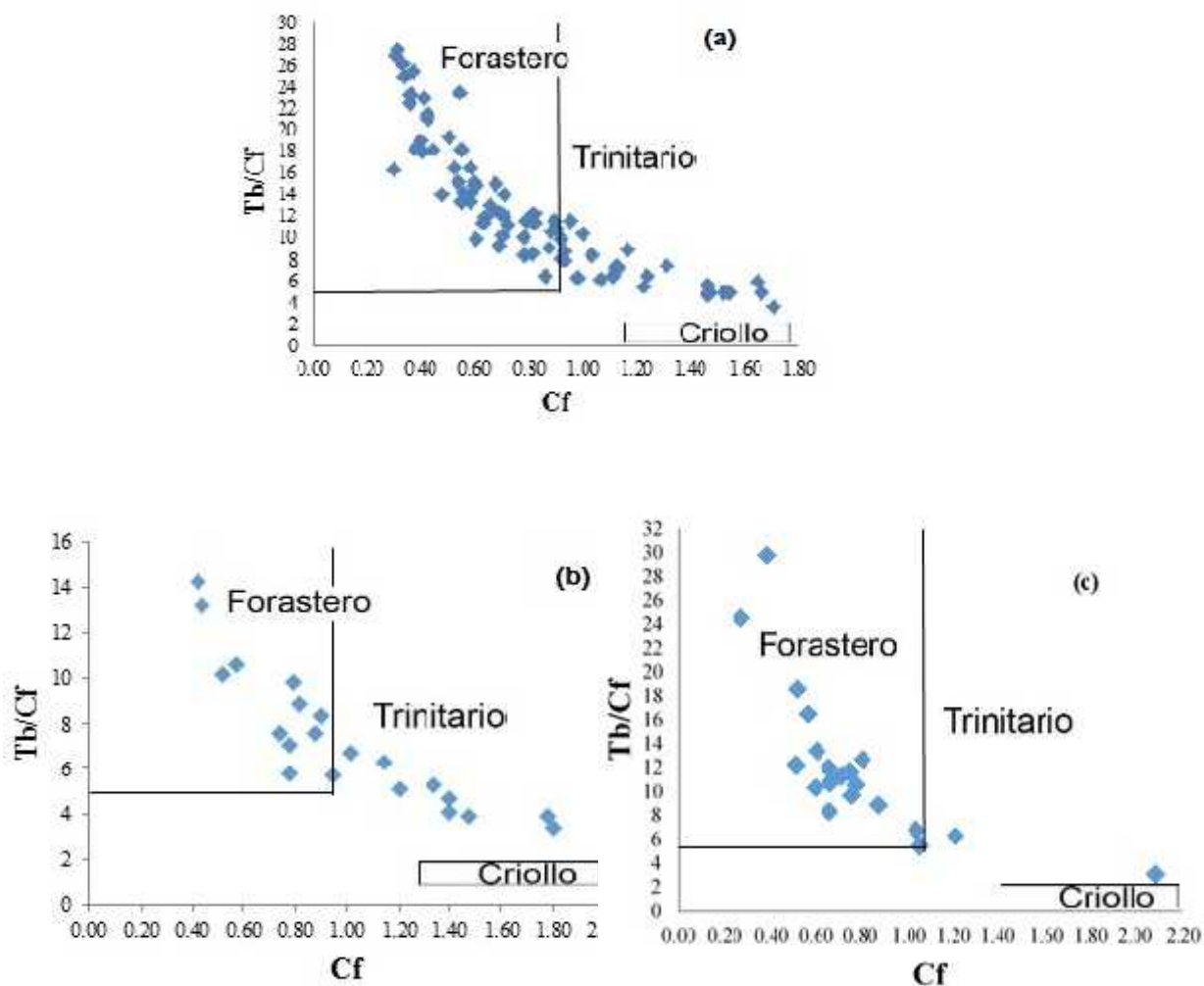


Figura 11: Índice de teobromina y cafeína de Tingo María (a), San Alejandro (b) y Curimana (c).

El índice de Tb/Cf vs Cf depende del contenido de metilxantinas (Tb y Cf), este es afectado por la variedad del cacao y la zona de producción ($P < 0,05$). Las pruebas de media en función de la zona del cacao mostraron que el contenido de teobromina fue menor en las muestras de cacao trinitario, mientras que los resultados opuestos se observaron para el contenido de cafeína Cuadro 4. PORTILLO *et al.*, 2011; WAKAO, 2002 mencionan que los cacaos Criollos

poseen menor índice de amargor, en respuesta a una menor concentración de teobromina, comparados con otros grupos genéticos. Se ha demostrado también, que los distintos variedades de cacao presentaron diferencias en el contenido de metilxantinas, sugiriendo su posible utilidad para la diferenciación de genotipos de cacao, cuanto más baja sea el índice de Tb/Cf, el cacao será de la variedad criollo, en caso contrario será trinitario o forastero (PORTILLO *et al.*, 2011).

Este método gráfico tiene en cuenta tanto la relación de determinación de la calidad de las metilxantinas y su cantidad en particular. Los altos niveles de cafeína son característicos de la alta calidad de cacaos criollos (TROGNITZ *et al.*, 2013).

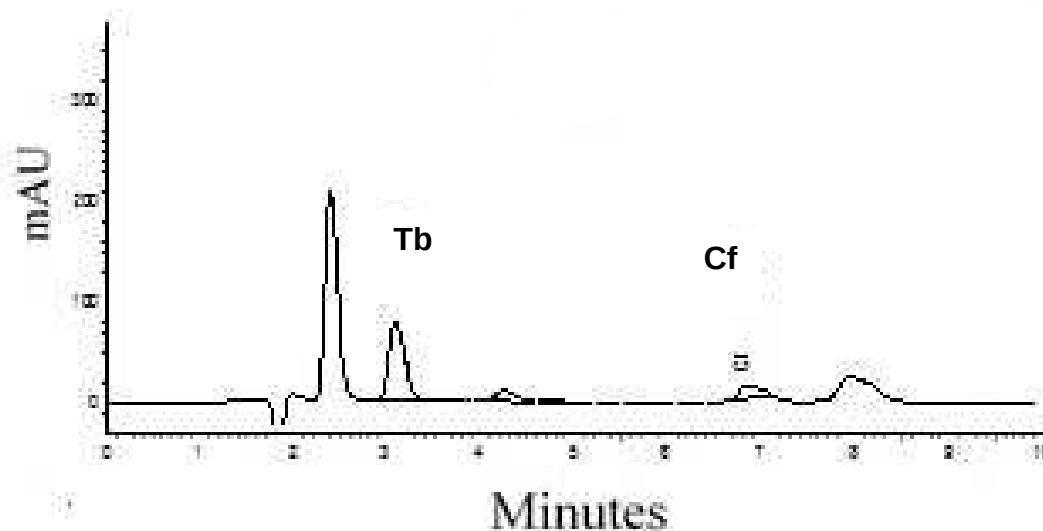


Figura 12. Perfil Cromatográfico del grano fresco de Tingo María a 210 nm.

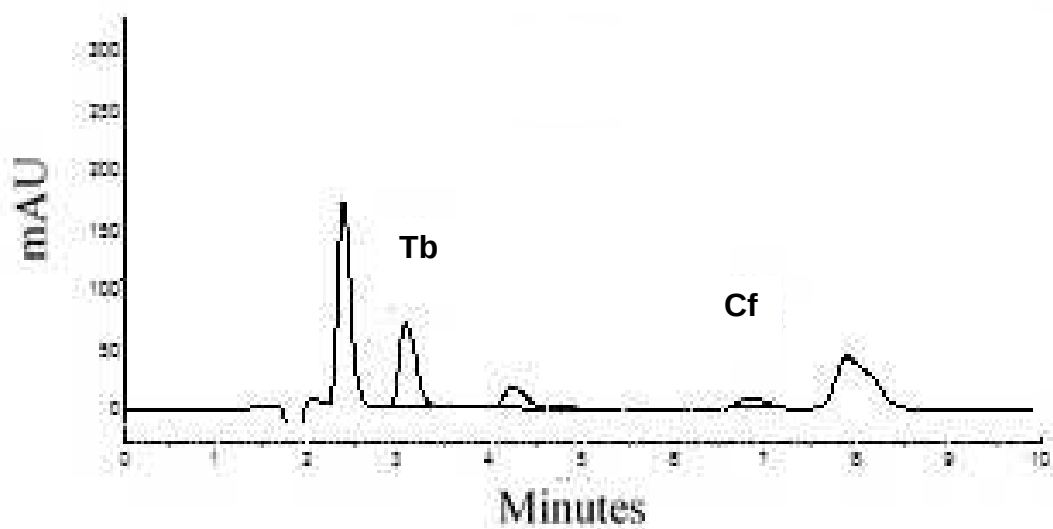


Figura 13. Perfil Cromatográfico del grano fresco de San Alejandro a 210 nm.

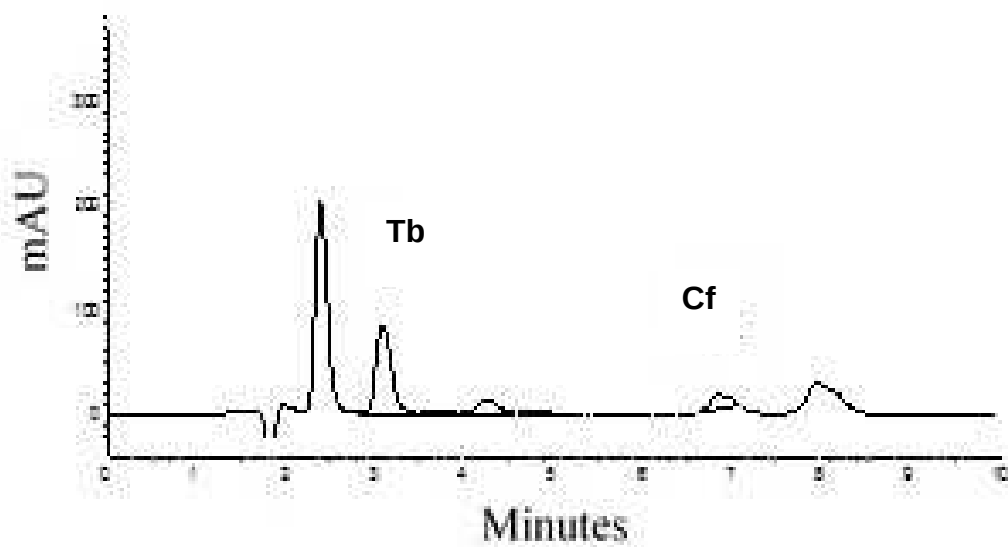


Figura 14. Perfil Cromatográfico del grano fresco de Curimana a 210 nm.

4.2. Variación del contenido de metilxantinas, catequinas, en grano fresco, durante la fermentación, grano seco, licor de cacao.

Para la implementación de la metodología de análisis de teobromina, cafeína y catequinas por HPLC, se siguió la metodología descrita por CALA *et al.*, 2011 que realizó la investigación de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao colombiano.

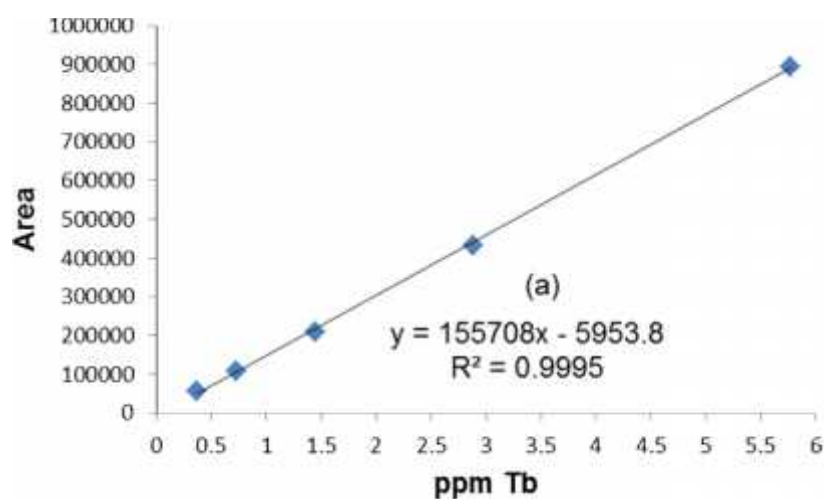
4.2.1. Curva estándar de teobromina, cafeína, catequina y epicatequina.

En el Cuadro 5, se presentan los estándares utilizados, concentración, área, absorbancia y tiempo de retención (TR), se observó que la teobromina (Tb) eluyó primero, seguida de la Epigallocatequina (EGC), catequina (C), cafeína (Cf), Epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina (EC) y epicatequina galato (ECG). El orden de elución de los estándares de catequinas es igual al reportado en la literatura para el caso de catequinas extraídas de cinco variedades de cacao (CALA *et al.*, 2011), pero los tiempos de retención variaron. Los datos de las curvas de los estándares de teobromina, catequina, cafeína, y epicatequina, se presentan en los anexos (A-II a - A-II d), y la curva de calibración se muestran en la figura 15.

Cuadro 5. Estándares utilizados y características obtenidas en el HPLC.

Estándares	Concentración (ppm)	Área 210 nm	Absorbancia mUA	TR min
Teobromina	1,44	227715	20069	3.783
Epigallocatequina	5	623559	43404	5.358
Catequina	7,5	1390859	80185	6.030
Cafeína	1,164	227520	10251	9.994
Epigallocatequina galato	7,5	1434421	28801	10.928
Epicatequina	12	2381807	67728	13.283
Epicatequina galato	14	2692452	22625	31.483

Fuente: Elaboración propia.



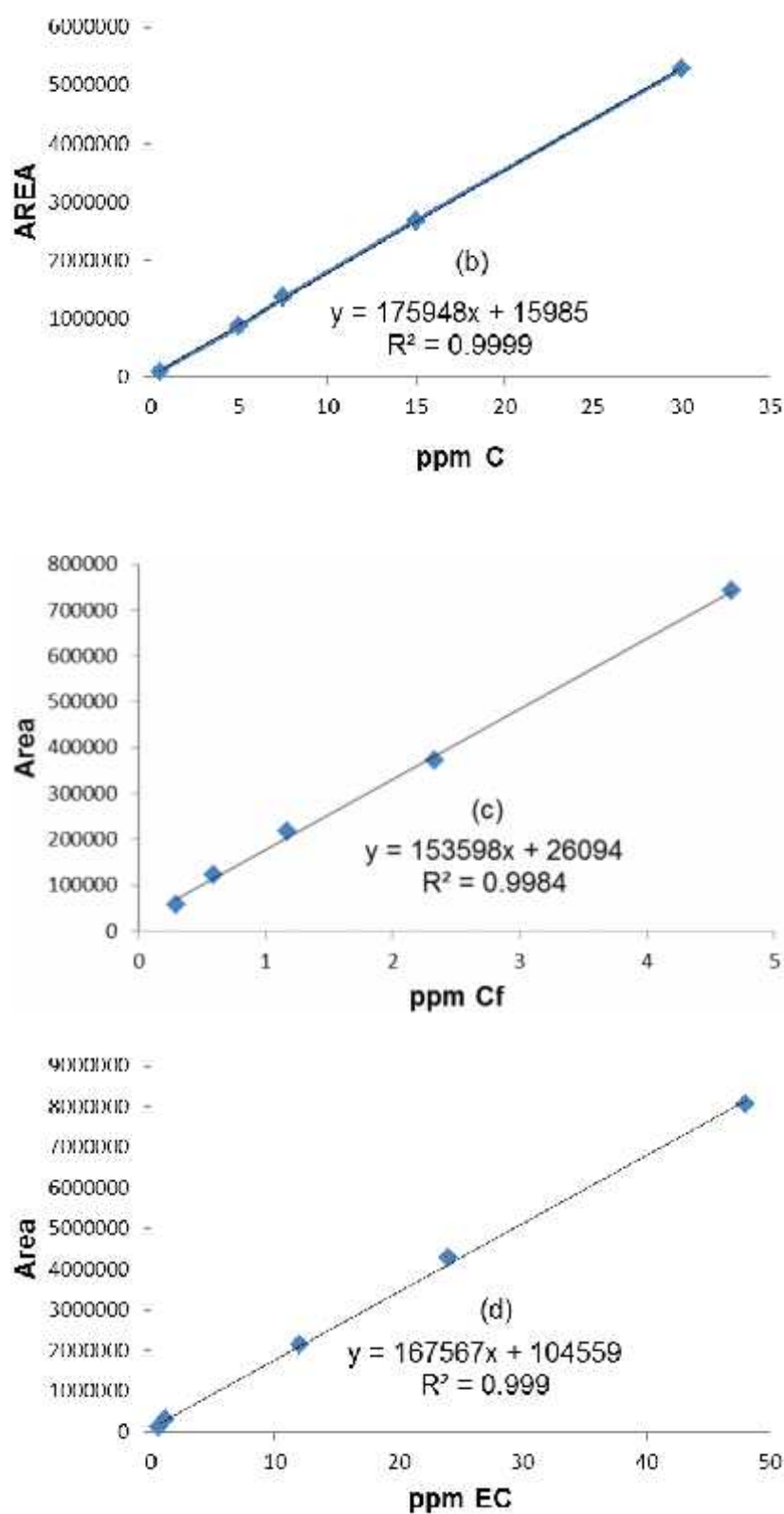


Figura 15: Curva estándar de teobromina (a), catequina (b), cafeína (c) y epicatequina (d).

RISNER. 2008, menciona que el instrumento de precisión es el responsable de la linealidad, límites de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), de los estándares usados en el trabajo así como las condiciones iniciales de fase móvil y del volumen (80:20), ácido acético al 0.1% y metanol.

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 R^2 variaron entre 0,9984 – 0.9999, indicando que existe una relación positiva muy fuerte o casi perfecta esto concuerda con lo mencionado en otras investigaciones (HERNÁNDEZ *et. al.*, 2010).

La línea del coeficiente de correlación (R^2), determina 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. Los valores del límite de cuantificación están entre la concentración de los estándares usados para el análisis de las muestras. De los 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 *et al.*, 2010; RISNER, 2008).

En la Figura 16, se observa los perfiles cromatográficos de los estándares, 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 cocoa (RISNER, 2008.), en esta figura se observan los siete estándares a diferentes concentraciones. Se aprecia que los tiempos de retención son diferentes para cada estándar (ver cuadro 5). Se trabajó un mix de

estos estándares, con 5 concentraciones para cada estándar y se realizó 3 repeticiones por cada concentración.

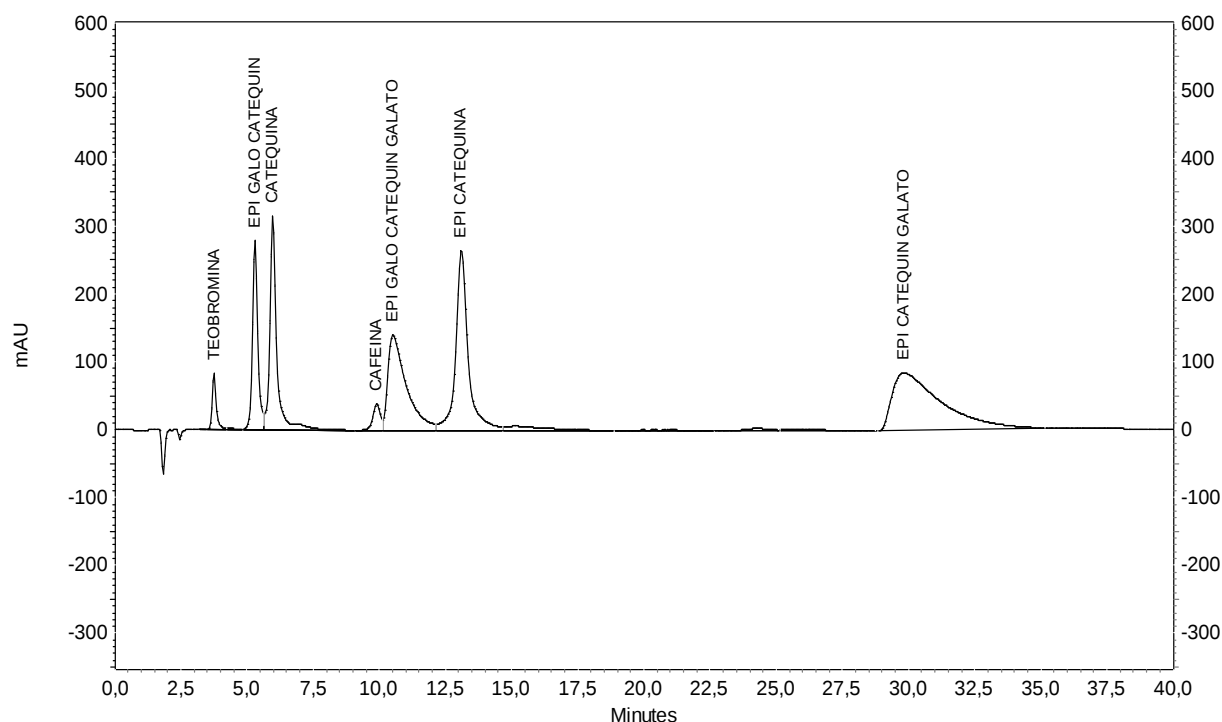


Figura 16: Perfil Cromatográfico de los estándares de teobromina, epigallocatequina, catequina, cafeína, epigallocatequina galato, epicatequina y epicatequina galato.

4.2.2. Variación del contenido de Teobromina, Cafeína, Catequina y Epicatequina.

- Teobromina

Según el análisis estadístico para los resultados de Tb (Anexo A-V a), se puede apreciar que existe diferencia estadística entre los granos frescos y el licor de cacao, puesto que el valor $P < 0,05$.

La prueba de Tukey (Anexo A-V b) aplicada al nivel zona – proceso, establece que los granos de cacao fresco presentaron mayor contenido de

teobromina variando estos contenidos entre 1,088 – 1,449 g Tb/100 g, destacando el contenido en los granos frescos de TM; El contenido de Tb es mayor a lo reportado por (RISNER, 2008), indicando que varía entre 0,8622 – 0,8909 g Tb / 100 g, variando las condiciones de extracción.

Así mismo se observa que no existió diferencia estadística entre las muestras fermentadas y el licor de cacao. Se conoce que durante la etapa de fermentación y licor, disminuye la teobromina (GIL, 2012), pero por otro lado, la calidad química mejora con la reducción de la concentración de los alcaloides y polifenoles, lo que influye en las características organolépticas del grano de cacao (RIVERA *et al.*, 2011, TROGNITZ *et al.*, 2013).

Durante la fermentación el contenido de teobromina para Tingo María, San Alejandro y Curimana se redujo en 21,33; 23,16 y 29 % respectivamente; al respecto se ha reportado que la teobromina se reduce en 20% durante la fermentación, disminuyendo el nivel de amargor de los granos, se conoce que el sabor amargo del cacao está influenciado en gran parte por el contenido de metilxantinas (Tb, Cf) 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 (PORTILLO. *et al.*, 2011; TROGNITZ *et al.*, 2013)

- Cafeína.

En el Cuadro 6 se muestran que los granos de cacao fresco presentaron mayor cantidad de Cf, variando estos contenidos entre $0,204 \pm 0,01$ – $0,410 \pm 0,03$ g Cf/100 g de cacao, destacando el contenido de Cf en los granos frescos; 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-VI a), demostró que existe diferencia estadística, influyendo en el contenido de Cf el nivel zona - proceso ($P < 0,05$). La prueba de tukey (Anexo A-VI b), aplicada al nivel zona - proceso, establece que no existe diferencia estadística entre las muestras fermentadas, secas y el licor, mientras que si existe diferencia estadística entre los granos frescos y el licor de cacao. Durante la fermentación el contenido de cafeína para Tingo María, San Alejandro y Curimana se redujo entre 40,24; 37,75 y 26 %, pérdida que excede a lo reportado de un 30% durante la fermentación (AMORES *et al.*, 2009).

WAKAO, 2002; menciona 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 fenólico. La reducción de las purinas causada por la fermentación, es similar en porcentaje para la teobromina y cafeína (AMORES *et. al.*, 2009). Se ha demostrado también, que las distintas variedades de cacao presentan diferencias en el contenido de cafeína y de teobromina. Se determinó que el contenido de metilxantinas (Tb y Cf), fue afectada por el nivel zona - proceso, destacando los granos frescos, de la zona de TM por su mayor contenido en Tb y Cf, estos contenidos disminuyeron durante la fermentación de los granos y el licor, variando entre $1,449 \pm 0,004$ hasta $1,140 \pm 0,010$ g Tb/100 g de grano de cacao y $0,410 \pm 0,03$ hasta $0,165 \pm 0,02$ g Cf/100 g de grano de cacao existiendo diferencia estadística entre los granos frescos, y el licor de cacao.

Cuadro 6. Contenido de teobromina (Tb) y cafeína (Cf) en grano fresco, fermentado (48, 96 y 120 horas), seco y licor de cacao, de Tingo María, San Alejandro y Curimaná, expresado en base seca¹.

Etapas Beneficio	g Tb/100 g de grano de cacao			g Cf/100 g de grano de cacao		
	TM	SA	CU	TM	SA	CU
Fresco	1,449 ± 0,004	1,088 ± 0,009	1,324 ± 0,074	0,410 ± 0,03	0,204 ± 0,01	0,350 ± 0,01
48	1,376 ± 0,029	1,047 ± 0,020	1,182 ± 0,020	0,317 ± 0,01	0,168 ± 0,01	0,312 ± 0,01
96	1,282 ± 0,003	1,002 ± 0,019	1,236 ± 0,081	0,277 ± 0,02	0,155± 0,00	0,182 ± 0,01
120	1,241 ± 0,011	0,952 ± 0,022	1,063 ± 0,043	0,210 ± 0,01	0,100 ± 0,00	0,139 ± 0,01
Seco	1,156 ± 0,005	0,885 ± 0,012	0,854 ± 0,011	0,200 ± 0,01	0,088 ± 0,00	0,087 ± 0,00
Licor	1,140 ± 0,010	0,836 ± 0,011	0,940 ± 0,106	0,165 ± 0,02	0,077 ± 0,00	0,091 ± 0,01

¹ Los valores representan el promedio ± SEM, n=3 inyecciones de HPLC. El volumen de cada inyección (20 µL). La cantidad de teobromina (Tb) y cafeína (Cf), esta expresada en g ÷ 100 g de granos de cacao fresco, fermentado (48, 96 y 120 horas), seco y licor.

- Catequina

En el Cuadro 7, se presentan los resultados del contenido de catequina (C), considerando el nivel zona - proceso. Los resultados fueron expresados en g de C / 100 g de grano de cacao. Los resultados demuestran que los granos de cacao fresco, presentaron mayor cantidad de C, variando estos contenidos entre $0,065 \pm 0,01$ y $0,020 \pm 0,0$ g C/100 g; los contenidos de C encontrados, son cercanos 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), siendo los resultados similares.

El análisis estadístico de los resultados de C (Anexo A-VII a), demostró que existe diferencia estadística ($P < 0,05$), influyendo en el contenido de C el nivel zona - proceso. La prueba de Tukey (Anexo A-VII b) aplicada al nivel zona - proceso, destaca que el grano de cacao fresco presentó mayor contenido de C y que no existió diferencia estadística entre las muestras fermentadas, secas y licor; mientras que si existió diferencia estadística entre los granos fresco y el licor de cacao.

Según HURST *et al.*, 2011; reportó una disminución del contenido de catequina desde $0,58 \pm 0,10$ mg/g en granos maduros, hasta $0,07 \pm 0,00$ mg/g en granos fermentados y secos

En trabajos de investigación realizados, la catequina presentó un comportamiento inesperado, debido a que a medida de que el contenido de epicatequina disminuyó, 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).

- Epicatequina

En el cuadro 7, se presentan los resultados del contenido de epicatequina (EC), considerando el nivel zona - proceso. Los resultados obtenidos nos muestran que existe diferencia estadística (Anexo A-VIII a), siendo la EC afectado por el nivel zona - proceso ($P < 0,05$). La prueba de tukey (Anexo A-VIII b), aplicada al nivel zona - proceso, demuestran que los contenidos de EC fueron mayores en las muestras de granos de cacao fresco, habiéndose cuantificado para TM, SA Y CU $1,855 \pm 0,20$; $1,291 \pm 0,01$ y $0,055 \pm 0,01$ g EC/100 g de grano de cacao respectivamente; siendo la muestra de SA, el que se aproxima al valor 1,27 g EC/100 g de muestra, reportado en un trabajo de investigación (GIL, 2012).

El análisis estadístico nos indica que no existe diferencia estadística del contenido de EC de los granos de cacao fermentado y seco,

En el Cuadro 7 se aprecia que el contenido de EC disminuyó durante la fermentación y el secado, alcanzando valores entre $0,022 \pm 0,01$ – $0,139 \pm 0,01$ g EC/100 g en licor de cacao, resultados que difieren, pero incluyen al contenido reportado de 0,184 g EC/100 g (RISNER, 2008); pero el valor de 0,377 g EC/100 g es casi igual al reportado en un trabajo similar (GIL, 2012).

Según GIL, 2012, menciona que la ocurrencia de reacciones de condensación es confirmada por la disminución drástica en el contenido de

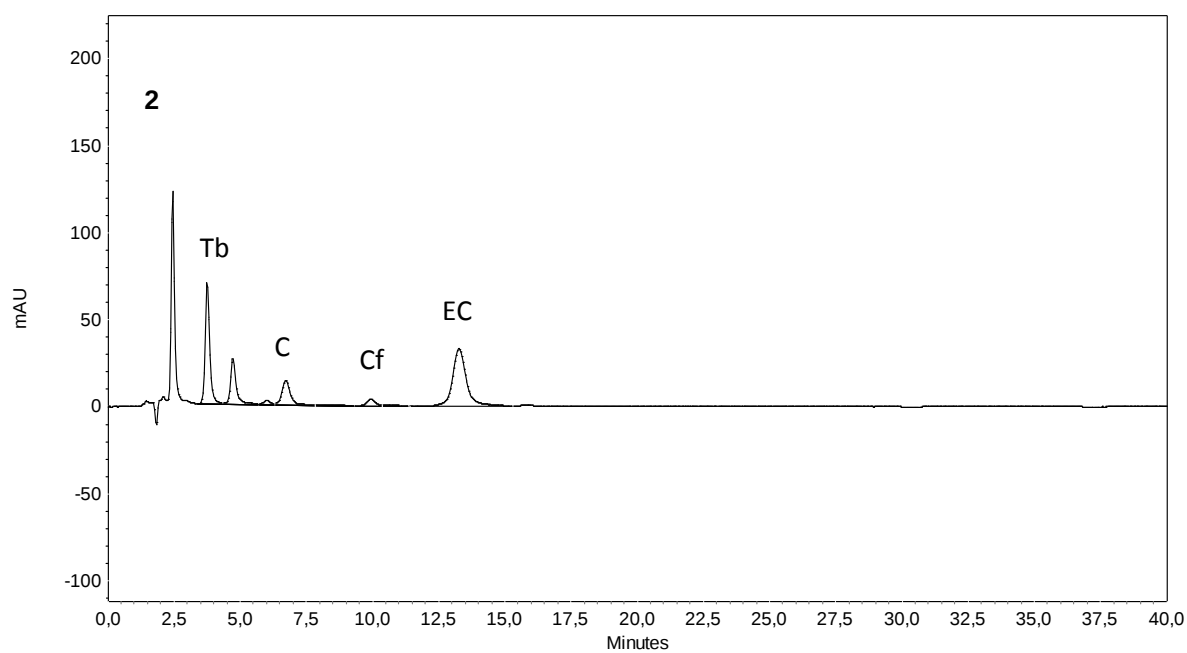
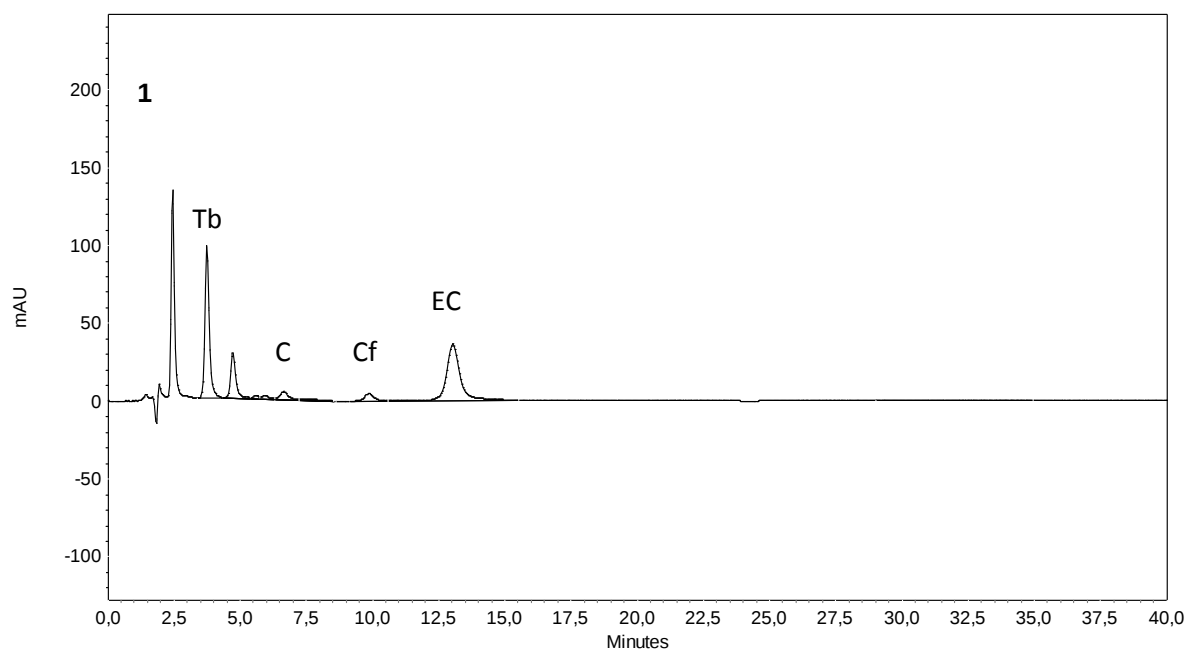
epicatequina durante el segundo y tercer día de la fermentación, lo que concuerda con los resultados como se aprecia en el cuadro 7, además menciona que el incremento de temperatura durante el secado en campo es un factor importante vinculado a la pérdida de polifenoles. En general, se ha encontrado que el contenido de polifenoles disminuye drásticamente hasta cerca de un 80% durante estas etapas del procesamiento, es necesario enfatizar que estos procesos de pre industrialización no están estandarizados a nivel mundial, generando alta variación en la concentración de catequinas de cacaos provenientes de diferentes procedencias.

Se determinó que el contenido de C y EC fueron afectados por el nivel zona - proceso, encontrándose la C y EC en mayor concentración en granos de cacao fresco, siendo el cacao de la zona de Tingo María, que tiene mayor contenido de estos compuestos; variando entre $0,065 \pm 0,01$ - $0,020 \pm 0,00$ g C/100 g de grano fresco y que este contenido disminuyo durante la fermentación, secado y licor alcanzando valores entre $0,001 \pm 0,0$ – $0,013 \pm 0,0$ g C/100 g de muestra de licor; mientras que la EC, vario entre $0,055 \pm 0,01$ – $1,855 \pm 0,20$ g EC/100 g de grano fresco y $0,022 \pm 0,01$ – $0,139 \pm 0,01$ g EC/100 g de licor y no existió diferencia estadística entre las muestras fermentadas y secas.

Cuadro 7. Contenido de catequina (C) y epicatequina (EC) en granos fresco, fermentado (48, 96 y 120 horas), seco y licor de cacao, de Tingo María, San Alejandro y Curimaná, expresado en base seca¹.

Etapas Beneficio	g C/ 100 g de grano de cacao			g EC/ 100 g de grano de cacao		
	TM	SA	CU	TM	SA	CU
Fresco	0,065 ± 0,01	0,020 ± 0,00	0,026 ± 0,00	1,855 ± 0,20	1,291 ± 0,01	0,055 ± 0,01
48	0,053 ± 0,01	0,007 ± 0,00	0,023 ± 0,00	1,180 ± 0,16	0,760 ± 0,04	0,041 ± 0,01
96	0,027 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,017 ± 0,00	0,931 ± 0,17	0,393 ± 0,08	0,043 ± 0,01
120	0,016 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,011 ± 0,00	0,496 ± 0,13	0,375 ± 0,05	0,029 ± 0,01
Seco	0,014 ± 0,00	0,002 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,504 ± 0,06	0,377 ± 0,05	0,033 ± 0,02
Licor	0,013 ± 0,00	0,001 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,139 ± 0,01	0,086 ± 0,01	0,022 ± 0,01

¹ Los valores representan el promedio ± SEM, n=3 inyecciones de HPLC. El volumen de cada inyección (20 µL). La cantidad de epicatequina (EC) y catequina (C), esta expresada en g ÷ 100 g de granos de cacao fresco, fermentado (48, 96 y 120 horas), seco y licor



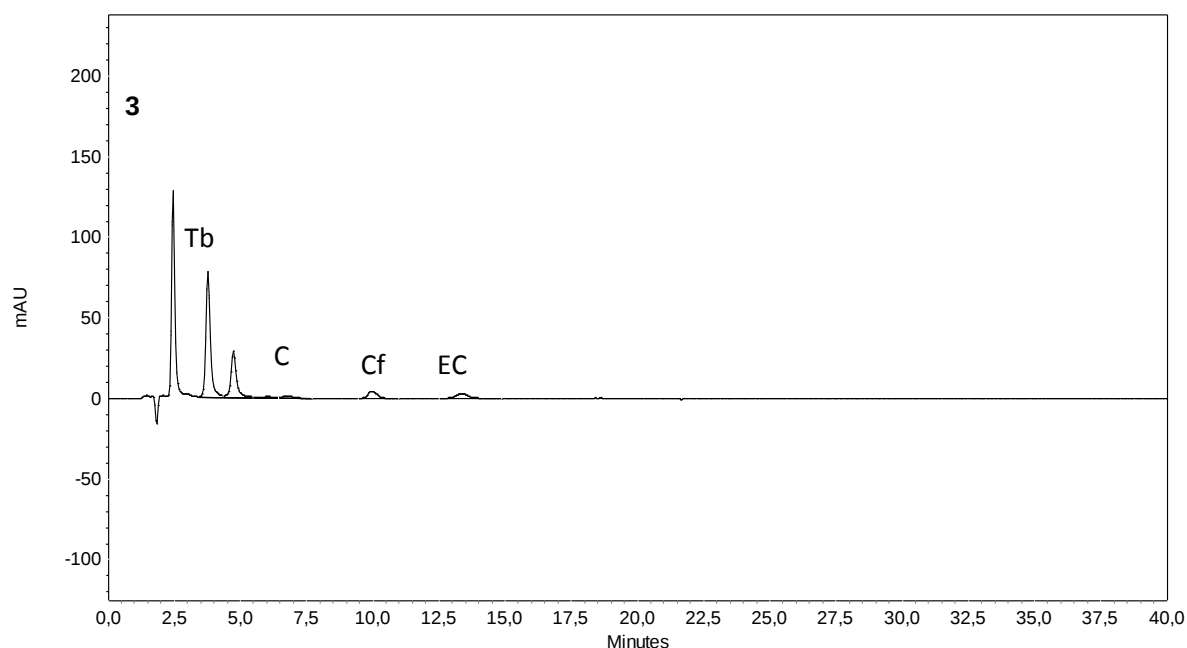


Figura 17: Cromatograma de muestra de cacao de Tingo María (1), San Alejandro (2) y Curimaná (3)

4.3. Evaluación sensorial del licor de cacao de las muestras seleccionadas.

La evaluación sensorial es una herramienta que nos permite evaluar, medir, analizar e interpretar la percepción de los atributos de un producto. Los atributos sensoriales son el conjunto de características de un alimento que conforman su percepción sensorial (textura, olor, color, flavor, etc). En diversas investigaciones mencionan, que la formación del sabor y del aroma en el cacao y en el chocolate específicamente están relacionadas con el genotipo de grano, las condiciones de cultivo y los factores de procesamiento del mismo. El genotipo influye tanto en la calidad del sabor como en la intensidad del chocolate probablemente determinando las cantidades de precursores y la actividad de las enzimas y, por lo tanto, las contribuciones a la

formación del aroma y del sabor. Como también los polifenoles y alcaloides, constituyen entre el 14% y el 20% del peso del grano y son el elemento central en el carácter del aroma y del sabor del cacao (GONZALES *et al.*, 2012).

En el cuadro 8, se muestran los resultados de la evaluación sensorial del licor de cacao de las 3 muestras seleccionadas de las zonas de TM, SA y CU; analizados mediante el método de Kruskal Wallis.

Cuadro 8. Resultados de los atributos sensoriales del licor de cacao de Tingo María, San Alejandro y Curimaná.

Atributos	TM	SA	CU
Cacao	2,5 ± 0,00	1,5 ± 0,00	1,3 ± 0,17
Acidez	0,8 ± 0,17	0,3 ± 0,17	0,0 ± 0,00
Astringencia	0,7 ± 0,17	0,7 ± 0,17	0,0 ± 0,00
Amargor	1,2 ± 0,44	0,7 ± 0,17	1,3 ± 0,17
Afrutado	1,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Floral	0,5 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Nueces	1,7 ± 0,44	0,7 ± 0,17	0,7 ± 0,17
Panela / Malta	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Crudo / Habas	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00

¹ Los valores representan el promedio ± SEM. (ANOVA DCA, n=3, Kruskal Wallis, p<0,05).

- Del atributo cacao:

La prueba de Kruskal Wallis para el atributo cacao del licor aplicando el diseño completo al azar (ver Anexo A-IX a); nos muestra que si

existe diferencia estadística ($p < 0,05$) entre las zonas de producción.

Del cuadro 8, el mayor valor del atributo a cacao fue de $2,5 \pm 0,00$ correspondiente a la muestra de TM y el menor valor fue de $1,3 \pm 0,17$ de la zona de CU. La calidad aromática de un chocolate está relacionada con el origen de las almendras, con la fermentación y secado y con el tostado. El aroma a chocolate se forma desde el momento en que ocurre la muerte del embrión, al tiempo que se producen la rápida destrucción de las antocianinas, proporcionándole a las almendras de cacao el sabor y aroma característico del chocolate (SÁNCHEZ, 2007).

DIAZ y PINOARGOTE. 2012; mencionan que a temperaturas elevadas de tostado, aumenta los atributos sensoriales a cacao, debido a que hay una elevada producción de pirazinas. Las pirazinas son importantes para el sabor a chocolate.

- Del atributo acidez:

La prueba de Kruskal Wallis para el atributo acidez del licor de cacao aplicando el diseño completo al azar (ver Anexo A-IX b); nos muestra que existe diferencia estadística significativa puesto que el valor $p < 0,05$ entre las zonas de producción.

Del cuadro 8, el mayor valor del atributo acidez fue de $0,8 \pm 0,17$ de la muestra de TM y el menor fue de $0,0 \pm 0,00$ correspondiente a CU.

Los granos de cacao contienen de forma natural, pequeñas cantidades de ácido cítrico (0,5% después de la fermentación y secado), que puede ser suficiente para proporcionar acidez (GONZALES *et al.*, 2012).

Por otro lado la calidad aromática de un chocolate está relacionada

con el origen de las almendras, con la fermentación, secado y tostado. El proceso de secado debe hacerse en forma lenta y gradual, empezando por pocas horas de exposición al sol durante los primeros días y aumentar progresivamente hasta la plena exposición en los últimos días. Con el secado violento, no se logra un secado uniforme a la vez se endurece rápidamente la testa o cascarilla la cual una vez seca impide la salida o difusión de los ácidos volátiles que se concentran en la almendra generando almendras ácidas (SÁNCHEZ, 2007).

PORTILLO *et al.*, 2006. Indican que la acidez se incrementa durante la fermentación, ya que se produce ácido acético que se infiltra en los cotiledones, produciéndose una serie de reacciones que generan el sabor y el aroma característico del cacao. Mientras que ROHSIUS *et al.*, 2006; señala que el sabor final del cacao está influenciado directamente por el proceso de acidificación durante la fermentación.

- Del atributo astringencia:

La prueba de Kruskal Wallis para el atributo astringencia del licor de cacao aplicando el diseño completo al azar (ver Anexo A-IX c); nos muestra que existe diferencia estadística significativa puesto que el valor $p < 0,05$ entre las zonas de producción.

Del cuadro 8, el mayor valor del atributo astringencia fue de $0,7 \pm 0,17$ de las zonas de TM y SA, siendo el de menor valor de $0,0 \pm 0,00$ correspondiente a la zona de CU.

Según PORTILLO *et al.*, 2006, indican que el grado de astringencia del cacao, está determinado por los componentes polifenólicos del

grano.

Según SÁNCHEZ, 2007; menciona que el mal secado de las almendras después de la fermentación, interrumpe la hidrólisis enzimática de las antocianinas generando almendras púrpuras que le confieren un sabor astringente, a la vez se endurece rápidamente la testa o cascarilla la cual una vez seca impide la salida o difusión de los ácidos volátiles que se concentran en la almendra generando almendras ácidas.

La catequina es un componente de los taninos del cacao, y es el compuesto responsable de su color y astringencia (ZURIDAY. 2007)

Según ÁLVAREZ *et al.*, 2010, mencionan que a mayor tiempo de fermentado, menor es el valor de la astringencia. Al respecto mencionan que durante la fermentación se producen reacciones bioquímicas que causan una disminución del amargor y de la astringencia, dando origen a los precursores del aroma y sabor a chocolate.

Se encontraron valores de $0,7 \pm 0,17$ astringencia en los licores de cacao de la zona de TM y SA en comparación a la zona de CU. El cual indica que los factores ambientales influyen en los atributos como en la astringencia de los licores de cacao. Sostienen que el sabor, determinado por el gusto y el aroma, refleja los efectos combinados del genotipo, de los factores edafoclimáticas, del manejo agronómico y de la tecnología post cosecha utilizada (GARCÍA, 2008).

- Del atributo amargor:

La prueba de Kruskal Wallis para el atributo amargor del licor de cacao aplicando el diseño completo al azar (ver Anexo A-IX d); nos muestra

que no existe diferencia estadística significativa puesto que el valor $p > 0,05$ entre las zonas de producción.

Del cuadro 8, el mayor valor del atributo amargor fue de $1,3 \pm 0,17$ correspondiente a CU, siendo el menor valor de $0,7 \pm 0,17$ perteneciente a SA.

Según ÁLVAREZ *et al.*, 2010, mencionan que durante la fermentación se producen reacciones bioquímicas que causan disminución del amargor y de la astringencia, dando origen a los precursores del aroma y sabor a chocolate. Coincidiendo con lo mencionado por RAMOS. 2004, que indica que el atributo amargor disminuye conforme avanza el tiempo de fermentado, debido a la pérdida de teobromina. El sabor amargo está determinado por las purinas, como son la cafeína y la teobromina (PORTILLO *et al.*, 2006).

Según SÁNCHEZ. 2007, menciona que se han realizado numerosas investigaciones lo cual ha determinado la importancia de los compuestos involucrados en la formación del aroma del cacao y por ende el desarrollo de los precursores del sabor a chocolate. En ese sentido; los compuestos volátiles como las pirazinas y los aldehídos representan un sabor básico, los esteres que originan un sabor a fruta. Así mismo el grado de astringencia del chocolate, está determinado por los compuestos polifenólicos y el amargor por las purinas (cafeína y teobromina).

Los alcaloides no sufren transformaciones químicas durante la fermentación, sin embargo se elimina cerca del 30% de su contenido por difusión y migración hacia el exterior del grano. Lo cual produce una reducción del gusto amargo de los granos de cacao fermentado (RODRIGUEZ. 2011).

- Del atributo afrutado:

La prueba de Kruskal Wallis para el atributo afrutado del licor de cacao aplicando el diseño completo al azar (ver Anexo A-IX e); nos indica que existe diferencia estadística significativa puesto que el valor $p < 0,05$ entre las zonas de producción.

Del cuadro 8, el mayor valor del atributo afrutado se obtuvo de la zona de TM con un valor de $1,0 \pm 0,0$, siendo el de menor valor de $0,0 \pm 0,0$ correspondiente a las zonas de SA y CU.

GONZALES *et al.*, 2012, señalan que el aroma a frutas y flores pueden venir en forma de alcoholes superiores, producidos por las levaduras durante la fermentación. Las levaduras provocan un potenciamiento del 2-fenil acetato, que pertenece al grupo de los ésteres y está relacionado al aroma floral (SÁNCHEZ, 2007).

- Del atributo floral:

La prueba de Kruskal Wallis para el atributo floral del licor de cacao aplicando el diseño completo al azar (ver Anexo A-IX f); nos indica que existe diferencia estadística significativa puesto que el valor $p < 0,05$ entre las zonas de producción.

Del cuadro 8, el mayor valor del atributo floral se obtuvo de la zona de TM con un valor de $0,5 \pm 0,0$, siendo el de menor valor de $0,0 \pm 0,0$ correspondiente a SA y CU.

PORTILLO *et al.*, 2009, mencionan que las pirazinas son los compuestos predominantes (el 20 % del número de compuestos identificado en el aroma), seguidos por los ésteres (13 %), hidrocarburos (13 %) y los ácidos

(11 %); así mismo señala que el linalol es un compuesto clave que permite la clasificación de los cacaos en función de su origen. El elevado contenido de linalol, contribuye con la calidad aromática, orígenes de cacaos y sería responsable de sus notas florales.

GONZALES *et al.*, 2012, mencionan que el aroma a frutas y flores puede venir en forma de alcoholes superiores, producido durante la fermentación; así mismo señala que las pirazinas y los aldehídos representan un sabor básico y que las levaduras provocan un potencionamiento del 2-fenil acetato, que pertenece al grupo de los esterres que originan sabores a frutas y flores (SÁNCHEZ, 2007).

- Del atributo nueces:

La prueba de Kruskal Wallis para el atributo a nuez del licor de cacao aplicando el diseño completo al azar (ver Anexo A-IX g); nos indica que no existe diferencia estadística significativa puesto que el valor $p > 0,05$ entre las zonas de producción.

Del cuadro 8, el mayor valor del atributo a nuez se obtuvo de la zona de TM con un valor de $1,7 \pm 0,44$, siendo el de menor valor de $0,7 \pm 0,17$ correspondiente a las zonas de SA y CU.

SÁNCHEZ. 2007, indica que la genética del grupo de los cacaos criollos tiende a producir un bajo sabor a cacao pero favorece un alto nivel de notas de sabor a nuez.

SALVADOR, 2010 y SÁNCHEZ, 2007; mencionan que el complejo polipéptidosfenoles y pirazinas, intervienen en el sabor a dulce y nuez; así mismo menciona que el sabor a nuez es característico de los cacaos criollos y

trinitarios.

En las figuras 18, 19 y 20 se muestran las gráficas del perfil sensorial del licor de cacao de las zonas de Tingo María, San Alejandro y Curimana respectivamente.

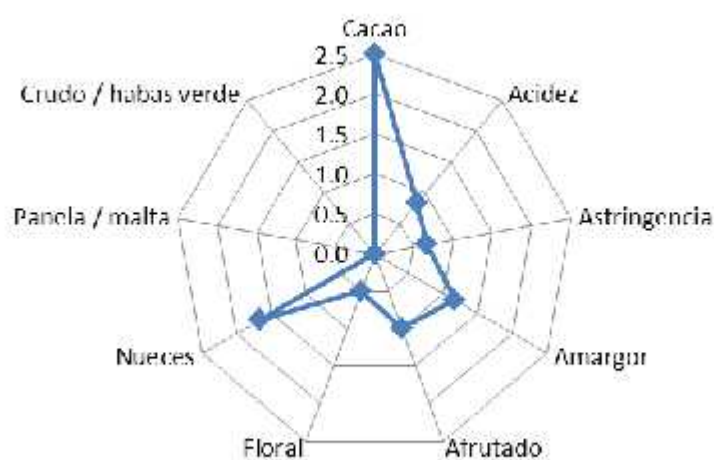


Figura 18. Perfil sensorial del licor de cacao de Tingo María.



Figura 19. Perfil sensorial del licor de cacao de San Alejandro.

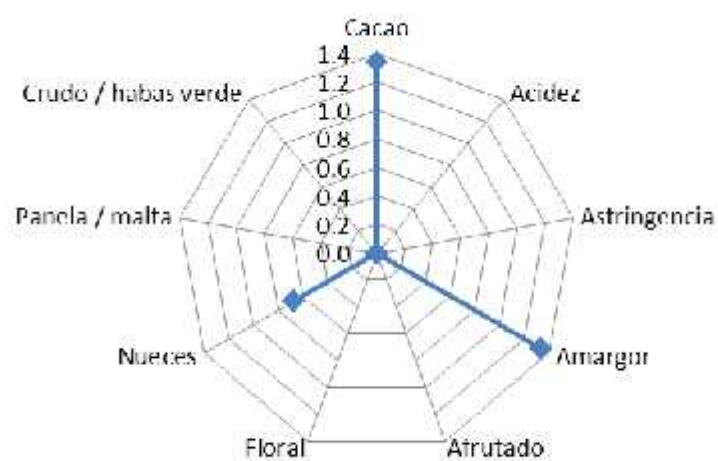


Figura 20. Perfil sensorial del licor de cacao de Curimana.

V. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación dieron lugar a la conclusión siguiente:

1. Se cuantifico por HPLC el contenido de teobromina y cafeína y se determinó el índice de Tb/Cf Vs Cf: el cual permitió seleccionar las mejores muestras de la zona de Tingo María, San Alejandro y Curimaná. El análisis estadístico ($P \leq 0.05$), estableció que el contenido de Teobromina y Cafeína en el grano fresco, fue afectado por la zona de producción, encontrándose la teobromina entre $5,735 \pm 0,09 - 7,606 \pm 0,043$ g Tb/100 g de grano de cacao y $1,208 \pm 0,018 - 2,083 \pm 0,025$ g Cf/100 g de grano de cacao y encontrándose los índices de teobromina y cafeína entre $3,10 \pm 0,053 - 6,30 \pm 0,057$.
2. El nivel zona – proceso, afectó el contenido de Teobromina y Cafeína, los cuales disminuyeron durante la fermentación y el secado de los granos, llegando a un contenido entre $0,854 \pm 0,011 - 1,156 \pm 0,005$ g Tb/ g de grano seco y $0,87 \pm 0,00 - 0,200 \pm 0,01$ g Cf / g de grano seco. Se cuantifico por HPLC los contenidos de catequina (C) y epicatequina (EC). El análisis estadístico determinó que el contenido de C y EC fue afectado por el nivel zona - proceso, encontrándose la C y EC en mayor concentración en granos de cacao fresco, presentando el cacao de

Tingo María el mayor contenido de estos compuestos; variando entre $0,065 \pm 0,01$ - $0,020 \pm 0,00$ g C/100 g de grano y $1,855 \pm 0,20$ – $0,055 \pm 0,01$ g EC/100 g de grano

El contenido de C y EC disminuyo durante la fermentación, secado y licor, alcanzando valores entre $0,001 \pm 0,0$ – $0,013 \pm 0,0$ g C/100 g de licor; mientras que la EC, vario entre $0,022 \pm 0,01$ – $0,139 \pm 0,01$ g EC/100 g de licor y no existió diferencia estadística entre las muestras fermentadas y secas.

3. La evaluación sensorial realizado a los licores de cacaos seleccionados de Tingo María, San Alejandro y Curimaná, según el análisis estadístico ($P \leq 0,05$), nos indica que existe diferencia estadística para los atributos, acidez, astringencia, sabor a cacao, frutas y flores; mientras que no se encontró diferencia estadística en cuanto los atributos amargor y sabor a nuez.

VI. RECOMENDACIONES

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

1. Investigar en los granos de cacao el compuesto linalol, ya que este compuesto es clave en la clasificación de los cacaos en función de su origen. Este contenido de linalol, contribuye con la calidad aromática en los cacaos de origen y sería responsable de sus notas florales.

2. Investigar la variación de la capacidad antioxidante de los granos de cacao durante la fermentación a diferentes horas, en grano seco y el licor de cacao, considerando diversos tiempos en el proceso de remoción de las almendras.

VII. ABSTRACT

Using HPLC the methylxanthine and catechin content of fresh, fermented, and dry beans as well as cacao liquor from three zones: the region of Huánuco (Tingo Maria), Ucayali (San Alejandro) and Curimana (South of Peru), were quantified. It was determined ($p \leq 0.05$) that the content of theobromine (Tb) and caffeine (Cf) in the fresh beans is affected by the production zone ($5.735 \pm 0.09 - 7.606 \pm 0.043$ g Tb/100 g of beans and $1.208 \pm 0.018 - 2.083 \pm 0.025$ g Cf/100 g of beans), with the theobromine and caffeine indices ranging from $3.10 \pm 0.053 - 6.30 \pm 0.057$. The zone level – process affect the theobromine and caffeine content as they diminish during the fermentation and drying of the beans ($0.854 \pm 0.011 - 1.156 \pm 0.005$ g Tb/ g of dry beans and $0.87 \pm 0.00 - 0.200 \pm 0.01$ g Cf/g of dry beans respectively). The catechin (C) and epicatechin (EC) content are affected by the zone level – process with the fresh beans from the Tingo Maria zone having the greatest concentrations ($0.065 \pm 0.01 - 0.020 \pm 0.00$ g C/100 g of beans and $1.855 \pm 0.20 - 0.055 \pm 0.01$ g EC/100 g of beans). The content of C and EC diminish during fermentation, drying and in the liquor; reaching levels of $0.001 \pm 0.0 - 0.013 \pm 0.0$ g C/100 g of liquor. Meanwhile, the EC ranged from $0.022 \pm 0.01 - 0.139 \pm 0.01$ g EC/100 g of liquor and no statistical difference between the fermented and dry samples existed. A statistical difference ($p \leq 0.05$) does exist with regards to the attributes of acidity, astringency, and fruit and floral flavors of cacao but there is

no statistical difference in the attributes of bitterness and the nut flavor in the selected beans.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- ÁLVAREZ, C.; TOVAR, L.; GARCÍA, H.; MORILLO, F.; SÁNCHEZ, P.; GIRÓN, C y DE FARIAS, A. 2010. Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) usando dos tipos de fermentadores. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Miranda). Revista Científica UDO Agrícola 10.
- 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.
- ASOCIACIÓN PERUANA DE PRODUCTORES DE CACAO 2012. Manual de control de calidad del cacao. APPCACAO 1^{ra} edición. Impreso Lima – Perú. 50 p.
- ASHIHARA, H. KATO, M. CROZIER, A. 2011. Distribution, Biosynthesis and Catabolism of Methylxanthines in Plants. Handbook of Experimental Pharmacology 200 Pág. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- ATOMSSA y GHOLAP. 2014. Characterization and determination of catechins in green tea leaves using UV – visible spectrometer. Journals of engineering and technology. Vol 7. Enero2015.
- BERLANGA SILVENTE, V. y RUBIO HURTADO, M. J. (2012) Clasificación de pruebas no paramétricas. Cómo aplicarlas en SPSS. REIRE, Revista d'Innovació i Recerca en Educació, Vol. 5, núm. 2, 101-113.
- BORBOR, F. y VERA, M. 2007. Manual del cultivo de cacao para productores. Unidad ejecutora del programa Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones CORPEI, y Co – ejecutor Asociación Nacional de Exportadores de cacao ANECACAO. Guayaquil – EC. 47 p.
- CALA, M; VÁSQUEZ, A; GARCÍA, A; MARTÍNEZ, J. y STASHENKO, E. 2011. Estudio comparativo por electroforesis Capilar y cromatografía líquida de alta Eficiencia de catequinas extraídas de Cinco variedades de cacao colombiano. Revista académica colombiana ciencia. Volumen XXXV.
- CALDERÓN, L. 2002. Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción Nacional durante la fermentación en relación con la calidad. Tesis Lic. en Química, Quito Ecuador, Pontificia Universidad Católica. 144 p.
- 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%Cescxs1415.pdf>, documento, 18 Oct. 2010).

- CÓRDOVA, Z. 2 003. Estadística descriptiva e inferencial. Aplicaciones. Quinta edición. Edit. Librería Moshera S.R.L. Lima – Perú. 87 p.
- CUELLAR, G. 2010. Obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana. Tesis para optar el título como Tecnólogo Químico. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnologías Escuela de química Pereira. Colombia.
- DAZA P. J.F. 2006. Estadística aplicada con Microsoft Excel. Ed. Megabyte S.A.C. Lima, Perú. p.p. 485 – 516.
- DAVRIEUX, F. S. ASSEMAT, R. BOULANGER AND E. CROS. 2004. Determination of cocoa purine content by near infrared spectroscopy. XIV international conference of investigation of the cocoa, Ghana, Poster Presentation.
- DÍAZ, S. y PINOARGOTE, M. 2012. Análisis de las Características Organolépticas del Chocolate a partir de Cacao CCN51 Tratado Enzimáticamente y Tostado a Diferentes Temperaturas."Guayaquil – Ecuador.
- GARCIA, L. 2008. Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú. Proyecto de Cooperación UE –PERÚ, en materia de asistencia técnica relativa al comercio.
- GIL Q. J. A. 2012. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Tesis de postgrado, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 119 p.

- GONZALES, M.; PEREZ, S.; PALOMINO, C. 2012. Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. Vol 13 - Nº 4. Venezuela. 18 p.
- HERNANDEZ, A. 2010. Tecnología de cacao. Universidad Nacional Agraria y a Distancia. 170 p.
- 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, 2004. Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonia peruana "cacao". Instituto de cultivos tropicales. Tarapoto, Perú. 184 p.
- JIMENEZ. 2003. Prácticas del Beneficio del Cacao y su Calidad Organoléptica, 12 p. Mimeografiado.
- LOAYZA, L. W. 2014. Influencia de la frecuencia de remoción, durante la fermentación, en la calidad sensorial del cacao (*Theobroma Cacao, L.*) de Satipo. Tesis para optar el título profesional de químico de la Universidad Nacional Mayor de san Marcos. Facultad de Química e Ingeniería Química. 22 – 23 pp
- 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.

- LÓPEZ B. E.A. 2008. Diseño y análisis de experimentos, fundamentos y aplicaciones en agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 176 p.
- NAVIA, O. y PAZMIÑO, P. 2012. Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación. Tesis de grado para optar el título de Ingeniero de Alimentos. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil – Ecuador. 100 p.
- NAZARUDDIN, R. AYUB, M. MAMOT, S. y HENG, C. 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
- PALACIOS, C. 2008. Establecimientos de parámetros (físicos, químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao (*theobroma cacao l.*) producido en dos zonas identificadas al norte y sur del litoral ecuatoriano. Tesis optar el título de Ingeniero Agrónomo. Ecuador.
- PORTILLO, E.; GRAZIANI DE FARINAS, L.; CROS, E. 2006. Efecto de algunos factores post-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao L.*). Universidad de Zulia – Venezuela. 9 p.
- PORTILLO, E; LABARCA, M; GRAZZIANI, L; CROS, E; ASSEMAT, S; DAVRIEUX, F; BOULANGER, R. y MARCANO, M. 2009. Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao L.*) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. Revista UDO Agrícola 9 (2): 458-468.

- PORTILLO, E.; LABARCA, M.; GRAZZIANI, L.; CROS, E.; ASSEMAT, S.; DAVRIEUX, F.; BOULAGER, R. 2011. Influencia de las condiciones del tratamiento poscosecha sobre la temperatura y acidez en granos de cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.). Universidad de Zulia – Venezuela. 15 p.
- RAMOS, G. 2004. La fermentación, el secado y almacenamiento del Cacao. In taller internacional de calidad integral de cacao teoría y práctica. Quevedo – Ecuador.
- 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
- ROHSIUS C.; ANDERSON M.; NIEMENAK N.; SUKHA D.; LIEBEREI R. 2006. Calidad de la fermentación y su dependencia en la estructura de la testa y en procesos de transporte. 15^e conferencia internacional sobre investigaciones del cacao.
- SALVADOR, N. 2010. Mapeo de la calidad física y organoléptica del *Theobroma cacao* L. a nivel subcuenca del río bigote como estrategia para la inserción y posicionamiento en nichos de mercado de la asociación de

pequeños productores de cacao de Piura. Consultoría origen del cacao de Piura. Primer informe.

SÁNCHEZ, V.; 2007. Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. Universidad Técnica Estatal De Quevedo. Ecuador. 93 p.

SULLCA, B. 1992. Tecnificación del cacao en la selva peruana. Fundeagro. Lima – Perú. 140-142p.

TORRES, M. 2012. Influencia de las características y procesamiento del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro.

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

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.

ZAMBRANO, A. ROMERO, C. GOMEZ, A. 2010. Evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao criollo merideño durante la

fermentación en dos condiciones edafoclimáticas. Venezuela. Trop. 60(2): 211-219. 2010

ZURIDAY, Y. 2007. Extracción de manteca a partir de las semillas del cacao (*theobroma cacao* L.) utilizando dióxido de carbono en condiciones supercríticas como solvente. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Tesis optar el título de Ingeniero Químico. Caracas.

IX. ANEXOS

A-I a. Datos para obtener la curva estándar de teobromina.

Concentración (μM)	Área ¹ 210 nm	Absorbancia (mUA)	Tiempo de retención (min)
1.5	82,972 $\pm$ 785	7,686 $\pm$ 446.03	3.080
3	125,112 $\pm$ 7,785	10,045 $\pm$ 59.57	3.083
4	190,694 $\pm$ 1,912	16,505 $\pm$ 131.94	3.085
12	356,804 $\pm$ 10,396	31,491 $\pm$ 651.25	3.079
18	512,370 $\pm$ 3,593	46,678 $\pm$ 350.13	3.073
24	717,145 $\pm$ 1,919	66,083 $\pm$ 261.96	3.068
36	1,106,311 $\pm$ 4,879	102,570 $\pm$ 547.62	3.069

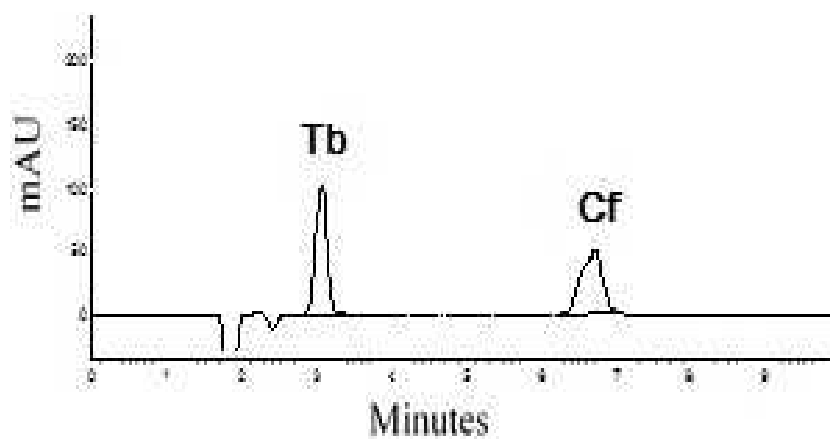
¹Indica los valores representativos del área promedio $\pm$ SEM debajo de la curva (picos HPLC), las absorbancias $\pm$ SEM de 3 repeticiones por cada concentración de teobromina (Tb), realizada en el sistema HPLC en fase reversa.

A-I b. Datos para obtener la curva estándar de cafeína.

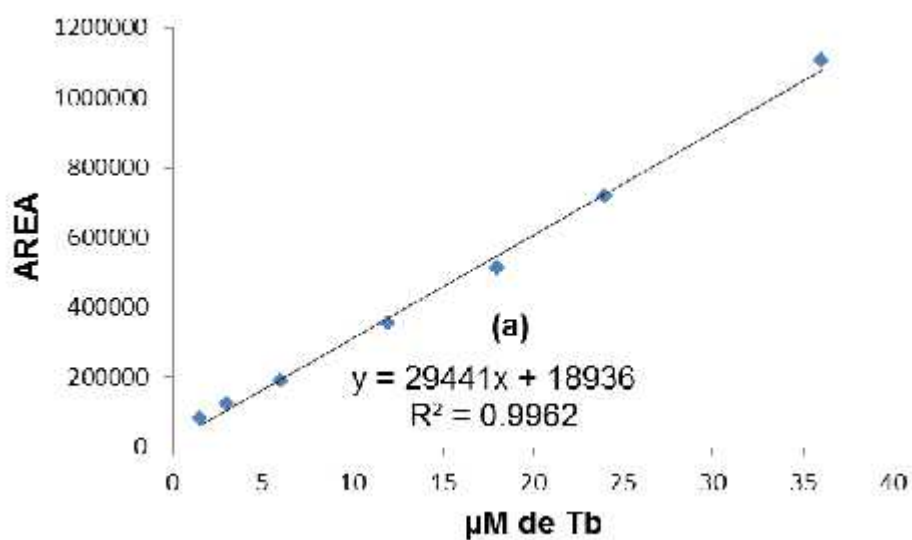
Concentración (μM)	Área ¹ 210 nm	Absorbancia (mUA)	Tiempo de retención (min)
0.75	45,535 $\pm$ 3,653	17,279 $\pm$ 308.31	6.785
1.5	47,605 $\pm$ 2,964	19,694 $\pm$ 37.53	6.789
3	129,212 $\pm$ 2,649	23,167 $\pm$ 86.03	6.791
6	191,938 $\pm$ 1,711	27,384 $\pm$ 282.32	6.776
12	369,870 $\pm$ 2,479	33,533 $\pm$ 210.73	6.732
18	631,317 $\pm$ 2,733	41,035 $\pm$ 107.39	6.713
30	1,014,464 $\pm$ 4,044	50,637 $\pm$ 252.88	6.708

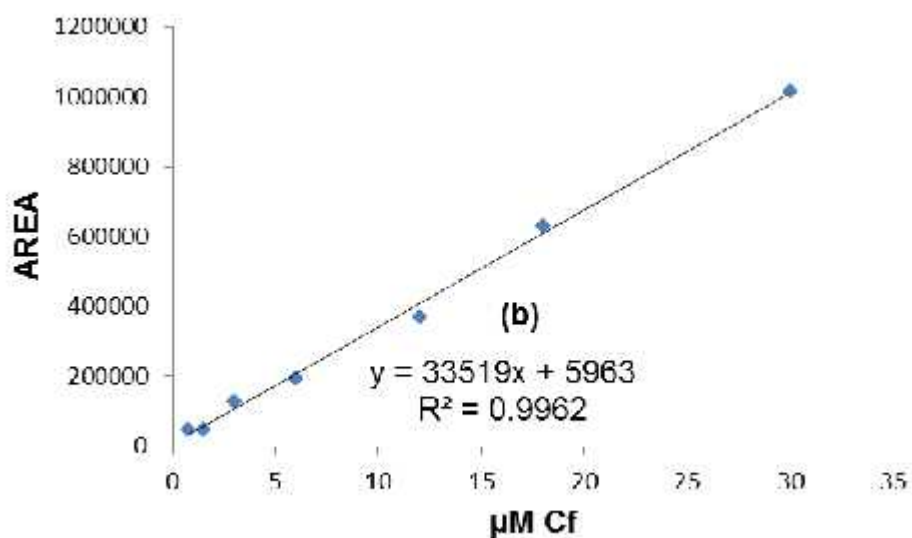
¹Indica los valores representativos del área promedio $\pm$ SEM debajo de la curva (picos HPLC), las absorbancias $\pm$ SEM de 3 repeticiones por cada concentración de teobromina (Cf), realizada en el sistema HPLC en fase reversa.

A-I c. Perfil cromatográfico de los estándares de teobromina (Tb) y cafeína (Cf)



A-I d. Curva estándar de teobromina (a) y cafeína (b).





A-II a. Datos para obtener la curva estándar de teobromina.

Concentración (ppm)	Área 210 nm	Absorbancia (mUA)	Tiempo de retención (min)
0,36	64,576 ± 2,265	5,509 ± 64	3.757
0,72	120,658 ± 4,729	10,560 ± 66	3.764
1,44	227,715 ± 4,605	20,069 ± 486	3.783
2,88	438,502 ± 9,44	39,285 ± 204	3.712
5,76	906,406 ± 16,427	82,372 ± 259	3.765

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

A-II b. Datos de la curva estándar de catequina.

Concentración	Área¹	Absorbancia	Tiempo de
(ppm)	210 nm	(mUA)	retención (min)
0.5	136,319 ± 11,768	6,106 ± 220	5.962
5	882,838 ± 8,817	52,742 ± 143	5.982
7,5	1,390,859 ± 24,211	80,185 ± 2,143	6.030
15	2,676,686 ± 15,195	147,015 ± 735	5.856
30	5,643,445 ± 34,221	314,622 ± 884	5.987

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

A-II c. Datos de la curva estándar de cafeína

Concentración	Área	Absorbancia	Tiempo de
(ppm)	210 nm	(mUA)	retención (min)
0.291	72,259 ± 12,178	2,612 ± 132	9.871
0.582	148,010 ± 12,069	5,589 ± 72	9.903
1.164	227,520 ± 1,318	10,251 ± 269	9.994
2.328	552,334 ± 7,068	20,008 ± 469	9.690
4.656	766,694 ± 1,780	38,189 ± 178	9.907

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

A-II d, Datos de la curva estándar de epicatequina.

Concentración (ppm)	Área 210 nm	Absorbancia (mUA)	Tiempo de retención (min)
0.6	177,892 ± 20,301	4,005 ± 62	13.063
1.2	380,445 ± 41,888	8,646 ± 178	13.121
12	2,381,807 ± 87,919	67,728 ± 2.226	13.283
24	4,520,896 ± 40,314	123,812 ± 547	12.776
48	8,590,930 ± 29,054	263,186 ± 852	13.107

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

A-III a. Análisis de varianza de los contenidos de teobromina (g Tb/100 g muestra) en granos de cacao fresco, considerando el factor zona de producción.

FV	GL	SC	CM	Razón F	P valor
Entre grupos	129	853,7	6,61783	21,13	0,0000
Intra grupos	260	81,4321	0,313201		
Total	389	935,132			

A-III b. Resultado del contenido de Tb del grano de cacao fresco de Tingo María, San Alejandro y Curimana.

N	Codigo	R1	R2	R3	MEDIA $\pm$ SEM
1	RCL1	7,6937	7,7129	7,4937	7,633 $\pm$ 0,07
2	EC2	9,3508	10,1771	8,7343	9,421 $\pm$ 0,42
3	LR2	8,9986	8,6874	9,6547	9,114 $\pm$ 0,29
4	JM1	7,4289	6,8832	7,1887	7,167 $\pm$ 0,16
5	RLJ2	8,6257	8,3640	9,2994	8,763 $\pm$ 0,28
6	FV1	7,7276	8,5788	8,9375	8,415 $\pm$ 0,36
7	CS1	7,5429	8,0049	7,8531	7,800 $\pm$ 0,14
8	RH1	8,7368	8,1476	8,2705	8,385 $\pm$ 0,18
9	FT1	9,4527	9,5145	9,1930	9,387 $\pm$ 0,10
10	LP2	7,4002	7,2750	7,0115	7,229 $\pm$ 0,11
11	EC3	7,8022	7,9931	7,8867	7,894 $\pm$ 0,06
12	BSV1	9,1385	8,6319	7,3868	8,386 $\pm$ 0,52
13	WA1	10,4560	10,3132	9,5875	10,119 $\pm$ 0,27
14	WA2	9,9814	8,3994	8,8620	9,081 $\pm$ 0,47
15	JC0	6,5557	6,9004	6,9769	6,811 $\pm$ 0,13
16	MA1	9,3768	8,4650	7,5738	8,472 $\pm$ 0,52
17	AP1	6,6192	9,3572	9,8981	8,625 $\pm$ 1,02
18	AP3	5,1999	6,1113	6,5855	5,966 $\pm$ 0,41
19	SS1	10,0703	10,7069	10,2210	10,333 $\pm$ 0,19
20	EH1	7,8167	8,1361	8,9294	8,294 $\pm$ 0,33
21	MC2	17,1473	10,6923	10,4616	12,767 $\pm$ 2,19
22	TN1	8,9164	8,4503	9,0668	8,811 $\pm$ 0,19

23	3N	8,4148	9,0301	9,0959	8,847 ± 0,22
24	7N	10,4299	10,4475	9,8839	10,254 ± 0,19
25	SS4	8,5764	8,5858	8,6305	8,598 ± 0,02
26	AH1	5,9961	6,7304	6,4134	6,380 ± 0,21
27	PC1	4,9583	4,8647	4,8867	4,903 ± 0,03
28	VBV2	9,7453	10,1450	9,9932	9,961 ± 0,12
29	FM1	8,3247	8,9185	8,5250	8,589 ± 0,17
30	FM3	9,9869	9,9130	10,0448	9,982 ± 0,04
31	OC1	6,3023	6,4553	5,8270	6,195 ± 0,19
32	OC2	8,1477	8,1159	8,0226	8,095 ± 0,04
33	ZC1	7,4807	7,7466	7,2320	7,486 ± 0,15
34	CSN2	8,0878	9,4300	9,4201	8,979 ± 0,45
35	PE	6,6325	6,1071	5,7257	6,155 ± 0,26
36	WA3	7,8205	7,6074	8,5542	7,994 ± 0,29
37	CSB1	7,3042	6,9770	7,1163	7,133 ± 0,10
38	SS6	8,7090	8,2514	8,2117	8,391 ± 0,16
39	DM1	7,4408	7,3336	7,2988	7,358 ± 0,04
40	NC1	9,4703	9,9243	9,3634	9,586 ± 0,17
41	SGD1	9,5624	9,8415	10,6323	10,012 ± 0,32
42	ST1	11,0408	11,2097	10,6456	10,965 ± 0,17
43	LC1	8,9956	9,8485	8,9573	9,267 ± 0,29
44	AFG1	8,1247	8,3886	8,2404	8,251 ± 0,08
45	MC3	9,6548	10,9672	10,4472	10,356 ± 0,38
46	QRS	7,9100	8,2307	8,3867	8,176 ± 0,14
47	2N	9,1374	8,8984	9,0725	9,036 ± 0,07

48	HSE	7,9725	7,0671	7,3907	7,477 ± 0,27
49	3PW	7,4078	7,4876	7,5204	7,472 ± 0,03
50	EMU	7,8530	8,2122	8,2174	8,094 ± 0,12
51	FM2	10,7633	9,7407	10,3241	10,276 ± 0,30
52	TN2	7,7625	7,1931	7,1200	7,359 ± 0,20
53	CSM1	7,1798	7,3198	7,2941	7,265 ± 0,04
54	AR1	8,3036	8,1652	7,8781	8,116 ± 0,13
55	SS8	9,3179	9,1047	9,3731	9,265 ± 0,08
56	SS5	10,2847	9,8257	9,3938	9,835 ± 0,26
57	VP3	6,8908	6,4636	6,5584	6,638 ± 0,13
58	VP4	7,8528	7,9322	8,1344	7,973 ± 0,08
59	VP5	8,2350	7,8499	7,9428	8,009 ± 0,12
60	SS9	8,4233	9,4140	9,2364	9,025 ± 0,31
61	ERF	7,1615	7,2715	7,5736	7,336 ± 0,12
62	ERG	6,7955	7,0362	6,9664	6,933 ± 0,07
63	SS3	10,0528	10,0306	9,7612	9,948 ± 0,09
64	SS7	9,7626	9,9719	9,7337	9,823 ± 0,08
65	VP1	8,5581	8,4315	8,5023	8,497 ± 0,04
66	SAL	7,1167	7,5183	7,3521	7,329 ± 0,12
67	CCN8	8,4048	8,2239	8,6758	8,435 ± 0,13
68	1N	8,1727	8,1385	7,9302	8,080 ± 0,08
69	4N	10,1023	10,2578	10,3431	10,234 ± 0,07
70	6N	9,1161	8,5513	8,4946	8,721 ± 0,20
71	BR2	6,4319	6,5851	6,6237	6,547 ± 0,06
72	RLF2	8,5466	8,3891	8,7082	8,548 ± 0,09

73	CF1	6,9157	6,9540	7,6605	7,177 ± 0,24
74	MC1	8,1913	8,2550	7,9006	8,116 ± 0,11
75	AMC1	8,5915	8,4472	7,9013	8,313 ± 0,21
76	DM3	7,4274	7,0164	7,2247	7,223 ± 0,12
77	ECH1	7,4819	7,8946	8,1571	7,845 ± 0,20
78	CSM2	5,7245	4,7482	9,4830	6,652 ± 1,44
79	RLF1	9,6166	10,4371	9,5200	9,858 ± 0,29
80	RA2	5,4584	5,4754	5,3454	5,426 ± 0,04
81	HE1	9,9106	9,4625	9,1489	9,507 ± 0,22
82	QR3	8,1428	8,3855	8,0935	8,207 ± 0,09
83	DM4	7,9156	7,5725	8,0615	7,850 ± 0,15
84	AMC2	7,6857	8,3124	7,9790	7,992 ± 0,18
85	AMC3	9,6451	9,6139	9,6831	9,647 ± 0,02
86	PE1	6,8795	7,0688	7,1716	7,040 ± 0,09
87	5N	9,4244	8,9368	9,0340	9,132 ± 0,15
88	1PW	6,5907	6,4226	6,6717	6,562 ± 0,07
89	MA2	8,6021	8,4764	8,3400	8,473 ± 0,08
90	GCZ1	6,4218	6,4419	6,5170	6,460 ± 0,03
91	GCZ4	5,5597	5,8441	5,9185	5,774 ± 0,11
92	GCZ6	7,6595	7,5212	7,6386	7,606 ± 0,04
93	GCZ7	6,8480	7,3556	6,8145	7,006 ± 0,18
94	GCZ8	5,4934	5,5074	5,4055	5,469 ± 0,03
95	RV1	7,9194	8,2423	7,0457	7,736 ± 0,36
96	GCZ2	7,3845	7,1596	7,3798	7,308 ± 0,07
97	GCZ3	6,0534	6,2814	6,0519	6,129 ± 0,08

98	GCZ9	7,0814	7,1214	9,9360	8,046 ± 0,95
99	RGS1	6,9242	7,0371	7,3495	7,104 ± 0,13
100	RGS2	8,0386	7,8783	7,9695	7,962 ± 0,05
101	WSR1	8,0230	8,9078	9,2115	8,714 ± 0,36
102	GCZ5	7,7113	7,7192	8,1369	7,856 ± 0,140
103	TMG1	5,9343	6,4907	6,3387	6,255 ± 0,17
104	NGS	10,0009	10,2339	10,1402	10,125 ± 0,07
105	CCM1	8,5581	7,6126	8,0583	8,076 ± 0,27
106	CCM2	9,1059	9,3499	9,3136	9,256 ± 0,08
107	PVE	9,5363	9,6509	9,7131	9,633 ± 0,05
108	ARM	6,2442	6,9550	6,6784	6,626 ± 0,21
109	RV2	11,3074	11,5282	11,1672	11,334 ± 0,11
110	BDF1	6,2267	6,2555	5,5916	6,025 ± 0,22
111	BDF2	6,6377	6,9429	7,0568	6,879 ± 0,13
112	CAM1	5,6344	5,9204	5,6490	5,735 ± 0,09
113	CAM2	5,5342	5,7380	5,5974	5,623 ± 0,06
114	EFJ1	6,5844	6,3511	6,6131	6,516 ± 0,08
115	VCM1	5,6125	6,2030	6,5943	6,137 ± 0,29
116	VCM2	7,0520	7,2093	6,7738	7,012 ± 0,13
117	VCM3	4,9350	5,4320	5,7140	5,360 ± 0,23
118	VCM4	4,4859	4,7122	4,3474	4,515 ± 0,11
119	VCM5	7,0684	7,1723	7,3898	7,210 ± 0,09
120	VCM6	6,7855	6,7633	6,8215	6,790 ± 0,02
121	EFJ2	5,4819	5,1355	5,9146	5,511 ± 0,23
122	EFJ3	5,6643	5,6656	5,4926	5,608 ± 0,06

123	EFJ4	6,5155	6,9991	6,5834	6,699 ± 0,15
124	CMA1	7,1667	7,4328	7,8147	7,471 ± 0,19
125	CMA2	7,3876	6,8073	7,3877	7,194 ± 0,19
126	CMA3	7,5453	7,8973	8,0774	7,840 ± 0,16
127	CMA4	5,2114	5,2843	5,5256	5,340 ± 0,09
128	NDR1	5,9560	6,2568	6,0378	6,084 ± 0,09
128	NDR2	5,6492	5,6855	6,0336	5,789 ± 0,12
130	NDR3	6,2421	6,0090	5,8728	6,041 ± 0,11

Donde R son las repeticiones, N es número de muestras, esta expresado en g Tb / 100 g grano de cacao ± SEM. (1-89 muestra de TM, 90-109 muestra de SA y 110-130 muestra de CU)

A-IV a. Análisis de varianza de los contenidos de cafeína (g Cf./100 g muestra) en granos de cacao fresco, considerando el factor zona de producción.

FV	GL	SC	CM	Razón F	P valor
Entre grupos	129	60,2608	0,467138	145,02	0,0000
Intra grupos	260	0,837493	0,00322113		
Total	389	61,0983			

A-IV b. Resultado del contenido de Cf del grano de cacao fresco de Tingo María, San Alejandro y Curimana.

N	Codigo	R1	R2	R3	X ± SEM
1	RCL1	0,4006	0,3912	0,4137	0,402 ± 0,01
2	EC2	0,4330	0,3894	0,3080	0,377 ± 0,04
3	LR2	0,4518	0,3727	0,4531	0,426 ± 0,03
4	JM1	1,1877	1,0360	1,1222	1,115 ± 0,04
5	RLJ2	0,4083	0,3518	0,5248	0,428 ± 0,05
6	FV1	0,2547	0,3625	0,3180	0,312 ± 0,03
7	CS1	0,5627	0,6544	0,5381	0,585 ± 0,04
8	RH1	0,3686	0,3631	0,2891	0,340 ± 0,03
9	FT1	0,3925	0,4283	0,4090	0,410 ± 0,01
10	LP2	0,1526	0,1444	0,1690	0,155 ± 0,01
11	EC3	0,5930	0,5502	0,5327	0,559 ± 0,02
12	BSV1	0,3908	0,3867	0,3094	0,362 ± 0,03
13	WA1	0,7320	0,7144	0,5925	0,680 ± 0,04
14	WA2	1,0345	0,8432	0,8916	0,923 ± 0,06
15	JC0	1,4385	1,3938	1,5627	1,465 ± 0,05
16	MA1	0,7265	0,6830	0,5585	0,656 ± 0,05
17	AP1	0,4077	0,5152	0,6577	0,527 ± 0,07
18	AP3	0,5421	0,6527	0,6144	0,603 ± 0,03
19	SS1	0,8312	0,9392	0,9145	0,895 ± 0,03
20	EH1	0,3168	0,2985	0,3101	0,308 ± 0,01
21	MC2	0,7326	0,4618	0,4410	0,545 ± 0,09
22	TN1	0,5963	0,6288	0,5699	0,598 ± 0,02

23	3N	0,2095	0,2493	0,2225	0,227 ± 0,01
24	7N	0,3134	0,2614	0,2596	0,278 ± 0,02
25	SS4	0,7331	0,7081	0,6668	0,703 ± 0,02
26	AH1	0,6462	0,7268	0,6950	0,689 ± 0,02
27	PC1	0,2960	0,3138	0,2933	0,301 ± 0,01
28	VBV2	0,8206	0,8109	0,8153	0,816 ± 0,00
29	FM1	1,0329	1,0384	1,0269	1,033 ± 0,00
30	FM3	0,5358	0,5620	0,5560	0,551 ± 0,01
31	OC1	1,6685	1,9089	1,5416	1,706 ± 0,11
32	OC2	0,4519	0,4629	0,4292	0,448 ± 0,01
33	ZC1	0,6027	0,6654	0,6410	0,636 ± 0,02
34	CSN2	0,5762	0,6202	0,6196	0,605 ± 0,01
35	PE	1,0853	0,9351	0,9324	0,984 ± 0,05
36	WA3	1,1260	1,0589	1,2016	1,129 ± 0,04
37	CSB1	0,6616	0,7257	0,7311	0,706±0,02
38	SS6	1,1801	1,1058	1,1028	1,130 ± 0,03
39	DM1	0,5414	0,5472	0,5734	0,554 ± 0,01
40	NC1	1,5944	1,7405	1,6169	1,651 ± 0,05
41	SGD1	0,7334	0,8406	0,8943	0,823 ± 0,05
42	ST1	0,9733	0,9461	0,9465	0,955 ± 0,01
43	LC1	0,7962	0,8702	0,7970	0,821 ± 0,02
44	AFG1	1,5854	1,7370	1,6585	1,660 ± 0,04
45	MC3	1,0147	1,2518	1,2256	1,164 ± 0,08
46	QRS	1,4297	1,4432	1,5207	1,465 ± 0,03
47	2N	0,5779	0,5947	0,6159	0,596 ± 0,01

48	HSE	0,9535	0,9093	0,8984	0,920 ± 0,02
49	3PW	1,4818	1,5513	1,5920	1,542 ± 0,03
50	EMU	0,9085	0,9433	0,9510	0,934 ± 0,01
51	FM2	1,0233	0,9838	0,9904	0,999 ± 0,01
52	TN2	1,5623	1,5802	1,4366	1,526 ± 0,05
53	CSM1	1,5529	1,4288	1,4353	1,472 ± 0,04
54	AR1	0,3770	0,3448	0,3645	0,362 ± 0,01
55	SS8	0,9418	0,8658	0,8489	0,886 ± 0,03
56	SS5	0,9507	0,8660	0,8902	0,902 ± 0,03
57	VP3	1,2181	1,2079	1,2593	1,228 ± 0,02
58	VP4	0,8514	0,9088	0,8720	0,877 ± 0,02
59	VP5	1,1647	1,0653	1,1518	1,127 ± 0,03
60	SS9	0,6648	0,8612	0,8408	0,789 ± 0,06
61	ERF	0,4063	0,4033	0,4155	0,408 ± 0,00
62	ERG	0,3691	0,3733	0,4045	0,382 ± 0,01
63	SS3	0,6858	0,7451	0,7037	0,712 ± 0,02
64	SS7	0,4844	0,5202	0,5225	0,509 ± 0,01
65	VP1	0,6868	0,6937	0,6992	0,693 ± 0,00
66	SAL	0,9429	0,9647	0,9023	0,937 ± 0,02
67	CCN8	0,3102	0,3055	0,3434	0,320 ± 0,01
68	1N	0,7033	0,7138	0,7502	0,722 ± 0,01
69	4N	0,2689	0,2767	0,2787	0,275 ± 0,00
70	6N	0,3642	0,3130	0,3283	0,335 ± 0,02
71	BR2	1,0157	1,1396	1,0562	1,071 ± 0,04
72	RLF2	0,3749	0,3590	0,3722	0,369 ± 0,00

73	CF1	0,3692	0,3872	0,4056	0,387 ± 0,01
74	MC1	0,5753	0,5366	0,5041	0,539 ± 0,02
75	AMC1	0,6848	0,7105	0,6124	0,669 ± 0,03
76	DM3	0,6402	0,6093	0,6529	0,634 ± 0,01
77	ECH1	0,1020	0,1071	0,1076	0,106 ± 0,00
78	CSM2	0,4020	0,3266	0,7180	0,482 ± 0,12
79	RLF1	0,0934	0,0931	0,1130	0,100 ± 0,01
80	RA2	0,8079	0,8531	0,9184	0,860 ± 0,03
81	HE1	0,5702	0,6479	0,5303	0,583 ± 0,03
82	QR3	0,5909	0,5930	0,5735	0,586 ± 0,01
83	DM4	0,7716	0,8220	0,7507	0,781 ± 0,02
84	AMC2	1,1877	1,2542	1,2747	1,239 ± 0,03
85	AMC3	1,3181	1,3131	1,3000	1,310 ± 0,01
86	PE1	0,8303	0,8131	0,8081	0,817 ± 0,01
87	5N	0,2930	0,2840	0,2728	0,283 ± 0,01
88	1PW	0,7773	0,7757	0,7951	0,783 ± 0,01
89	MA2	0,7012	0,7303	0,7105	0,714 ± 0,01
90	GCZ1	2,1178	2,0984	2,0334	2,083 ± 0,03
91	GCZ4	1,0236	1,0645	1,0779	1,055 ± 0,02
92	GCZ6	1,2321	1,1739	1,2194	1,208±0,018
93	GCZ7	1,0187	1,0806	1,0160	1,038 ± 0,02
94	GCZ8	0,7002	0,6200	0,6527	0,658 ± 0,02
95	RV1	0,8664	0,8724	0,8788	0,873 ± 0,00
96	GCZ2	0,7472	0,7295	0,7882	0,755 ± 0,02
97	GCZ3	0,5786	0,6294	0,5774	0,595 ± 0,02

98	GCZ9	0,6873	0,6166	1,0065	0,770 ± 0,12
99	RGS1	0,6361	0,6418	0,7046	0,661 ± 0,02
100	RGS2	0,7555	0,7414	0,6348	0,711 ± 0,04
101	WSR1	0,6918	0,7776	0,7713	0,747 ± 0,03
102	GCZ5	0,6423	0,6457	0,6812	0,656 ± 0,01
103	TMG1	0,4900	0,5175	0,5289	0,512 ± 0,01
104	NGS	0,7986	0,7984	0,8092	0,802 ± 0,00
105	CCM1	0,6490	0,5857	0,5762	0,604 ± 0,02
106	CCM2	0,5443	0,5572	0,5819	0,561 ± 0,01
107	PVE	0,4940	0,5074	0,5546	0,519 ± 0,02
108	ARM	0,2526	0,2890	0,2698	0,270 ± 0,01
109	RV2	0,3804	0,3778	0,3837	0,381 ± 0,00
110	BDF1	1,7529	1,9118	1,7480	1,804 ± 0,05
111	BDF2	1,7626	1,7658	1,8065	1,778 ± 0,01
112	CAM1	1,4939	1,4973	1,4359	1,476 ± 0,02
113	CAM2	1,4094	1,3727	1,4129	1,398 ± 0,01
114	EFJ1	1,4026	1,3756	1,4231	1,400 ± 0,01
115	VCM1	1,1531	1,1818	1,2675	1,201 ± 0,03
116	VCM2	1,3785	1,3265	1,3207	1,342 ± 0,02
117	VCM3	0,8915	0,9212	1,0265	0,946 ± 0,04
118	VCM4	0,8154	0,7861	0,7457	0,782 ± 0,02
119	VCM5	1,1699	1,1176	1,1501	1,146 ± 0,02
120	VCM6	1,0273	1,0026	1,0090	1,013 ± 0,01
121	EFJ2	0,7358	0,7479	0,8479	0,777 ± 0,04
122	EFJ3	0,7056	0,7500	0,7629	0,739 ± 0,02

123	EFJ4	0,8524	0,9050	0,8815	0,880 ± 0,02
124	CMA1	0,8642	0,8616	0,9686	0,898 ± 0,04
125	CMA2	0,7880	0,7565	0,9024	0,816 ± 0,04
126	CMA3	0,7649	0,7970	0,8278	0,797 ± 0,02
127	CMA4	0,5112	0,5099	0,5481	0,523 ± 0,01
128	NDR1	0,5514	0,5815	0,5934	0,575 ± 0,01
129	NDR2	0,4195	0,4379	0,4569	0,438 ± 0,01
130	NDR3	0,4307	0,4307	0,4092	0,424 ± 0,01

Donde R son las repeticiones, N es número de muestras, esta expresado en g Tb / 100 g grano de cacao ± SEM. (1-89 muestra de TM, 90-109 muestra de SA y 110-130 muestra de CU)

A-V a. Análisis de varianza de los contenidos de teobromina (g Tb./100 g de granos de cacao), considerando el nivel Zona – proceso.

FV	GL	SC	CM	Razón F	P valor
Entre grupos	17	1,69865	0,0999208	21,20	0,0000
Intra grupos	36	0,169679	0,0047133		
Total	53	1,86833			

A-V b. prueba de Tukey del contenido de teobromina, en granos de cacao considerando el nivel Zona – proceso.

Zona	Proceso	Caso	Media	Grupos Homogéneos
TM	Licor	3	1,1397	X X X X X X
	Seco	3	1,15577	X X X X X
	F4	3	1,24127	X X X X X
	F3	3	1,28207	X X X X
	F2	3	1,3759	X X
	Fresco	3	1,44923	X
SA	Licor	3	0,835733	X
	Seco	3	0,884733	X X X
	F4	3	0,952167	X X X X X
	F3	3	1,00203	X X X X X X
	F2	3	1,04657	X X X X X X
	Fresco	3	u1,0879	X X X X X X
CU	Licor	3	0,939533	X X X X
	Seco	3	0,8538	X X
	F4	3	1,06267	X X X X X X
	F3	3	1,23563	X X X X
	F2	3	1,18197	X X X X X
	Fresco	3	1,32437	X X X

A-VI a. Análisis de varianza de los contenidos de cafeína (g Cf./100 g de granos de cacao), considerando el nivel Zona – proceso.

FV	GL	SC	CM	Razón F	P valor
Entre grupos	17	0,508607	0,029918	76,02	0,0000
Intra grupos	36	0,0141688	0,000393579		
Total	53	0,522776			

A-VI b. prueba de Tukey del contenido de cafeína, en granos de cacao considerando el nivel Zona – proceso.

Zona	Proceso	Caso	Media	Grupos Homogéneos
TM	Licor	3	0,164933	X X
	Seco	3	0,1997	X X
	F4	3	0,2097	X
	F3	3	0,277367	X
	F2	3	0,3174	X X
	Fresco	3	0,4104	X
SA	Licor	3	0,0765333	X
	Seco	3	0,0877667	X X
	F4	3	0,0999667	X X X
	F3	3	0,155333	X X X
	F2	3	0,1679	X X
	Fresco	3	0,203767	X
CU	Licor	3	0,0905333	X X
	Seco	3	0,0875	X X
	F4	3	0,1393	X X X
	F3	3	0,1823	X X
	F2	3	0,311533	X X
	Fresco	3	0,3499	X X

A-VII a. Análisis de varianza de los contenidos de catequina (g C./100 g de granos de cacao), considerando el nivel Zona – proceso.

FV	GL	SC	CM	Razón F	P valor
Entre grupos	17	0,015334	0,000901998	49,05	0,0000
Intra grupos	36	0,000662073	0,0000183909		
Total	53	0,015996			

A-VII b. prueba de Tukey del contenido de catequina, en granos de cacao considerando el nivel Zona – proceso.

Zona	Proceso	Caso	Media	Grupos Homogéneos
TM	Licor	3	0,0127075	X X X X X
	Seco	3	0,0138738	X X X X X
	F4	3	0,01609	X X X X X
	F3	3	0,0271486	X
	F2	3	0,0530619	X
	Fresco	3	0,0651613	X
SA	Licor	3	0,000544858	X
	Seco	3	0,00216124	X X
	F4	3	0,00298081	X X X
	F3	3	0,00340366	X X X
	F2	3	0,00664287	X X X X
	Fresco	3	0,0200639	X X X
CU	Licor	3	0,00394018	X X X X
	Seco	3	0,0103716	X X X X X
	F4	3	0,0105258	X X X X X
	F3	3	0,0169762	X X X X
	F2	3	0,0231064	X X X
	Fresco	3	0,0259929	X X

A-VIII a. Análisis de varianza de los contenidos de epicatequina (g EC./100 g de granos de cacao), considerando el nivel Zona – proceso.

FV	GL	SC	CM	Razón F	P valor
Entre grupos	17	17,215	1,01265	46,34	0,0000
Intra grupos	36	0,786769	0,0218547		
Total	53	18,0018			

A-VIII b. prueba de Tukey del contenido de epicatequina, en granos de cacao considerando el nivel Zona – proceso.

Zona	Proceso	Caso	Media	Grupos Homogéneos
TM	Licor	3	0,1386	X X
	Seco	3	0,503767	X X X
	F4	3	0,4963	X X X
	F3	3	0.9314	X X
	F2	3	1,67963	X X
	Fresco	3	1,85547	X
SA	Licor	3	0,0858333	X X
	Seco	3	0,3767	X X X
	F4	3	0,375267	X X X
	F3	3	0,393167	X X X
	F2	3	0,760133	X X
	Fresco	3	1,29143	X X
CU	Licor	3	0,0219	X
	Seco	3	0,0325667	X
	F4	3	0,0293333	X
	F3	3	0,0433333	X
	F2	3	0,0407	X
	Fresco	3	0,0554667	X X

A-IX a. Prueba de kruskall wallis para el atributo cacao por zonas de producción.

Zona de producción	Tamaño de muestra	Rango Promedio
TM	3	8
SA	3	4
CU	3	3

Estadístico = 7.0 Valor-P = 0.0301974

A-IX b. Prueba de kruskall wallis para el atributo acidez por zonas de producción.

Zona de producción	Tamaño de muestra	Rango Promedio
TM	3	7,66667
SA	3	4,83333
CU	3	2,5

Estadístico = 6.12063 Valor-P = 0.0468728

A-IX c. Prueba de kruskall wallis para el atributo astringencia por zonas de producción.

Zona de producción	Tamaño de muestra	Rango Promedio
TM	3	6,5
SA	3	6,5
CU	3	2,0

Estadístico = 6.17143 Valor-P = 0.0456974

A-IX d. Prueba de kruskall wallis para el atributo amargor por zonas de producción.

Zona de producción	Tamaño de muestra	Rango Promedio
TM	3	5,33333
SA	3	3,0
CU	3	6,66667

Estadístico = 2.97898 Valor-P = 0.225488

A-IX e. Prueba de kruskall wallis para el atributo afrutado por zonas de producción.

Zona de producción	Tamaño de muestra	Rango Promedio
TM	3	8,0
SA	3	3,5
CU	3	3,5

Estadístico = 8.0 Valor-P = 0.0183156

A-IX f. Prueba de kruskall wallis para el atributo floral por zonas de producción.

Zona de producción	Tamaño de muestra	Rango Promedio
TM	3	8,0
SA	3	3,5
CU	3	3,5

Estadístico = 8.0 Valor-P = 0.0183156

A-IX g. Prueba de kruskal wallis para el atributo a nuez por zonas de producción.

Zona de producción	Tamaño de muestra	Rango Promedio
TM	3	7,66667
SA	3	3,66667
CU	3	3,66667

Estadístico = 4.83019 Valor-P = 0.0893589

A-X a. coordenadas de las mazorcas de cacao estudiadas.

N	Código de socio	Coordenadas	
		18L	UTM
1	RCL1	389513,27	8986766,06
2	EC2	395101,00	8987389,00
3	LR2	409515,00	8964775,00
4	JM1	382848,24	8993881,20
5	RLJ2	404503,74	8974758,49
6	FV1	404432,84	8976263,31
7	CS1	377837,00	9018866,00
8	RH1	404920,23	8973512,92
9	FT1	409491,00	8964840,00
10	LP2	392639,00	8987695,00
11	EC3	394443,00	8987564,00
12	BSV1	390721,00	8976258,00

13	WA1	375677,00	9018213,00
14	WA2	375677,00	9018213,00
15	JC0	395158,00	8985443,00
16	MA1	389947,00	8992825,00
17	AP1	394552,00	8986291,00
18	AP3	394565,00	8986285,00
19	SS1	410067,00	8965206,00
20	EH1	390377,00	8976922,00
21	MC2	407460,00	8974230,00
22	TN1	396915,00	8980906,00
23	3N	393856,00	8983624,00
24	7N	393844,00	8983749,00
25	SS4	410458,00	8962336,00
26	AH1	391199,00	8974598,00
27	PC1	385906,00	8989642,00
28	VBV2	404427,03	8976437,22
29	FM1	410142,00	8963459,00
30	FM3	410289,00	8963215,00
31	OC1	405093,39	8973489,46
32	OC2	405150,43	8973429,56
33	ZC1	372500,00	9019651,00
34	CSN2	390721,00	8976258,00
35	PE	390133,83	8978063,29
36	WA3	375677,00	9018213,00
37	CSB1	406705,00	8972267,00

38	SS6	409515,00	8964775,00
39	DM1	407143,00	8975429,00
40	NC1	406520,00	8972427,00
41	SGD1	486392,00	9020621,00
42	ST1	402076,00	8978667,00
43	LC1	404135,00	9056309,00
44	AFG1	484318,00	9056451,00
45	MC3	407510,00	8974170,00
46	QRS	404264,00	8975031,00
47	2N	393840	8983686,00
48	HSE	391326,00	8974516,00
49	3PW	373276,00	9030986,00
50	EMU	406793,00	8972774,00
51	FM2	410245,00	8963576,00
52	TN2	396917,00	8980900,00
53	CSM1	490379,00	9071040,00
54	AR1	477236,00	9069573,00
55	SS8	410100,00	8965190,00
56	SS5	410386,00	8962279,00
57	VP3	410298,00	8962749,00
58	VP4	410250,00	8962780,00
59	VP5	410230,00	8962690,00
60	SS9	410306,00	8965200,00
61	ERF	396953,00	8981134,00
62	ERG	397078,00	8981120,00

63	SS3	409491,00	8964840,00
64	SS7	410412,00	8962930,00
65	VP1	409719,00	8964617,00
66	SAL	482336,00	9019748,00
67	CCN8	494264,00	9105031,00
68	1N	393800,00	8983744,00
69	4N	393820,00	8983567,00
70	6N	393860,00	8983700,00
71	BR2	384603,00	8942339,00
72	RLF2	405121,00	8975742,00
73	CF1	396335,00	8984837,00
74	MC1	407420,00	8974259,00
75	AMC1	410789,00	8965787,00
76	DM3	407230,00	8957358,00
77	ECH1	404979,47	8976386,16
78	CSM2	407091,96	8972685,89
79	RLF1	405121,00	8975742,00
80	RA2	372169,00	9019525,46
81	HE1	406939,16	8972873,60
82	QR3	404253,22	8975107,06
83	DM4	407289,00	8957376,00
84	AMC2	410687,00	8965736,00
85	AMC3	410356,00	8965657,00
86	PE1	390137,83	8978067,29
87	5N	393764,00	8983594,00

88	1PW	372909,00	9028379,00
89	MA2	389905,96	8992828,00
90	GCZ1	486346,00	9020641,00
91	GCZ4	487553,00	9019408,00
92	GCZ6	486419,00	9020711,00
93	GCZ7	487277,00	9019961,00
94	GCZ8	487902,00	9019299,00
95	RV1	475628,00	9052926,00
96	GCZ2	486357,00	9020662,00
97	GCZ3	486370,00	9020698,00
98	GCZ9	487915,00	9019345,00
99	RGS1	487920,00	9019074,00
100	RGS2	487969,00	9019037,00
101	WSR1	447575,00	9009599,00
102	GCZ5	487532,00	9019430,00
103	TMG1	476971,00	9069606,00
104	NGS	397089,00	8980804,00
105	CCM1	407656,00	8973466,00
106	CCM2	407646,00	8973452,00
107	PVE	397016,00	8923867,00
108	ARM	403660,00	8975760,00
109	RV2	475670,00	9056957,00
110	BDF1	481801,00	9021961,00
111	BDF2	480469,00	9019882,00
112	CAM1	476919,00	9054939,00

113	CAM2	476913,00	9054934,00
114	EFJ1	476971,00	9054729,00
115	VCM1	477448,00	9053833,00
116	VCM2	477550,00	9053860,00
117	VCM3	477300,00	99053789,00
118	VCM4	477111,00	99053980,00
119	VCM5	477780,00	99053120,00
120	VCM6	477256,00	99053457,00
121	EFJ2	473147,00	9065011,00
122	EFJ3	476868,00	9055022,00
123	EFJ4	475337,00	906526,00
124	CMA1	389736,00	8988526,00
125	CMA2	389727,00	8988360,00
126	CMA3	389745,00	8988325,00
127	CMA4	389765,00	8988386,00
128	NDR1	487543,00	9019947,00
128	NDR2	485677,00	9020509,00
130	NDR3	486944,00	9019845,00
