

POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE GRANOS SECOS Y ANALISIS SENSORIAL DEL LICOR DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CRIOLLO Y SIETE CLONESOrfa Nazario¹; Elizabeth Ordoñez², Yeni Mandujano³, Juan Arévalo⁴

Recepción: 13 de marzo de 2014

Aceptado: 16 de noviembre de 2014

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 determinar la capacidad antioxidante por su capacidad de inhibir radicales libres DPPH y ABTS⁰⁺ 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 hidroalcohólico, 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 SCA-6 y ICS-95 con $5,72 \pm 0,045$ y $5,59 \pm 0,05$ g EAG/100 g respectivamente, presentaron mayor contenido de polifenoles totales y el menor IMC-67 $3,34 \pm 0,02$ g EAG/100g, el CCN-51 y Criollo con $0,425 \pm 0,003$ y $0,424 \pm 0,004$ mg cianidina-3-glucósido/g respectivamente, presentaron mayor contenidos de antocianinas y el menor ICS-95 $0,122 \pm 0,003$ mg cianidina-3-glucósido/g. La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH lo presentó ICS-95 IC_{50} $73,29 \pm 0,9$ μ g/mL y el menor IMC-67 IC_{50} $139,01 \pm 0,49$ μ g/mL y frente al radical ABTS⁰⁺ SCA-6 con un IC_{50} $33,04 \pm 0,69$ μ g/mL y P-12 IC_{50} $64,76 \pm 0,42$ μ g/mL respectivamente. En la evaluación sensorial se encontró cuatro grupos con características similares (SCA-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 P-12 sin carácter predominante. El contenido de polifenoles totales, la capacidad antioxidante y el análisis sensorial está influenciado por el grupo genético que pertenece el cacao, la poscosecha y las variables medio ambientales.

Palabras clave: Cacao, clones, polifenoles, antocianinas, antioxidante, análisis sensorial.**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 determined antioxidant capacity by their ability to inhibit free radical DPPH and ABTS⁰⁺ in dry beans and sensory analysis of cacao liquor criollo and seven clones (SCA-6, IMC-67, P-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 (DCR) and the Tukey test ($p < 0,05$) for sensory evaluation multivariate principal components analysis was used. It is concluded that the SCA-6 and ICS-95 clones with $5,72 \pm 0,045$ and $5,59 \pm 0,05$ g GAE/100g respectively, had higher total polyphenol content and lower IMC-67 $3,34 \pm 0,02$ g GAE/100g, the CCN-51 $0,425 \pm 0,003$ and Criollo $0,424 \pm 0,004$ had higher contents of anthocyanins and lower ICS-95 $0,122 \pm 0,003$ mg cyanidin-3-glucoside/g. The highest antioxidant capacity against DPPH radical presented it ICS-95 IC_{50} $73,29 \pm 0,9$ mg/mL and IC_{50} lower IMC-67 $139,01 \pm 0,49$ mg/mL and the radical ABTS⁰⁺ SCA-6 with an IC_{50} $33,04 \pm 0,69$ mg/mL and P-12 IC_{50} $64,76 \pm 0,42$ mg/mL. In the sensory evaluation, four groups with similar characteristics (SCA-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 P-12 without predominant character. The total polyphenol content, antioxidant capacity and sensory analysis is influenced by the genetic group belonging cocoa, postharvest and environmental variables.

Key words: Cacao, clones, polyphenol, anthocyanins, antioxidant, analysis sensory.¹ Tesista de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias - UNAS, Tingo María - Perú² Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agrarias de la Selva (UNAS), Tingo María - Perú.³ Agroindustrias MAKAO PERÚ, Pucacaca-San Martín⁴ Instituto de Cultivos Tropicales-ICT, Tarapoto-San Martín

Introducción

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. Se distinguen dos razas de cacao, Raza Forasteros: Conocidos también como cacaos Amazónicos y/o amargos, tienen granos aplanados, pequeños de color morado y sabor amargo (1). La Colección Castro Naranjal (CCN-51) y fueron obtenidos de dos cruces, el primero entre ICS-95 x IMC-67, y el segundo cruce con cacao forastero "Canelos", se caracteriza por tener 44 semillas/fruto, tamaño de semilla intermedia, el color de los cotiledones es morado, peso seco de semilla 1,4 g, rendimiento es 937 - 2,812 kg/ha. El licor tiene acidez y astringencia media; amargor medio; frutal bajo y notable intensidad de chocolate (2). El clon Iquitos Mezclado con Calabacillo (IMC-67), es Peruano, tiene 45 semillas/ fruto, tamaño de semilla intermedia, peso seco de semilla 1,2 g, su rendimiento es 833 a 2,500 Kg/ha; 48% de grasa (3). Scavina-6 (SCA-6) es un forastero de alto amazónico, tiene 40 semillas/fruto, tamaño de semilla 0,8 g, rendimiento 484 - 1,452 kg/ha; tiene alta acidez y astringencia, amargor medio, floral bajo, cacao medio (3). Pound (P-12) o Perú es un forastero del Alto Amazonas, de origen peruano, tamaño de la semilla es pequeña-mediana y su cotiledones es morado (2).

Raza Criollo: Se cultivaba en América central, es conocido como cacao fino, produce un fruto aromático, afrutado y dulce, pero tiene bajos rendimientos (2). El híbridos se origina cuando un genotipo criollo se cruzó naturalmente con un genotipo amelonado del Brasil (forastero del bajo Amazonas) (1). Presentan almendras de tamaño mediano a grande con cotiledones rojizos y desarrolla un aroma a chocolate pronunciado con un sabor adicional frutal (2). Imperial College Selection (ICS-1), de Trinidad, es de fruto mediano, el color del cotiledon 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 (4).

El Imperial College Selection (ICS-95), de Trinidad, tiene fruto mediano, el color de los cotiledones es morado; el tamaño del fruto es grande, 35 semillas/fruto, tamaño de semilla intermedia, peso seco de semilla 1,3 g, rendimiento 682 - 2,045 kg/ha; el licor tiene una nota intermedia de corteza y nuez, notas a fruta tropical, la intensidad del chocolate tiende a ser moderado (3).

Híbrido Seleccionado en Trinidad (TSH-1188), es originario de Trinidad y Tobago, el peso del fruto es 839,36 g, peso seco del grano 1,241 g, el cotiledón

(sin testa) 1,18 g, el índice del grano 18,36 (5). Los Aspectos importantes para mejorar la genética de cacao son los clones, 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.) (4).

Los polifenoles son metabolitos secundarios más numerosos y ubicuamente distribuidos entre las especies vegetales y los polifenoles de interés en el cacao son los del grupo de flavonoides, como las catequinas (37%), antocianinas (4%) y procianidinas (58%) (6). Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos solubles al agua visibles para el ojo humano, son metabolitos secundarios de color morado a rosa en las semillas de cacao y son más estables en un medio ácido que en un medio neutro o alcalino (7). Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (8). Los radicales libres son cualquier átomo o molécula que contenga algún electrón no apareado en su orbital externo y que puede existir en forma independiente (9). Las principales especies reactivas del oxígeno son: Radical hidroxilo (HO[•]); peróxido de hidrógeno (H₂O₂); anión superóxido (O₂^{•-}); oxígeno singlete (¹O₂); oxígeno nítrico (NO); peróxido (ROO); semiquinona (Q) y ozono (10). El desbalance entre radicales libres y antioxidantes, produce un fenómeno llamado estrés oxidativo, lo cual ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas (11). Nuestra amazonia es un espacio megadiverso que alberga una amplia diversidad y variabilidad genética de esta especie, siendo la región San Martín y 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. 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, antocianinas y 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+) y realizar el análisis sensorial del licor de cacao criollo y siete clones.

Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), ubicado en la ciudad de Tingo María, Provincia de Leoncio Prado,

Región Huánuco y en el laboratorio del Instituto de Cultivos tropicales (ICT), ubicada en el distrito de La Banda de Shilcayo, provincia y región San Martín.

Materia prima

Las muestras de granos secos de cacao fueron: Criollo, Forasteros (CCN-51, SCAVINA-6 o SCA-6, IMC-67 y POUND-12 o P-12) y Trinitarios (ICS-1, TSH-1188 y ICS-95). Procedentes de la estación experimental Juan Bernito del ICT, a una altitud de 360 m.s.n.m., a 06°30'07" de latitud Sur, a 76°20'09" de latitud Oeste, con un clima tropical de húmedo y humedad relativa media de 60% y temperatura media anual de 30°C.

Equipos: 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 Heating Drying Oven). Congelador FFV-2065FW -20°C (Frigidaire, USA). Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industries. SITM). Centrifuga modelo MIKRO 22R (Hettich). pH - metro (Mettler Toledo SevenEasy) pH 0-14.

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, para ello se cosechó selectivamente (frutos maduros), quiebre y desgrane, fermentación (pequeña escala, se toma 1 Kg de muestra en baldes transparentes y se lleva a estufa a 33°C), 1º remoción (a 48 h y se sube la temperatura 40°C), 2º remoción (72 h), 3º remoción (96 h y se sube a 45°C), 4º remoción (120 h y sube a 47°C), prueba de fermentación (144 h y se toma 10 semillas, se calificó como buena fermentación ≥ 7 semillas), secado (hasta 7,5% humedad) y almacenado (bolsas de polietileno a -18°C) (12).

Preparación del extracto hidroalcohólico

Los extractos se prepararon a partir de los granos secos de cacao, se desengraso por el método de Folch, que 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.

Métodos de análisis

Cuantificación de polifenoles totales: Se realizó por el método espectrofotométrico desarrollado por Folin Ciocalteu (13). Cuantificación de antocianinas: Se realizó por el método del pH diferencial (14). Determinación de la capacidad antioxidante: Capacidad de inhibir radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (15) y Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino

-6- ácido sulfónico) (ABTS+) (16) y evaluación sensorial del licor de cacao (17).

Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó primero la curva estándar con ácido gálico a las concentraciones de 1,0; 0,50; 0,25; 0,125 y 0,0625 mg/mL, por triplicado. Para las muestras de los siete clones y el criollo, se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100mg/mL (filtrado y centrifugado 10000rpm/10min a 4°C), a partir de ello se realizó la dilución de trabajo de 10 mg/mL, con 3 repeticiones por tratamiento. En cada tubo de ensayo se adicionó agua destilada 1580 µL, 20 µL de las soluciones de trabajo diluida, 100 µL de solución de fenol Folin- Ciocalteu y finalmente 300 µL Na₂CO₃ al 20%, se incubó 2 h a temperatura ambiente y se realizó la lectura a 700 nm.

Cuantificación de antocianinas

Para la cuantificación de antocianinas primero se preparó las soluciones buffer: Buffer pH = 1 y Buffer pH = 4,5. Luego se trabaja con el extracto de 100 mg/mL, filtrado y centrifugado, por triplicado; en una cubeta de poliestireno se adicionó 200 µL de extracto (SCA-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 se adicionó 250 µL de extracto (TSH-1188, P-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 realizó la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a 510 nm. Las absorbancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación y expresadas en mg cianidina-3-glucósido/g muestra.

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

Dónde: C (mg/g) = mg de cianidina-3-glucósido por g de muestra seca. PM= Masa molecular de la cianidina-3-glucósidos 484,82, AbM= La absorptividad 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.

Capacidad de inhibir radicales libres 1,1-difenil-2- picrylhidrazil (DPPH)

Para la determinación del coeficiente de inhibición (IC₅₀) del radical DPPH, se preparó 10 mL de solución stock de DPPH a 1mM en metanol al 99% de pureza, se agitó 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. Las concentraciones usadas para cada clon fueron SCA-6(25; 50; 100 y 200), CCN-51 y ICS-1(25; 50; 100 y 250), IMC-67(37,5; 75; 150 y 350), P-12(31; 25; 62,5; 125 y 250), ICS-95(21,87; 43,75; 87, 5 y 175), TSH-1188 (25; 62,5; 125 y 300), y Criollo (25; 50; 125 y 250) ug/mL respectivamente. En una cubeta de poliestireno se adicionó 25 µL de

muestra y 975 µL de solución DPPH a 100 µM, se realizó la lectura en un espectrofotómetro de UV/VIS a 517 nm con intervalos de 30 s por un tiempo de 10 min. Se determinó el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación:

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

Dónde: Abs Control: Absorbancia del control y Abs Muestra: Absorbancia de la muestra en 10 min.

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

Según la metodología el radical ABTS^{o+} se forma tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (140 mM) incubados a temperatura ambiente y oscuridad por 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{o+} se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia entre 0,7 a 1,2. Para la inhibición del radical ABTS^{o+} en las distintas muestras se realizó el filtrado y centrifugado, y se prepararon soluciones de trabajo SCA-6 (5; 17,5;35 y 80), CCN-51 y ICS-1(5, 25,50 y 100), IMC-67 (10; 40; 80 y 150), P-12(10; 50; 80 y 140), ICS-95 y criollo(5; 20; 50 y 100), TSH-1188 (5; 30; 60 y 120), µg/mL respectivamente. Luego en una cubeta de poliestireno se adicionó 10µL de la solución de trabajo y 990µL del radical ABTS^{o+}. 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 formula:

$$\% \text{ inhibicion ABTS} = ((\text{Ac}-\text{Am}))/\text{Ac} * 100$$

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

Evaluación sensorial del licor de cacao

La limpieza de los granos de cacao (eliminar cuerpo extraños y granos defectuosos), luego el tostado a 115 °C/20 min, con la finalidad de separar la cascarilla del grano y cada 10 min se remueve, luego se deja enfriar 25 °C/20 min, pasa a la trituration, los nibs de cacao son molidos y para ayudar con la finura pasa a un conchado a 50 °C/4 h. El licor obtenido se colocó en un recipiente de plástico; se identificó la muestra con una etiqueta: fecha de elaboración, tipo de cacao. Se dejó enfriar y luego se almacenó a 4 °C, hasta las evaluaciones sensoriales. Para la evaluación sensorial los licores de cacao se llevaron a 40-45 °C, hasta consistencia fluida, con tres repeticiones. Cada catador tomó una cantidad pequeña de licor de cacao en una paleta plástica pequeña. Los resultados para ambos radicales se expresaron en IC₅₀ (µg/ml). Todos los resultados fueron analizados mediante el modelo estadístico Diseño Completo al Azar (DCA),

sometidos al programa estadístico SAS 9.0 y la prueba de Tukey (p<0,05).

Resultados y discusión

Cuantificación de polifenoles totales en grano seco de cacao criollo y siete clones

En Cuadro 1 y Figura 1, se presenta 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, comparando los promedios mediante la prueba de Tukey (p≤0,05) podemos indicar que el mayor contenido de polifenoles totales se encontró en los clones SCA-6 (forastero) fue 5,721±0,039 y ICS-95 (trinitario) 5,592±0,051 g EAG /100 g respectivamente, (8) 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 tuvo el contenido de polifenoles más alto, este clon pertenece a los forasteros (2), el porcentaje de polifenoles totales fue mayor en los acriollados y en el cultivar Catongo que pertenece al 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 (18).

Cuadro 1. Cuantificación de polifenoles totales en los 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).

Comparando los ocho tratamientos el segundo lugar fue ocupado por el CCN-51 con 5,184±0,03 g EAG/100g; comparando los polifenoles totales en Criollo y CCN-51 encontró 7,597±0,011 y 7,547±0,038 g EAG/100g respectivamente (19); este triple híbrido contiene un nivel de polifenoles totales no menor al 3% y no superior al 12% en peso referido a la semilla seca de cacao (20).

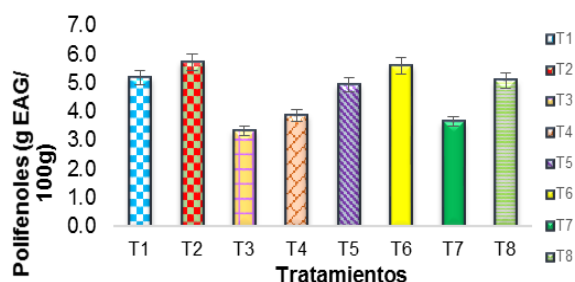


Figura 1. Representación del contenido de polifenoles totales en granos secos de cacao criollo y siete clones

IMC-67 (clon forastero) 3,338±0,020 g EAG/100g, para este mismo clon se reportó 4 g EAG/100 g [6]; la diferencia en la cantidad de polifenoles totales registrados en los clones se debe en parte por la interacción de la parte genética, pero más importante son las variables medio ambientales (condiciones de crecimiento, intensidad de la luz, humedad, temperatura, y otros factores como el estrés) (21).

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

En Cuadro 2 y Figura 2, se presentan 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, comparando los promedios mediante la prueba de Tukey (p≤0,05), el mayor contenido de antocianinas fue para el clon CCN-51 (Forastero) con 0,425±0,003 y el Criollo 0,424±0,004 mg cianidina-3-glucósido/g de muestra.

Cuadro 2. 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).

Comparando estos resultados en granos fermentados de cacao, presentó mayor contenido de antocianinas el clon ICS-1 1,05±0,045 y en menor correspondió al CCN-51 0,27±0,003 mg de cianidina-3-glucósido/g (22); y durante la fermentación se da el cambio de color del cotiledón que pasa de violeta a marrón por la liberación de antocianinas (23). En la Figura 2, se muestra el menor contenido de antocianinas en el clon ICS-95

con 0,122±0,003 mg cianidina-3-glucósido/g, para el mismo clon se reporta 0,65±0,008 mg de cianidina-3-glucósido/g, la coloración del cotiledón es un carácter típico genético que está asociado al tipo de cacao (24). La concentración de antocianinas se reduce en un 90% durante la fermentación, las concentraciones más bajas se observaron en los días 2 y 3 respectivamente (25).

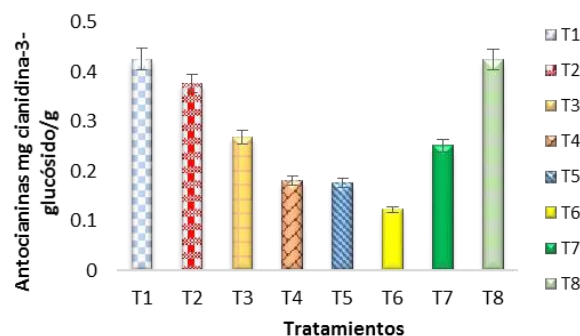


Figura 2. Representación del contenido de antocianinas en granos secos de cacao criollo y siete clones

Coefficiente de inhibición (IC₅₀) del radical 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil (DPPH).

En Cuadro 3 y figura 3 se presentan los resultados del IC₅₀ del radical DPPH en granos secos de cacao Criollo y siete clones, realizando el análisis estadístico se encontró diferencia significativa comparando los promedios mediante Tukey (p≤0,05) podemos indicar que la mayor eficiencia para inhibir el radical DPPH fue ICS-95 IC₅₀ 73,293±0,9 µg/mL cabe indicar que este tratamiento fue el que tuvo mayor contenido de polifenoles totales. Este clon pertenece a un híbrido trinitario y obtuvo alto contenido de polifenoles totales, 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 (22); la actividad antioxidante está determinada por el contenido de polifenoles, flavonoles como (-)-epicatequina y (+) catequina (26).

Cuadro 3. Resultados del IC₅₀ del radical DPPH en granos secos de cacao criollo y siete clones

Muestra	Trat.	IC ₅₀ (µg/mL)	1/IC ₅₀ (µg/mL)
CCN-51	Clon F T1	89,44±0,24 ^e	0,0112
SCA-6	Clon F T2	80,473±0,15 ^f	0,0124
IMC-67	Clon F T3	139,008±0,49 ^a	0,0072
P-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 una misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

El segundo lugar lo ocupó el clon SCA-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. 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 (6).

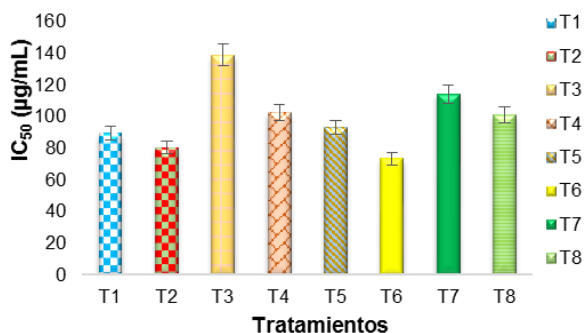


Figura 3. Comportamiento del IC₅₀ con el radical DPPH en los granos secos de cacao criollo y siete clones

En la Figura 3, además se puede observar que el 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 [19], 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 reportó mayor contenido de polifenoles 7,54±0,038 g EAG/100g para este clon. Por otro lado, el cacao Criollo en la investigación se cuantificó un IC_{50} de 100,878±0,58 µg/mL y el contenido de polifenoles totales fue 5,078±0,060 g EAG/100 g y (19) reporta IC_{50} 43,041±0,16 µg/mL con un contenido de polifenoles 7,59±0,011 g EAG/100 g; al respecto (27) manifiesta que la actividad antioxidante varía según la variedad botánica, factores de manufactura como manejo de postcosecha, fermentación, secado y tostado. 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 3 se realizó la correlación logrando un $r^2=0,818$ (Figura 4), este alto coeficiente quiere decir que el contenido de polifenoles totales es predominante en la capacidad antioxidante. Según (22), al realizar análisis de correlación entre el contenido 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 $r^2=0,982$ y (28) encontró en su análisis de correlación entre la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles un $r^2=0,9868$.

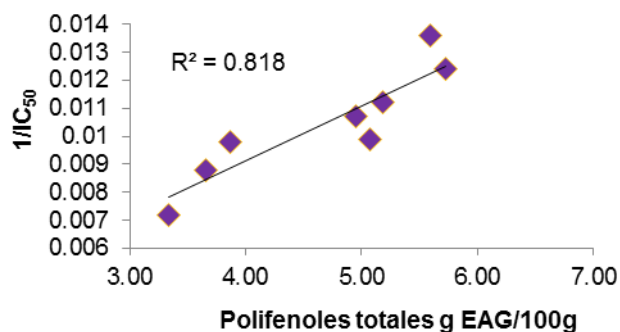


Figura 4. Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la eficiencia de la actividad antioxidante (DPPH)

Coefficiente de Inhibición (IC_{50}) del radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino - 6 ácido sulfónico) ABTS⁰⁺

En el Cuadro 4 y Figura 5 se presentan los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante referidos al radical ABTS⁰⁺ en los granos secos de cacao criollo y siete clones, según los resultados de la evaluación estadística se encontró diferencia significativa comparando promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Cuadro 4. 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 ($p \leq 0,05$).

Se encontró que la mayor eficiencia frente al radical ABTS⁰⁺ lo presentó el clon SCA-6 IC_{50} 33,036±0,69 µg/mL. Sobre los resultados encontrados referente al clon Scavina-6 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 (29), hace mención que los cacaos del grupo Forastero contiene de 30 a 60% más compuestos fenólicos que los del grupo Criollo. En el clon CCN-51 IC_{50} 43,013±0,56 µg/mL, este es un triple híbrido, (23) 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. (30) 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 entre variedades de un mismo producto.

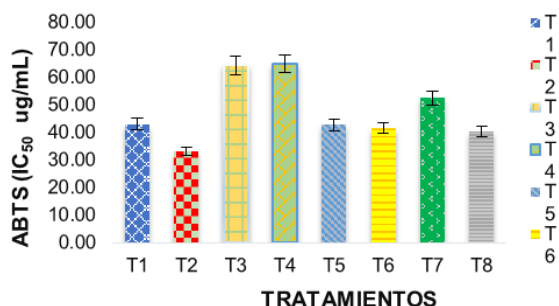


Figura 5. Comportamiento del IC₅₀ con el radical ABTS en los granos secos de cacao criollo y siete clones

En la figura 5, se observa que el último lugar referente a la capacidad antioxidante fue para los clones IMC-67 con IC₅₀ 64,238±0,62 y P-12 IC₅₀ 64,76±0,42 µg/mL, y con respecto al contenido de polifenoles totales estos tuvieron 3,338±0,02 y 3,868±0,02 g EAG/100 g respectivamente y si existe mayor presencia de polifenoles totales, mayor actividad antioxidante o menor IC₅₀, lo que demuestra la importancia de los polifenoles en las propiedades funcionales del cacao (31).

Evaluación sensorial del licor de cacao criollo y siete clones

Según el análisis estadístico de componentes principales 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 % (Figura 6).

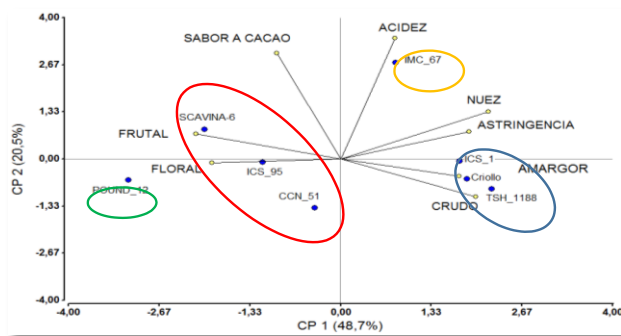


Figura 6. Comportamiento del biplot de la evaluación sensorial en granos secos de cacao criollo y siete clones

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. Según (32), el sabor frutal predominante es debido a los compuestos volátiles como las pirazinas y los aldehídos, se concentran en zonas entre 200 a 400 m.s.n.m. Según (33), el desarrollo de la fracción aromática está en función

de la variedad de cacao y el tratamiento poscosecha (días de fermentación) y el tipo de secado no es tan influyente, pero el tostado lo desarrolla aún más. Además en la misma Figura, el clon que tuvo mayor sabor frutal fue la SCA-6 calificado como forastero y ellos solo manifiestan sabores tradicionales (frutal) y casi nada floral, pero existen algunas excepciones, como SCA-9, NANAY-33, y SCA-6, con sabor frutal específico y algo de floral (2) y el aroma dependen del origen del grano, la línea genética, las diferentes prácticas de fermentación y las condiciones de tostado (34).

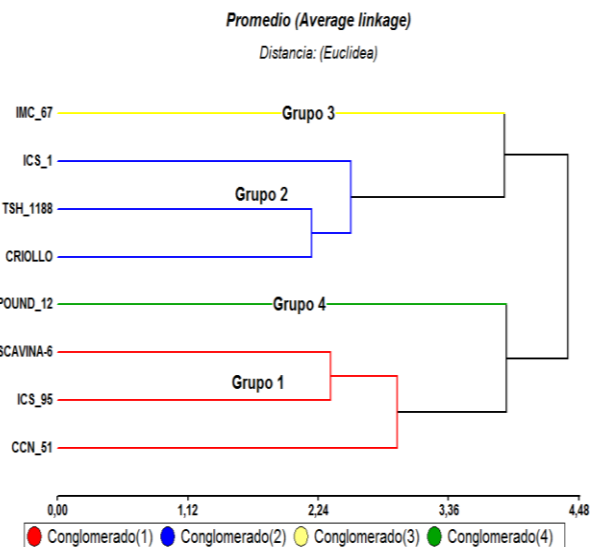


Figura 7. Presentación del análisis de conglomerados de las muestras de granos secos de cacao criollo y siete clones

El atributo acidez puede ser afectado por la sobre fermentación y un tostado leve como lo reporta (34), el aroma a ácido es debido a la presencia de ácidos volátiles y libres, generados como producto a una sobre fermentación. Realizando el análisis de conglomerados de los tratamientos evaluados, podemos diferenciar cuatro grupos (Figura 7); el grupo 1 representa 37,5% (SCA-6, ICS-95 y CCN-51); el grupo 2 represento 37,5% (Criollo y los clones ICS-1, TSH-1188), el grupo 3 represento 12,5% (IMC-67) y el cuarto grupo represento 12,5% (P-12).

Referencias bibliográficas

1. Arciniegas A. Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE. Tesis, Magister Scientiae. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 2005, 126 p.
2. García L. 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; 2008, 143 p.
3. García L. Catálogo de cultivares. Dirección de Promoción de Competitividad. Tingo María, Perú. 2009; 110 p.
 4. Phillips W, Arciniegas A, Mata A, Motamayor J. Catálogo de clones de cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba (Costa Rica). Manual Técnico nº 105. 2012; 70 p.
 5. Maharaj K, Maharaj P, Bekele F, Ramnath D, Bidaisee G, Bekele I, Persad C, Jennings K, Sankar R. Trinidad selected hybrids: An investigation of the phenotypic and agro economic traits of 20 selected cacao cultivars. *Trop. Agric., Trinidad.* 88(4): 2011; 175-185.
 6. Negaresh S, Marín I. El cacao y la salud humana: propiedades antioxidantes del cacao nicaragüense y productos alimenticios comercializados. *Rev. Agroforestería de américas.* Managua, 2013; 49. 93-98 p.
 7. Cuevas M, Antezana A., Winterhalter P. Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz boliviano. *Memorias Red-Alpha-Lagrotech.* Comunidad Europea. Cartagena. 2008; 79-95 p.
 8. Ramos E, Castañeda B, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev. Acad. Perú Salud, Perú.* 2008; 15: 42-46.
 9. Peláez E. Actividad antioxidante del extracto en diclorometano de *Palicourea guianensis* Aubl. (Rubiaceae). Tesis Ing. químico. Pereira. Universidad Tecnológica de Pereira. 2009, 41 p.
 10. Lima H. Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. Universidad de la Habana. Cuba. 2002; p. 2-4.
 11. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit., Cuba.* 2002; 31(2):126-133.
 12. Instituto de Cultivos Tropicales-ICT. Beneficio del cacao y sus variedades. Tarapoto, Perú. 2003; 155 p.
 13. Sandoval M, Okuhama N, Angeles F. Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidativa y anti-inflamatorio de plantas medicinales de la Amazonia. *International work shop.* Iquitos, Perú. 2001; 25 p.
 14. Poo S. Concentración de antocianinas en jugo de cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mediante nanofiltración. Tesis Lic. Ciencias de los Alimentos. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 62 p. Gonzales – Fierro Marcilla. 2 ed. Zaragoza, España. Acribia S.A. 2005; 746 p.
 15. Brand W, Cuvelier M., Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss Technol.* 1995; 28: 25-30.
 16. Pelligrini N, Re R, Yang M, Rice–Evans C. 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.* 1999; 299:379-391.
 17. Braudeau J. El Cacao, Traducido por A. Hernández C., Barcelona, España. Ed. Blumé. 1970; 185 234 p.
 18. Cubero C. Indicadores químicos de la calidad del grano seco de cacao (*Theobroma cacao* L.) y su aplicación. Costa Rica. 1990; 154p.
 19. Huanca J. 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. 2010; 83 p
 20. Cienfuegos F, Ibarra E, Pasamar A, Montañés J, Pons A, Vicente J. Proceso para la obtención de polvo de cacao rico en polifenoles y bajo contenido en materia grasa y polvo de cacao obtenido. *Oficina española de patentes y marcas.* Madrid, España. 2007; 14 p.
 21. Niemenak N, Rohsius C, Elwers S, Omokolo D, Lieberei R. 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. 2006; 19: 612-619.
 22. Zapata S, Tamayo A, Alberto B. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Rev. Cubana de Plantas Medicinales.* Medellín. 2013; 18(3):391-404.
 23. Rohsius C, Andersson M, Niemenak N, Sukha D, Lieberei R. Calidad de la fermentación y su dependencia en la estructura de la testa y en procesos de transporte. *Conferencia internacional sobre investigaciones del cacao N° 11.* Costa Rica. 2006; 86 p.
 24. Sandoval S. Evaluación de fermentaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) clon catongo y comparación con dos clones. Tesis Ing. Agrónoma. Guácimo, Costa Rica. Universidad EARTH; 2009. 32 p.
 25. Espín S, Samaniego I. Parámetros químicos de calidad en almendras y licor de cacao. *Taller de presentación de resultados.* Guayaquil, Ecuador. 2006; 61 p.
 26. Miller K, Apgar J, Sweigart D, Stuart A, Mchale N, Kondo M, Hurst W. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin content in foods prepared with cocoa powder. *J. of Food Sci. States Unites.* 2009; 74(6): 398-404.
 27. Cienfuegos E, Del Mar M, Muguerza B, Moulay L, Miguel M. 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. 2009; 57(14): 6156-6162.
28. Radojčić I, Delonga K, Dragović-Uzelac V, Vorkapić-Furac J. Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech J. Food Sci.* Zagreb, Croacia. 2009; 27(5): 330-337.
29. Efraim P, Barreto A, Pereira D. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Braz. J. Food Technol.*, Campinas. 2011; 14(3): 181-201.
30. Tomas F. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alim. Nutri. Salud.* 2003; 10(2): 41-53.
31. Ramírez M, Cely V, Ramírez S. Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas, México. *Perspect Nutr Humana*, Chiapas, México. 2013; 15: 27-40.
32. Cross E, Jeanjean N. Formation l'arôme cacao. In: *Cacao et Chocolat - Production et caractéristiques*. Lavoisier (Paris), à paraître. *Memorias del I Congreso del Cacao y su Industria*, Maracay, estado Aragua; 1997.
33. Suazo Y. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao Nicaragüense. Memoria de investigación: Máster. Pamplona. Universidad Pública de Navarra. 2012; 64 p.
34. Wilbur C. Sensory Analysis of Chocolate. 2010. Hallado en: www.wilderchocolate.com. Acceso el 30 marzo de 2010.