UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS

"POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE GRANOS SECOS Y ANÁLISIS SENSORIAL DEL LICOR DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CRIOLLO Y SIETE CLONES"

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

NAZARIO INOCENTE, ORFA MARIA

PROMOCIÓN 2011 - II

Tingo María - Perú

2014

BIBLIOTECA CENTRAL - UNAS

T
IND
Nazario Inocente, Orfa Maria

"Polifenoles totales, Antocianinas, Capacidad Antioxidante de Granos secos y Análisis Sensorial del Licor de Cacao (*Theobroma cacao* L) Criollo y siete clones"

85 páginas; 10 cuadros; 28 fgrs.; 96 ref.; 30 cm.
Tesis (Ing. en Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias, 2014

1. POLIFENOLES **2. CLONES/CACAO** **3. ANTOCIANINA**

4. GRANOS SECOS **5. LICOR/CACAO** **6. ANTIOXIDANTE**

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

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS Nº 007-2014

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 06 de agosto de 2014, a horas 5:10 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentada por la Bach. **NAZARIO INOCENTE Orfa María,** titulada:

"POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE GRANOS SECOS Y ANALISIS SENSORIAL DEL LICOR DE CACAO (*Theobroma cacao L.)* CRIOLLO Y SIETE CLONES"

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

Tingo María, 06 de agosto de 2014

Dr. Pedro Pablo Peláez Sánchez
Presidente

Ing. Williams Roldán Carbajal
Miembro

Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez
Asesor

DEDICATORIA

Dedico el éxito y la satisfacción de esta investigación a DIOS quien me regala los dones de la Sabiduría y el *Entendimiento, el principio y el fin* de todos mis propósitos. Gracias por hacerme ver las maravillas de la vida.

A mi madre MAGNA INOCENTE SIMÓN, *que en paz descanse.* Por el gran esfuerzo que ha hecho para formarnos como personas de bien, por su amor, comprensión y apoyo para que se realicen todo mis sueños. Siempre estarás en mi mente y corazón.

A mi padre GREGORIO NAZARIO MATIAS, aún en la distancia siempre ha estado conmigo. Por el apoyo y su preocupación de que siempre este bien.

A mis hermanos JENI, CARLOS Y HANDER, por el apoyo brindado, por cada momento vivido en lo bueno y lo malo y porque siempre estarán a mi lado.

A la Dra. ELIZABETH ORDOÑEZ GÓMEZ, por creer en mí, todo el apoyo brindado, la comprensión, la paciencia, el cariño y sobre todo su amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por ser el alma mater en el culminé mi carrera y donde viví muchos momentos dignos de recordar.

A la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias por haberme formado como profesional, a todos los docentes, por sus conocimientos compartidos. Al Centro de investigación de productos naturales (CIPNA), por abrirnos sus puertas y brindarnos los recursos necesarios para este proyecto.

A mi asesora Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez, por todo el apoyo, enseñanza y dedicación a la investigación y a su esposo Dr. Tomás Menacho.

A la Ing. Jenny Mandujano Paredes, por su conocimiento, apoyo y amistad brindada durante el desarrollo de este proyecto y al Ing. Juan Arévalo G., por su apoyo técnico y al Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), por brindarnos las muestras para la ejecución de este proyecto.

A los miembros de jurado: Dr. Pedro Peláez y al Ing. Williams Roldan por el apoyo y el tiempo dedicado para la evaluación de este proyecto.

A la señora Claudia Palomino Cabezas y familia, por estar siempre a mi lado apoyándome e incentivándome en los buenos y no tan buenos momentos. A mis amigos: Frezia por su amistad, risas, tristeza y dilemas de tesis. A Dina, por la amistad. A Evil, por su apoyo técnico en el laboratorio. A la Ing. Lupe por su apoyo y motivándonos para la culminación de la tesis. A Vicky T., Carla, Carolina, Lucy, Vicky P., Ing. Aurelia, Carlos, Gilmer...y a todos aquellos que de una u otra manera me apoyaron para la culminación de esta meta, que de una u otra manera formaron parte de las alegrías y tristezas que se viven durante esta ardua trayectoria.

ÍNDICE

Página

I. INTRODUCCION 1

II. REVISION BIBLIOGRAFICA 3

2.1. Aspectos generales del cacao (*Theobroma cacao* L.) 3

2.1.1 Origen y distribución geográfica del cacao 3

2.1.2 Identificación taxonómica 4

2.1.3 Características biológicas y botánicas del cacao 4

2.1.4 Características de las razas y clones 5

2.1.5 Aspectos importantes para mejorar la genética de cacao 14

2.1.6 Definición del grano de cacao 16

2.1.7 Calidad del grano de cacao 16

2.1.8 Beneficio del cacao 19

2.2 Aspectos generalidades de polifenoles 21

2.2.1 Descripción 21

2.2.2 Clasificación de los Polifenoles 21

2.2.3 Polifenoles en cacao 24

2.3 Aspectos generales de las antocianinas 26

2.3.1. Definición 26

2.3.2 Estructura de las antocianinas y color 27

2.3.3 Factores que alteran la estabilidad de las antocianinas 29

2.4 Generalidades de Antioxidantes 30

2.4.1 Definición 30

2.4.2 Tipos de antioxidantes 30

2.4.3 Radicales libres 31

2.4.4 Estrés oxidativos 32

2.4.5 Función de los antioxidantes 32

2.4.6 Método de análisis para la capacidad antioxidante 33

III. MATERIALES Y METODOS 35

3.1 Lugar de ejecución 35

3.2 Materia prima 35

3.3 Equipos, materiales y reactivos. 36

3.3.1 Equipos de laboratorio. 36

3.3.2 Materiales de laboratorio. 36

3.3.3 Otros Materiales. 37

3.3.4 Reactivos y solvente 37

3.4 Métodos de análisis 37

Cuantificación de polifenoles totales. 37

Cuantificación de antocianinas. 37

Determinación de la capacidad antioxidante 38

Evaluación sensorial del licor de cacao. 38

3.5. Metodología experimental 38

3.5.1 Acondicionamiento de la materia prima 38

3.5.2 Preparación del extracto 40

3.5.3 Cuantificación polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones 41

3.5.4 Cuantificación de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones 43

3.5.5 Determinar la actividad antioxidante de granos secos de cacao criollo y siete clones..... 45

3.5.6 Evaluación sensorial del licor de cacao criollo y siete clones..... 52

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES 55

4.1. Cuantificación polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones..... 55

4.1.1 Determinación de la curva estándar 55

4.1.2 Cuantificación de polifenoles totales..... 57

4.2. Cuantificación de antocianinas en grano seco de cacao criollo y siete clones 63

4.3 Determinación de la capacidad antioxidante en los granos secos de cacao criollo y siete clones 67

4.3.1 Coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical 1,1-diphenyl-2 picrylhidrazil (DPPH). 67

4.3.2 Coeficientede inhibición (IC_{50}) del radical 2,2-azinobis (3 etilbenzotiazolino -6- ácido sulfonico) (ABTS ^{o}+). 72

4.4 Evaluación sensorial del licor de cacao criollo y siete clones 77

V. CONCLUSIÓN..... 84

VI. RECOMENDACIÓN 85

VII. ABSTRACT 86

VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 88

XI.ANEXOS..... 103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Fruto de cacao de raza forastero de alto amazonas.....	6
2.	Fruto de cacao forastero del bajo amazonas.....	6
3.	Fruto de cacao de la colección Castro Naranjal (CCN-51) ...	7
4.	Característica del fruto de cacao Iquitos Mezclado con Calabacillo (IMC-67)	8
5.	Característica del fruto de cacao Scavina-6 (SCA-6).....	9
6.	Característica del fruto de cacao Pound-12 (P-12).....	10
7.	Característica del fruto de cacao de raza criollo.....	11
8.	Características del fruto de cacao Trinitario.....	12
9.	Característica del fruto de cacao Imperial College Selection (ICS-1)	13
10.	Característica del fruto de cacao Imperial College Selection (ICS-95)	13
11.	Característica del fruto de cacao Híbrido Seleccionado en Trinidad (TSH-1188)	14
12.	Principales clases de los polifenoles.....	23
13.	Principales polifenoles encontrados en granos de cacao	25
14.	Estructura química de las antocianinas	27
15.	Reacción de decoloración del DPPH frente a los Antioxidantes	33
16.	Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao	41

17. Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles en granos secos de cacao criollo y siete clones 43
18. Diseño experimental para la cuantificación de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones 44
19. Diseño experimental para la evaluación de la capacidad Antioxidante en granos secos de cacao criollo y siete clones 46
20. Flujograma para la elaboración del licor de cacao..... 53
21. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales..... 56
22. Representación del contenido de polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones..... 59
23. Representación del contenido de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones..... 64
24. Comportamiento del IC_{50} con el radical DPPH en los granos secos de cacao criollo y siete clones..... 70
25. Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la eficiencia de la actividad antioxidante (DPPH) 72
26. Comportamiento del IC_{50} con el radical ABTS en los granos secos de cacao criollo y siete clones..... 75
27. Comportamiento del biplot de la evaluación sensorial del licor de cacao criollo y siete clones..... 78
28 Presentación del análisis de conglomerados de las evaluación sensorial del licor de cacao criollo y siete clones..... 81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Partes sustituyentes de las antocianinas.....	28
2	Concentraciones utilizadas para el análisis de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH.....	47
3	Preparación de soluciones de trabajo.....	48
4	Preparación de soluciones de trabajo de muestras de cacao para el análisis de ABTS°+.....	50
5	Soluciones de trabajo de muestras de cacao para el análisis de ABTS°+.....	51
6	Resultados de las absorbancias para la curva estándar de polifenoles (mg EAG/100g).....	56
7	Cuantificación de polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones.....	59
8	Cuantificación de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones.....	64
9	Resultados del IC_{50} del radical DPPH en granos secos de cacao criollo y siete clones.....	70
10	Capacidad antioxidante del IC_{50} referida al radical ABTS en granos secos de cacao criollo y siete clones.....	75

ÍNDICE DE ANEXOS

Página

1. Tasación sensorial (perfil) de granos de cacao 102
2. Análisis de varianza contenido de polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones 102
3. Análisis de varianza de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones 103
4. Análisis de varianza del IC_{50} del radical DPPH en granos secos de cacao criollo y siete clones..... 103
5. Análisis de varianza del IC_{50} referida al radical ABTS en granos secos de cacao criollo y siete clones 103
6. Resultados de la evaluación sensorial de los granos de cacao criollo y siete clones 104
7. Autovalores del análisis multivariado 105
8. Autovectores del análisis multivariado..... 105
9. Correlaciones con las variables originales..... 106

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios del CIPNA-UNAS y del Instituto de cultivo tropicales (ICT). Los objetivos fueron: cuantificar el contenido de polifenoles totales, antocianinas y la capacidad antioxidante por su capacidad de inhibir radicales libres DPPH y $ABTS^{\circ+}$ en granos secos y análisis sensorial del licor de cacao criollo y siete clones (SCA-6, IMC-67, P-12, CCN-51, ICS-1, ICS-95 y TSH-1188). Las muestras fueron molidas y desgrasadas, el extracto fue hidroalcohólicos, se pesó 2,5 g de cacao en 25 mL (agua/etanol 50:50v/v), macerado por 24 h, filtrado y centrifugado, los análisis se realizó por espectrofotometría UV/VIS. Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA), y la prueba de Tukey ($p<0,05$), para la evaluación sensorial se utilizó el análisis multivariado con componentes principales. Los clones SCAVINA-6 y ICS-95 con 5,72±0,04; 5,59±0,05 presentaron mayor contenido de polifenoles totales y el menor IMC-67 3,34±0,02 g EAG/100g, el CCN-51 y criollo con 0,425±0,003; 0,424±0,004 presentaron mayor contenidos de antocianinas y el menor ICS-95 con 0,122±0,003 mg cianidina-3-glucósido/g. La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH lo presentó el ICS-95 IC_{50} 73,29±0,9 µg/mL y el menor IMC-67 IC_{50} 139,01±0,49 µg/mL y en el radical $ABTS^{\circ+}$ SCAVINA-6 con un IC_{50} 33,04±0,69 µg/mL y POUND-12 IC_{50} 64,76±0,42 µg/mL. En la evaluación sensorial se encontró cuatro grupos con características similares (SCAVINA-6, ISC-95 y CCN-51) frutal y floral caracteres predominante, (Criollo, ISC-1 y TSH-1188) amargor y crudo, IMC-67 acidez alta y POUND-12 sin carácter predominante.

I. INTRODUCCION

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es una especie originaria de los bosques tropicales húmedos de América del Sur, sus almendras constituyen el insumo básico para la industria del chocolate y sus derivados; la industria farmacéutica, y la industria cosmética.

Nuestra amazonia es un espacio megadiverso que alberga una amplia diversidad y variabilidad genética de esta especie, siendo la región San Martin, un puente intermedio entre la selva norte y la selva central por sus favorables condiciones edafoclimáticos para el cultivo del cacao, el Huallaga central cuenta con una amplia diversidad de material genético híbrido, y pocas variedades (clones) trinitarios y complejos que ocupan más del 70% de las plantaciones de cacao a nivel de la región, en Huánuco (Tingo María) las variedades caracterizadas también muestran una amplia variación genética de sus caracteres morfológicos, tanto a nivel de frutos como a nivel de semillas.

El instituto de cultivo tropicales (ICT) tienen dos bancos de germoplasma de cacao, uno en Tarapoto y otro en Tocache; seis jardines clónales ubicados en San Martín, Tocache, Bellavista, Picota, Huallaga y Mariscal Cáceres, esta institución viene trabajando en la implementación y mejora de la productividad del cacao, instalando nuevo material genético superior, rehabilitando plantaciones antiguas, capacitando en manejo tecnificado del cultivo, la postcosecha, y el mejoramiento de la calidad del

producto cosechado; existiendo actualmente un gran interés de conocer el componente hereditario (grupo genético) sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en los granos de cacao; en este contexto de la presente investigación se planteó los siguientes objetivos:

- Cuantificar el contenido de polifenoles totales y antocianinas en los granos secos de cacao criollo y siete clones.
- Cuantificar la capacidad antioxidante en los granos secos de cacao criollo y siete clones, mediante la capacidad de inhibir radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6-ácido sulfónico) (ABTS+).
- Realizar el análisis sensorial del licor de cacao criollo y siete clones.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Aspectos generales del cacao (*Theobroma cacao* L.)

2.1.1 Origen y distribución geográfica del cacao

Theobroma cacao L. es el nombre científico que recibe el árbol del cacao, que en griego significa "alimento de los dioses"; pero la palabra "cacao", se presume es derivada de las palabras mayas "Kaj" que significa "amargo" y "Kab" "jugo". La difusión de estas palabras dio como resultado "kajkab" que se convirtió en "Kajkabatl", de la que se deriva "cacauatl" y en conjunto los mayas, toltecas y aztecas llamaban *xocolatl* (chocolate) a la bebida que elaboraban a partir de este fruto, para finalmente transformarse en "cacao" apareciendo en la literatura botánica en 1582 **(MORILLO, 2005)**.

El cacao es originario de América del Sur, específicamente de las cuencas hidrográficas del alto Amazonas y Orinoco, al este de la cordillera de los Andes, en territorios que hoy corresponden a Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Venezuela y las Guayanas. Actualmente se extiende desde Brasil a México en zonas tropicales, y también se siembra en el oeste de África **(BARTLEY, 2005)**.

2.1.2 Identificación taxonómica

El cacao como especie ha sido ubicado según la siguiente clasificación taxonómica **(ADRIAZOLA, 2003)**.

Origen : América Latina

Reino : Vegetal

Orden : Málvales

Clase : Angiospermas

Familia : Esterculiáceae

Tribu : Birtheriaceae

Género : Theobroma

Especie : *Theobroma cacao* L.

División : Spermatophyta

Nombre científico y común : *Theobroma cacao L.,* Cacao.

2.1.3 Características biológicas y botánicas del cacao

El cacao es una especie diploide (2n = 20 cromosomas), de porte alto (8 - 20 m de altura) y de ciclo vegetativo perenne **(GARCIA, 2008)**. Es un árbol necesitado de humedad y calor, requiere sombra (otros árboles más grandes como cocoteros y plataneros), protección del viento y un suelo rico y poroso, pero no se desarrolla bien en las tierras bajas de vapores cálidos **(PLÚA, 2008)**.

El cacao posee una raíz principal pivotante, con hojas simples, enteras y de colores variables que van desde morado hasta verde pálido, con pecíolo corto, posee flores pequeñas, hermafroditas y pentámeras con cinco

lóculos donde hay de 6 a 12 óvulos. Las flores al igual que los frutos se producen en racimos pequeños sobre el tejido maduro del tronco y de las ramas. Generalmente su polinización es entomófila, principalmente llevada a cabo por individuos del género *Forcipomya* y una planta puede llegar a producir de 100 000 a 150 000 flores por año, de las cuales sólo se fecunda entre el 0,1 y 0,3% por lo que las demás caen **(ARCINIEGAS, 2005)**. Su fruto es grande, de forma variable, miden 30 cm de largo y 10 cm de diámetro, siendo lisos o acostillados, de forma elíptica y de color rojo, amarillo, morado o café y la pulpa es blanca, rosada o café, de sabor ácido a dulce y aromática; de 20 a 40 semillas por fruto y son planas o redondeadas, de color blanco, café o morado, de sabor dulce y amargo **(ZAMBRANO *et al.*, 2010)**.

2.1.4 Características de las razas y clones

Se distinguen dos razas de cacao: Forastero y Criollo.

2.1.4.1 Raza Forasteros

Conocidos también como cacaos Amazónicos y/o amargos son originarios de América del Sur, su centro de origen es la parte alta de la cuenca del Amazonas en el área comprendida entre los ríos Napo, Putumayo y Caquetá. Es la raza más cultivada en las regiones cacaoteras de África y Brasil y proporcionan más del 80% de la producción mundial **(ARCINIEGAS, 2005)**.

Se trata de un cacao normal con elevado contenido de taninos, tienen mazorcas pequeñas inicialmente son de color verde claro o rosado pálido, luego se ponen amarillas, la punta es redondeada, la cáscara es lisa o ligeramente rugosa y delgadas **(PLÚA, 2008)**. Los forasteros tienen granos

aplanados, pequeños de color morado y sabor amargo. Dentro de esta raza se destacan distintas variedades como Cundeamor, Amelonado, Sambito, Calabacillo y Angoleta **(GARCIA, 2008)**.

- **Forasteros del Alto Amazonas:** Crecen en estado silvestre y domesticado en la Amazonía Alta (Perú, Ecuador y Colombia). Son árboles vigorosos con frutos de forma variable, las almendras son pequeñas y con ciertas excepciones grandes, con cotiledones de color violeta, pudiéndose encontrar cotiledones blancos como en la variedad porcelana de Piura (Perú) y producen un chocolate de calidad corriente o básico **(GARCIA, 2008)**.

Figura 1. Fruto de cacao de raza forastero de alto amazonas.

- **Forastero del Bajo Amazonas o Guyanas** (amelonado): Sus árboles crecen más rápidamente y tienen mejores rendimientos que el criollo, se cultiva en áfrica y algunos países de centro y sur américa **(GIL, 2012)**.

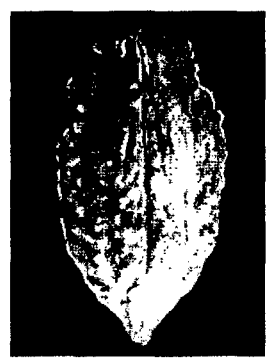


Figura 2. Fruto de cacao forastero del bajo amazonas.

Crecen en estado silvestre y domesticado en la Amazonia Baja (Brasil, Guyana, Guyana Francesa), y a lo largo del Orinoco (Venezuela). Las mazorcas son pequeña, ligeramente rugosas y de forma amelonada, las almendras pueden ser pequeñas, intermedias o grandes; de color morado y excepcionalmente blancas **(GARCIA, 2008)**.

Colección Castro Naranjal (CCN-51): Es de origen ecuatoriano, Homero Castro logra en 1960 en su finca "Teobroma" localizada en Naranjal, seleccionar varios híbridos con las características deseadas, procediendo luego a clonar algunos de ellos a los que denominó con las siglas CCN-51. Los diferentes clones CCN fueron obtenidos del híbrido entre los clones ICS-95 x IMC-67 (Imperial College Selection e Iquitos Mixed Cabacillo), luego realizo un segundo cruce entre dicho híbrido con un cacao encontrado por él en el Oriente ecuatoriano y denominado "Canelos" y este clon se caracteriza por ser un cultivo precoz, inicia su producción a los 24 meses de edad, no necesita de polinización cruzada para su adecuado fructificación tal como la mayoría de los clones y es tolerante a la escoba de bruja **(CRESPO, 1997)**.

Figura 3. Fruto de cacao de la colección Castro Naranjal (CCN-51).

El tamaño del fruto es muy grande, 44 semillas/fruto, tamaño de semilla intermedia, color de los cotiledones es morado, peso seco de semilla 1,4 g, índice de mazorca 16, rendimiento es 937 - 2,812 kg/ha, es susceptible a pudrición parda, moderadamente resistente a la escoba de bruja, moderadamente susceptible a moniliasis; tiene 54% de grasa; sabores básicos y específicos de pulpa dulzura media, acidez media, astringencia media, amargor de almendra medio; floral muy bajo y frutal bajo; sabores básicos y específicos del licor acidez media, astringencia media; amargor medio; floral ausente; frutal bajo, y nuez ausente. Tiene una nota de corteza pronunciada y notable intensidad de chocolate **(GARCIA, 2009)**.

Iquitos Mezclado con Calabacillo (IMC-67): Es un clon que pertenece al forastero de alto amazónico, de origen Peruano, es moderadamente susceptible a la pudrición parda, moderadamente resistente a la escoba de bruja y moderadamente a moniliasis y su calidad organoléptica es corriente o básico.

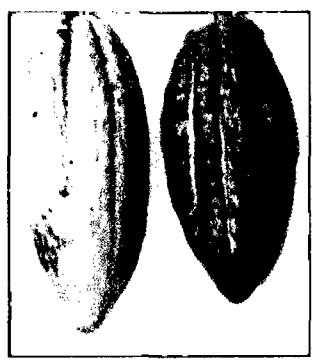


Figura 4. Característica del fruto de cacao Iquitos Mezclado con Calabacillo (IMC-67).

El fruto es muy grande, tiene 45 semillas/ fruto, tamaño de semilla intermedia, peso seco de semilla 1,2 g, índice de mazorca 18, su rendimiento

es 833 a 2,500 Kg/ha; 48% de grasa; sabores básicos y específicos de pulpa tiene dulzura media, acidez media, astringencia baja, amargor de almendra medio, floral muy bajo y frutal medio; sabores básicos y específicos del licor tiene una combinación de notas de madera blanca y oscura; con carácter herbal, de amargor temprano y astringencia temprana y final **(GARCIA, 2009)**.

Scavina-6 (SCA-6): Forastero de alto amazónico, origen Peruano, el color del fruto inmaduro es verde oscuro y amarrillo en la madurez, de cáscara delgada; color de cotiledones morado; en la productividad tiene 40 semillas/fruto, tamaño de semilla 0,8 g, índice de mazorca 31, rendimiento 484 - 1,452 kg/ha; moderadamente resistente a la pudrición parda, escoba de bruja y resistente a moniliasis; sus descriptores industriales tiene 59% grasa; sabores básicos en pulpa tiene dulzura alta, acidez media, astringencia baja, amargor de almendra medio, floral bajo y frutal medio; sabores básicos y específicos del licor tiene acidez alta, astringencia alta, amargor medio, floral bajo, cacao medio **(GARCÍA, 2009)**.

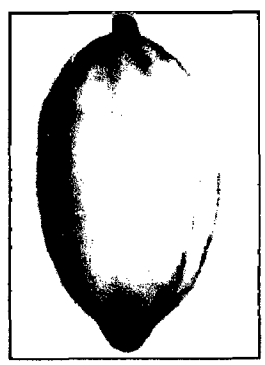


Figura 5. Característica del fruto de cacao Scavina-6 (SCA-6).

Pound (P-12) o Perú: Este material genético del grupo Forastero del Alto Amazonas, de origen peruano. El fruto es de forma alargada, color en el estado madurez es amarrillo, sirvió de base para hacer cruzamientos y

selección de clones ICS (Selección del Colegio Imperial), en Trinidad y Tobago **(GARCIA, 2008)**. Su forma del fruto es elíptico, forma del ápice del fruto es obtuso, ligeramente rugoso, su grosor de la cáscara es intermedia, su número de semillas/fruto esta entre 30 – 52, tamaño de la semilla es pequeña-mediana y su color de cotiledones es morado.

El clon Pound 12, el cual es más comercial, tiene una aceptación intermedia en cuanto a color y apariencia en general, teniendo baja aceptación en cuanto a aroma **(SANDOVAL, 2009)**.

Figura 6. Característica del fruto de cacao Pound-12 (P-12).

2.1.4.2 Raza Criollo

El criollo se cultivaba en América central antes de la colonización, a partir de México, se propagó hasta Venezuela, algunas islas del Pacífico, Indonesia y Sri Lanka, actualmente se cultiva cada vez en menor proporción **(MORILLO, 2005)**. Son árboles poco vigorosos, de lento crecimiento, más susceptibles a enfermedades e insectos que los forasteros y se caracterizan por su alta diversidad morfológica, el fruto es de forma variable (alargados, amelonados y cundeamor), las mazorcas son rojas o verde al estado inmaduro y tienen un pericarpio ligeramente lignificado **(GARCIA, 2008)**.

El grupo Criollo, es conocido como cacao fino, produce un fruto aromático, afrutado y dulce, pero tiene bajos rendimientos, las almendras son de tamaño mediano con cotiledones claros que presentan un delicado aroma de chocolate acompañado por un sabor de nuez suave y frutas **(GIL, 2012)**. Los granos requieren de dos a tres días para fermentar **(PALACIOS, 2008)**.

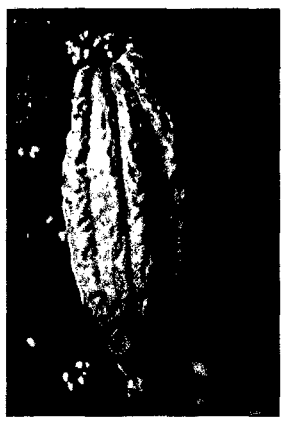


Figura 7. Característica del fruto de cacao de raza criollo

2.1.4.3 Híbridos

Según **ARCINIEGAS (2005)** los cacaos **Trinitarios** están conformados por híbridos, se originó cuando un genotipo criollo se cruzó naturalmente con un genotipo amelonado del Brasil (forastero del bajo Amazonas), por esta razón, estos materiales presentan características morfológicas y genéticas de ambas razas, siendo los genotipos típicos de Granada, Jamaica, Trinidad y Tobago, ocupan del 10 al 15% de la producción mundial. Los trinitarios aparecieron en Trinidad alrededor del año 1 800. Es un tercer grupo, son árboles que nunca se han encontrado en estado silvestre **(GARCIA, 2008)**.

Los trinitarios presentan diversas formas de mazorcas, hallándose de colores verdes y rojos cuando están inmaduras, tornándose en algunos casos anaranjadas y amarillas en la madurez; generalmente presenta almendras de tamaño mediano a grande con cotiledones rojizos y desarrolla un aroma a chocolate pronunciado con un sabor adicional definido como frutal **(PALACIOS, 2008)**.

Figura 8. Características del fruto de cacao Trinitario.

Imperial College Selection (ICS-1): Es originario de Trinidad, de fruto mediano, forma elíptico, color rojo del fruto inmaduro, color de cotiledones de la semilla es morado, peso seco de semilla 1,3 g, índice de mazorcas 18, 46 semillas por fruto, es tolerante a la escoba de bruja, ligeramente susceptible a moniliasis, y una calidad organoléptica fina **(PHILLIPS *et al.*, 2012).**

Su contenido de grasa es 53%, sabores básicos y específicos de pulpa de dulzura media, acidez media, astringencia baja, amargor de almendra medio, floral bajo y frutal medio; sabores básicos y específicos del licor de acidez media, amargor medio, astringencia moderada, floral muy bajo, frutal bajo, nuez ausente y posee una concentrada intensidad de chocolate **(GARCIA, 2009)**.

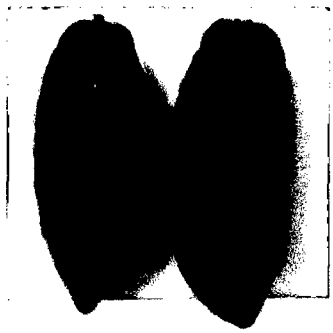


Figura 9. Característica del fruto de cacao Imperial College Selection (ICS-1).

Imperial College Selection (ICS-95): su originario de Trinidad, tiene fruto mediano, color rojo del fruto inmaduro, su cascara es delgada, su semilla tiene forma en sección longitudinal elíptica, forma en sección transversal intermedia y el color de los cotiledones es morado; en la productividad el tamaño del fruto es grande, 35 semillas/fruto, tamaño de semilla intermedia, peso seco de semilla 1,3 g, índice de mazorca 22, rendimiento 682 - 2,045 kg/ha, es tolerante a la escoba de bruja, moderadamente resistente a moniliasis y de calidad organoléptica fina.

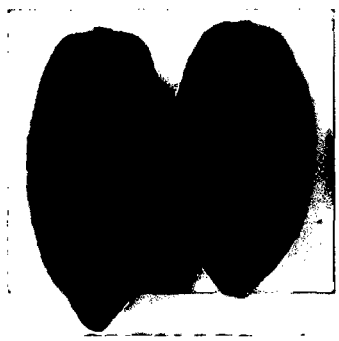


Figura 10. Característica del fruto de cacao Imperial College Selection (ICS-95).

Además tiene descriptores industriales 56% de grasa; sabores básicos y específicos de pulpa tiene dulzura baja, acidez baja, baja astringencia, amargor de almendra baja, floral bajo y frutal medio; sabores

básicos y específicos del licor tiene una nota intermedia de corteza y nuez, también tiene ligeras notas de fruta tropical, la intensidad del chocolate tiende a ser moderado **(GARCIA, 2009)**.

Híbrido Seleccionado en Trinidad (TSH-1188): Es originario de Trinidad y Tobago, la descendencia proviene del cruce de los clones POUND-18 x TSH-753. El peso del fruto es 839,36 g, la longitud del fruto 22,51 cm, la anchura 9,76 cm, el espesor de la pared de la vaina 17,1 mm, peso húmedo total de grano 208,27 g, sin mucílago 88,98 g, la anchura del cotiledón 1,17 cm, la longitud del cotiledón 2,4 cm, el espesor del cotiledón 0,95 cm, número de granos 48,1; peso seco del grano 1,241 g, el cotiledón (sin testa) 1,184 g, el índice de la vaina 18,36, mínimo 13,45 y máximo 25,33 **(MAHARAJ *et al.*, 2011)**.

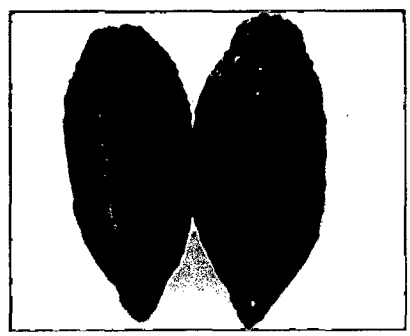


Figura 11. Característica del fruto de cacao Híbrido Seleccionado en Trinidad (TSH-1188).

2.1.5 Aspectos importantes para mejorar la genética de cacao

Los clones: Son grupos de plantas reproducidas vegetativamente originadas en un solo árbol de rendimiento sobresaliente, todos los individuos de dicho grupo presentan condiciones similares en la apariencia física (vigor, tipo, color,

tamaño de los frutos, productividad, etc.) algunos de los clones recomendados por la federación nacional de cacaoteros son los siguientes: Para bosque húmedo tropical, alta precipitación, alta humedad ambiental sobresalen el MON-1, ICS-1, CCN-51, TSH-565, IMC-67 **(GUTIERREZ Y HOLGUIN, 2007)**.

Jardines clónales: Son la fuente de material vegetativo para la reproducción de los clones. Podrían actuar simultáneamente como parcelas demostrativas o ensayos regionales, en cuyo caso se deben establecer bajo un diseño experimental adecuado y asignar de forma aleatoria la posición de los clones en el campo **(PHILLIPS *et al.*, 2012)**. Los jardines clónales se clasifican en dos partes:

- **Jardín clonal para producción de varas yemeras:** Es donde se siembran los clones plenamente identificados, por su rendimiento, calidad y tolerancia a enfermedades, y cuyas plantas se preparan para proveer en forma constante de material vegetal fresco, joven y sano, lo cual garantiza un alto rendimiento en el proceso de injertación, buen índice de mazorcas y grano, adaptados al ambiente y con buenas características industriales. Los clones más utilizados para plantaciones comerciales son: ICS-1, ICS-39, ICS-95, TSH-565, TSH-1188, IMC-67, CCN-51, ICS-6, UF-650, UF-613 e híbridos de súper árboles.
- **Jardines clónales para producción de semilla para patrón:** Es el área de terreno aislada por lo menos a 500 metros de cualquier plantación comercial o de cultivares que no se incluyan como progenies. En este terreno están sembradas los clones plenamente identificados como tolerantes a condiciones adversas de ambiente, suelo y/o patógenos vegetales y animales. Los árboles

que conforman este jardín deben producir semilla con características ideales, exigidos a un patrón, entre las que se destacan vigor, precocidad, afinidad, adaptabilidad, tolerancia a condiciones adversas del suelo, tolerancia a enfermedades y longevidad. Se recomienda la semilla de los cruces de los clones IMC-67, P-7, P-12, EET-400 e híbridos con características similares al IMC-67 los cuales presentan buena adaptación a suelos, pH bajos y poseen tolerancia a Ceratocystis.

2.1.6 Definición del grano de cacao

Según **SULLCA (1992)** el fruto puede alcanzar una longitud de 15 - 25 cm, cada fruto contiene entre 30 y 40 semillas, que una vez secas y fermentadas se convierten en cacao en grano. Las almendras del cacao constituyen el insumo básico para la industria del chocolate y sus derivados, la industria cosmética y farmacéutica **(GONZALES *et al.*, 2007)**.

El cacao fino son almendras que poseen alto potencial aromático (floral) y bajo contenido de sustancias amargas (taninos) y que por lo tanto sus delicadas bondades sensoriales le permiten distinguirse de otros cacaos y dar un toque más refinado al chocolate **(VERDESOTO, 2009)**.

2.1.7 Calidad del grano de cacao

Para la calidad del cacao se deben tomar parámetros como el aspecto físico de la almendra y las propiedades intrínsecas de sabor y aroma, el primero estaría determinada por el cumplimiento adecuado de las prácticas de cultivo y postcosecha y la calidad de sabor y aroma, demostró que está

completamente ligado al origen de las almendras, tratamientos óptimos de postcosecha (fermentado y secado) o beneficio y posterior tostado y especifica que el aroma es la suma de una fracción genética presente en la almendra, una fracción desarrollada durante la fermentación y secado y otra fracción formada en el proceso de tostado **(VERDESOTO, 2009)**.

La calidad del cacao depende de las exigencias de cada mercado y del fin a que se lo destine, siendo el cacao la materia prima del chocolate **(SANCHEZ, 2007)**.

2.1.7.1 Evaluación sensorial

Según **JIMENEZ (2006)** indica que es una técnica reproducible para identificar, cuantificar y describir las características del grano de cacao para determinar sus atributos de la calidad sensorial como: sabor a cacao, acidez, astringencia, amargor, floral, frutal, nuez, tierra, moho y otros, es una disciplina de los panelistas para medir, analizar e interpretar las reacciones de las características de los alimentos percibidos por los órganos de los sentidos.

Para el fabricante, la evaluación sensorial es la única prueba confiable para determinar si puede utilizar determinado cacao para sus productos **(SANCHEZ, 2007)**, manifiesta que los sabores más frecuentes que se encuentran en una degustación en licores de cacao, son los siguientes:

- **Sabores básicos**

Acidez: Se incrementa durante el fermentado, ya que se produce ácido acético que se infiltra en los cotiledones, produciéndose una serie de reacciones que generan el sabor y aroma característico del cacao **(PORTILLO *et al.*, 2006)**.

Se la describe como un sabor ácido, debido a la presencia de ácidos volátiles y no volátiles y se la percibe a los lados y al centro de la lengua, se puede relacionar con las frutas cítricas y vinagre **(SANCHEZ, 2007)**.

Astringencia: La alta astringencia, está determinado por los compuestos polifenólicos, existiendo una correlación negativa con la astringencia, es decir que a medida que trascurre el tiempo de fermentación, disminuye la astringencia de los granos, la alta astringencia indica que los granos no han alcanzado el óptimo en el índice de fermentación **(LUNA *et al.*, 2002)**. Más que un sabor es una sensación que causa una contracción de la superficie de las mucosas de la boca, dejando una sensación seca y áspera en la lengua, además produce salivación generalmente debido a la falta de fermentación y se percibe primero en toda la boca, lengua, garganta y hasta en los dientes un sabor floral pero después es amargo, parecido al sabor de las hojas de plátano **(SANCHEZ, 2007)**.

Amargor: Los granos de cacao secos presentan amargor, lo que indica que está determinado por la presencia de cafeína y teobromina, **(ADRIAZOLA, 2003)**. Según **DIAZ y PINOARGOTE (2012)**, describe un sabor fuerte y amargo, en respuesta a una falta de fermentación; se percibe en la parte posterior de la lengua o en la garganta, tiene referencia con el café, cerveza y toronja.

- **Sabores específicos**

Sabor a cacao: Durante la fermentación y secado se forman los compuestos precursores de sabor y aroma que durante el tostado reaccionan y dan origen característico al chocolate con sabor a cacao **(SANCHEZ, 2007)**.

El sabor frutal: Según **DIAZ y PINOARGOTE (2012)**, describe el sabor y aroma a fruta madura, combinado con notas dulzainas agradables. Se tiene como referencia: cualquier fruta seca madura, fruta cítrica madura y seca; ciruelas pasas. Además **SANCHEZ (2007)**, menciona que los compuestos volátiles como las pirazinas y los aldehídos representan un sabor básico, los esteres originan un sabor a fruta.

El sabor floral: El cacao producido en una altitud media concentra sabores frutales, existe mayor sabor a floral, debido al sabor propio del cacao agridulce, generado por su propia característica y por el entorno del ambiente que está en contacto con plantaciones de frutas cítricas, **(SALVADOR, 2008)**.

Describe aroma a flores, con tonos perfumados, se tiene como referencia: lilas, violetas, flores de cítricos **(DIAZ y PINOARGOTE, 2012)**.

El sabor nuez: El sabor predominante a nuez se ha encontrado principalmente el complejo polipéptidos – fenoles y pirazina, indican que los sabores a nuez se concentran en la zona alta de 400 a 800 m.s.n.m, **(CROSS y JEANJEAN, 1997)**. Según **SANCHEZ (2007)**, se describe como un sabor similar a la nuez, característico de los cacaos tipo Criollos y Trinitarios.

Crudo/verde: Sabor adquirido, muestras con sabor manchoso crudo.

2.1.8 Beneficio del cacao

En el cultivo de cacao el beneficio constituye parte fundamental y decisiva para obtener buena calidad del grano, y permitir su correcta comercialización en el mercado nacional e internacional. Con un beneficio adecuado se desarrollan en la almendra los principios fundamentales del sabor,

el aroma y la calidad, lo que determina en gran medida su condición de finos y aromáticos, es decir la calidad del producto final **(ARCINIEGAS, 2005)**.

Recolección: Siendo esta una de las fases importantes del proceso, se debe hacer la identificación de las mazorcas maduras, debido a que estas otorgan los sabores innatos del chocolate.

Partida y desgrane de las mazorcas: Es de gran importancia evitar causar daños mecánicos a las almendras, pues quedarán predispuestas al ataque de hongos e insectos, y los granos que lleguen al final del proceso, presentarán un aspecto defectuoso que alterará la calidad del producto.

Fermentación: Proceso que comprende la eliminación de la baba o mucílago del cacao y la formación dentro de la almendra, de las sustancias precursoras del sabor y aroma del chocolate. Durante el proceso, la acción combinada y balanceada de temperatura, alcoholes, ácidos, pH y humedad matan el embrión. La duración del sistema de fermentación depende de la variedad, y por ejemplo no debe ser mayor de tres días para los cacaos "Criollos" y de ocho días para los cacaos "Forasteros" **(ARCINIEGAS, 2005)**.

Secado: Según **MORILLO (2005)** tiene por objeto llevar el contenido del 60% aproximadamente en humedad de las almendras fermentadas a un valor del 6 o 7%. El contenido en humedad del cacao secado debe ser mantenido por debajo del 8% si se quiere asegurar al cacao buenas condiciones de conservación. Durante los primeros días del periodo de secado las reacciones internas, que afectan principalmente a los polifénoles de los cotiledones producidas en la fermentación, prosiguen y condicionan la calidad final del producto y su aroma.

2.2 Aspectos generalidades de polifenoles

2.2.1 Descripción

Los polifenoles son uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuamente distribuidos entre las especies vegetales, con más de 8000 estructuras químicas reportadas hasta el momento, que se caracterizan por tener en su estructura química al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo y frecuentemente se encuentran como derivados de esteres, éteres y glucósidos **(GIL, 2012)**.

PALADINO (2008) menciona que estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, defensa ante los factores adversos del ambiente, además están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia y dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal y la característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol.

2.2.2 Clasificación de los Polifenoles

Según **UGARTONDO (2009)** pueden clasificarse en grupos como los ácidos fenólicos (benzóicos y cinámicos), flavonóides (antocianinas, flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas), estilbenos y lignanos.

Los polifenoles comprenden una amplia variedad de moléculas que incluyen desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples

con un solo anillo fenólico en su estructura, como los alcoholes y ácidos fenólicos, los polifenoles alimentarios se pueden clasificar en dos grupos: extraíbles y no extraíbles.

Los extraíbles: Son compuestos de pesos moleculares bajos o medios que se pueden extraer empleando diferentes disolventes acuosos y acuoso-orgánicos **(LARREA, 2012)**. Se pueden clasificar en función de su estructura química tal como se presenta en la Figura 12 y se describe a continuación:

- Ácidos fenólicos, estructuras simples y que pueden aparecer libres, como el caféico, el ferúlico, el p-cumárico y el sináptico, o esterificados, como el clorogénico, isoclorogénico, neocolorogénico y criptoclorogénico.
- Flavonoides, estructuras mucho más complejas, que a su vez se subdividen en flavonas (crisina, rutina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavanoles o catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina), flavanonas (hesperidina, naringenina), antocianinas (delfinidina, malvidina, cianidina), taninos condensados con un número bajo de monómeros, etc.

Los flavonoides, nombre que deriva del latín "flavus", cuyo significado es "amarillo", se encuentran mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre (también llamados agliconas flavonoides) **(QUIÑONES *et al.*, 2012)**. Representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas, y en la actualidad, ya se han identificado más de 4000 compuestos diferentes, su estructura química común es un difenilpropano (C6-C3-C6), y consta de dos anillos aromáticos (A y B)

unidos a través de tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (anillo C) **(GRANADO, 2010)**.

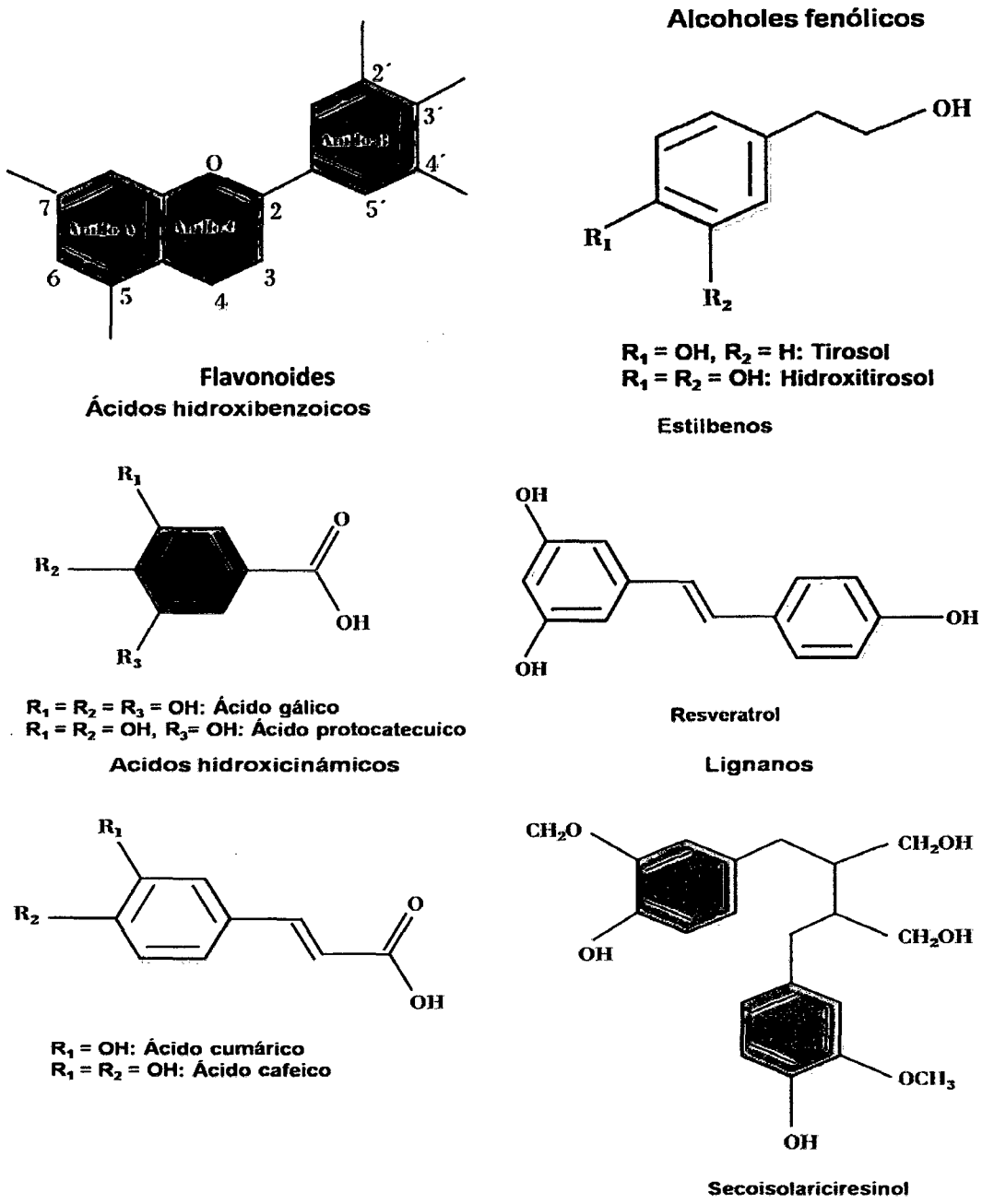


Figura 12. Principales clases de los polifenoles.

Ácidos fenólicos: Son compuestos no flavonoides más estudiados, se caracterizan por tener un ácido carboxílico funcional, forman un grupo diverso

que incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxinámico **(ODRIOZOLA, 2009)**.

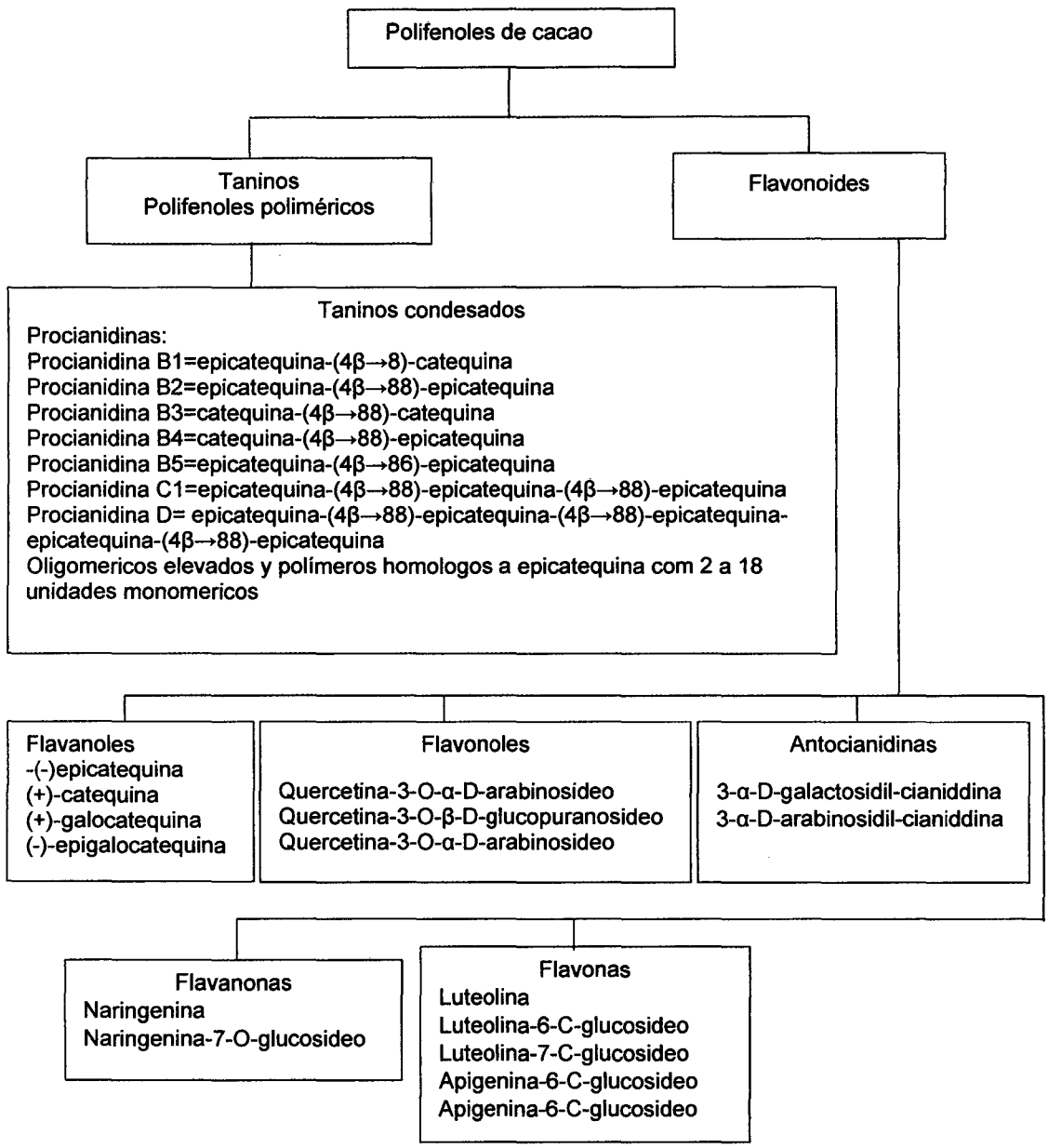
Los ácidos hidroxibenzoicos, como el ácido gálico y el ácido protocatecuico, se encuentran en muy pocos alimentos, forman parte de estructuras complejas como los taninos hidrolizables. Los ácidos hidroxicinámicos, son más comunes, representantes de este grupo son el ácido cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico **(GRANADOS, 2010)**.

Los polifenoles no extraíbles: Son compuestos con un elevado peso molecular, o polifenoles unidos a fibra dietética o proteínas que se pueden encontrar en los residuos de las extracciones, incluyen taninos hidrolizables y taninos condensados con un elevado número de unidades en la cadena polimérica **(LARREA, 2012)**.

2.2.3 Polifenoles en cacao

Los polifenoles de la semilla del cacao están almacenados en células distribuidas en grupos a través de los cotiledones. Son compuestos que participan activamente en las modificaciones bioquímicas en el interior de las almendras durante la fermentación como la oxidación enzimática, causa la disminución del contenido de polifenoles **(CALDERÓN, 2002)**. A través de la hidrólisis de las antocianinas y la polimerización de los monómeros y oligómeros de flavonoides, transformándolos en compuestos insolubles, como resultado disminuye la astringencia y amargor, influyendo positivamente sobre la calidad sensorial del cacao **(CROS, 2004)**.

Los polifenoles de interés en el cacao son los del grupo de flavonoides, como las catequinas (37%), antocianinas (4%) y procianidinas (58%) **(NEGARESH y MARIN, 2013)**. Los principales compuestos fenólicos encontrados en el cacao, se muestran en la Figura 13, resaltando los taninos y los flavonoides, los flavonoides presentes incluyen los flavonoles, flavanoles, antocianinas, flavonas e flavanonas.



Fuente: EFRAIM *et al.* (2011).

Figura 13. Principales polifenoles encontrados en granos de cacao.

En los granos de cacao, los polifenoles constituyen cerca del 8% en peso seco, son responsables del color café característico y el sabor del cacao procesado, así como de la astringencia y el amargor que se percibe en el producto final. Se ha estimado que la semilla de cacao contiene entre 78 000 y 100 000 ppm de polifenoles; una vez que se fermente los granos, estos conservan el 20% de los polifenoles originales, las células que pigmentan los granos poseen 70% de polifenoles y 3% de antocianinas p/p **(MARQUEZ, 2009)**.

2.3 Aspectos generales de las antocianinas

2.3.1. Definición

Las antocianinas tiene significado del griego *anthos* flor y *kyanos* azul, son el grupo más importante de pigmentos solubles al agua visibles para el ojo humano, forman parte de la familia de los polifenoles y se definen como flavonoides fenólicos. Los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras se deben a la presencia de estos pigmentos, se hallan en las células epidermales o subepidermales de la planta, principalmente en flores y frutos **(CUEVAS *et al.*, 2008)**.

Actualmente se conocen aproximadamente 20, las más importantes son la pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga

y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación del color rojo **(BADUI, 2006)**.

La fracción de antocianinas consiste principalmente de cianidina-3-arabinosay cianina-3-D-galactosa entre las procianidinas, la más abúndate son aquellas unidades diméricas, triméricas y oligoméricas de epicatequina y flavan-3,4-diol **(AGUILERA *et al.*, 1997)**.

Las antocianinas y antocianidinas son metabolitos secundarios de color morado a rosa en las semillas de cacao, son productos a partir de las leucoantocianidinas o procianidinas (compuestos incoloros) por la acción de la enzima antocianidina sintasa en la ruta de biosíntesis de flavonoides **(MARQUEZ, 2009)**.

2.3.2 Estructura de las antocianinas y color

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C (Figura 14). Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas que se muestran en el Cuadro. 1.

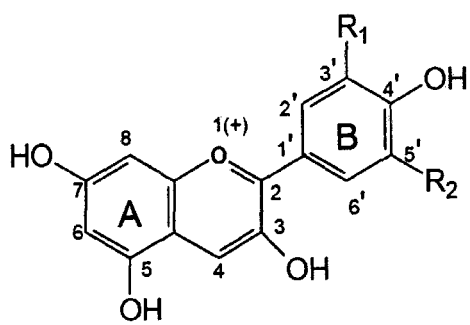


Figura 14. Estructura química de las antocianinas.

Su estructura química se conforma de un esqueleto que contiene quince carbono (C6-C6-C3), ordenados en dos anillos aromáticos (anillo A benzoil y anillo B hidroxicinamoil) unidos por un tercer anillo que consta de tres carbonos y un oxigeno (C_3O) **(MENDOZA, 2012)**.

Cuadro 1. Partes sustituyentes de las antocianinas.

Aglicona	Sustitución		λ max (nm)
	r1	r2	espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH_3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH_3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH_3	OCH_3	510 (azul-rojo)

Fuente: GARZON (2008).

En la naturaleza, las antocianinas presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes como la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa, otra variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos, pueden ser alifáticos como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico **(GARZON, 2008)**.

2.3.3 Factores que alteran la estabilidad de las antocianinas

La estabilidad de las antocianinas depende de factores como enzimas, pH, temperatura, oxígeno, luz, metales, etc.

Efecto del pH: Las antocianinas son más estables en un medio ácido que en un medio neutro o alcalino; en medio ácido la forma predominante es la del ión flavilio, da el color rojo, cuando esta es sometida a pH básico o alcalino, el ión flavilio es susceptible al ataque nucleofílico por parte del agua, produciéndose la pseudo base carbinol, esto es a pH 4,5 y seguido se forma la chalcona, las dos formas son incoloras **(CUEVAS *et al.*, 2008)**.

Azúcares: Los azúcares a altas concentraciones estabilizan a las antocianinas, por la baja actividad del agua, uno de los factores de degradación, por el ataque nucleofílico al catión flavilio que ocurre en el C-2 formando la base carbinol incolora y cuando los azúcares están en bajas concentraciones no tendrán efecto sobre la actividad del agua, provocando que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleren la degradación de las antocianinas **(CONDEZO, 2011)**.

Temperatura: Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras **(GARZON, 2008)**, además la velocidad de degradación se incrementa durante el procesamiento y almacenamiento a medida que la temperatura aumenta.

2.4 Generalidades de Antioxidantes

2.4.1 Definición

RAMOS *et al.* (2008) menciona que un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Se produce una oxidación, siempre que una especie cede electrones a otra, la especie que gana electrones se reduce, y la que pierde se oxida. En estas reacciones de oxidación, a veces, se pueden producir radicales libres, especies muy oxidativas y que pueden producir daños al organismo.

A nivel de la industria de alimentos, los antioxidantes resultaron de interés para la preservación y estabilidad de los mismos, reduciendo la velocidad de degradación de compuestos por la oxidación y la pérdida de su calidad nutritiva **(PELÁEZ, 2009)**.

2.4.2 Tipos de antioxidantes

Según **HICKS *et al.* (2006)** los tipos de antioxidantes son:

Antioxidantes enzimáticos

Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos. Se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar por diferentes mecanismos a las ERO, como es el caso de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px) entre otras.

Antioxidantes no enzimáticos

Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son: el glutatión en su forma reducida (GSH), algunos minerales como selenio, zinc, o vitaminas como

riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y α-tocoferol (vitamina E), éstos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes.

2.4.3 Radicales libres

Se entiende por radical libre a cualquier átomo o molécula que contenga algún electrón no apareado en su orbital externo y que puede existir en forma independiente. Los electrones no apareados provocan inestabilidad y un aumento en la reactividad. Los radicales libres, en un intento por completar sus pares de electrones interaccionan con moléculas adyacentes quitándoles electrones y como en una reacción en cadena, generan nuevos radicales libres **(PELÁEZ, 2009)**.

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son: Radical hidroxilo (HO)+; peróxido de hidrógeno (H_2O_2); anión superóxido (O_2); oxígeno singlete ($^1O_2$); oxígeno nítrico (NO); peróxido (ROO); semiquinona (Q) y ozono. La mitocondria es el principal productor de radicales libres (RL) o llamados especies reactivas de oxígeno (ERO), ya que la respiración celular se verifica específicamente a este nivel. Como se sabe el 90% del total del oxígeno inhalado se consume en la mitocondria y alrededor del 2% del oxígeno reducido se transforma en el radical superóxido ($O_2\cdot$). Otra fuente de este radical son los fagocitos activados que producen el superóxido como mecanismo protector frente a agentes u organismos extraños. Por otros mecanismos el radical superóxido se transforma en el radical hidroxilo ($OH\cdot$), que es aún más reactivo que el anterior **(LIMA, 2002)**.

2.4.4 Estrés oxidativos

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno **(VENEREO, 2002)**.

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular al mismo tiempo que involucra un peligro potencial debido a las características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una reactividad alta conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) **(MARTINEZ, 2007)**.

2.4.5 Función de los antioxidantes

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar interactúan más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, la acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas, lípidos, proteínas, ADN, etc. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos **(MENDOZA, 2012)**.

Las principales características de un sistema antioxidante son, la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la

estabilización del radical generado y la regeneración del antioxidante radicalario ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano **(MARTINEZ, 2007)**.

2.4.6 Método de análisis para la capacidad antioxidante

Entre los métodos desarrollados para medir la actividad antirradical son la actividad antioxidante equivalentes a trolox (TEAC), la capacidad de absorción de radicales de oxigeno (ORAC), la absorción total de radicales potenciales (TRAP), la fotoquimioluminicensia (PCL) y el método de decoloración del radical 2,2, difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) **(JULIÁN, 2009)**.

Radical 2,2, difenil-1-picrilhidracilo (DPPH): El fundamento del método desarrollado por Brand-Williams, consiste que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre, se calcula el IC_{50} que es la concentración de pulpa a la cual reduce en un 50% la concentración de radical DPPH **(RAMOS, 2008)**.

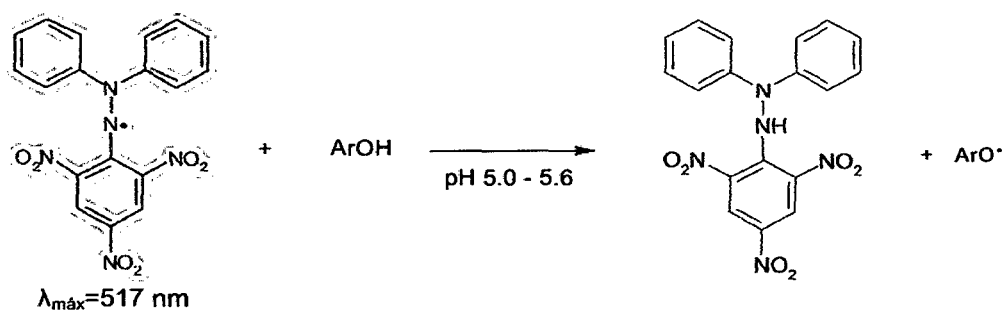


Figura 15. Reacción de decoloración del DPPH frente a los antioxidantes

Método del ABTS: En el método ABTS (ácido 2,2-azinobis (3etilbenzotiazoline)-6-acidosulfonico) el radical es generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP, enzimática (peroxidasa, mioglobulina)). Con este método, se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofilica como lipofilica. El cromoforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical ABTS una vez generado por medio de enzimas o químicamente pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a λ (414, 645, 734, 815 nm), pero se mide a una longitud de onda λ 734 nm. Una de las principales ventajas del uso de este radical es que tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y en medios orgánicos. Es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de antocianos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (λ 734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria **(OVACO y PINEDA, 2011)**.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia (CIPNA), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS); 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° 17'08" de Latitud Sur, a 75° 59'52" de Latitud Oeste, con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 84% y temperatura media anual de 24ºC; y en el laboratorio del Instituto de Cultivos tropicales (ICT), ubicada en el distrito de La banda de Shilcayo, provincia de san Martín , región de San Martin.

3.2 Materia prima

Las muestras fueron granos secos de cacao de:

- Criollo
- Forasteros (CCN-51, SCAVINA-6, IMC-67 y POUND-12)
- Trinitarios (ICS-1, TSH-1188 y ICS-95).

Procedentes de la estación experimental Juan Bernito del instituto de cultivos tropicales (ICT), ubicado en el distrito de la banda de Shilcayo - Tarapoto - San Martin, a una altitud de 360 m.s.n.m., a 06º 30' 07" de latitud

Sur, a 76º 20' 09" de latitud Oeste, con un clima tropical de húmedo y humedad relativa media de 60% y temperatura media anual de 30°C.

3.3 Equipos, materiales y reactivos.

3.3.1 Equipos de laboratorio.

Espectrofotómetro modelo Genesys 6 (Thermo Electrón Corporation) SN 2M6G261002, balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión), capacidad 200g y modelo Adventurer Pro AV114 (OHAUS) capacidad 110 g, estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS HeatringDrying Oven), congelador FFV-2065FW -20°C (Frigidaire, USA), refrigerador Icebeam Door Cooling LG modelo GR-5392QLC (Corea), desionizador modelo D 7035 (Barnstead), agitador magnético modelo 625 standard (VWRTM hotplate/stirrer), homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industrias. SITM), centrifuga modelo MIKRO 22R (Hettich) y pH - metro (Mettler Toledo Seven Easy) pH 0-1 4, T° 0-100°C SN 8513902, estufa mermert, conchadora marca Ultra grindy, molino marca chambion. descascarilladora, molinillo para granos eléctrico marca Bosch.

3.3.2 Materiales de laboratorio.

Matraces de Erlenmeyer de 50, 100 y 250 mL; vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 1000 mL; tubos de ensayo Gene Mate® de 10 mL; fiolas de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000 mL; probetas graduadas de 10, 100, 25O y 500 mL; frascos ámbar de 100mL y gradillas, termómetro de 150ºC.

3.3.3 Otros Materiales.

Micropipetas 0-10 µL, 10-100µL, 20-200µL y 100-1000 µL; cubetas de poliestireno Gene Mate® (1cmx 1cmx4.5cm); tips FISHERBRAND® (1000 y 200 µL); microtubos (1,5 - 2,00 mL); papel de filtro; espátulas y varilla de vidrio, bandejas de plástico, baldes de 1 L. transparentes, termómetro de 100 °C.

3.3.4 Reactivos y solventes

Acido clorhídrico (HCl) (Merk) pureza 36,5 %; ácido gálico ($C_7H_6O_5$) al 98,1% Sigma Atdrich; cloruro de potasio (KCl) (sigma) pureza 99,5; acetato de sodio (CH_3COONa) (Merk) pureza 99 %; Folin–ciocalteu'sphenolreagent, 2N, Sigma Aldrich; carbonato de sodio (Na_2CO_3) p.a. ISO. Scharlau; metanol 99% de pureza; etanol 99,99% Merck KGaA; 1,1-Diphenyl-1-picril-hydrayl (DPPH; Sigma Aldrich, USA); 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline – 6 ácido sulfónico) diammoniumsalt (ABTS; Sigma Aldrich, USA); persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) p.a. Sigma Chemical; agua desionizada (H_2Odd) y cloroformo 99,8% Merck. Germany.

3.4 Métodos de análisis

- **Cuantificación de polifenoles totales:** Se realizó por el método espectrofotométrico desarrollado por Folin Ciocalteu *et al.* (1927), reportado por **(SANDOVAL *et al.*, 2001)**.

- **Cuantificación de antocianinas:** Se realizó por el método del pH diferencial reportado por **POO (2005)**.

- **Determinación de la capacidad antioxidante**

Capacidad de inhibir radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), se utilizó el método espectrofotométrico de luz visible a 517nm descrito por **(BRAND-WILLIAMS *et al.* 1995)**.

Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6-ácido sulfónico) (ABTS+): Se realizó por el método descrito por **(PELLIGRINI *et al.*, 1999)**.

- **Evaluación sensorial del licor de cacao**: La evaluación sensorial se realizó según **BRAUDEAU (1970)**.

3.5. Metodología experimental

3.5.1 Acondicionamiento de la materia prima

Para el acondicionamiento de la materia prima se siguió el protocolo de micro fermentación de cacao por el método de la estufa **(ICT, 2003)**.

Para realizar la micro fermentación se realiza la post cosecha del cacao que se sigue los siguientes pasos:

Cosecha selectiva: Los frutos fueron cosechados teniendo en cuenta su índice de madurez, evitando la cosecha de frutos pintones, enfermos y sobre maduros, disponibles por cada uno de los genotipos, posteriormente estas han sido codificados y transportadas hasta el laboratorio.

Quiebre y desgrane: Luego se procede a realizar el quiebre de las mazorcas, para ello es necesario el uso de un machete sin filo inverso; a continuación las semillas son colocadas, sin la placenta en un envase hasta obtener la muestra

necesaria, para luego hacer las combinaciones de acuerdo a los porcentajes establecidos para cada muestra.

Fermentación: Consiste colocar aproximadamente 1 Kg de granos de cacao en un envase de plástico con orificios en la parte posterior para facilitar el exudado, se debe considerar un espacio de 2 cm con referencia al envase del fondo que sirve para recoger el exudado, la temperatura de la estufa fue 33°C ± 1 °C.

Primera remoción: Transcurrido las 48 h de proceso de la fermentación se procede a realizar la primera remoción de la masa de forma rápida para evitar la pérdida de calor, posteriormente se incrementa la temperatura en la estufa a 40°C.

Segunda remoción: La segunda remoción se realizó transcurrido las 72 h, la remoción se realizó de forma inmediata con la finalidad de evitar la pérdida de calor en la masa.

Tercera remoción: Esta remoción se realiza a las 96 h y posteriormente se incrementa la temperatura en la estufa a 45°C.

Cuarta remoción: Se realiza la remoción a las 120 h y se incrementa la a 47 °C, con la finalidad de generar calor en la masa.

Prueba de fermentación: Se realizó a las 144 h, para esta prueba se seleccionaron 10 semillas al azar, se cortó por la mitad para comprobar si la fermentación fue completa o no, se calificó como buena fermentación ≥ 7 semillas.

Secado: Se procedió al secado de los granos hasta una humedad 7,5%, según la norma Peruana NTP ISO 2291 (2006). Para ello los granos fueron colocados

en bandejas de madera debidamente codificados, asegurando un secado gradual que nos va permitir tener un grano de calidad y de baja acidez. La remoción de los granos en este proceso fue cada dos horas, utilizando un rastrillo de madera, permitiendo homogenizar los granos evitando la proliferación de los hongos.

Almacenado: Los granos secos de cacao fueron almacenados en bolsa de polietileno de alta densidad gruesa en congelación a -18°C, hasta su análisis.

3.5.2 Preparación del extracto

Las operaciones realizadas para la preparación de los extractos se muestran en la Figura 16 y se describe a continuación:

Descascarillado: Los granos de cacao serán descascarillados de forma manual, para la obtención de la almendras.

Molido: Se redujo el tamaño para facilitar el proceso de desengrasado, lo cual se hizo con un .molino de granos.

Desengrasado: El desengrasado se realizó por solvente en frio (método de Folch), consistió en pesar 20 g de muestra de cacao molido y macerado por 24 h en 50 mL de solvente (1:2 v/v. metanol y cloroformo), luego se filtró para separar la torta de la grasa; la torta fue secado en estufa a 45°C/15 min para evaporar el solvente.

Envasado: Las muestran de cacao molido desengrasado fueron envasados en bolsas de polietileno, y envueltas con papel metálica.

Almacenados: Las bolsas de polietileno conteniendo las muestras de cacao molido desengrasado fueron almacenadas a -18°C hasta su análisis.

Extracto: Se preparó un extracto hidroalcohólico de cacao a una concentración de 100 mg/mL, se pesó 2,5 g de muestra desengrasada, luego se enraso hasta 25 mL con solución hidroalcohólica (50/50 v/v), se transfirió a un frasco de vidrio de color ámbar, se tapó herméticamente y se macero por 24 h, se filtró y se almaceno en frascos de color ámbar a -18°C hasta su posterior análisis.

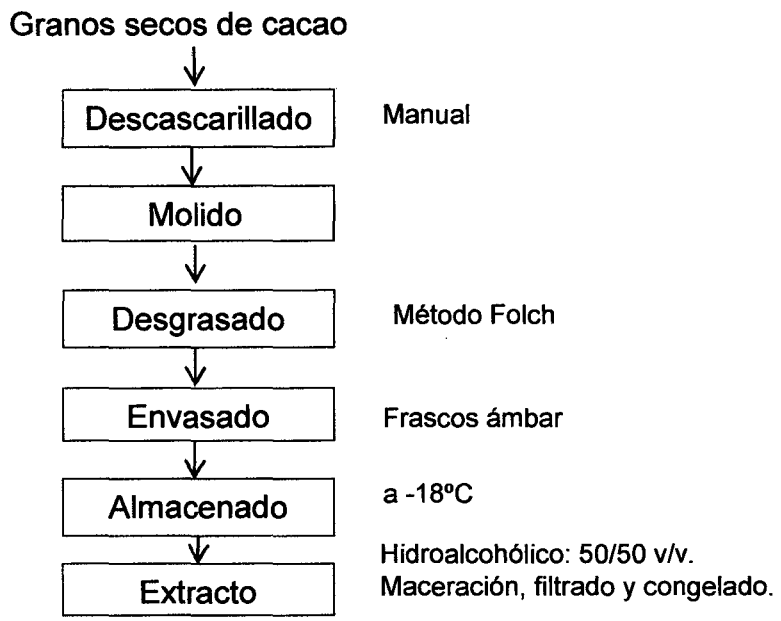


Figura 16. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao.

3.5.3 Cuantificación polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones

3.5.3.1. Determinación de la curva estándar

La curva estándar se realizó preparando una solución stock de 10mL de ácido gálico a una concentración de 2mg/mL a partir de ello se hicieron las concentraciones siguientes: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50 y 1,00 mg/mL, cada dilución se preparó por triplicado. Se agregó a cada tubo 1580 µL

de agua desionizada y 20 µL de muestra control y estándares, para el control se adicionó 20 µL de agua desionizada; se homogenizo ligeramente, luego se agregó 100 µL de solución de fenol Folin Ciocalteu, se incubo por 1 minuto a temperatura ambiente; se neutralizo la reacción agregando 300 µL de Na_2CO_3 al 20% y finalmente se incubo por 2 horas a temperatura ambiente, para una completa reacción, luego se realizó la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a 700 nm; con los resultados obtenidos se hizo la gráfica concentración vs absorbancia, se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

3.5.3.2 Cuantificación de polifenoles totales

La cuantificación de polifenoles totales de las muestras de granos secos de cacao Criollo y siete clones, se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL (filtrado y centrifugado 10000rpm/10min a 4°C), a partir de ello se realizó la dilución de trabajo a 10 mg/mL, con 3 repeticiones por tratamiento, luego se adiciono en los tubos de ensayos para cada tratamiento 1580 µL de agua desionizada, 20 µL de extracto diluido (10 mg/mL), 100 µL de fenol Folin Ciocalteu y finalmente 300 µL de Na_2CO_3 al 20% y se incubo por 2 h a temperatura ambiente y oscuridad, luego se hizo la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 700 nm.

Las absorbancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar y expresadas en equivalente de ácido gálico (g EAG/100g muestra).

Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se procedió a determinar la prueba de Tukey $p<0,05$ para ello se utilizó el programa SAS versión 9,0 (español).

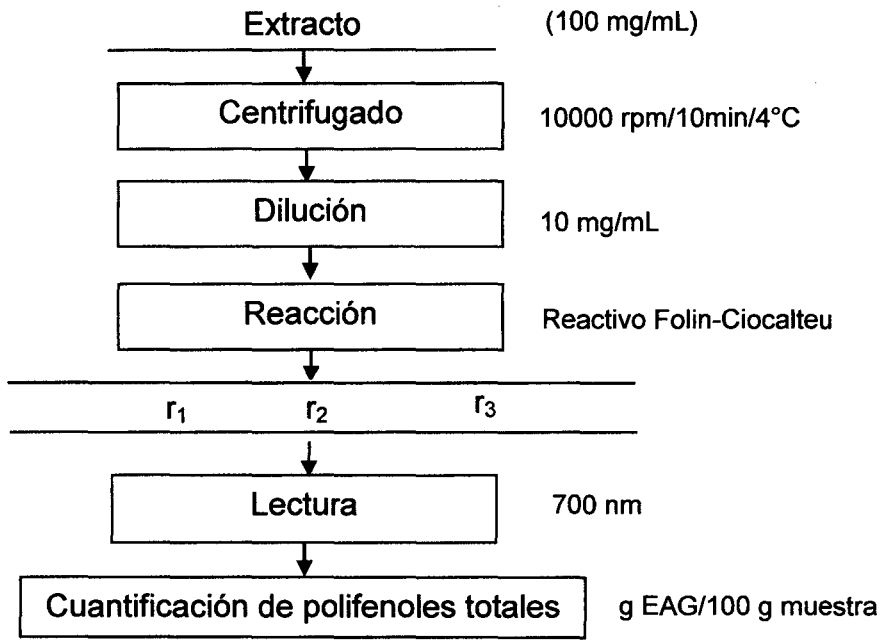


Figura 17. Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles en granos secos de cacao criollo y siete clones.

3.5.4 Cuantificación de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones

3.5.4.1 Preparación de la solución Buffer

Se preparó dos soluciones buffer:

Buffer pH = 1: 125 mL de 0,2 M KCl y 375 mL de 0,2 M HCl y aforado a 1 L con agua desionizada.

Buffer pH = 4,5: 200 mL de 1 M CH_3COONa, 120 mL de 1 MHCl y 180 mL de H_2O desionizada y aforado a 1 L.

3.5.4.2. Procedimiento de análisis

Para la cuantificación de antocianinas se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL, filtrado y centrifugado 10000rpm/10min a 4°C, se trabajó con 3 repeticiones por tratamiento, tal como se muestra en la Figura 18, en una cubeta de poliestireno se adicionó 200 µL de extracto de las muestras (SCAVINA-6, Criollo, CCN-51, ICS-1 y ICS-95) más 800 µL de buffer para ambos pH (1 y 4,5); para los tratamientos que no alcanzaron las absorbancias requeridas se adicionó 250 µL de extracto (TSH-1188, POUND-12 y IMC-67) más 750 µL de buffer y para el control se adicionó 1 mL de buffer para cada pH (1 y 4,5), y se hizo la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 510 nm.

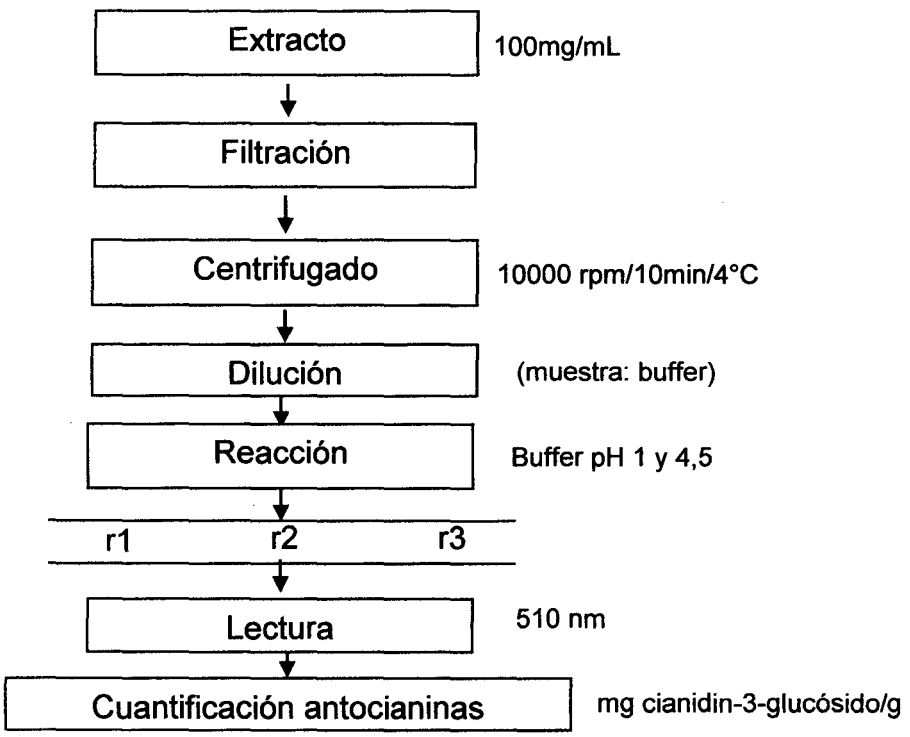


Figura 18. Diseño experimental para la cuantificación de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones.

Las absorbancias obtenidas serán reemplazadas en la ecuación y expresadas en mg cianidina-3-glucósido/g muestra.

$$C(mg/g) = \left(A_{pH=1,0} - A_{pH=4,5}\right) * 482{,}82(1000/24825) * DF$$

Dónde: C (mg/g) = mg de cianidína-3-glucósido por g de muestra seca. PM = La masa molecular de la cianidína-3-glucósidoes 484,82, AbM = La absortividad molar a 510 nm, a pH = 1,0; pH = 4,5 es la corrección de la formación de productos de degradación es 24825 y DF= Factor de dilución.

3.5.5. Determinar la actividad antioxidante de granos secos de cacao criollo y siete clones

3.5.5.1. Capacidad de inhibir radicales libres 1,1-diphenil-2-picrylhidrazil (DPPH)

Para la determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical DPPH el procedimiento se presenta en la Figura 19, para ello se preparó 10 mL de solución stock de DPPH a 1mM en metanol al 99% de pureza, se agitó hasta la solubilización completa del compuesto y se almacenó a 4°C protegido de la luz. A partir de ésta solución stock se preparó 50 mL de DPPH a 100 µM en metanol al 99% de pureza. El coeficiente de inhibición (IC_{50}) indica la cantidad de extracto de cacao mg/mL, requerido para inhibir el 50% del radical libre DPPH.

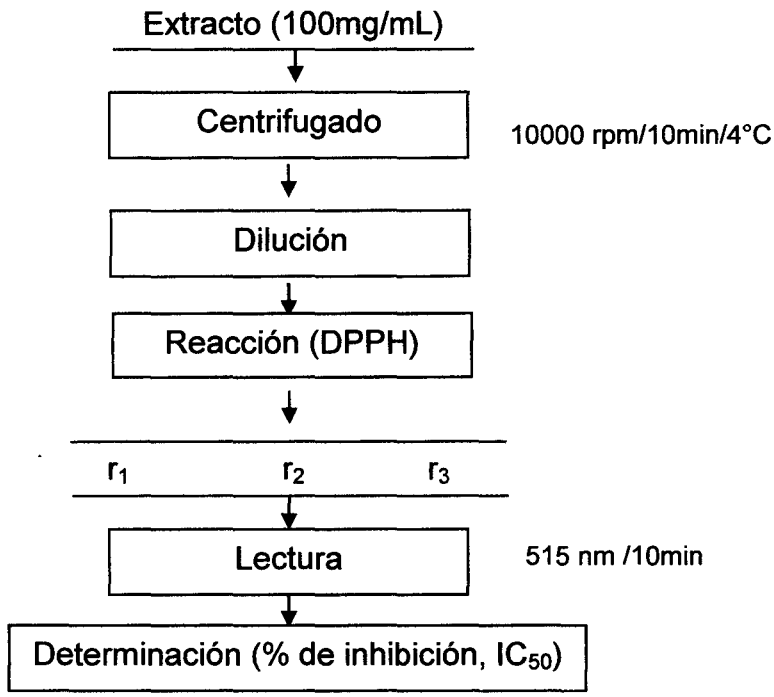


Figura 19. Diseño experimental para la evaluación de la capacidad antioxidante en granos secos de cacao criollo y siete clones.

A partir de ello se prepararon soluciones de trabajo tal como se describe en el Cuadro 2 y 3.

Cuadro 2. Concentraciones utilizadas para el análisis de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH.

Concentración (µg/mL)	Clones de cacao							Criollo
	SCA-6	CCN-51	IMC-67	P-12	ICS-1	ICS-95	TSH-1188	
21,875						x		
25	x	x			x		x	x
31,25				x				
37,5			x					
43,75						x		
50	x	x			x			x
62,5				x			X	
75			x					
87,5						x		
100	x	x			x			
125				x			X	x
150			x					
175						x		
200	x							
250		x		x	x			x
300							X	
350			x					

Cuadro 3. Preparación de soluciones de trabajo.

Solución de trabajo (µg/mL)	Extracto 100 mg/mL (µL)	Solución hidroalcólica (µL)	Volumen final (µL)
21,88	8,8	991,2	1000
25	10	990	1000
31,25	12,5	987,5	1000
37,5	15	985	1000
43,75	17,5	982,5	1000
50	20	980	1000
62,5	25	975	1000
75	30	970	1000
87,5	35	965	1000
100	40	960	1000
125	50	950	1000
150	60	940	1000
175	70	930	1000
200	80	920	1000
250	100	900	1000
300	120	880	1000
350	140	860	1000

En una cubeta de poliestireno se adicionó 25 µL del volumen final de la solución de trabajo y 975 µL de solución DPPH a 100 µM, se realizó la lectura en un espectrofotómetro de UV/VIS a una longitud de onda de 517 nm con intervalos de 30 s por un tiempo de 10 min. Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%\,Inhibición\;\; DPPH \;= \left[\frac{(AbsControl \;- AbsMuestra\;)}{AbsControl}\right] \times 100$$

Dónde: Abs Control: Absorbancia del control y Abs Muestra: Absorbancia de

la muestra en 10 min.

El diseño experimental de trabajo se presenta en la Figura 19, los resultados de la capacidad de inhibir (IC_{50}) del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) **(RITCHEY, 2002)** y en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey $p<0,05$, mediante el programa SAS versión 9,0 (español).

3.5.5.2 Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico) ($ABTS^{o}+$)

Según la metodología desarrollada por **PELLIGRINI *et al.* (1999)** el radical $ABTS^{o}+$ se forma tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (140mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $ABTS^{o}+$ se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia entre 0,7 a 1,2. Para la inhibición del radical $ABTS^{o}+$ en las distintas muestras se realizó el filtrado y centrifugado 10000rpm/10min a 4°C, a partir de ello se prepararon soluciones de trabajo. En el Cuadro 4 se describe el modo de operación que se siguió.

Cuadro 4. Preparación de soluciones de trabajo de muestras de cacao para el análisis de ABTS °+.

Concentración (µg/mL)	Clones de cacao							
	SCA-6	CCN-51	IMC-67	P-12	ICS-1	ICS-95	TSH-1188	Criollo
150			X					
140				X				
120							X	
100		X			X	X		X
80	X		X	X				
60							X	
50		X		X	X	X		X
40			X					
35	X							
30							X	
25		X			X			
20						X		X
17,5	X							
10			X	X				
5	X	X			X	X	X	X

Cuadro 5. Soluciones de trabajo de muestras de cacao para el análisis de ABTS °+.

Solución de trabajo (µg/mL)	Extracto 100 mg/mL (µL)	Solución hidroalcólica (µL)	Volumen Final (µL)
150	150	850	1000
140	140	860	1000
120	120	880	1000
100	100	900	1000
80	80	920	1000
60	60	940	1000
50	50	950	1000
40	40	960	1000
35	35	965	1000
30	30	970	1000
25	25	975	1000
20	20	980	1000
17,5	17,5	982,5	1000
10	10	990	1000
5	5	995	1000

Luego en una cubeta de poliestireno se adicionó 10µL de la solución de trabajo y 990µL del radical ABTS °+. La disminución de la absorbancia se registró a 734 nm por espacio de 10 minutos.

El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%\ \text{inhibicion ABTS} = \frac{(\text{Ac} - \text{Am})}{\text{Ac}}\ \text{x}100$$

Dónde: Ac: absorbancia de los controles y Am es absorbancia de la muestra en función del tiempo (10 min).

3.5.6 Evaluación sensorial del licor de cacao criollo y siete clones

Preparación del licor de cacao

La limpieza, es la primera etapa en el procesamiento la cual consiste en eliminar cuerpo extraños y granos defectuosos, luego pasar al tostado y/o torrefacción donde a través de aire sobrecalentado de 115 °C por 20 minutos los granos son tostados con la finalidad de separar la cascarilla del grano así como también reducir su humedad, definir el sabor y aroma típica del chocolate y cada 10 min se remueve, luego se deja enfriar 25 °C por 20 min para que no haya una pérdida de aroma, transcurrido el tiempo pasa al ser triturado donde se hace pasar los granos primero por una máquina que estruja la semilla para que libera la cascarilla estas máquinas impulsan los granos sobre la placas de impacto a grandes velocidades provocando la ruptura, los nibs de cacao son molidos hasta que esté suficientemente fino y para ayudar con la finura pasa a un conchado a 50 °C por 4 h fluctúan dependiendo de las exigencias para el producto final. El licor obtenido se colocó en un recipiente de plástico; se identificó la muestra, colocando en la etiqueta: fecha de elaboración, tipo de cacao, código de la muestra. Se dejó enfriar y luego se almacenó a 4 °C, hasta el momento de las evaluaciones sensoriales, en la Figura 20 ilustra el proceso seguido para la elaboración del licor de cacao.

Para la evaluación sensorial se sacó los licores de cacao por tratamiento, durante la evaluación los licores se llevaron a una temperatura de 40 a 45 °C, hasta consistencia fluida, con tres repeticiones por tratamiento. Cada catador tomó una cantidad pequeña de licor de cacao en el extremo de una paleta plástica pequeña y la colocó uniformemente sobre su lengua.

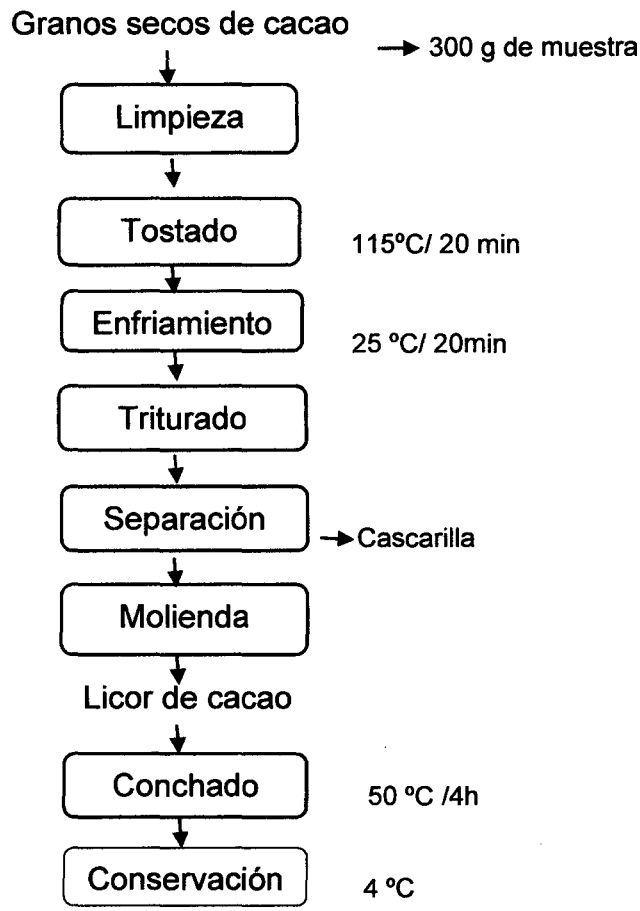


Figura 20. Flujograma para la elaboración de licor de cacao.

El catador mantuvo la muestra en su boca por espacio de 15 a 20 segundos, determinando los atributos de cada una de ellas y registrando los resultados en un formato diseñado para el efecto (A-I). Las puntuaciones fueron de 0 – 10 con los calificativos siguientes: 0= ausente, 1-3= Intensidad

baja, 3-5= Intensidad media, 6 - 8 = Intensidad alta y 9 a 10 = Intensidad muy alta o fuerte.

Se utilizó 2 catadores entrenados, las degustaciones se realizaron en forma individual y antes de continuar con la siguiente muestra, los catadores esperaron unos minutos para que se pierdan los sabores remanentes de la muestra anterior tomando agua o consumiendo galletas. Se realizó una sesión por día, evaluando en cada sesión un máximo de 5 muestras de licor de cacao.

Se realizó un análisis multivariado, asociando las variables organolépticas (sabores básicos, específicos y adquiridos), además, se realizó el análisis de componentes principales (ACP) para graficar su respuesta en un Cluster (dendrograma) y conglomerados **(FRANCO y HIDALGO, 2003)**, el cálculo se realizó en el programa de INFOSTAT versión libre.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Cuantificación polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones

4.1.1. Determinación de la curva estándar

Para la cuantificación de polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones fue necesario establecer una curva patrón y se elaboró en base al ácido gálico; las diluciones estuvieron comprendidas entre 1 a 0,0625 mg/mL, los resultados se presentan en el siguiente Cuadro 6 y Figura 21.

Para la curva estándar se utilizó compuestos puros y recomendados por los protocolos de análisis, al respecto, **SOGI *et al.*, (2012)** utilizó ácido gálico para la curva estándar cuya concentración fue 10 a 100 µg/mL y fue leído a 725 nm. Así mismo, **ANDREW *et al.* (1989)**, indican que el método de Folin-Cioucalteu permite medir fenoles totales y para la cuantificación debe crearse la curva de calibración y puede realizarse con ácido gálico (EGA), porque este es un compuesto estable y se pierde solo 5% de su valor real después de dos semanas de refrigerado y tapado.

Cuadro 6. Resultados de las absorbancias para la curva estándar de polifenoles (mg EAG/100g).

Concentraciones (mg EAG/mL)	Absorbancias (700nm)			Promedio
	r1	r2	r3	
1,000	0,976	0,995	1,099	1,023
0,500	0,525	0,523	0,552	0,533
0,250	0,286	0,244	0,243	0,258
0,125	0,122	0,120	0,123	0,122
0,063	0,049	0,052	0,056	0,052

Los valores representan (promedio) datos provienen del experimento (n=3)

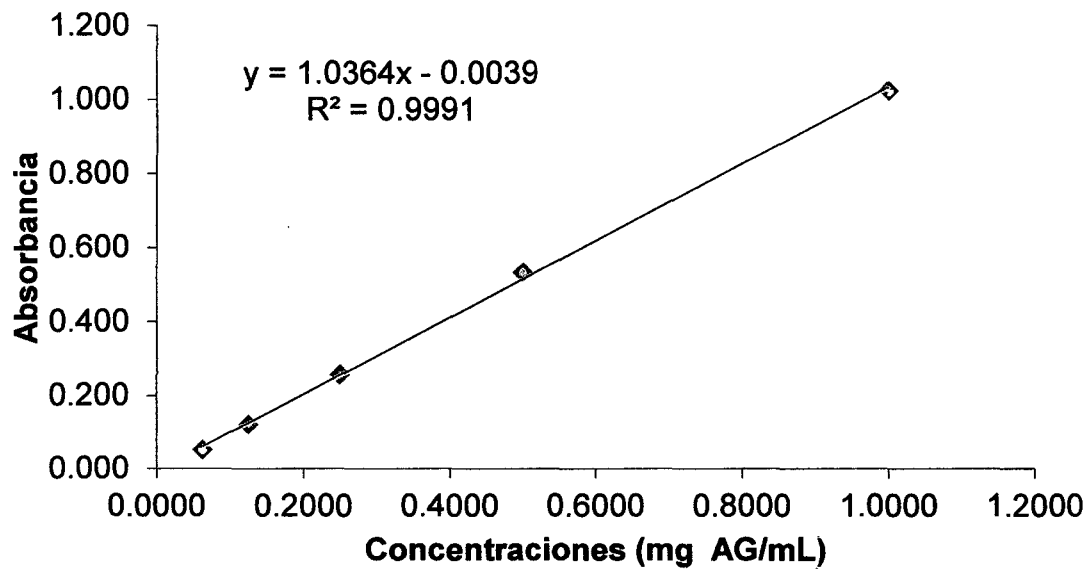


Figura 21. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales

Según los resultados de la gráfica la ecuación encontrada es de primer orden teniendo como variables "y" (absorbancia) y "x" (concentración), al respecto **CORDOVA (2003)**, indica que la forma de estudio de la asociación entre las variables "x" e "y" es la regresión, que consiste en determinar una

relación funcional entre ellas, con el fin de que se pueda predecir el valor de una variable en base a la otra. El valor de R^2=0,9991 indica que existe una relación positiva muy fuerte o casi perfecta **(HERNANDEZ *et al.*, 2001)**. Así mismo, valores cercanos a 1 se considera ajustes casi perfectos, tiene una buena estimación de ajuste de los datos e implica que en el diagrama de dispersión correspondiente a las variables X y Y los puntos se disponen a lo largo de una línea recta **(RITCHEY, 2002)**.

4.1.2. Cuantificación de polifenoles totales

Los polifenoles predominantes de los granos de cacao de diferentes países del mundo son especialmente catequinas, epicatequinas, dimeros de epicatequina, procianidina, en el presente estudio se presenta en el Cuadro 7 y Figura 22 los resultados de la cuantificación de polifenoles totales en los granos de cacao criollo y siete clones. Realizando el análisis estadístico de las muestras se encontró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (A-II), comparando los promedios mediante la prueba de tukey ($p \leq 0,05$) podemos indicar que el mayor contenido de polifenoles totales se encontró en los clones SCAVINA-6 (clon forastero) fue 5,721±0,039 g EAG /100g y ICS-95 fue 5,592±0,051g EAG /100g (clon trinitario); según **NIEMENAK *et al.*, (2006)**, reporta un mayor contenido de polifenoles para el clon ICS-95 en grano fresco 13,94, fermentado 1 día 13,57 y a 2 días 14,36 g EEC/100g, pero **ZAPATA *et al.*, (2013)** reporta un contenido de polifenoles totales de ICS-95 3,522±2,77 g EAG/100g siendo el segundo en la comparación de 5 clones;

NEGARESHY y MARÍN (2013) en grano de cacao del clon ICS-95 encontró 6 g EAG/100 g siendo este muy cercano al reportado en la investigación.

Con respecto al clon SCAVINA-6 este tiene el contenido de polifenoles más alto, este comportamiento puede ser explicado por **CUBERO (1990)**, el porcentaje de polifenoles totales fue mayor en los acriollados y en el cultivar Catongo que en el grupo forastero sin fermentar; al fermentarse este último cultivar contenía mayor cantidad que el grupo trinitario, el cual no presentó diferencias estadísticas significativas con el Catongo y finalmente el grupo Criollo.

La familia Scavina aunque tiene semilla y frutos muy pequeños, también tiene un potencial de producción y una alta resistencia a la enfermedad escoba de bruja. Se pudo detectar que compuestos como la galactosa y la fructosa presentes en mayor cantidad en los clones resistentes, además se piensa que son los polifenoles son los responsables de la resistencia **(ENRIQUEZ, 1984)**.

Cuadro 7. Cuantificación de polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones.

Muestra		Tratamiento	Polifenoles Totales (g EAG /100g)
CCN-51	Clon F	T1	5,184±0,03^{b}
SCAVINA-6	Clon F	T2	5,721±0,039^{a}
IMC-67	Clon F	T3	3,338±0.020^{f}
POUND-12	Clon F	T4	3,868±0.020^{d}
ICS-1	Clon T	T5	4,949±0.026^{c}
ICS-95	Clon T	T6	5,592±0,051^{a}
TSH-1188	Clon T	T7	3,656±0.017^{e}
Criollo		T8	5,078±0.060^{bc}

Los valores representan (promedio ±SEM) datos provienen del experimento (n=7) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

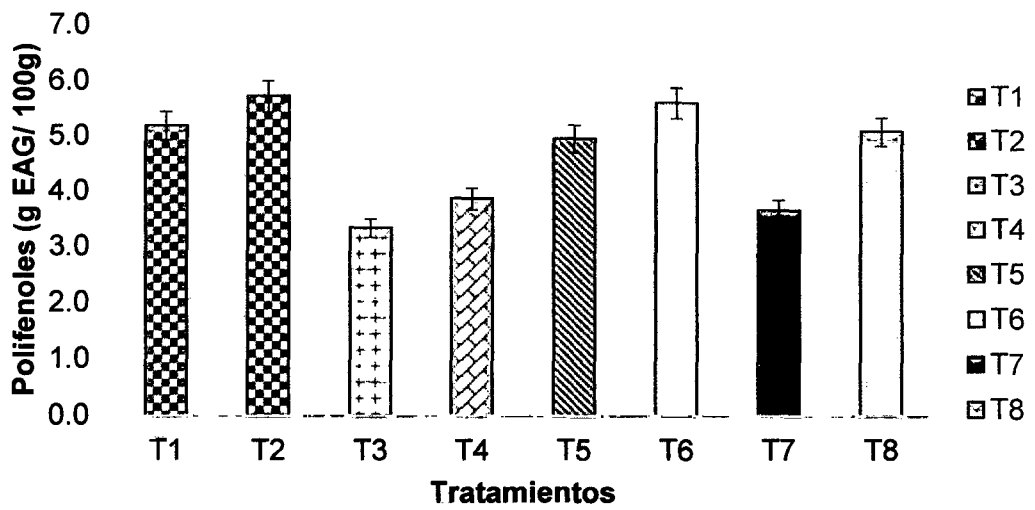


Figura 22. Representación del contenido de polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones.

En nuestra investigación el CCN-51 tuvo un contenido de polifenoles de 5,184±0,03 g EAG/100g y estuvo en el segundo lugar en la comparación de los ocho tratamientos, y según **HUANCA (2010)**, en su trabajo sobre la comparación de polifenoles totales en Criollo y CCN-51 encontró 7,597±0,011 y 7,547±0,038 g EAG/100g respectivamente. Cabe resaltar que este clon en los departamentos de Huánuco y San Martin es el que tiene una mayor aceptación por el agricultor debido a su adaptabilidad y productividad. Según **CIENFUEGOS *et al.*, (2007)**, el CCN-51, procedente de la región de Quevedo en el Ecuador, se ha seleccionado como el más indicado producto de partida para el nuevo proceso por su elevado contenido en polifenoles. Se trata de un triple híbrido que procede de un cruce del clon amazónico IMC-67 con el clon Trinitario ICS-95, el cual a su vez ha sido cruzado con el genotipo Canelo amazónico, regional de la zona de Quevedo. Este triple híbrido contiene un nivel de polifenoles totales no menor al 3% en peso referido a la semilla seca y no superior al 12% en peso referido a la semilla seca de cacao. Así mismo, **NEGARESHY y MARÍN (2013)** reportó para el clon CCN-51 valor de 7 g EAG/100 g y **ZAPATA *et al.*, (2013)** para el CCN-51 2,258 ±0,39 g EAG/100g de cacao.

El clon ICS-1 (Trinitario) analizado entre los 8 tratamientos ocupa el tercer lugar con un contenido de polifenoles de 4,949±0,026 g EAG/100g, sin embargo para **ZAPATA *et al.*, (2013)** que compara en 5 clones de cacao fermentado el clon de cacao el que presentó mayor contenido de fenoles totales fue el ICS-1 con 5,023±1,96 g EAG/100g; Así mismo, **NIEMENAK *et al.*, (2006)**, en ICS-1 el contenido de polifenoles totales en un grano sin fermentar

fue 12,66, fermentado (1dia) 11,6 y a dos días 10,3 g EEC/100g y fue menor que el ICS-95, este comportamiento puede deberse a que el contenido de polifenoles totales aumenta hasta 25% después de dos días de fermentación (SNK-10; T79/467, UPA-143), en otros decrece de 14 a 25% (ICS-84, ICS-1) y para otros se mantiene constante (SNK-413, IMC-60, ICS-95 y UPA-134), esta inestabilidad puede ser explicado por **ZAPATA *et al.*, (2013)** y **NIEMENAK *et al.*, (2006)** quienes mencionas que las pérdidas de fenoles totales son debidas a la difusión de los polifenoles fuera de los cotiledones durante la fermentación, además, los compuestos fenólicos pueden acomplejarse con proteínas, polisacáridos y alcaloides del cacao y el incremento de los polifenoles durante el proceso de fermentación puede reflejar una formación de proantocianidinas poliméricas (taninos).

Analizando el mismo Cuadro 7 y Figura 22 podemos apreciar que el menor contenido de polifenoles totales se encontró en IMC-67 (clon forastero) 3,338±0,020g EAG/100g, y **NEGARESHY Y MARÍN (2013)** reporta para el clon IMC-67 valores de 4 g EAG/100 g. Esta variabilidad puede ser explicado por **NIEMENAK *et al.* (2006)**,que cita que la diferencia en la cantidad de polifenoles totales registrados en los clones se debe en parte por la interacción de la parte genética (varietal y regional), pero más importante son las variables medio ambientales (condiciones de crecimiento, intensidad de la luz, humedad, temperatura, uso de fertilizantes, sanidad y otros factores como el estrés) y según **ZAPATA *et al.*, (2013)**, indica que existen varios factores internos y externos que afectan la calidad o cantidad de los compuestos fenólicos en las plantas, como la diversidad genética (variedad y origen de la

muestra), variables ambientales (intensidad de la luz, temperatura, uso de fertilizantes, heridas), procesamiento (fermentación y secado) y almacenamiento. **QUIÑONEZ *et al.*, (2013)**, en extractos de semillas del clon UF-654 mostraron los mayores valores en contenido de compuestos fenólicos, expresados como equivalentes de ácido clorogénico, en 7 clones es diferente, lo cual indica que el genotipo influye en el contenido de esos compuestos en *Theobroma cacao* L.

Comparando los grupos genético podemos indicar que no existe un comportamiento uniforme en el contenido de polifenoles, el mayor fue para SCAVINA-6 (Forastero) y ICS-95 (Trinitario), seguido por criollo y el menor correspondió a IMC-67 (Forastero). Al respecto, **MORILLO (2005)**, indica que existen tres variedades de árboles de cacao, la más conocida es la variedad Forastero, que representa el 90% del cacao producido en el mundo, el segundo grupo es el Criollo, que produce cacao fino y de aroma y por último, existe la variedad Trinitario, que es un cruce entre el Criollo y el Forastero; por otro lado **GIL (2012)**, en estudios previos se ha demostrado que el contenido total de polifenoles solubles en los granos de cacao secos y desengrasados de la variedad forastero varía entre 10-15% donde el contenido de (-)epicatequina oscila entre 34,65 y 43 mg/g, mientras que los cacaos criollos contienen solo 2/3 partes de este contenido. El clima (exposición al sol, precipitaciones, etc.) o factores agronómicos (diferentes tipos de cultivos, producción de fruta por el árbol, etc.), el grado de conservación puede también determinar el contenido en polifenoles **(QUIÑONES *et al.*, 2012)**.

4.2. Cuantificación de antocianinas en grano seco de cacao criollo y siete clones

Las antocianinas pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, particularmente de los flavonoides, que se caracterizan por su solubilidad en agua y por sus colores brillantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En el Cuadro 8 y Figura 23 se presenta los resultados de la cuantificación de antocianinas en granos secos de cacao Criollo y siete clones, realizando el análisis estadístico de las muestras se encontró que existe diferencia significativa entre los tratamientos (A-III), comprando los promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) podemos indicar que el mayor contenido de antocianinas fue para el clon CCN-51(Forastero) con 0,425±0,003 y para el Criollo 0,424±0,004mg cianidina-3-glucósido/g de muestra, comparando estos resultados con lo reportado por **ZAPATA (2013)** en granos fermentados de cacao, presentó mayor contenido de antocianinas el clon ICS-1 1,05±0,045 y en menor correspondió a CCN-51 0,27±0,003mg de cianidina-3-glucósido/g; y **VERDESOTO (2009)**, señala que cacaos tipo forastero y criollo cambian en sus componentes químicos durante la etapa del fermentado, similarmente comenta **MORILLO (2005)** que ocurre un cambio semejante en los taninos y las antocianinas y el cacao criollo tiene un porcentaje superior al cacao Forastero, siendo similares o inferiores luego de la fermentación.

Cuadro 8. Cuantificación de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones.

Muestra		Tratamiento	(mg cianidina-3-glucósido/g)
CCN-51	Clon F	T1	0,425±0,003 [a]
SCAVINA-6	Clon F	T2	0,376±0,003 [b]
IMC-67	Clon F	T3	0,268±0,004 [c]
POUND-12	Clon F	T4	0,181±0,001 [e]
ICS-1	Clon T	T5	0,176±0,005 [e]
ICS-95	Clon T	T6	0,122±0,003 [f]
TSH-1188	Clon T	T7	0,251±0,002 [d]
Criollo		T8	0,424±0,004 [a]

Los valores representan (promedio±SEM) datos provienen del experimento (n=7) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

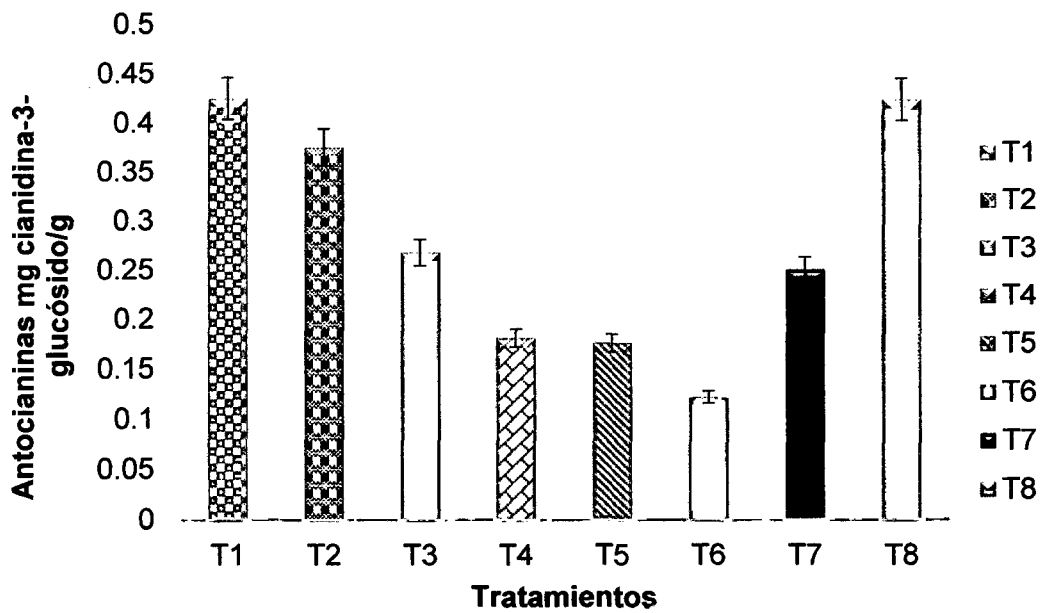


Figura 23. Representación del contenido de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones.

Realizando la comparación de los resultados del mismo Cuadro 8 y Figura 23, podemos indicar que tuvieron un contenido intermedio los clones SCAVINA-6, IMC-67 y TSH-1188 en un rango de 0,376 a 0,251 mg cianidina-3-glucósido/g. Según **ROHSIUS *et al.*, (2006)** y **DEL VALLE *et al.* (2005)**, reportan que durante la fermentación se da el cambio de color del cotiledón que pasa de violeta a marrón por la liberación de antocianinas de las vacuolas que son el lugar de almacenamiento a las capas hipodérmicas de las bayas después de tres a cuatro días de fermentación y en algunos casos en el mesocarpio y las semillas.

Según el contenido de antocianinas el ICS-1 y POUND-12 ocupan el penúltimo lugar en contenido de antocianinas 0,176±0,005 y 0,181±0,001cianidina-3-glucósido/g respectivamente. Según **NIEMENAK *et al.* (2006)**, el mayor contenido lo reporto T79/467 2,554 cianidina-3-galactosido/g y en menor fue para ICS-1 0,149 cianidina-3-galactosido/g. Según **CIENFUEGOS *et al.*, (2007)**, es destacable la diferencia de color existente entre los cotiledones del cacao Criollo y Forastero, el cual está directamente asociado con el grupo de sustancias químicas llamadas antocianinas y que son responsables del desarrollo característico del color púrpura del grano de cacao.

El menor contenido de antocianinas se encontró en el clon ICS-95 con 0,122±0,003 mg cianidina-3-glucósido/g, para **ZAPATA (2013)**, ICS-95 0,65±0,008mg de cianidina-3-glucósido/g ocupando el segundo lugar. Los granos frescos de cacao contienen pigmentos de antocianinas de color púrpura, cyanidins 3-βgalactosyl y cyanidins 3-α-L-arabinosyl y durante la

fermentación estos pigmentos son hidrolizados por glucósidos resultando un cambio del cotiledón de violeta a marrón **(NIEMENAK *et al.*, 2006)**.

Comparando los clones en funciones en base a los grupos genéticos podemos indicar que los forasteros contienen mayor antocianina que los trinitarios al respecto **CUBERO (1990)**, el grupo Criollo presentó más antocianinas que el grupo Forastero, luego el grupo Trinitario y finalmente el Catongo sin fermentar, después de que se fermentan fue el grupo Forastero el que más antocianinas retuvo. **MARQUEZ (2009)**, determinó en granos de cacao maduros sin fermentar, que los cacaos forasteros poseen más de 4 mg de antocianinas por grano de tejidos, mientras que los cacaos criollos e híbridos (trinitario), la concentración de antocianinas esta entre 0,1 y 2,3 mg/g.

De los 7 clones de cacao y un criollo el contenido de antocianinas se encuentra entre 0,425±0,003 a 0,122±0,003 mg cianidina-3-glucósido/g, según **ZAPATA (2013)**, reporta valores que varían entre 0,59 y 1,60 mg.g-1 en granos sin fermentar, así como 0,27 y 1,05 mg.g-1 en granos fermentados. Durante la fermentación de los granos de cacao, las antocianinas son hidrolizadas por acción de las glicosidasas, que causan el blanqueamiento de los cotiledones. Estas enzimas hidrolizan el enlace glicosídico de las antocianinas y producen azúcar y aglicona, que reduce así el contenido de antocianinas. Según **SANDOVAL (2009)**, la coloración del cotiledón es un carácter típico genético que está asociado al tipo de cacao. Puede variar del tipo blanco (Criollo), hasta el bien pigmentado (Forastero), con diferentes tonalidades y distribución de los colores. **MARQUEZ (2009)**, indica que las procianidinas también se encuentran en diferentes proporciones dependiendo

del cultivar, encontrándose mayor cantidad de procianidinas en cacaos forasteros. Estos resultados explicarían la asociación empírica existente entre la intensidad del color y las cualidades de amargor y astringencia de los granos pigmentados.

Durante la fermentación las antocianinas sufren una hidrolisis enzimática por acción de las levaduras, además, parte de los alcaloides y polifenoles se pierden por oxidación **(BARRAGAN y REY, 2004)**. La concentración de antocianinas se reduce en un 90% durante la fermentación tanto para cacaos nacional finos como para otros cacaos, las concentraciones más bajas se observaron a partir de los días 2 y 3 respectivamente **(ESPÍN y SAMANIEGO, 2006)**.

4.3. Determinación de la capacidad antioxidante en los granos secos de cacao criollo y siete clones

4.3.1 Coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil (DPPH).

Como sabemos los antioxidantes son micronutrientes que están presentes en muchos alimentos e inhiben la iniciación o propagación de reacciones de oxidación en cadena de radicales libres; en el Cuadro 9 y Figura 24, se presentan los resultados del IC_{50} del radical DPPH en granos secos de cacao Criollo y siete clones, realizando el análisis estadístico se encontró diferencia significativa (A-IV) comparando los promedios mediante Tukey ($p \leq 0,05$) podemos indicar que la mayor eficiencia para inhibir el radical DPPH fue ICS-95 IC_{50} 73,293±0,9 µg/mL cabe indicar que este tratamiento fue el que

tuvo el mayor contenido de polifenoles totales (5,592±0,051 g EAG /100g); este resultado puede ser comparado con lo reportado por **ZAPATA (2013)** que indica valores de TEAC(µmol Trolox/g de cacao) con el radical DPPH varió entre 251,59 y 367,80 en los granos sin fermentar, y 253,75 y 464,64 µmol Trolox/g en los granos fermentados; el mismo autor indica que los clones de cacao que presentaron mayor potencial antioxidante fueron ICS-1, ICS-60 y TSH-565 en los granos sin fermentar, e ICS-1 en los granos fermentados; también observó después de la fermentación, un incremento de esta propiedad en los clones ICS-1 e ICS-95. **MILLER *et al.*, (2009)** indica que la actividad antioxidante está determinada por el contenido de polifenoles, flavonoles como (-)epicatequina y (+) catequina, y otros oligómeros conocidos como proantocianidinas.

Analizando el comportamiento de la capacidad antioxidante de los clones podemos a preciar que el segundo lugar lo ocupó el clon SCAVINA-6 (IC_{50} 80,473±0,15 µg/mL) (Forastero), cabe resaltar que este clon tuvo el mayor contenido de polifenoles al igual que el ICS-95, el grupo de moléculas que constituyen los polifenoles es muy variado y su respuesta antioxidante depende del tipo de molécula, no todos los polifenoles reaccionan con la misma intensidad para generar una buena capacidad antioxidante. En el caso en que coincidan un valor alto de polifenoles con una alta capacidad se debe a que el grupo de moléculas que conforman el valor del polifenol tiene propiedades de ceder electrones con facilidad para generar una respuesta antioxidante **(NEGARESHY y MARÍN 2013)**.

Del cuadro de resultados cabe resaltar que CCN-51 ocupó el tercer lugar en la capacidad de inhibir al DPPH IC_{50} 89,44±0,24 µg/mL y contenido de polifenoles totales fue 5,184±0,03 g EAG/100g, el mismo clon fue analizado por **HUANCA (2010)** en granos de cacao procedente de Tingo María IC_{50} 52,493±0,29 µg/mL teniendo mayor eficiencia frente al radical DPPH, el mismo autor reporto mayor contenido de polifenoles 7,547±0,038 g EAG/100g para este clon. Al respecto, **PADILLA *et al.* (2008)** indica que la capacidad antioxidante está asociada a la presencia de compuestos fenólicos que ejercen su acción a través del rompimiento de la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno.

Por otro lado, con respecto al cacao Criollo en la investigación se encontró un IC_{50} de 100,878±0,58 µg/mL y el contenido de polifenoles totales fue 5,078±0.060 g EAG/100g y **HUANCA (2010)** reporta IC_{50} 43,041±0,16 µg/mL con un contenido de polifenoles 7,597±0,011g EAG/100g; al respecto **QUIÑONEZ *et al.*, (2013)** indica que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe mayormente a sus propiedades redox, las cuales desempeñan un papel importante en la adsorción y neutralización de radicales libres. Así mismo, este comportamiento puede ser explicado por **CIENFUEGOS *et al.* (2009)** que manifiesta que la actividad antioxidante varía según la variedad botánica, factores de manufactura, tales como manejo de postcosecha, fermentación, secado y tostado.

La menor eficiencia frente a la inhibición del radical DPPH lo presentó los granos de cacao IMC-67 IC_{50} 139,008±0,49 µg/mL. Al respecto **JONFIA *et al.* (2007)** indica que la capacidad antioxidante mediante la prueba

de FRAP de granos de cacao fue 12,4±7,3 µmol TE/g para la variedad tradicional y en los híbridos 45,5± 2,86 µmol TE/g y presentan diferencia altamente significativa comparando con los granos tradicional.

Cuadro 9. Resultados del IC_{50} del radical DPPH en granos secos de cacao criollo y siete clones.

Muestra		Tratamiento	IC_{50} (µg/mL)	$1/IC_{50}$ (µg/mL)
CCN-51	Clon F	T1	89,44±0,24 [e]	0,0112
SCAVINA-6	Clon F	T2	80,473±0,15 [f]	0,0124
IMC-67	Clon F	T3	139,008±0,49 [a]	0,0072
POUND-12	Clon F	T4	102,495±0,38 [c]	0,0098
ICS-1	Clon T	T5	93,161±0,11 [d]	0,0107
ICS-95	Clon T	T6	73,293±0,9 [g]	0,0136
TSH-1188	Clon T	T7	114,191±0,23 [b]	0,0088
Criollo		T8	100,878±0,58 [c]	0,0099

Los valores representan (promedio ± SEM) datos provienen del experimento (n=7) valores de la misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

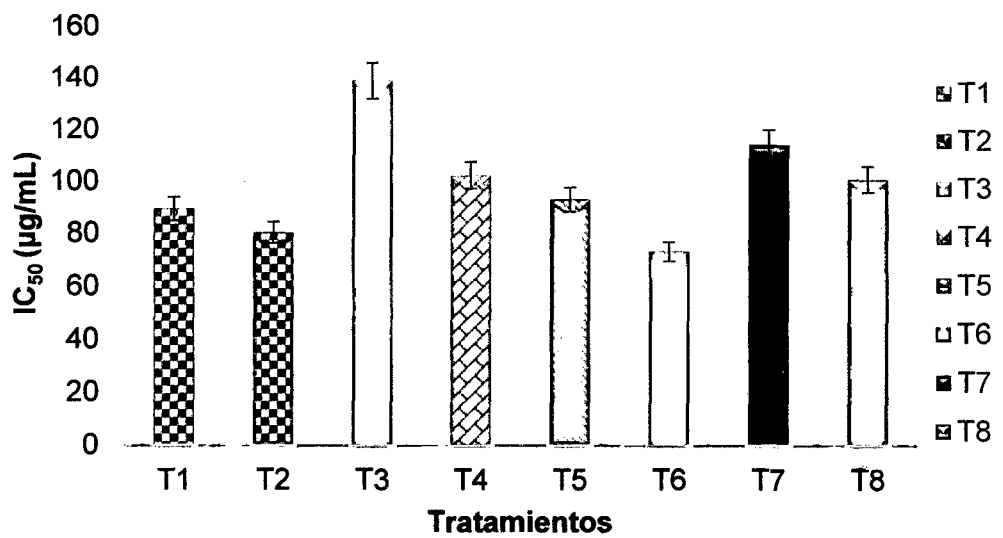


Figura 24. Comportamiento del IC_{50} con el radical DPPH en los granos secos de cacao criollo y siete clones

Del mismo Cuadro y Figura realizando la comparación entre 7 clones de cacao y un criollo la capacidad de inhibir el radical DPPH fue 73,293±0,9 a 139,008±0,49µg/mL, **CONDEZO (2011)** reportó la capacidad antioxidante mediante el radical DPPH en granos de cacao comercial buenos IC_{50} 51,310±0,47 a 80,887±0,62 µg/mL y defectuosos en Tingo María y Tocache IC_{50} 58,420±0,64 a 85,380±0,32 µg/mL. Según **OTHMAN *et al.*, (2007)**, reporta en granos de cacao IC_{50} (DPPH) en extracto etanólico en granos de Malasia 130 µg/mL y en extracto acuoso 2,4 µg/mL. **QUIÑONEZ *et al.*, (2013)** en su trabajo encontró en los extractos fenólicos crudos una capacidad antioxidante en semillas de cacao un IC_{50} de 67,78 µg/mL; **CHAVEZ (2012)**, encontró valores de IC_{50} grano comercial en Tingo María 52,318±0,085 µg/mL. Como podemos apreciar existe diferencia estadística entre razas y clones esto puede deberse a que cada uno de ellos tiene diferente contenido de catequinas como lo cita **CALA *et al.* (2011)** en cinco muestras de tres variedades de cacao cultivadas en cacao Colombia (ICS-39, 2 tipos de IMC-67 y 2 tipos TSH-565), reporto valores para el clon IMC-67 0,79 ±0,05; TSH-565 0,33 ± 0,03; IMC-67 0,26 ± 0,02; THS-565 0,19 ± 0,01 y ICS-39 0,07 ± 0,01 mg de catequina/g de semilla respectivamente.

Con los resultados presentados referente al contenido de polifenoles totales y la eficiencia de la actividad antioxidante frente al radical DPPH presentados en el Cuadro 9 se realizó la correlación logrando un r^2= 0,818 (Figura 25), este alto coeficiente quiere decir que el contenido de polifenoles totales es predominante en la capacidad antioxidante, y **ZAPATA (2013)**, al realizar análisis de correlación entre los contenidos de polifenoles

totales y la actividad antioxidante (evaluada por el método DPPH y expresada en µmol/g), en muestras de cacao de los clones THS-565, ICS-60, CCN-51, ICS-95 y ICS-1 encontró un r^2= 0,982. **RADOJCIC *et al.* (2009)** indica según su análisis de correlación entre la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles r^2= 0,9868; Así mismo, se ha reportado en muchos otros estudios análisis similares con alta correlación como **ADAMSON *et al.*** (1999); **COUNET *et al.* (2004); NINFALI *et al.* (2005); MILLER *et al.* (2006)**.

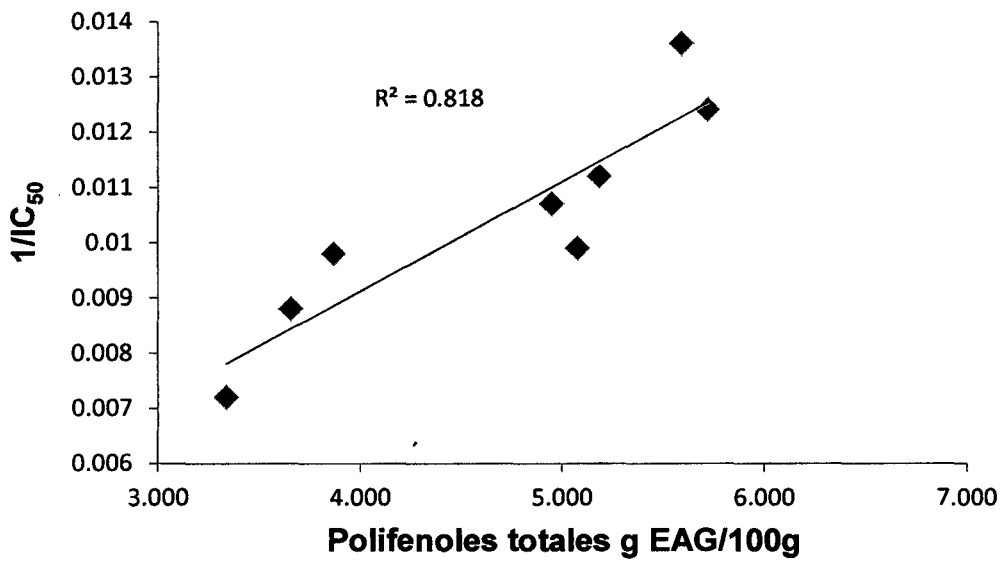


Figura 25. Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la eficiencia de la actividad antioxidante (DPPH).

4.3.2 Coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfonico) (ABTS °+).

La evaluación de la capacidad antioxidante de las muestras de cacao se realizó por dos métodos debido a que los compuestos interactúan entre si pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios, por esta razón se utilizó como cromógeno al radical DPPH y ABTS °+, que son utilizados para

determinar la capacidad de los compuestos con acción antioxidante y sirven para captar los radicales libres generados. La evaluación de la capacidad antioxidante para inhibir el radical ABTS °+ ha sido ampliamente usada tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica.

En el Cuadro 10 y Figura 26 se presenta los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante referidos al radical ABTS °+ en los granos secos de cacao criollo y siete clones, según los resultados de la evaluación estadística se encontró diferencia significativa (A-V) comparando promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), se encontró que la mayor eficiencia frente al radical ABTS °+ fue el clon SCAVINA-6 IC_{50} 33,036±0,69 µg/mL, sobre los resultados encontrados referente a este clon se puede indicar que fue el que tuvo el mayor contenido de polifenoles y una buena eficiencia frente al radical DPPH, cabe resaltar que este clon pertenece al grupo forastero y al respecto **EFRAIM *et al.* (2011)**, hace mención que los cacaos del grupo Forastero contiene de 30 a 60% más compuestos fenólicos que los del grupo Criollo, además **SUAZO (2012)** menciona que los polifenoles de estas semillas son relacionados con la actividad antioxidante, se cree que cuanto más elevado sea la cuantificación de polifenoles mayor será la actividad antioxidante; sin embargo, con el fermentado se pierde gran parte de los polifenoles de esta semilla.

En el mismo Cuadro y figura según el ordenamiento sobre la eficiencia frente al radical ABTS°+ no se encontró diferencia estadística significativa en el Criollo IC_{50} 40,262±0,26 µg/mL y los clones ICS-95 IC_{50}

41,566±0,28 µg/mL y ICS-1 IC_{50} 42,755±0,69 µg/mL de estos resultados podemos indicar que los dos clones pertenecen al hibrido de los trinitarios, al respecto **SUAZO (2012)** indica que de los trinitarios se heredó la robustez del cacao forastero y el delicado sabor del cacao criollo, aunque su calidad es más próxima al forastero y presenta similares o mayores concentraciones de polifenoles que las anteriores variedades. Con respecto a los clones ICS-1 y ICS-95 **ZAPATA (2013)** reportó valores para los granos secos fermentados por el método FRAP, CCN-51 de 32,98±0,44 mg de ácido ascórbico/g de cacao, ICS-1 de 59,35±0,39 y ICS-95 de 45,02±0,79 mg de ácido ascórbico/g de cacao, siendo mejor los dos últimos.

En el tercer lugar se encuentra el clon CCN-51 IC_{50} 43,013±0,56 µg/mL, este es un triple híbrido que procede de un cruce del clon amazónico IMC-67 con el clon Trinitario ICS-95, el cual a su vez ha sido cruzado con el genotipo Canelo amazónico, regional de la zona de Quevedo, **ZAPATA (2013)** indica en granos fermentados de CCN-51 1410,83±95,27, ICS-1 2337,14±33,06 y ICS-95 1551,79±11,86 TEAC (µmol de trolox/g de cacao) respectivamente. **TOMAS (2003)** menciona que existen factores intrínsecos al propio vegetal (de origen genético), que llevan a que la composición de polifenoles sea diferente no sólo entre distintos géneros o especies, sino incluso también entre variedades de un mismo producto. Además la relación entre la actividad antioxidante de los extractos de cacao y la concentración de fenoles totales parece ser bastante significativo, ya que los extractos con las mayores concentraciones de fenoles monomericos son los que tienen mayor actividad antioxidante **(BACELAR *et al.*, 2013)**.

Cuadro 10. Capacidad antioxidante del IC_{50} referida al radical ABTS en granos secos de cacao criollo y siete clones.

Muestra		Tratamiento	IC_{50} (µg/mL)
CCN-51	Clon F	T1	43,013±0,56 ^{c}
SCAVINA-6	Clon F	T2	33,036±0,69 ^{e}
IMC-67	Clon F	T3	64,238±0,62 ^{a}
POUND-12	Clon F	T4	64,76±0,42 ^{a}
ICS-1	Clon T	T5	42,755±0,69 ^{cd}
ICS-95	Clon T	T6	41,566±0,28 ^{cd}
TSH-1188	Clon T	T7	52,374±0,63 ^{b}
Criollo		T8	40,262±0,26 ^{d}

Los valores representan (promedio ± SEM) datos provienen del experimento (n=7) valores de la misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

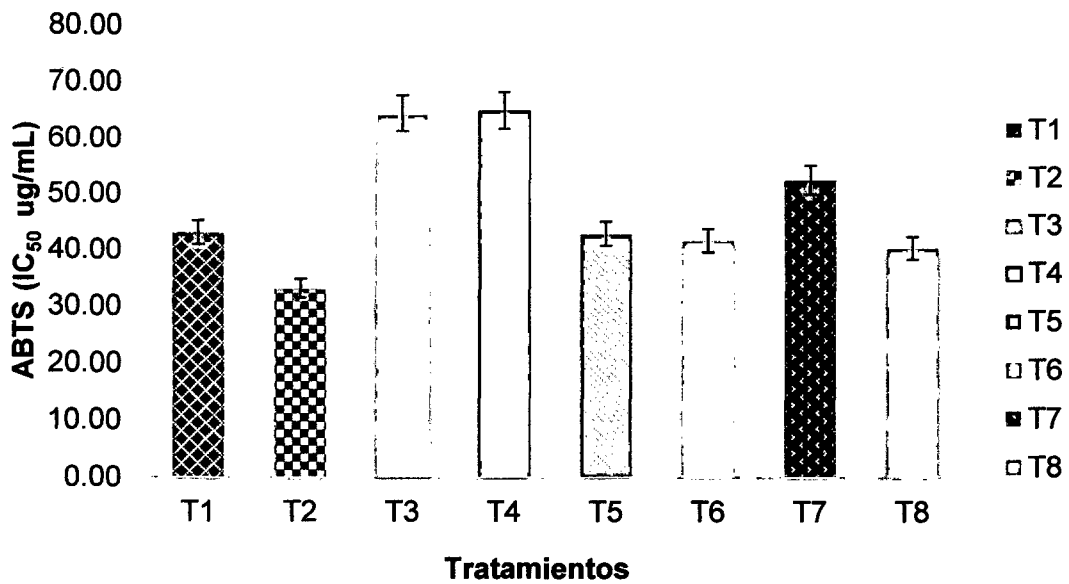


Figura 26. Comportamiento del IC_{50} con el radical ABTS en los granos secos de cacao criollo y siete clones.

El cuarto lugar fue ocupado por el clon TSH-1188 IC_{50} 52,374±0,63 µg/mL podemos indicar que este clon pertenece a los trinitarios; así mismo, con respecto al contenido de polifenoles totales este clon tuvo el menor valor (3,656±0.017 g EAG/100g), Según **STAHL *et al.* (2009)**, menciona que los resultados de los polifenoles son afectados por el genotipo, origen geográfico, método de fermentación y tamaño de poda. La actividad antioxidante de los polifenoles es la propiedad de mayor interés, este efecto se debe a que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, los cuales reaccionan con los radicales libres **(MARTINEZ, 2007)**.

El último lugar referente a la capacidad antioxidante frente al radical ABTS los encontramos en los clones IMC-67 IC_{50} 64,238±0,62 y POUND-12 IC_{50} 64,76±0,42 µg/mL, son forasteros y con respecto al contenido de polifénoles totales estos tuvieron 3,338±0.02 y 3,868±0.02 g EAG /100g respectivamente y **RAMIREZ *et al.* (2013)**, indica que si existe mayor presencia de polifenoles totales en las muestras, mayor actividad antioxidante o menor IC_{50}, lo que demuestra la importancia de los polifenoles en las propiedades funcionales del cacao.

Analizando todos los resultados de la capacidad antioxidante frente al radical $ABTS^{o+}$ podemos indicar que la mayor eficiencia se encontró en SCAVINA-6 IC_{50} 33,036±0,69 µg/mL y el menor fue POUND-12 IC_{50} 64,76±0,42 µg/mL. **CHAVEZ (2012)** evaluó la capacidad antioxidante frente al radical ABTS en grano comercial de cacao encontrando un IC_{50} 34,918 µg/mL y **PEREA (2009)**, evaluó la actividad antioxidantes en granos secos y fermentados de cacao frente al radical $ABTS^{o+}$ obteniendo 361,45 ± 44,68 (mmol TROLOX/Kg).

La variación con respecto a la capacidad de inhibición del radical $ABTS^{o+}$ puede ser afectada por el contenido de polifenoles totales presente en el cacao y depende de las características genéticas y además de otros factores como el clima (temperatura y humedad), propiedades químicas del suelo, región de cultivo, entre otros aspectos **EFRAIM *et al.*, (2011)** y el contenido de epicatequina y catequina parecen ser los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante **(BACELAR *et al.*, 2013)**.

4.4 Evaluación sensorial del licor de cacao criollo y siete clones

Los resultados de la evaluación sensorial referido a los sabores básicos, específicos y adquiridos realizados en las muestras de licor de cacao elaborados con granos secos de cacao criollo y siete clones en estudio, fueron analizados mediante componentes principales (A-VI) y (A-VII), según los resultados estadísticos podemos concluir que en el biplot de variables del primer componente (CP 1) separa al atributo frutal de las demás variables, el cual representa el 48,7 % de la variabilidad total de los indicadores de la calidad de los granos (Figura 27). Así mismo, el atributo acidez de los granos de cacao representa el 20,5 % de la variabilidad del segundo componente (CP 2) y en general ambos componentes representan el 69,2% de la variabilidad total. De los resultados podemos indicar que el atributo frutal permitió determinar en qué medida se logró diferenciar los granos de cacao entre criollo y los clones; según **CROSS y JEANJEAN (1997)**, el sabor frutal predominante es debido a los compuestos volátiles como las pirazinas y los aldehídos que representan un sabor básico, los ésteres que originan un sabor a fruta

manifiestan que los sabores frutales se concentran en zonas comprendidas entre 200 a 400 msnm. Según **SUAZO (2012)** menciona sobre el desarrollo de la fracción aromática ha sido puesto en evidencia que está en función de la variedad de cacao y el tratamiento pos cosecha (días de fermentación) y que el tipo de secado no es tan influyente, pero el tostado lo desarrolla aún más, al inducir a la formación de compuestos aromáticos que en su gran mayoría son del tipo de las pirazinas.

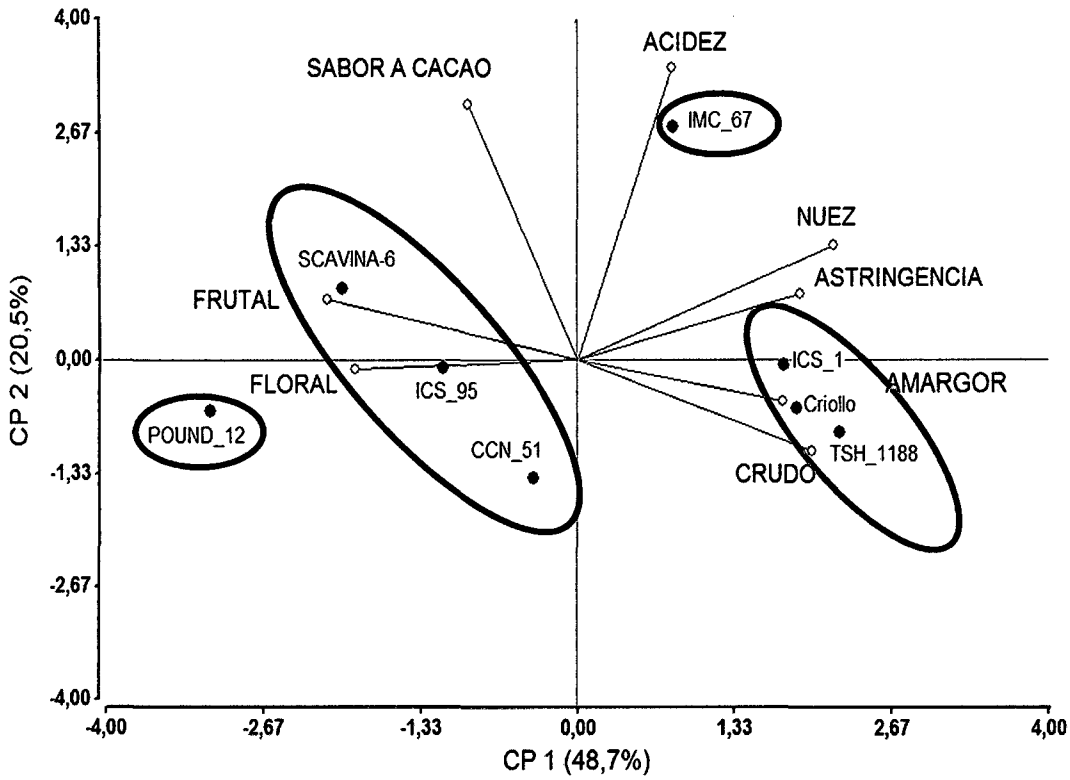


Figura 27. Comportamiento del biplot de la evaluación sensorial en granos secos de cacao criollo y siete clones.

Además en la Figura, el clon que contiene mayor sabor frutal es la SCAVINA-6 calificado como Forastero peruano, **GARCIA (2008)** indica que los Forasteros solo manifiestan sabores tradicional (frutal) y casi nada floral, pero existen algunas excepciones, como los clones: SCA 9, NANAY- 33, y SCA-6,

con sabor frutal específico y algo de floral y **WILBUR (2010)** reporta para los forasteros peruanos tiene sabor levemente amargo y frutal y las diferencias en el aroma dependen del origen del grano, la línea genética, las diferentes prácticas de fermentación y las condiciones de tostado como los granos forasteros de Côte d'Ivoire, São Tomé y Príncipe, Brasil, Perú, Jamaica presentan sabor frutal.

El CP 2 fue representado por atributos de acidez cuya variabilidad representó el 20,5%, este atributo puede ser afectado por la sobre fermentación y un tostado leve como lo reporta **WILBUR (2010)** que el aroma a ácido es debido a la presencia de ácidos volátiles y libres, generados como producto a una sobre fermentación, es diferente a una aroma acético que es generado por presencia del ácido acético. En tanto a la acidez **DIAZ y PINOARGOTA (2012)** mencionan que el contenido de ácidos orgánicos son compuestos que aportan a la acidez del perfil sensorial del cacao, varía entre el 1,2% y 1,6%. Algunos, entre ellos el acético, cítrico y oxálico, se forman durante la fermentación.

El clon que tiene mayor acidez fue el clon IMC-67 con un valor de 3,2 y **SANCHEZ (2007)**, reporta para este mismo clon valor de 4,36 lo cual obtuvo mayor puntaje entre los atributos; el aroma del cacao incluye varias fracciones determinadas en los granos frescos: una fracción constitutiva (presente en la almendra fresca), de una fracción desarrollada durante la fermentación y secado y por último por una fracción formada durante el tostado. Procesos de tostado bajos acentúan aroma frutal y acidez, preferidos

en Europa porque dan como resultados en el chocolate una característica de ácido y amargo leve **(WILBUR, 2010)**.

Realizando el análisis estadístico mediante conglomerados de los tratamientos evaluados, podemos diferenciar cuatro grupos (Figura 28); el grupo 1 representa 37,5% (SCAVINA-6, ICS-95 y CCN-51); el grupo 2 representó 37,5% (Criollo y los clones ICS-1, TSH-1188), el grupo 3 representó 12,5% (IMC-67) y el cuarto grupo representó 12,5 % (POUND-12).

Con respecto a los grupos formados se puede decir que el **primer grupo** está conformado por los clones SCAVINA-6, ICS-95 y CCN-51 cuyos calificativos fueron los valores más altos para sabor a cacao 3,2; 3,2 y 2,3, la astringencia 3,0; 2,7 y 3,3, amargor 3,2; 3,5 y 3,2, frutal 2,2; 1,7 y 1,2 y el menor valor fue floral 1,7; 0,7 y 0,8, no presenta sabor a nuez y crudo respectivamente. Cabe indicar que el clon CCN-51, pertenece al grupo genético procedente de los cruzamientos entre forastero del Alto Amazonas IMC-67 (Perú) con el trinitario ICS-95 (Trinidad y Tobago) y con forastero desconocido **(GARCÍA, 2010)** y la SCAVINA-6 es forastero de alto amazónico, origen Peruano **(GARCIA, 2009)**; por esta razón estos tres clones llevan algunas características sensoriales similares, que permitió agruparse según la evaluación sensorial. **RAMOS *et al.*, (2005)** menciona que el sabor a cacao es típico de los cacaos tipo Forasteros y Trinitarios. La variedad CCN-51 tiene un buen nivel de sabor a cacao **(SANCHEZ, 2007)**.

El clon CCN-51, se caracteriza por notas altas de astringencia y acidez **(DIAZ y PINOARGOTA, 2012)**, además **SANCHEZ (2007)** refiere que el grado de astringencia del chocolate, está determinado por los compuestos

polifenólicos y el amargor por las purinas (cafeína y teobromina), el complejo polipéptidos fenoles y pirazinas, intervienen en el sabor a dulce y nuez.

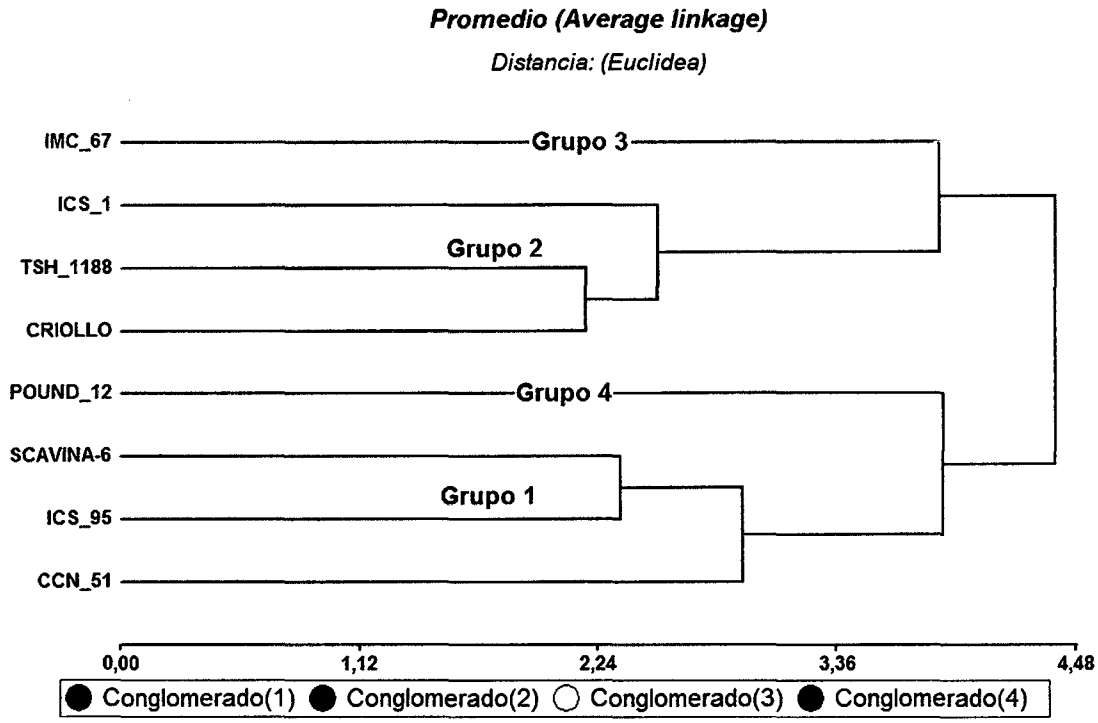


Figura 28. Presentación del análisis de conglomerados de las muestras de granos secos de cacao criollo y siete clones.

El **segundo grupo** está conformado por el Criollo y los clones ICS-1, TSH-1188 encontramos valores para sabor a cacao menor que en el primer grupo, 2,5; 3,2 y 2,5, la acidez 2,0; 1,5 y 1,7, mayor fue la astringencia 3,0; 3,5 y 3,2 y amargor 3,7; 3,3 y 3,5 respectivamente, muy leve sabor frutal en criollo y floral solo presenta el TSH-1188, las tres muestras presentaron sabor a nuez y crudo. Al respecto podemos indicar que los criollos son una de las razas del cacao **(ARCINIEGAS, 2005)**, y los clones ICS-1 y TSH-1188 tienen rasgos genéticos similares tal como lo citan **MAHARAJ *et al.*, (2011)** el clon TSH-1188 proviene de los cruces POUND-18 x TSH-753; y **GARCIA (2008)**, reporta los

clones ICS tiene como base para su cruzamiento y selección a los Clones Pound o Perú grupo forastero del alto amazonas.

Este grupo tiene menor sabor a cacao al respecto **SANCHEZ (2007)**, confirma acerca de sus resultados que los cacaos de tipo Trinitario presentan un mediano sabor a cacao al momento de la degustación y también presentaron mayor astringencia y amargor. **CROS (2004)** concluye que los cacaos de tipo forasteros son generalmente menos amargos y menos astringentes que los Trinitarios. **ELWERS *et al.*, (2009)** indican que la amargura y la astringencia son componentes importantes del sabor de cacao y la amargura se puede atribuir en parte a purinas. Así mismo, el amargor y la astringencia, que están dados en las almendras de cacao, principalmente por la presencia de xantinas, alcaloides y polifenoles **(MORILLO, 2005)**. En este mismo grupo se presentó sabor a nuez, esta característica es atribuida al cacao Criollo que produce almendras de tamaño mediano con cotiledones claros y presentan un delicado aroma de chocolate acompañado por un sabor de nuez suave **(MORILLO, 2005)**.

El **tercer grupo** lo conforma el clon IMC-67 presenta valores para el sabor a cacao 3,5, acidez 3,2, astringencia 3,3, amargor 3,0 y menor valor a frutal, floral y nuez. Este clon pertenece a un forastero de alto amazonas y su calidad organoléptica es corriente o básico **(GARCIA, 2008)**; los forasteros en cata son fuertes y amargos, ligeramente ácidos, con mucho tanino y astringencia y tienen una gran potencia aromática, pero sin finura ni diversidad de sabores **(NAVIA y PAZMIÑO, 2012)**. Además, las cualidades sensoriales del cacao se desarrollan y expresan normalmente con periodos de

fermentación y secado que son estandarizados para zonas y tipos de cacao, en base a estudios previos **(DIAZ y PINOARGOTA, 2012)**.

El **cuarto grupo** lo conforma el POUND-12 y presenta valores para el sabor a cacao 3,2, amargor 2,2, astringencia 1,7, frutal 1,7, bajo sabor a acidez y floral. Cabe indicar según la revisión bibliográfica este clon es un forastero de alto amazonas, de origen peruano **(GARCIA, 2008)**. Un cacao de determinado origen genético presenta propiedades organolépticas muy características, de los cuales los forasteros denominados cacao común, proveniente de árboles Amazónicos y estos poseen un sabor a chocolate muy fuerte **(CALDERÓN, 2002)**. Asimismo, sabor floral, frutal y nuez, dependen del tipo de cacao **(SANCHEZ, 2007)**.

V. CONCLUSIÓN

- Los clones SCAVINA-6 y ICS-95 con 5,72±0,04 y 5,59±0,05 g EAG /100 g presentaron mayor contenido de polifenoles totales y el menor correspondió al IMC-67 3,34±0,02 g EAG /100 g.
- El clon CCN-51 y el criollo con 0,425±0,003 y 0,424±0,004 mg cianidina-3-glucósido/g presentaron mayor contenido de antocianinas y el menor valor correspondió al ICS-95 0,122±0,003 mg cianidina-3-glucósido/g.
- La mayor la capacidad antioxidante frente al radical DPPH lo presentó el ICS-95 con un IC_{50} 73,29±0,9 µg/mL disminuyendo en el presente orden: SCAVINA-6 > CCN-51 > Criollo > ICS-1 > POUND-12 > TSH-1188 y IMC-67 IC_{50} 139,01±0,49 µg/mL.
- La mayor la capacidad antioxidante frente al radical $ABTS^{o}+$ lo presentó la SCAVINA-6 con un IC_{50} de 33,04±0,69 µg/mL disminuyendo en el siguiente orden: Criollo > ICS-95 > ICS-1 > CCN-51 > TSH-1188 > IMC-67 y POUND-12 IC_{50} 64,76±0,42 µg/mL.
- Del análisis de conglomerados y componentes principales sobre la evaluación sensorial del licor de cacao criollo y clones se encontró cuatro grupos con características similares (SCAVINA-6, ISC-95 y CCN-51) frutal y floral caracteres predominante, (Criollo, ISC-1 y TSH-1188) amargor y crudo, IMC-67 acidez alta y POUND-12 sin carácter predominante.

VI. RECOMENDACIÓN

Según los resultados obtenidos en el estudio, se recomienda lo siguiente:

- Realizar análisis de polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante en los granos de cacao de los clones "Selecciones Hibridas de la UNAS" (SHU), Tingo María.
- Realizar el análisis fisicoquímico de los granos de cacao criollo y los clones evaluados en la presente investigación.
- Realizar la fermentación del cacao criollo y los clones, estableciendo el tiempo adecuado para cada una de ellos.
- Elaborar chocolates con los granos de cacao criollo y los clones en estudio, para saber si se mantiene o no el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante.

VII. ABSTRACT

This research was developed in the laboratories of CIPNA-UNAS and the Institute of Tropical crop (ICT). The objectives were to quantify the content of total polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity determined by their ability to inhibit free radical DPPH and ABTS°+ in dry beans and sensory analysis of Criollo cacao liquor seven clones (SCAVINA-6, IMC-67, POUND-12, CCN-51, ICS-1, ICS-95 and TSH-1188). The samples were ground and defatted was hydroalcoholic extract, 2,5 g of cocoa was weighed in 25 mL (water / ethanol 50:50 v/v), macerated for 24 h, filtered and centrifuged, the analysis was performed by spectrophotometry UV/VIS. The results were analyzed by complete randomized design (DCA) and the Tukey test ($p<0,05$) for sensory evaluation multivariate principal components analysis was used. The SCA-6 and ICS-95 clones with 5,72 ± 0,04; 5,59 ± 0,05 had higher total polyphenol content and lower IMC-67 3,34 ± 0,02 g GAE/100g, the CCN-51 and Criollo 0,425 ± 0,003 and 0,424 ± 0,004 had higher contents of anthocyanins and lower ICS-95 0,122 ± 0,003 mg cyanidin-3-glucoside/g. The highest antioxidant capacity against DPPH radical was presented by ICS-95 IC50 73,29 ± 0,9 mg/mL and IC50 lower IMC-67 139,01 ± 0,49 mg/mL and the radical ABTS°+ SCAVINA-6 with an IC50 33,04 ± 0,69 mg/mL and POUND-12 IC50 64,76 ± 0,42 mg/mL. In the sensory evaluation four groups with similar

characteristics (SCAVINA-6, ISC-95 and CCN-51) predominantly fruity and floral characters (Criollo, ISC-1 and TSH-1188) bitterness and raw, IMC-67 high acidity found and POUND-12 without predominant character.

Key words: Cacao, clones, polyphenol, anthocyanins, antioxidant, analysis sensory.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMSON, G., LAZARUS, S., MITCHELL, A., PRIOR, R., CAO, G., JACOBS, P., KREMERS, B., HAMMERSTONE, J., RUCKER, R., RITTER, K., SCHMITZ, H.1999. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. J. of Agricultural and Food Chemistry, 47: 4184–4188.

ADRIAZOLA, D. 2003. Producción de los alimentos de los dioses (Theobroma cacao L.). Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. p. 5-8.

AGUILERA, M., REZA, M., CHEW, R., MEZA, J. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. Rev. de Cienc. Biol. y de la Salud. Durango, México. 13(2): 16-22.

ANDREW, R., DE SIMONE, F., PIZZA, C., CONTI, C., STEIN, M. 1989. Plants metabolites, structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glicosydes from *Uncaria tomentosa* and *Guetardaplaypoda*.J. of natural products. 52: 679-685.

ARCINIEGAS, A. 2005.Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE. Tesis, Magíster Scientiae. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 126 p.

BACELAR, P., FONSECA, L., FRANÇA, L., SOARES, S., DA SILVA, E. 2013. Phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity in cocoa mass and chocolates produced from "witch broom disease" resistant and nonresistant cocoa cultivars. Ciênc. Agrotec., Lavras, Salvador, Brasil. 37(3): 244-250.

BADUI, S. 2006. Quimica de los alimentos. Ed. por E. Quintanilla. 4 ed. México. Pearson educación. 736 p.

BARTLEY, B. 2005. The genetic diversity of cocoa and its utilization. CABI Publishing, Oxford shire-U.K. 1ed. 337 p.

BARRAGAN, A., REY, L. 2004. Establecimiento de núcleos productivos de cacao (*Theobroma cacao*) entorno a microcentrales de beneficio para mejorar la calidad del grano en la región del distrito agroindustrial de Magdalena Caldense. Especialización en gestión de proyectos de desarrollo agroindustrial. Manizales, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 69 p.

BRAND WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C.1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss Technol. 28: 25-30.

BRAUDEAU, J. 1970. El Cacao, Traducido por A. Hernández C., Barcelona, España. Ed. Blumé. 185 234 p.

CALA, M., VASQUEZ, A., GARCIA, A., MARTINEZ, J., STASHENKO, E. 2011. Estudio comparativo por electroforesiscapilar y cromatografía líquida de altaeficiencia de catequinas extraídas decinco variedades de cacao colombiano. Rev. Acad. Colomb. Cienc., Bucaramanga,

Colombia.35(136): 371-379.

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 a la calidad. Tesis Lic. en Química. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 114 p.

CHAVEZ, R. 2012. Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao. Tesis Ing. Ind. Alim. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria la Selva. 80p.

CIENFUEGOS, E., DEL MAR, M., MUGUERZA, B., MOULAY, L., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A. 2009. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. J. Agric. Food Chem., Madrid, España. 57(14): 6156-6162.

CIENFUEGOS, F., IBARRA, E., PASAMAR, A., MONTAÑÉS, J., PONS, A., VICENTE, J. 2007. Proceso para la obtención de polvo de cacao rico en polifenoles y bajo contenido en materia grasa y polvo de cacao obtenido. Oficina española depatentes y marcas. Madrid, España. 14 p.

CONDEZO, O. 2011. Polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante (DPPH y peroxilo) en granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) comercial de Tingo María y Tocache. Tesis ing. Ind. Alim. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria la Selva. 80p.

CORDOVA, Z. 2003. Estadística descriptiva e inferencial. Aplicaciones. 5 ed. *Lima, Perú. Ed. Librería Moashera S.R.L. 87 p.*

COUNET, C., OUWERX, C., ROSOUX, D., COLLIN, S. 2004. Relationship between procyanidin and flavor contentsof cocoa liquors from different origins. J. of Agricultural and Food Chemistry, 52: 6243-6249.

CRESPO, F. 1997. Cultivo y beneficio del cacao CCN-51. 1 ed.Guayaquil, Ecuador. El conejo. 135 p.

CROS, E., 2004. Factores que afectan el desarrollo del sabor a cacao, bases Bioquímicas del perfil aromático. INIAP, Estación experimental tropical Pichilingue, Quevedo, Ecuador.20 p.

CROSS, E., JEANJEAN, N. 1997. Formation I aröme cacao. In: Cacao et Chocolat - Production et caractéristiques. Lavoisier (Paris), á paraitre. Memorias del I Congreso del Cacao y su Industria, Maracay, estado Aragua.

CUBERO C., E. 1990. Indicadores químicos de la calidad del grano seco de cacao (*Theobroma cacao* L.) y su aplicación. Costa Rica. 154p.

CUEVAS, M., ANTEZANA, A., WINTERHALTER, P. 2008. Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz boliviano. Memorias Red-Alpha-Lagrotech. Comunidad Europea. Cartagena. 79-95 p.

DEL VALLE L., G., GONZALEZ L. A., BÁEZ, R. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis vinífera* L.) y su relación con el color. Chipango, México. 28(4): 359-368.

DIAZ, S., PINOARGOTE, M. 2012. Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN-51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. Tesis Ing. de

alimentos. Guayaquil, Ecuador. Escuela superior politécnica del litoral. 145 p.

EFRAIM, P., BARRETO, A., PEREIRA, D. 2011. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. Braz. J. Food Technol., Campinas. 14(3): 181-201.

ELWERS, S., ZAMBRANO, A., ROHSIUS C., LIEBEREI, R. 2009. Differences between the content of phenolic compounds in criollo, forastero and trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). Eur Food Res Technol. Hamburg, Germany. 229:937–948.

ENRIQUEZ, G., SORIA, J. 1984. Mejoramiento genético para resistencia a cinco enfermedades del cacao. Serie materiales de enseñanza n° 9. Centro agronómico tropical de investigaciones y enseñanza (CATIE). Torrealba, Costa Rica. 26 p.

ESPÍN, S., SAMANIEGO, I. 2006. *Parámetros químicos de calidad en* almendras y licor de cacao. Taller de presentación de resultados. Guayaquil, Ecuador. 61 p.

FRANCO, T., HIDALGO, R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterizaciónmorfológica de recursos fitogenéticos. Boletín técnico N° 8, *InstitutoInternacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali,* Colombia.89 p.

GARCIA, L. 2009. Catálogo de cultivares. Dirección de Promoción de Competitividad. Tingo María, Perú. 110 p.

GARCIA, L. 2008. Estudio de caracterización potencial genética de cacao en el Perú. Informe final, proyecto de cooperación UE y Perú en materia a

asistencia técnica relativa al comercio-apoyo al programa estratégico nacional exportaciones (PENX 2003-1013). Lima, Perú. 143 p.

GARCÍA, L. 2010. Catálogo de Cultivares de Cacao del Perú. Ministerio de Agricultura. Comisión Nacional para el Desarrollo y Vida sin Drogas-DEVIDA. Lima. 112 p.

GARZON, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta biol. Colomb., Bogotá, Colombia. 13(3): 27-36.

GIL, A. 2012. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en *cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización*. Tesis, Mg. Ciencias farmacéuticas. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia. 119 p.

GONZALES, F., ANTEPARRA, M., ADRIAZOLA, J., NATIVIDAD, R., GARCIA, L. 2007. Cultivos industriales tropicales: cacao, café y palma aceitera. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva.

GRANADO, A. 2010. Estudios de los mecanismos de acciónmolecular de polifenoles de la dietaen cultivos celulares y animales deexperimentación. Tesis Doctoral. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 178 p.

GUTIERREZ, J., HOLGUIN, Y. 2007. Estudio del comportamiento y desarrollo de la enjertación de cinco clones de cacao (*Theobroma cacao*) durante el primer año de establecimiento bajo dos modelos agroforestales en condiciones agroecológicas del Guaviare. Tesis en manejo forestal. San José de Guaviare. Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente. Universidad nacional abierta y a distancia. 157 p.

HICKS, J., TORRES, Y., SIERRA, V. 2006. Estrés oxidante, concepto y clasificación. Rev. Endocrinology y Nutr. 14 (4): 223-226.

HERNADEZ, R., FERNANDEZ, C., BAPTISTA, L. 2001. Metodología de la investigación. Ed. McGraw - Hill interamericana S.A. México. 503p.

HUANCA, J. A. 2010. Polifenoles totales, catequina y actividad antioxidante en granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) Criollo y CCN–51 en las etapas de beneficio y tostado. Tesis, Ing. en industrias alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad nacional agraria de la selva. 83 p.

ICT. 2003. *Beneficio del cacao y sus variedades. Tarapoto, Perú. 155 p.*

JIMÉNEZ, J. 2006. Calidad sensorial de cacaos especiales. Seminario Taller Internacional: Producción, calidad y mercadeo de cacaos especiales 21-23.Nov. 2006. Quevedo, Ecuador.

JONFIA, W., WEST, G., ALDERSON, G., TUCKER, G. 2007.Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. Food Chemistry. 108:1155-1159.

JULIAN, P. 2009. Propiedades físicas y químicas de tres variedades del fruto de *Annona diversifolia.* Tesis Ing. en alimentos. Huajuapan de León, México. Universidad Tecnológica del Mixteca. 78 p.

LARREA, J. 2012. Obtención de extractos polifenólicos a partir de uvapara uso alimentario. Tesis Mg. de tecnología y calidad en las industrias agroalimentarias. Universidad pública de Navarra. 99 p.

LIMA, H. 2002. Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. Universidad de la Habana. Cuba. p. 2 - 4.

LUNA, F., CROUZILLAT, L., CIROU, BUCHELI, P. 2002. Chemical composition and flavor of ecuatorian cocoa liquor. J. Agric. Food Chem. 50, 3527 – 3532.

MAHARAJ, K., MAHARAJ, P., BEKELE, F., RAMNATH, D., BIDAISEE, G., BEKELE, I., PERSAD, C., JENNINGS, K., SANKAR, R. 2011. Trinidad selected hybrids: An investigation of the phenotypic and agro economic traits of 20 selectedcacao cultivars. Trop. Agric., Trinidad. 88(4): 175-185.

MARQUEZ, E. 2009. *Contribución a la biología molecular de los genes* antocianidina sintasa (*ans)* y sorbitol deshidrogenasa (*sdh*) en cultivares criollos y trinitarios de *Theobroma cacao* L. Tesis Lic. en biología. Universidad de los Andes. 98p.

MARTINEZ, J. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *heliocarpusterebinthinaceus.* Tesis Ing. de alimentos. Huajuapan de León, México.Universidad Tecnológica de la Mixteca. 68 p.

MENDOZA, C. 2012. Las antocianinas del maíz: su distribución en la planta y producción. Tesis maestro en ciencias. Montecillo, México. Escuela de posgrado de recursos genéticos y productibilidad genética. 130 p.

MILLER, K., STUART, D., SMITH, N., LEE C.,MCHALE, N., FLANAGAN, J., OU, B., JEFFREY, H. 2006: Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 4062-4068.

MILLER, K., APGAR, J., SWEIGART, D., STUART, A., MCHALE, N., KONDO, M., HURST, W. 2009. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidincontent in foods prepared with cocoa powder. J. of Food Sci. States Unites. 74(6):398-404.

MORILLO, M. 2005. Alternativas de industrialización de cacao (*Theobroma cacao* L.) nacional fino o de aroma en el cantón Pangua provincia de Cotopaxi. Tesis ing. industrialización de alimentos. Quito, Ecuador. Universidad tecnológica equinoccial. 103 p.

NAVIA, A., PAZMIÑO, N. 2012. *Mejoramiento de las características sensoriales* del cacao CCN-51 a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación. Tesis Ing. de alimentos. Guayaquil, Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral. 135 p.

NEGARESH, S., MARÍN, I. 2013. El cacao y la salud humana: propiedades antioxidantes del cacao nicaragüensey productos alimenticios comercializados. Rev. Agroforestería de las américas. Managua, 49. 93-98 p.

NIENENAK, N., ROHSIUS, C., ELWERS, S., OMOKOLO, D., LIEBEREI, R. 2006. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao L.)* clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. J. of food composition and analysis. Hamburg, Germany.19: 612-619.

NINFALI, P., MEA, G., GIORGINI, S., ROCCHI, M., BACCHIOCCA, M. 2005. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. British Journal of Nutrition, 93: 257-266.

ODRIOZOLA, S. 2009. Obtención de zumos y frutos cortados con alto potencial antioxidante mediante tratamientos no térmicos. Memoria para optar el grado de Doctor. Brasil. Universidad de Lleida. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. 367 p.

OTHMAN, A., ISMAIL, A., GHANI, N., ADENAN, I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chemistry, Kuala Lumpur, Malaysia. 100: 1523-1530.

OVACO, V., PINEDA, LL. 2011.Los residuos de cacao (*Theobroma cacao* L.) *como fuente alternativa de antioxidantes. Tesis Ing. Industrias* Agropecuarias. Loja, Ecuador. Universidad Católica de Loja. 42 p.

PADILLA, F., RINCON, A., BOU-RACHED, L. 2008. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas. Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, Venezuela. 58(3): 303-308.

PALACIOS, A. 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, Ing. Agrónomo. Santa Ana, Ecuador. Universidad Técnica de Manabí. 257p.

PALADINO,S. 2008. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitisvinifera* L.). Tesis Mag. en Alimentos (Mención en Ciencias). Mendoza, Argentina. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. 100 p.

PELÁEZ, E. 2009. Actividad antioxidante del extracto en diclorometano de *Palicourea guianensis* Aubl.(*Rubiaceae*). Tesis Ing. químico. Pereira.

Universidad Tecnológica de Pereira. 41p.

PELLIGRINI, N.; RE, R.; YANG, M. y RICE – EVANS, C. 1999. Screening of Dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts of Antioxidant Activities Applying 2,2-azinobis (3-Ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) Radical Cation Decolorization Assay. Methods in Enzymology. 299:379-391.

PEREA, V., CADENA, C., HERRERA, A. 2009. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. Rev. Salud, Bucaramanga, Colombia.41(2):120-126.

PHILLIPS, W., ARCINIEGAS, A. MATA, A., MOTAMAYOR, J. 2012. Catálogo de clones de cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba(Costa Rica).Manual Técnico nº 105. 70 p.

POO, S. 2005. Concentración de antocianinas en jugo de cranberries (*Vacciniummacrocarpon*Ait.) mediante nanofiltración.Tesis Lic. Ciencias de los Alimentos. Valdivia, Chile. Escuela de Ingeniería en alimentos. Universidad Austral de Chile. 62 p.

PORTILLO, L., GRAZIANI, L., CROS, E. 2006. Efecto de algunos factores post-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.). Rev. Fac. Agron., Caracas. 23(1): 1-8.

PLÚA, J. 2008. Diseño de una línea procesadora de pasta de cacao artesanal. Tesis, Ing. de alimentos. Guayaquil, Ecuador.Escuela superior politécnica del litoral. 106p.

QUIÑONES, M., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, M. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr. Hosp. Madrid, España. 27(1):76-89.

QUIÑONEZ, J., TRUJILLO, R., CAPDESUÑER, Y., QUIRÓS, Y., HERNÁNDEZ, M. 2013. Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). Rev. Cubana de plantas medicinales, Cuba. 18(2):201-215.

RAMÍREZ, M., CELY, V., RAMÍREZ, S. 2013. Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas, México.Perspect Nutr Humana, Chiapas, México. 15: 27-40.

RAMOS, G., GÓMEZ, A., ZAMBRANO, A., ROMERO, C., RIVAS E., DUGARTE, S. 2005.Definición de perfiles sensoriales de licores de cacao para diferenciar entretipos finos y comunes. *In* Taller InternacionalDeterminación de los parámetros físicos químicos y organolépticos paradiferenciar cacaos finos de ordinarios. (03-05abril / 2006, Guayaquil, Ecuador).INIAP-CFCANECACAO.

RAMOS, E., CASTAÑEDA, B., IBÁÑEZ, L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Rev. Acad. Perú Salud, Perú. 15: 42-46.

RADOJCIC, I., DELONGA, K., MAZOR, E., DRAGOVIC-UZELAC, V., CARIC, M., VORKAPIC-FURAC, J. 2009. Polypehnolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. Czech J. Food Sci. Zagreb, Croacia. 27(5): 330-337.

RITCHEY, J. 2002.Estadística para las ciencias sociales. El potencial de la imaginación estadística. Trad. por Edgar Cosío. 1 ed. México. p. 467-485.

ROHSIUS, C., ANDERSSON, 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. Conferencia internacional sobre investigaciones del cacao Nº 11. Costa Rica. 86 p.

SALVADOR, Y. 2008. Evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao criollo merideño durante la fermentación en dos condiciones edafoclimáticas. Agron. Trop. 60(2): 211-219.

SANCHEZ, V. 2007. Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. Tesis Ing. Agronómico. Quevedo, Ecuador. Universidad técnica estatal de Quevedo. 93 p.

SANDOVAL, M., OKUHAMA, N., ANGELES, F. 2001. Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidativa y anti-inflamatorio de plantas medicinales de la Amazonia. International work shop. Iquitos, Perú. 25 p.

SANDOVAL, S. A. 2009. Evaluación de fermentaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) clon catongo y comparación con dos clones. Tesis Ing. Agronoma. Guácimo, Costa Rica. Universidad EARTH. 32 p.

STAHL, L., MILLER, K., APGAR, J., SWEIGART, D., STUART, D., MCHALE, N., OU, B., KONDO, M., HURST, W. 2009. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin

content in foods prepared with cocoa powder. J. of Food Science. EE.UU. 74(6): 456-461.

SOGI, D., SIDDIQ, M., ROIDOUNG, S., DOLAN, K. 2012. Total phenolics, carotenoids, ascorbic acid, and antoxidant properties of fresh- cut mango (*Mangifera indica* L., *Tommyatkin*) as affected by infrared heat treatment. Food science. 77 (11): 1197-1202.

SUAZO, Y. 2012. Efecto de la fermentación y el tostadosobre la concentración polifenólica yactividad antioxidante de cacao Nicaragüense.Memoria de investigación: Trabajo fin de máster. Pamplona. Universidad Pública de Navarra. 64 p.

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

TOMAS, F. 2003. *Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alim. Nutri. Salud.* 10(2): 41-53.

UGARTONDO, C. 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. J. Agric. FoodChem.Barcelona, España. 54:6945-6950.

VENEREO, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cubana Med. Milit., Cuba. 31(2):126-133.

VERDESOTO, P. 2009. Caracterización química preliminar de cacao *(Theobroma cacao)* de los municipios de Omoa y La Masica, Honduras. Tesis, Ing. en Agroindustria alimentaria. Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 66p.

WILBUR COMPANY. 2010. Sensory Analysis of Chocolate. [En línea]: (www.wilderchocolate.com).

ZAMBRANO, A., GÓMEZ, Á., RAMOS, G., ROMERO, C., LA CRUZ C., RIVAS, E.2010. Caracterización de parámetros físicos de calidad en almendras de cacao criollo, trinitario y forastero durante el proceso de secado. Agron. Trop., Venezuela. 60(4): 389-396.

ZAPATA, S., TAMAYO, A., ALBERTO, B. 2013. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. Rev. *Cubana de Plantas Medicinales. Medellín. 18(3):391-404.*

IX. ANEXO

A-I. Tasación sensorial (perfil) del licor de cacao.

Nombre:
Fecha: Sección:
Código de Muestra:

Pruebe la muestra y marque el punto sobre la línea que corresponda a la intensidad de cada atributo.

Atributos	Ausente 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Extremo 10
Cacao											
Acidez											
Astringencia											
Amargor											
Afrutado											
Floral											
Nueces											
Panela/Malta											
Crudo/Habas Verde											
Otros Sabores											

Comentarios: .....
.....

A-II. Análisis de varianza contenido de polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P_{valor}	Sig.
Tratamiento	7	17,7262	2,5323	669,54	<,0001	**
Error experimental	16	0,0605	0,0038			
Total	23	17,7867				

R^2 = 0,9966 CV = 1,3160 MSE = 0,0615 Media = 4,6730

A-III. Análisis de varianza contenido de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P_{valor}	Sig.
Tratamiento	7	0,2915	0,0416	1291,09	<,0001	**
Error experimental	16	0,0005	0,000032			
Total	23	0,2920				

R^2 = 0,9982 CV = 2,0433 MSE = 0,0057 Media = 0,2779

A-IV. Análisis de varianza IC_{50} del radical DPPH en granos secos de cacao criollo y siete clones.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P_{valor}	Sig.
Tratamiento	7	8929,9247	1275,7035	3746,08	<,0001	**
Error experimental	16	5,4487	0,340544			
Total	23	8935.373				

R^2 = 0,9993 CV = 0,5888 MSE = 0,5836 Media = 99,1172

A-V. Análisis de varianza IC_{50} del radical ABTS en granos secos de cacao criollo y siete clones.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P_{valor}	Sig.
Tratamiento	7	2822,3408	403,1915	456,82	<,0001	**
Error experimental	16	14,1216	0,8826			
Total	23	2836.4624				

R^2 = 0,9950 CV = 1,9674 MSE = 0,9394 Media = 47,7503

A-VI. Resultados de la evaluación sensorial de los granos de cacao criollo y diferentes clones.

CODIGO	Sabor acacao	Acidez	Astringencia	Amargor	Frutal	Floral	Nuez	Crudo	Otros sabores	Puntaje total
CCN_51	2,3	1,3	3,3	3,2	1,2	0,8	0,0	0,0	0	-0,83
POUND_12	3,2	1,0	1,7	2,2	1,7	1,0	0,0	0,0	0	3,00
TSH_1188	2,5	1,7	3,2	3,5	0,0	0,7	1,0	0,7	0	-1,50
ICS_1	3,2	1,5	3,5	3,3	1,0	0,0	0,7	1,0	0	-1,50
SCAVINA-6	3,2	2,2	3,0	3,2	2,2	1,7	0,0	0,0	0	3,07
ICS_95	3,2	1,5	2,7	3,5	1,7	0,7	0,0	0,0	0	0,83
IMC_67	3,5	3,2	3,3	3,0	1,0	0,3	1,0	0,0	0	2,67
Criollo	2,5	2,0	3,0	3,7	1,0	0,0	0,7	0,7	2	-3,17

A-VII. Autovalores del análisis multivariado

Lambda	Valor	Proporción	PropAcum
1	3,90	0,49	0,49
2	1,64	0,21	0,69
3	1,11	0,14	0,83
4	0,62	0,08	0,91
5	0,35	0,04	0,95
6	0,25	0,03	0,98
7	0,13	0,02	1,0
8	0,00	0,00	1,0

A-VIII. Autovectores del análisis multivariado.

Variables	E1	E2
Sabor acacao	-0,19	0,60
Acidez	0,16	0,68
Astringencia	0,38	0,16
Amargor	0,35	-0,10
Frutal	-0,43	1,14
Floral	-0,38	-0,02
Nuez	0,43	0,27
Crudo	0,40	-0,22

A-IX. Correlaciones con las variables originales.

Variables	CP 1	CP 2
Sabor a cacao	-0,37	0,77
Acidez	0,32	0,88
Astringencia	0,75	0,20
Amargor	0,69	-0,13
Frutal	-0,84	0,18
Floral	-0,75	-0,03
Nuez	0,86	0,34
Crudo	0,79	-0,28