



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Determinación del contenido de teobromina en licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los clones ICS-95 y CCN-51

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial

AUTOR:

Jhimmy Saucedo Cercado

ASESOR

Ing. Dr. Oscar Wifredo Mendieta Taboada

CO – ASESOR

Ing. Richer Garay García

Tarapoto - Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Determinación del contenido de teobromina en licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los clones ICS-95 Y CCN-51

AUTOR:

Jhimmy Saucedo Cercado

Sustentada y aprobada el día 07 de octubre del 2019, por los siguientes jurados:

.....
Ing. Dr. Abner Félix Obregón Lujerio

Presidente

.....
Ing. Ángel Chávez Salazar

Secretario

.....
Ing. M.Sc. Epifanio Efraín Martínez Mena

Miembro

.....
Ing. Dr. Oscar Wilfredo Mendieta Taboada

Asesor

Declaratoria de autenticidad

Jhimmy Saucedo Cercado con DNI N° 47991845, egresado de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, con la tesis titulada: Determinación del contenido de teobromina en licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los clones ICS-95 y CCN-51.

Declaró bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiado, es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presentan en la tesis se construirán en aportes a la realidad investigativa.

De considerar que el trabajo cuenta con alguna falta grave, como el hecho de contar con datos fraudulentos, demostrar indicios y plagios (al no citar la información con sus autores), plagio, (al presentar otros trabajos como propios), falsificación (al presentar la información e ideas que otras personas de forma falsa), entre otros, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto.

Tarapoto, 07 de octubre del 2019



Jhimmy Saucedo Cercado

DNI. 47991845

Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres:	Saucedo Lucado Jimmy	
Código de alumno :	112118	Teléfono: 942001839
Correo electrónico :	Saucedo2093@gmail.com	DNI: 47991845

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de:	Ingeniería Agroindustrial
Escuela Profesional de:	Ingeniería Agroindustrial

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(X)	Trabajo de investigación	()
Trabajo de suficiencia profesional	()		

4. Datos de trabajo de investigación

Título:	Determinación del contenido de teobromina en licor de cacao (Theobroma cacao L.) de los clones ICS-95 y CCN-51
Año de publicación:	2019

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(X)	Embargo	()
Acceso restringido **	()		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indiquen el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el Título Profesional o Grado Académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el Inciso 12.2, del Artículo 12° del Reglamento Nacional de Trabajos de Investigaciones para optar Grados Académicos y Títulos Profesionales –RENATI “Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA”.



.....
Firma del Autor

8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM-T.

Fecha de recepción del documento:

08, 11, 2019



.....
Firma del Responsable de Repositorio
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso
Abierto de la UNSM-T.

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

****Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mis padres

Santiago Saucedo Fernández y

María Cercado Flores por su amor

Comprensión y apoyo incondicional
siempre.

Jhimmy Saucedo.

Agradecimiento

Agradecer al Ing. Dr. Oscar Wilfredo Mendieta Taboada, por su inmenso apoyo y colaboración como asesor de tesis, por su amistad, confianza, experiencia, constante seguimiento en la ejecución de la etapa experimental de la investigación, además por su aporte con conocimientos personales y profesionales, muchas gracias.

A Dios por darme la existencia y salud, a mis padres por haberme apoyado en todo, por haber hecho que llegue hasta aquí, por enseñarme a ser una persona de bien.

A la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, por facilitarnos las instalaciones de los laboratorios de investigación y microbiología, por su formación académica profesional.

Al Ing. Richer Garay Montes, por su tiempo, paciencia, conocimientos y apoyo constante en el manejo del UHPLC (cromatografía líquida de ultra alta resolución), ha sido uno de los principales bastiones de ayuda en la parte experimental de la investigación, mil gracias.

A la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, por haber permitido mi formación académica y profesional.

Índice general

Introducción.....	1
CAPÍTULO I: REVISION BIBLIOGRAFICA	3
1.1. Generalidades del cacao.....	3
1.1.1. Taxonomía del cacao	3
1.1.2. Características de los granos de cacao	3
1.2. Variedades del cacao	4
1.2.1. Clon de Cacao CCN-51	4
1.2.1.1. Descriptores de identidad.....	4
1.2.1.2. Descriptores Morfológicos	4
1.2.1.3. Descriptores Agronómicos	5
1.2.1.4. Descriptores Industriales.....	5
1.2.2. Clon ICS-95	6
1.2.2.1. Descriptores de identidad.....	6
1.2.2.2. Descriptores Morfológicos	6
1.2.2.3. Descriptores Agronómicos	7
1.2.2.4. Descriptores Industriales.....	7
1.3. El cacao en el Perú y San Martín	7
1.3.1. Zonas de producción de cacao en el Perú	8
1.3.2. Producción de cacao en la región San Martín.....	9
1.4. Poscosecha de Cacao	10
1.4.1. Recolección y desgrane de la mazorca	10
1.4.2. Fermentación	11
1.4.3. El secado.....	12
1.5. Licor o Pasta de Cacao.....	13
1.5.1. Transformación del cacao.....	13
1.5.1.1. Limpieza y Selección.....	13
1.5.1.2. Tostado.....	13
1.5.1.3. Descascarillado de granos de cacao.....	14
1.5.1.4. Molienda de granos de cacao.....	15
1.6. La Teobromina.....	15

1.6.1. Características.....	15
1.6.2. Distribución de la teobromina en la planta de cacao	15
1.6.3. Concentración de teobromina en licor o pasta de cacao	17
1.7. La teobromina en la salud.....	18
1.8. Métodos utilizados para la determinación de teobromina	19
1.8.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	19
1.8.2. Métodos de elución en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	20
1.8.3. Componentes principales del HPLC.....	20
CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
2.1. Lugar de ejecución.....	22
2.1.1. Materia prima.....	22
2.2. Materiales y equipos	22
2.2.1. Materiales de laboratorio	22
2.2.2. Reactivos.....	23
2.2.3. Equipos	23
2.3. Metodología experimental	23
2.3.1. Proceso poscosecha de cacao.....	23
2.3.2. Control de parámetros durante poscosecha de cacao.....	25
2.3.3. Calidad física y prueba de corte.....	26
2.3.4. Análisis químico proximal.....	26
2.3.5. Proceso de obtención de licor de cacao°	27
2.3.6. Determinación y cuantificación de teobromina mediante UHPLC.	28
2.4. Diseño experimental y Análisis de datos	30
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1. Evaluación poscosecha de cacao	33
3.1.1. Comportamiento de pH, temperatura y acidez durante la fermentación	33
3.1.2. Comportamiento de la humedad durante el secado	37
3.1.3. Características físicas y grado de fermentación de grano de cacao	38
3.1.4. Composición químico proximal.....	40
3.2. Contenido de teobromina en grano y licor de cacao clones ICS-95 y CCN-51.....	42
3.2.1. Contenido de teobromina en grano de cacao fermentado seco.....	42
3.2.2. Contenido de teobromina en licor de cacao.....	43
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES	51

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	59

Índice de tablas

Tabla 1. Concentracion del estandar de teobromina para la curva de calibracion.....	31
Tabla 2. Variabilidad de pH, temperatura y acidez durante la fermentación de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) clones ICS-95 y CCN- 51.....	34
Tabla 3. Variación del porcentaje de la humedad durante el secado de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) clones ICS-95 y CCN- 51.....	37
Tabla 4. Características físicas de los granos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) de cacao clones ICS-95 y CCN-51.....	38
Tabla 5. Grado de fermentación del grano de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) clones ICS-95 y CCN-51.....	39
Tabla 6. Composición químico proximal en base seca de granos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) fermentado seco clones ICS-95 y CCN-51.....	40
Tabla 7. Contenido de teobromina en granos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) fermentado seco clones ICS-95 y CCN-51 en base seca.....	42
Tabla 8. Contenido de teobromina en el licor de cacao clones ICS-95 y CCN-51 en base seca.....	43

Índice de figuras

Figura 1. Perú, superficie cosechada y producción de cacao(<i>Theobroma cacao</i> L.).....	8
Figura 2. Producción nacional con las principales regiones productoras de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) en el 2015.....	9
Figura 3. Producción de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) en las provincias de San Martín	10
Figura 4. Fórmula química de la Teobromina.....	16
Figura 5. Diagrama de operaciones para la obtención de grano de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) fermentado seco.....	24
Figura 6. Diagrama de operaciones para la obtención de licor de cacao.....	27
Figura 7. Diseño experimental factorial de tres factores con dos niveles	31
Figura 8. Variación del pH en función al tiempo de fermentación del grano de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) clones ICS-95 y CCN-51	34
Figura 9. Variación de la acidez en función al tiempo de fermentación de los granos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) clones ICS-95 y CCN-51	35
Figura 10. Variación de la temperatura en función al tiempo de fermentación de los granos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) clones ICS-95 y CCN-51.....	36
Figura 11. Comportamiento del contenido de teobromina (mg/g) en diferentes tiempos y temperatura de tostado en granos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) clones ICS- 95 y CCN-51	44
Figura 12. Interacción de la temperatura y tiempo de tostado en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao clon ICS-95.....	45
Figura 13. Interacción de la temperatura y tiempo de tostado en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao clon CCN-51.....	46
Figura 14. Interacción de los clones de cacao(<i>Theobroma cacao</i> L.) en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao.....	47
Figura 15. Interacción de la temperatura de tostado en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao.....	48
Figura 16. Interacción del tiempo de tostado en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao	49

Resumen

La teobromina ha generado un creciente interés debido a sus efectos psicoactivos en el sistema nervioso central y sus beneficios en la salud, siendo responsable del sabor amargo del cacao. El objetivo de la investigación fue determinar y cuantificar por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) el contenido de teobromina en granos y licor de cacao de los clones ICS-95 y CCN-51. Las muestras de cacao se cosecharon y se realizó la poscosecha de cacao, en el proceso de industrialización de licor de cacao, se variaron la temperatura (120 y 140 °C) y el tiempo (35 y 40 min) de tostado. Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo UHPLC – Ultimate 3000 – Thermo Scientific. Los resultados obtenidos, indicaron para el grano fermentado seco clon ICS-95 y CCN-51 una concentración de teobromina de $16,6088 \pm 0,32$ y $15,8140 \pm 0,34$ mg/g respectivamente. Para el licor de cacao la teobromina no presentó cambios en su contenido independientemente de los factores (clon de cacao, temperatura y tiempo de tostado). El análisis estadístico demostró que solo existe diferencia significativa en el factor de temperatura de tostado ya que existe un mayor contenido de teobromina a 140°C de $14,1900 \pm 0,057$ y $14,0700 \pm 0,313$ mg/g para el clon ICS-95 y CCN-51 respectivamente. Esta investigación nos permitirá obtener chocolates con un contenido de teobromina considerable y obtener sus beneficios al consumirlos.

Palabras clave: Teobromina, Licor de Cacao, Cromatografía líquida de ultra alta resolución, Temperatura.

Abstract

The Theobromine has generated a growing interest due to its psychoactive effects on the central nervous system and its health benefits, being responsible for the bitter taste of cocoa. The objective of the investigation was to determine and quantify by ultra-high resolution liquid chromatography (UHPLC) the theobromine content in beans and cocoa liquor of clones ICS-95 and CCN-51. The cocoa samples were harvested and the post-harvest of cocoa was carried out, in the process of industrialization of cocoa liquor, the temperature (120 and 140 ° C) and the time (35 and 40 min) of roasting were varied. The samples were analyzed on a UHPLC - Ultimate 3000 - Thermo Scientific chromatograph. The results obtained indicated for the dry fermented beans clone ICS-95 and CCN-51 a concentration of theobromine of 16.6088 ± 0.32 and 15.8140 ± 0.34 mg / g respectively. For the cocoa liquor, theobromine did not show changes in its content regardless of the factors (cocoa clone, temperature and roasting time). The statistical analysis showed that there is only a significant difference in the roasting temperature factor since there is a higher theobromine content at 140 ° C of $14,1900 \pm 0,057$ and $14,0700 \pm 0,313$ mg / g for the ICS-95 clone and CCN-51 respectively. This research will allow us to obtain chocolates with considerable theobromine content and obtain their benefits when consumed.

Keywords: Theobromine, Cocoa Liqueur, Ultra High Resolution Liquid Chromatography, Temperature.



Introducción

En el 2015 las regiones de mayor producción de cacao en el Perú, fueron: San Martín con el 43%; Junín con el 18%, Cusco con 9%, Ucayali con 8% y Huánuco con 6%. Estas cinco regiones representan el 84% de toda la producción nacional. Además, ese mismo año se alcanzó una extensión de 121,3 mil hectáreas. La ampliación del área cosechada en estos últimos años se sustenta en el impulso del cultivo de cacao como alternativa a la producción ilícita de la hoja de coca, siendo un gran porcentaje de este incremento desarrollado en la zona del Valle de los ríos Apurímac, Ene y Mantaro (Ministerio de Agricultura y Riego, 2016).

El cacao y productos de cacao presentan un contenido considerable de metilxantinas (teobromina, cafeína y teofilina) las cuales confieren un poder estimulante. En la actualidad estas metilxantinas tienen mucha importancia para el público consumidor de chocolate debido a sus efectos psicoactivos y beneficios en la salud. La teobromina contribuye al sabor amargo del chocolate, junto con los demás compuestos formados en el tostado, además sirve como parámetro de calidad, ya que certifica la presencia de cacao.

El contenido de teobromina en grano fermentado seco es de $8,54 \pm 0,011 - 11,56 \pm 0,005$ mg Tb/g y en licor de cacao es de $8,36 \pm 0,011 - 11,40 \pm 0,010$ mg Tb/g en las regiones de Huánuco (Tingo María), Ucayali (San Alejandro) y Curimana, (Oriente del Perú) (Bardón, 2017). Además, en las localidades de Huingoyacu y Pucacaca el contenido de teobromina en grano fermentado seco es de $9,60 \pm 0,03 - 11,20 \pm 0,08$ mg Tb/g y en licor de cacao es de $8,83 \pm 0,02 - 12,39 \pm 0,03$ mg Tb/g (Quispe, 2013).

La teobromina posee propiedades terapéuticas, mejora la digestión y el movimiento intestinal. Además, es un estimulante protector del organismo, es un producto saludable para el corazón, los pulmones, el cerebro y los músculos. A diferencia de la cafeína es un estimulante del sistema nervioso central leve y también tiene algunas propiedades antioxidantes (Beaudoin y Graham, 2011).

En el presente trabajo de investigación aportando conocimientos sobre las propiedades del cacao, se inició el estudio relacionado al contenido de teobromina en el grano (*Theobroma cacao* L.) y licor de cacao durante la pre-industrialización e industrialización en la provincia de Chazuta. En tal sentido la presente investigación tiene los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Determinar y cuantificar por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) el contenido de teobromina en granos y licor de cacao de los clones ICS-95 y CCN-51.

Objetivos específicos

- Controlar los parámetros durante el proceso de fermentación (pH, acidez y temperatura) y secado (humedad) de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los clones ICS-95 y CCN-51.
- Efectuar el análisis proximal de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los clones ICS-95 y CCN-51.
- Efectuar la prueba de corte y calidad física de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los clones ICS-95 y CCN-51.
- Cuantificar la teobromina por el método UHPLC, presente en los granos y licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los clones ICS-95 y CCN-51.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Generalidades del cacao

El nombre científico *Theobroma cacao* fue otorgado en 1753 por el botánico suizo Carl Linnaeus, sobre la publicación de su famoso libro "Species Plantarum". El árbol del cacao, *Theobroma cacao* L. perteneciente a la familia de las Sterculiaceae, crece en un área geográfica limitada, a 10 grados al norte y al sur del ecuador, en particular en América Central, América del Sur, África y las islas del oeste de la India (Paoletti, Poli, Conti & Visioli, 2012).

1.1.1. Taxonomía del cacao

Según Doestert, Roque, Cano, La torre y Weigend (2012) el cacao (*Theobroma cacao* L.) tiene la siguiente clasificación taxonómica:

- Reino: Plantae
- Subreino: Tracheobionta
- División: Dicotiledónea
- Clase: Dilleniidae
- Orden: Malvales
- Familia: Malvaceae
- Subfamilia: Sterculioideae
- Género: *Theobroma*
- Especie: *Theobroma cacao* L.

En la literatura botánica actual se reconocen dos subespecies:

- *Theobroma cacao* L. subesp. cacao: grupo criollo
- *Theobroma cacao* L. *sphaerocapum* (chev.): grupo forastero

1.1.2. Características de los granos de cacao

Dependiendo del resultado del genotipo de cacao que muestra diferentes colores y formas, el tamaño puede variar entre 15 cm y 30 cm de largo.

Una fruta puede contener 50 granos de cacao que están conectados a una placenta y rodeado por una pasta que contiene aproximadamente 10,0 a 13,0% de azúcar, 1,0% de pectina y ácido cítrico 1,0 - 2,0%. La composición media de los granos de cacao, como materia seca es de 40,0 a 60,0% de manteca de cacao, proteína de 10,0 a 15,0%, 6,0% de almidón, entre 0,9 - 1,4% de teobromina y 0,2% de cafeína (del tipo Criollo puede contener hasta 1,3%) y 5,0 a 9,0% de flavonoides (Paoletti *et al.*, 2012).

1.2. Variedades del cacao

Hay tres variedades principales de cacao: Forastero, Criollo y Trinitario. La variedad Forastero es muy productiva y resistente, y representa el 95% de la producción mundial de cacao. La variedad criolla es muy aromática, pero debido a su sensibilidad al cambio climático, es muy propicia a las enfermedades y plagas, haciendo que su rendimiento sea muy bajo. La variedad Trinitario es un cruce entre Criollo y Forastero y tiene características de ambas variedades (Watson, Preedy & Zibadi, 2013). Dentro de los múltiples clones de cacao se encuentran los clones CCN-51 e ICS-95, objetos de la presente investigación, cuyas características son descritas por Ministerio de Agricultura y Riego (2012) en su publicación denominada: “Catálogo de cultivares de cacao del Perú”.

1.2.1. Clon de Cacao CCN-51

1.2.1.1. Descriptores de identidad

- Grupo genético/genealogía: (IMC-67 x ICS-95) x Forastero desconocido
- País de origen: Ecuador
- Accesión/código: BGC – 015

1.2.1.2. Descriptores Morfológicos

A. De la flor

- Color del pedúnculo: rojo
- Antocianina en la lígula: ausente
- Antocianina en el filamento estaminal: ausente
- Antocianina en los estaminodios: presente

- Antocianina en la parte superior del ovario: presente
- Numero de óvulos por ovario: 57

B. Del fruto

- Color al estado inmaduro: rojo
- Forma básica: oblongo
- Forma del ápice: ligeramente atenuado
- Rugosidad: fuerte
- Constricción basal: ligera
- Grosor de cáscara: intermedia
- Separación de un par de lomos: intermedio
- Profundidad de surcos: profundo

C. De la semilla

- Forma en sección longitudinal: elíptica
- Forma en sección transversal: intermedia
- Color de cotiledones: morado

1.2.1.3. Descriptores Agronómicos

A. De productividad

- Tamaño del fruto: muy grande
- N° de semillas por fruto: 44
- Tamaño de semilla: intermedia
- Peso seco de semilla: 1.4 g
- Índice de mazorca: 16
- Rendimiento: 2,760 kg/ha (937 - 2,812 kg/ha)
- Compatibilidad: autocompatible

B. De sanidad

- Reacción a enfermedades: Pudrición parda: susceptible, Escoba de bruja: moderadamente resistente, Moniliasis: moderadamente susceptible

1.2.1.4. Descriptores Industriales

- Contenido de grasa: 54%

- 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.

1.2.2. Clon ICS-95

1.2.2.1. Descriptores de identidad

- Grupo genético/genealogía: Trinitario
- País de origen: Trinidad y Tobago
- Accesoión/código: BGC – 008

1.2.2.2. Descriptores Morfológicos

A. De la flor

- Color del pedúnculo: rojo
- Antocianina en la lígula del pétalo: ausente
- Antocianina en el filamento estaminal: ausente
- Antocianina en los estaminodios: presente
- Antocianina en la parte superior del ovario: presente
- Número de óvulos por ovario: 42

B. Del fruto

- Color al estado inmaduro: rojo
- Forma básica: oblongo
- Forma del ápice: agudo
- Rugosidad: intermedia
- Constricción basal: ligera
- Grosor de cáscara: delgada
- Separación de un par de lomos: intermedia
- Profundidad de surcos: intermedia

C. De la semilla

- Forma en sección longitudinal: elíptica
- Forma en sección transversal: intermedia

- Color de cotiledones: morado

1.2.2.3. Descriptores Agronómicos

A. De productividad

- Tamaño del fruto: grande
- Número de semillas por fruto: 35
- Tamaño de semilla: intermedia
- Peso seco de semilla: 1.3 g
- Índice de mazorca: 22
- Rendimiento: 1,867 kg/ha (682 - 2,045 kg/ha)
- Compatibilidad: autocompatible

B. De sanidad

- Reacción a enfermedades: Pudrición parda: moderadamente resistente, Escoba de bruja: tolerante, Moniliasis: resistente

1.2.2.4. Descriptores Industriales

- Contenido de grasa: 56%
- Sabores básicos y específicos de pulpa: dulzura (baja), acidez (baja), astringencia (baja); 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.

1.3. El cacao en el Perú y San Martín

Las principales zonas de producción en el Perú durante el 2012 fueron: San Martín (46 848 TM, Cusco (10 788 TM, Ayacucho (5 439 TM), Junín (21 400 TM), Amazonas (4 276 TM) y Huánuco (6 491 TM) (MINAGRI, 2016).

Entre los años 2000-2008, la producción de cacao presentó un crecimiento anual (promedio) de un 4%; y en una segunda etapa, entre los años 2009 y 2015, muestra un incremento promedio anual de un 15,5%. En el año 2000 la producción de cacao en grano fue de 24,8 mil toneladas y al año 2008 se había elevado a solo 34 mil toneladas (37% aumento entre ambos años).

Sin embargo, a partir del 2009 se observa un fuerte crecimiento de la producción nacional, de manera que, de 36,8 mil toneladas producidas en el 2009, se eleva en los siguientes años hasta las 87,3 mil toneladas en el 2015 (137,2% de incremento entre ambos años). En cuanto a las áreas cosechadas, es importante mencionar que el incremento de la producción nacional de cacao en grano es producto de la ampliación de las áreas cosechadas, aumentando éstas entre los años 2000 hasta el 2008 a una tasa promedio de 5,6% por año (MINAGRI, 2016).

Al 2015 se alcanza una extensión de 121,3 mil hectáreas. La ampliación del área cosechada en estos últimos años se sustenta en el impulso del cultivo de cacao como alternativa a la producción ilícita de la hoja de coca, siendo un gran porcentaje de este incremento desarrollado en la zona del VRAEM (MINAGRI, 2016).

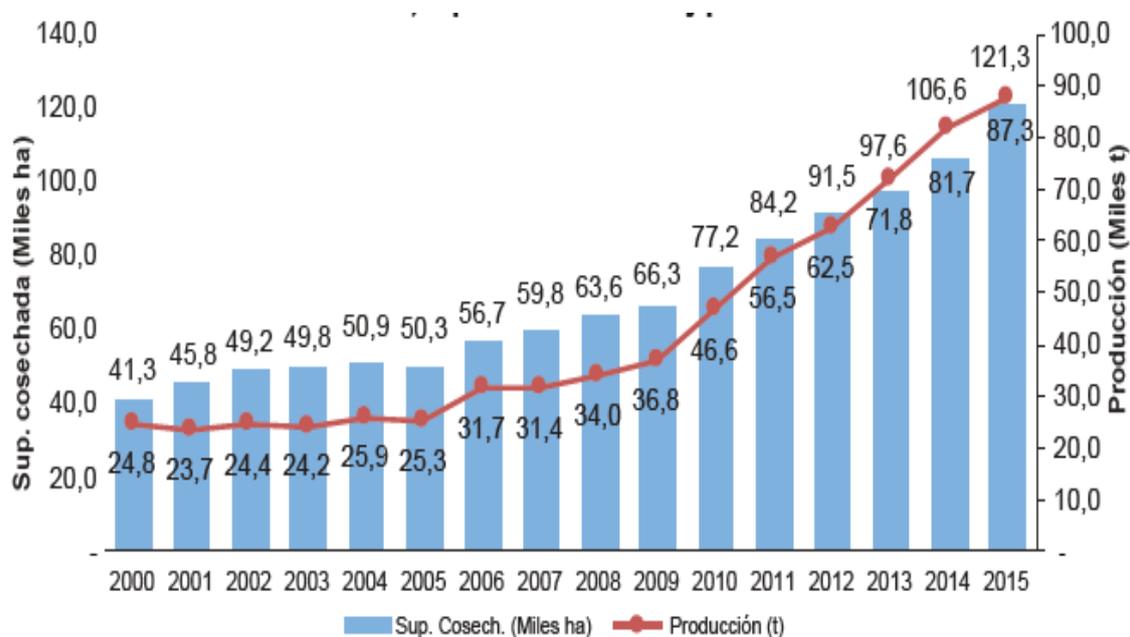


Figura 1. Perú, superficie cosechada y producción de cacao (*Theobroma cacao* L.). (Fuente: MINAGRI, 2016).

1.3.1. Zonas de producción de cacao en el Perú

Con relación a las regiones donde se produce cacao en grano, destacan en el 2015 básicamente las regiones de San Martín con el 43%; Junín con el 18%, Cusco con 9%, Ucayali con 8% y Huánuco con 6%. Estas cinco regiones representan el 84% de toda la producción nacional. Regiones como Ayacucho, Amazonas, Cajamarca, Tumbes, Loreto,

Puno y Madre de Dios, también tienen producción de cacao en menores volúmenes. San Martín, Junín y Ucayali son las regiones con mayor crecimiento en los últimos años.

Así mientras en el año 2000 estas regiones apenas producían 1,1 mil toneladas, 2,1 mil toneladas y 393 toneladas, respectivamente, en los siguientes años han crecido a una tasa promedio anual de 26,4% en el caso de San Martín, 14,1% en el caso de Junín y 20,8% en el caso de Ucayali. En términos de volumen, en el año 2015, registra un volumen de producción de 37,3 mil toneladas (San Martín), 15,3 mil toneladas (Junín) y 6,7 mil toneladas (Ucayali) (MINAGRI,2016).

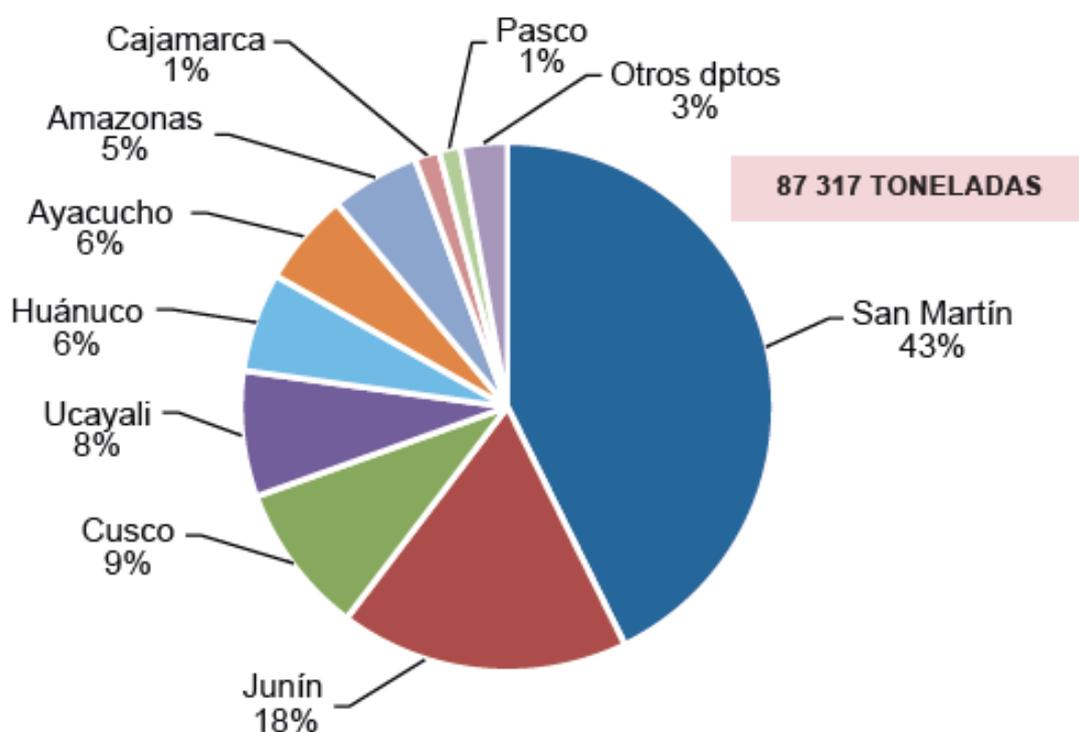


Figura 2. Producción nacional con las principales regiones productoras de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el 2015. (Fuente: MINAGRI, 2016).

1.3.2. Producción de cacao en la región San Martín

En la figura 3, se presenta la producción de cacao de las diferentes provincias del departamento de San Martín (MINAGRI, 2016, citado por Gonzáles, 2016). La provincia de Tocache es la de mayor producción, seguida de la provincia de Mariscal Cáceres con 13 174 y 10 262 TM respectivamente, siendo la provincia de Moyobamba la de menor producción de cacao con tan solo 560 TM.

1.4. Poscosecha de Cacao

La poscosecha de cacao comprende la fermentación y secado con la finalidad de obtener un grano con la humedad ideal y con las características de una buena fermentación. A continuación, se describen cada etapa:

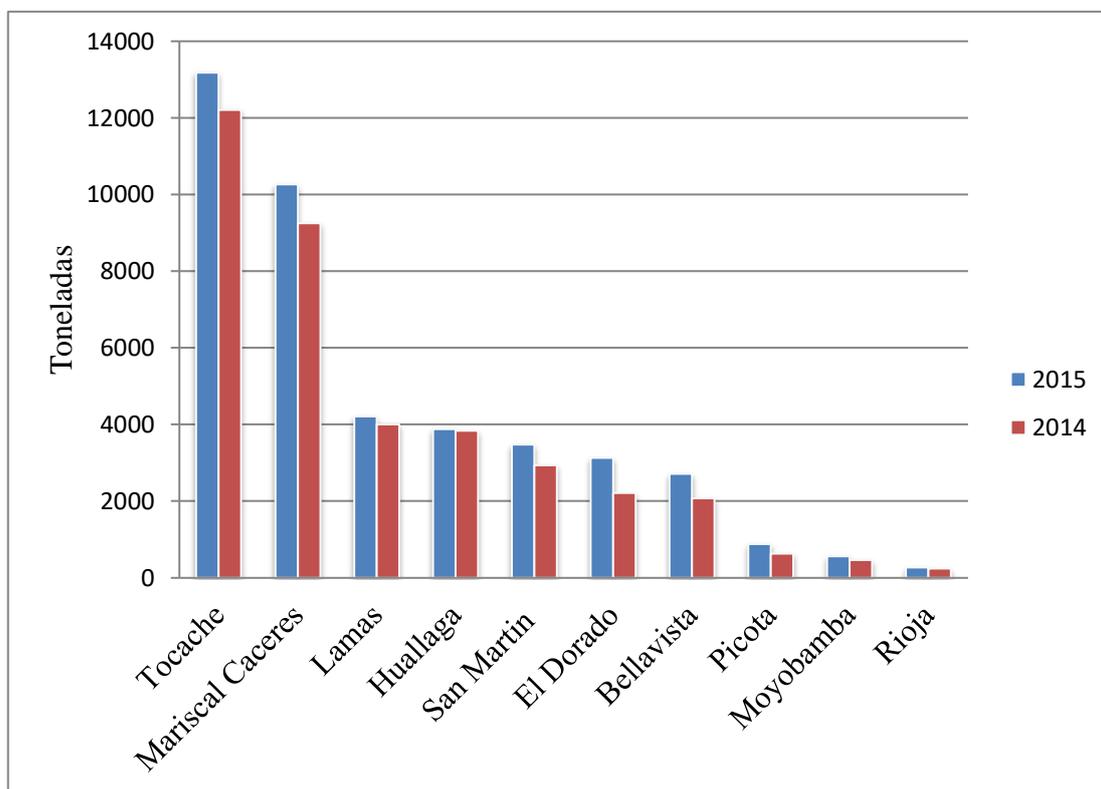


Figura 3. Producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en las provincias de San Martín.

1.4.1. Recolección y desgrane de la mazorca

Las mazorcas se parten manualmente utilizando un mazo de madera o un machete pequeño, con el que se da un golpe en la parte media para que quiebre sin que se despedace del todo y riegue los granos. La extracción de los granos se hace entonces fácilmente con ayuda de los dedos, deslizándolos a lo largo de la placenta por uno y otro lado (González y Ruiz, 2009).

Además, la Norma Técnica Peruana NTP. 208.040(2008) indica que se debe cortar los frutos en forma diagonal utilizando un cuchillo sin mucho filo para no lesionar las almendras y facilitar la extracción de las mismas, el tiempo entre el desgrane y la puesta en fermentación no debe exceder las 24 horas.

1.4.2. Fermentación

La razón principal para la fermentación de cacao es inducir transformaciones bioquímicas dentro de los granos que llevan al desenvolvimiento de precursores del sabor de chocolate. Sin este tratamiento, los granos de cacao son excesivamente amargos, ácidos y astringentes, y cuando son procesados no desarrollan el aroma y sabor característico del chocolate (Thompson, Miller & López, 2001).

La fermentación se inicia en la pulpa, donde la actividad microbiológica conduce a principios de los diversos procesos bioquímicos, importantes para el desarrollo de sabor en el interior de los granos, un proceso que continúa durante la fase de secado. Durante la fase inicial las condiciones de fermentación son favorables para el crecimiento de microorganismos debido a la alta concentración de azúcares (Watson *et al.*, 2013).

Los microorganismos presentes en la pulpa, tales como levaduras y bacterias productoras de ácido acético y ácido láctico metabolizan los azúcares en etanol. Posteriormente, parte del etanol se oxida a través de bacterias productoras de ácido acético por medio de una reacción exotérmica, provocando un aumento de la temperatura durante la fermentación que alcanza hasta 55 °C (Paoletti *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2013).

El etanol y el ácido acético penetran en la semilla, y este cambia el pH y la temperatura acelerando la muerte de la semilla, es decir, la destrucción de la germinación; las células de la pared de las semillas también son destruidas. Los procesos bioquímicos son los responsables de la formación de los precursores del sabor del chocolate (Beckett, 2009; Afoakwa, 2010). Este paso se produce durante 2-8 días y es decisivo para la calidad de los granos de cacao (Beckett, 2009).

La teobromina y la cafeína pertenecen a la familia de las purinas y representan más del 99% de los alcaloides presentes en el cacao (Wakao, 2002). Un estudio conducido por Wakao (2002) también demostró que los contenidos de teobromina y cafeína disminuyen a medida que avanza la fermentación, en proporciones que varían entre el 15 y 24%. Durante la fermentación se reduce la concentración de teobromina, donde la teobromina migra de la semilla a la cáscara, causando una disminución de aproximadamente el 25% (Beaudoin y Graham, 2011).

Según la Norma Técnica Peruana NTP. 208.040 (2008) la fermentación se realiza en cajones de madera resistente y en condiciones sanitarias con fondos perforados para el drenaje del mucílago, dejando las almendras recién extraídas durante 24 a 48 horas en el

primer cajón, para posteriormente cada 24 horas cambiarlas a los siguientes cajones durante 4 a 8 días. El cambio de las almendras de un cajón a otro se hace de tal forma que las que estaban arriba vayan al fondo del otro cajón.

1.4.3. El secado

La fermentación se detiene mediante el secado del grano, este paso está destinado a reducir la humedad inicial de 40-60% a una humedad del 6-7%. El secado puede llevarse a cabo al ambiente o a través de secadoras. Al ambiente hay un riesgo de contaminación de los granos de cacao con materiales del entorno o insectos y debe tomarse precauciones en el manejo cuando llegan a la planta de procesamiento. Cuando se utiliza secadores de combustión se pueden producir fugas de gases de combustión originando un grano de sabor desagradable debido a lo cual los secadores de aire forzado son una opción más segura (Afoakwa, 2010; Watson *et al*, 2013).

El secado se realiza normalmente al sol sobre plataformas de madera (barbacoa o tarima), cemento con mantas de polipropileno. Los dos primeros días iniciado el secado se recomienda exponer directamente al sol entre 4 a 5 horas por día, extendido en capa gruesa (10 cm. de espesor), al tercer día el espesor óptimo de la masa de cacao no debe ser mayor de 5 cm (capa delgada) con remociones cada dos horas (volteos), hasta lograr 7 a 7,5%.de humedad (Torres, 2016).

Según la Norma Técnica Peruana NTP208.040 (2008) Al final de la fermentación se tiene un contenido de humedad de los granos de cacao alrededor del 55%, para ser almacenados con seguridad debe reducir a un límite no mayor a 7%.

La fermentación y el secado son pasos donde se requiere extremo cuidado, ya que ningún otro procesamiento adicional es capaz de corregir defectos durante la fermentación y / o secado (Beckett, 2009).

Durante el secado, se continúan desarrollando los procesos bioquímicos iniciados durante la fermentación, y que son importantes para el desarrollo de color y sabor de los granos de cacao y son un paso esencial para la producción de chocolate de buena calidad.

Luego del secado, los granos están listos para ser comercializados como materia prima para la producción de productos de cacao. Por lo general, los granos se almacenan y transportan en sacos de yute o de forma masiva. Aunque algunos países productores de

cacao han establecido la industria de procesamiento de granos, gran parte de los granos fermentado seco son exportados directamente a Europa, Estados Unidos, Japón y otras partes del mundo industrializado (Watson *et al.*, 2013).

1.5. Licor o Pasta de Cacao

La Norma Técnica Peruana NTP 208.012 (2007) define licor o pasta de cacao como el producto obtenido del cacao sin cáscara ni germen que se obtiene de vainas de cacao de calidad comercial que ha sido limpiado y liberado de la cáscara del modo técnicamente más completo posible, sin quitar ni añadir ninguno de sus elementos constituyentes.

Cuando se elabora chocolates con alto contenido de cacao, la masa de cacao se añade directamente en el conchado, el cual debe estar libre de partículas gruesas para evitar una textura arenosa, el tamaño de las partículas de este tipo de masa de cacao debe ser alrededor de 20 micras (Sivasankar, 2004).

1.5.1. Transformación del cacao

1.5.1.1. Limpieza y Selección

Terminado el secado es conveniente limpiar de impurezas al cacao a fin de obtener un producto de mejor valor comercial. De acuerdo con los parámetros de calidad del grano del cacao exigidos por la Unión Europea, que son los que por lo general se toman como referencia en el comercio internacional del cacao, el tamaño mínimo permitido por grano es de un gramo. Por esta razón es importante realizar una adecuada selección del grano de cacao utilizando zarandas de mallas con medidas de orificio de 1cm², que permita pasar los granos más pequeños y retener los de mayor calibre (Instituto Nacional de investigaciones Agropecuarias, 2003).

1.5.1.2. Tostado

El tostado es una operación muy importante en el procesado del cacao, ya que determina en gran medida el color, aroma y sabor de los derivados del cacao. Durante el tostado el color del cacao sufre pardeamiento adicional al observado durante las etapas previas de

fermentación y secado. En este pardeamiento participan múltiples reacciones, como oxidaciones y polimerizaciones de polifenoles, degradación de proteínas y reacciones de Maillard. En cambio, en el aroma y sabor tienen especial influencia las diferentes temperaturas y tiempos a los que se somete el grano durante el tostado (Ramli, Hassan, Said, Samsudin & Idris, 2006).

Para el tostado del grano de cacao existen dos alternativas: el tostado convencional y el pre-tostado. El tostado convencional consiste en tostar los granos aún con cáscara en hornos industriales a temperaturas comprendidas entre 150 y 100 °C durante 15 o 45 minutos, respectivamente. En cambio, el pre-tostado, como su nombre lo indica, consiste en someter a los granos a un tratamiento térmico previo a temperaturas inferiores a 100 °C por cortos periodos de tiempo (15 minutos) para desprender la cáscara del grano y posteriormente someterla de manera directa a otros niveles de temperatura u otros procesos (Ramli et al., 2006).

Para este paso se utilizan temperaturas entre 120-130°C, no superior a 150 °C durante 10 a 35 minutos, estos parámetros dependen de la variedad, contenido de humedad y la maduración. Se debe tener especial atención a la relación adecuada de tiempo/temperatura de lo contrario, en este paso se puede perder por lo menos 50% de flavonoides existentes en el cacao (Paoletti *et al.*, 2012).

Después de tostar los granos, el contenido de humedad se reduce a 2-3%, lo que resulta en la oxidación de compuestos fenólicos y la eliminación de ácido acético, ésteres y otros sabores volátiles indeseables (Watson *et al.*, 2013).

Las condiciones de tostado deben ser las adecuadas a la variedad de cacao, ya que las altas temperaturas y tiempo prolongado de tostado eliminan las especificidades aromáticas de los cacaos finos de aroma (Cross, 2004).

1.5.1.3. Descascarillado de granos de cacao

Enríquez (2004) apunta que en la descascaradora se produce la operación de rotura de los granos de cacao, en donde se separa la cáscara y su interior “Nibs” de forma más rápida, el cual es usado en el proceso productivo de transformación de cacao, lo cual también se puede hacer manualmente cuando son pequeñas cantidades.

1.5.1.4. Molienda de granos de cacao

El grano de cacao contiene aproximadamente 55% de sólidos, como manteca de cacao en las células, por trituración esta grasa se retira desde el interior de las células y debido al calor generado en esta operación origina que la manteca de cacao se funde, formando una suspensión.

Para la producción de cacao en polvo es importante para obtener un molido fino. La viscosidad de la pasta de cacao obtenida después de la molienda se relaciona con el tostado granos realizadas y con la misma humedad (Beckett, 2008; Afoakwa, 2010).

1.6. La Teobromina

La teobromina es el componente principal del grupo de las metilxantinas en el grano de cacao, además es la responsable del sabor amargo del cacao y sus sub productos.

1.6.1. Características

La teobromina tiene como fórmula química molecular, $C_7H_8N_4O_2$, es un polvo blanco y se produce principalmente a través de las cáscaras de los granos de cacao. La molécula fue aislada por el ruso Alexander Woskresensky en 1841 y fue sintetizada a partir de la xantina hacia el final del siglo XIX por el alemán ganador del premio Nobel, Hermann Fischer (Clegg, 2014).

Es ligeramente soluble en agua y alcohol a temperatura ambiente, siendo más soluble en agua caliente. Este compuesto se considera diurético, relajante muscular y vasodilatador. A diferencia de la cafeína es un estimulante del sistema nervioso central leve y también tiene algunas propiedades antioxidantes (Beaudoin y Graham, 2011).

1.6.2. Distribución de la teobromina en la planta de cacao

La teobromina en el cacao se acumula en las hojas verdes, y con el paso del tiempo su concentración disminuye. En el fruto de cacao la teobromina es sintetizada por la parte exterior del pericarpio (semillas) y el cotiledón (embrión de la semilla) del cacao, sin embargo, la concentración de teobromina en la fruta madura, disminuye en el pericarpio y aumenta en los cotiledones. Sugiriendo por lo tanto que el lugar principal de la síntesis de la teobromina se encuentra en los propios granos de cacao (Beaudoin y Graham, 2011).

La concentración de las metilxantinas, incluyendo la teobromina, en el cacao en grano varía dependiendo de las especies frutales, aunque no existe un consenso en la comunidad científica acerca de las especies con mayor concentración. Brunetto *et al.* (2007) han determinado que la concentración de los granos de cacao varía entre 7 mg Tb/g y 20,0 mg Tb/g, donde el Forastero obtuvo una concentración mayor de teobromina, por otro lado, Amores, Palacios, Jiménez y Zhang (2009) reportó valores superiores en teobromina para cacao Esmeraldeño en época lluviosa y seca de 17,3 mg Tb/g y 18,0 mg Tb/g respectivamente.

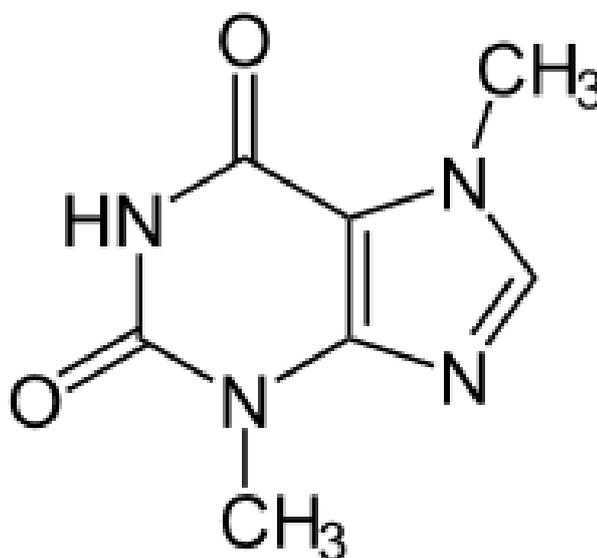


Figura 4. Fórmula química de la Teobromina.

Además, Portillo *et al.* (2014) en su trabajo estudiaron el efecto del tratamiento post cosecha sobre las purinas en cacao. La determinación se realizó por cromatografía líquida (HPLC), con una columna C18 en fase reversa y una solución metanol: agua al 20% v/v como fase móvil. Estos contenidos estuvieron comprendidos entre 13,2 mg Tb/g (teobromina), los valores más bajos corresponden a los cacaos fermentados.

En el Perú autores como Quispe (2013) reportaron valores de $9,68 \pm 0,05$ a $11,20 \pm 0,008$ mg Tb/g en las localidades Pucacaca y Huingoyacu variando el porcentaje de CCN-51. Del mismo modo Bardón (2017) reportó contenidos de teobromina en granos fermentado seco de $8,54 \pm 0,011$ – $11,56 \pm 0,005$ mg Tb/g en las regiones de Huánuco (Tingo María), Ucayali (San Alejandro) y Curimana, (Oriente del Perú).

1.6.3. Concentración de teobromina en licor o pasta de cacao

Bonvehi y Ventura (2000) citado por Zapata, Tamayo y Rojano (2014) afirma que el contenido de metilxantinas (teobromina y cafeína) en los granos de cacao disminuye después del proceso de tostado ya que, durante el tostado del cacao, hay un incremento en el contenido de algunas sustancias relacionadas con dicetopiperazinas (DKPs o dipéptidos cíclicos), influenciando negativamente en la calidad sensorial del cacao. Estos compuestos interactúan con los alcaloides de purinas, disminuyendo el contenido de teobromina y cafeína. Durante el tostado, puede originarse un sabor metálico amargoso de las DKPs y pronunciarse cuando estas DKPs se combinan con alcaloides de la purina.

El contenido de metilxantinas no se ve afectado en gran medida por la fermentación, secado o los procedimientos durante la industrialización, observándose un contenido más homogéneo durante estos procesos, a pesar de que existe una tendencia clara a su disminución. Estos autores sugieren que, debido a este comportamiento, las metilxantinas no juegan un papel importante dentro de los cambios fisiológicos que le ocurren a los granos de cacao durante la fermentación (Nazaruddin et al. 2006).

No hay cambios bruscos en la concentración de las metilxantinas durante las etapas de procesamiento, si se observa una disminución progresiva y consistente desde el inicio del secado al sol de los granos de cacao, hasta la obtención del licor en la planta de producción de chocolates ya que aproximadamente un 5 y 15% adicional de pérdida, durante la industrialización (Gil, 2012).

Mladenovic, Root y Ramanathan (2018) en su trabajo, Análisis de teobromina en *Theobroma cacao* L. y sus productos, la muestra de cacao provenientes de Costa Rica se analizaron durante cuatro etapas diferentes de procesamiento de cacao (cacao fresco, cacao seco, cacao tostado y licor de cacao), mediante cromatografía líquida. Los resultados obtenidos fueron de 4,20 mg Tb/g para cacao fresco, 4,01 mg Tb/g para cacao seco, 3,71 mg Tb/g para cacao tostado y 7,39 mg Tb/g para licor de cacao.

Nazaruddin *et al.* (2001) identificaron y cuantificaron las metilxantinas con la finalidad de determinar la teobromina y la cafeína contenidos en los productos comerciales de cacao y chocolate, tales como cacao en polvo, cacao en grano, licor de cacao y chocolate mediante el método HPLC con la columna -Bondapak y la fase móvil de metanol: agua: ácido acético (20: 79: 1). Realizo la determinación a 280 nm. Este autor reporto

contenidos de licor de cacao de Malasia y Ghana de $17,72 \pm 1,66$ y $25,28 \pm 0,56$ mg Tb/g respectivamente.

Quispe (2013) determinó teobromina en licor de cacao en las localidades de Huingoyacu y Pucacaca el contenido de teobromina en licor de cacao en granos de cacao variando el porcentaje de CCN-51 los valores obtenidos fueron de $8,83 \pm 0,02$ – $12,39 \pm 0,03$ mg Tb/g., la preparación del licor de cacao fue a una temperatura de tostado de 115°C por 20 min y conchado de 8 horas, del mismo modo Bardón (2017) reporto contenido de teobromina en licor de cacao es de $8,36 \pm 0,011$ – $11,40 \pm 0,010$ mg Tb/g en las regiones de Huánuco (Tingo María), Ucayali (San Alejandro) y Curimana, (Oriente del Perú), la preparación del licor de cacao fue a una temperatura de tostado de 115°C por 30 min y conchado de 8 horas.

1.7. La teobromina en la salud

La teobromina presenta varios beneficios en los seres humanos según estudios realizados por Beaudoin y Graham (2011) quienes determinaron:

- Produce sensación de bienestar
- Actúa como un diurético suave
- Relaja los vasos sanguíneos
- Relaja los músculos lisos
- Es un estimulante suave del sistema nervioso

La lista de beneficios citada, dio lugar a que la teobromina haya sido muy utilizada históricamente para tratar problemas del corazón y otras condiciones médicas tales como insuficiencia cardiaca, presión arterial alta, tos, dolores de cabeza y asma (Sobreiro, 2013).

En la actualidad, algunos estudios han encontrado que el cacao tiene un efecto en el aumento de óxido nítrico (NO) dentro del cuerpo. Algunos autores tienden a atribuir este beneficio a los componentes flavanoles del cacao. Sin embargo, otros expertos han destacado que este puede ser en realidad un efecto de la teobromina. Esto significa que la teobromina puede ser eficaz en el aumento de NO y por lo tanto dar un mejor efecto si se ingiere antes del entrenamiento (López de Cerain, 2012 citado por Sanchez, 2015).

1.8. Métodos utilizados para la determinación de teobromina

1.8.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía líquida es una de las técnicas muy utilizada en los campos de la industria farmacéutica, de alimentos y bebidas, de la investigación y desarrollo clínico, de la neurociencia y de la química como propósito general; esta técnica involucra una fase estacionaria sólida empacada en una columna cromatografía de tamaño de partícula hasta por debajo de las 2,0 μm y con longitudes desde 30 mm hasta 300 mm.

La fase móvil relacionada a esta técnica es un líquido (solvente orgánico, disolución de tampón o mezclas de pH definidas). Para mejorar la separación de los componentes (aumento de la resolución) actualmente se utiliza columnas con tamaños de partícula mucho menores, por debajo de 3 μm , lo cual genera una contrapresión enorme por el aumento del área superficial de los sitios activos de esta fase estacionaria; para ello se trabaja con tecnologías que utilizan presiones por encima de los 600 bares (tecnología UHPLC) (Thermo Scientific, 2015).

La cromatografía líquida es el nombre genérico que se usa para describir cualquier procedimiento cromatográfico en el que la fase móvil es un líquido. Con el progreso de la cromatografía en columna, utilizando soportes desarrollados con partículas más pequeñas dan cuenta de una mayor eficiencia y por lo tanto se hizo necesario el uso de bombas de alta presión para la elución de la fase móvil, por lo tanto, el desarrollo de Cromatografía Líquida alta Eficiencia (HPLC) (Thermo Scientific, 2015).

En este tipo de cromatografía los componentes son separados por el material de relleno de la columna que implica varias interacciones físicas o químicas entre las moléculas y partículas.

Estos componentes son detectados a la salida de la columna por un detector. Hay dos formas de clasificar los métodos de cromatografía de líquidos. La primera y más común es la clasificación basada en el mecanismo de retención.

Por ejemplo, el modo de fase normal, se puede realizar aprovechando tanto el mecanismo de adsorción y el mecanismo de partición. La filtración en gel se puede realizar usando el mecanismo de exclusión de tamaño. La segunda clasificación se basa en el principio de la separación y se encuentra más comúnmente en la literatura publicada antes de la década de 1990 (Weston y Brown, 1997).

1.8.2. Métodos de elución en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Según Thermo Scientific (2015) en cromatografía líquida, para una fase estacionaria determinada (columna cromatográfica), la naturaleza de la fase móvil (polaridad de la fase móvil) es un factor clave en la separación que se traduce en un resultado que beneficia o afecta al parámetro de Resolución, R. Dentro de la cromatografía tenemos dos tipos de elución, en función a las variaciones de composición del eluyente y del flujo utilizado:

- Separación isocrática: Se define de esta manera cuando la composición de la fase móvil, el flujo y la temperatura de la columna, permanecen constantes durante la separación.
- Separación en gradiente: Se genera cuando la composición de la fase móvil se modifica (varía los parámetros de composición de la fase móvil, el flujo y la temperatura de la columna) durante la separación, aunque no necesariamente todos los parámetros involucrados varían al mismo tiempo.

1.8.3. Componentes principales del HPLC

Según Thermo Scientific (2015) dentro de los equipos que se utilizan en la cromatografía líquida se suele tener una configuración generalizada que consta de:

- Bomba analítica: Este es el sistema de impulso de los solventes o fase móvil a un flujo determinado, lo cual originará una presión de trabajo del sistema. A este módulo se suele adicionar una bandeja para los solventes, la cual es de un material anticorrosivo y puede tener la capacidad de poseer un sistema de desgasificación en línea para los solventes, asimismo se suele obviar el desgasificador cuando se posee los módulos de bombas analíticas con desgasificador incorporado.
- Horno de columnas: Este es un compartimiento que alberga las columnas con el fin de brindarle una temperatura definida y estable para los procesos de elución que trabajan bajo las condiciones de un valor de temperatura definido; además este compartimiento posee la opción de optimizarse con válvulas de intercambio de columnas para aplicarse a desarrollo de metodologías automatizado o trabajos de dos columnas en paralelo ligadas a un par de bombas analíticas.
- Inyector o automuestreador: Es el módulo donde se colocan las muestras y los estándares en los viales para su inyección automática de acuerdo al orden que

hayamos programado, estos sistemas actualmente son elaborados para realizar inclusive procesos de derivatizaciones y diluciones automáticas asegurando así un resultado más exacto, además poseen la opción de mantener la temperatura de la muestra para evitar la degradación de ésta a través del tiempo; asimismo pueden poseer un sistema de agitación para que la inyección siempre sea homogénea, este módulo de automuestreador es evitado cuando se tiene un sistema cromatográfico con inyección manual, en este caso se posee una válvula de inyección y una jeringa que se usa para cargar la muestra a un determinado volumen.

- Detector: Este módulo cumple la función de registrador en su celda de flujo de volúmenes pequeños en el orden de microlitros de todas las porciones separadas a través de la columna cromatográfica; existen diversos sistemas de detección, están los que se utilizan para procesos generales como el detector de Ultravioleta – Visible o Arreglo de Diodos y los que se utilizan con un fin exclusivo como lo es el detector de Fluorescencia, especial para aquellas moléculas fluorescentes.

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la Cooperativa Agraria ALLIMA CACAO Ltda. y en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto

2.1.1. Materia prima

Se utilizaron 7,5 Kg de grano de cacao CCN-51 e ICS-95 fermentado seco (*Theobroma cacao* L.); del área de poscosecha (fermentado y secado) de la Cooperativa Agraria ALLIMA CACAO Ltda. en el distrito de Chazuta, provincia de San Martín.

2.2. Materiales y equipos

2.2.1. Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación de 50, 100 y 250 ml
- Micropipetas 10-100 μ l, 5 ml y 10 ml
- Probetas graduadas de 100, 500 y 1000 ml
- Fiolas de 10, 25 y 50 ml
- Viales de 2 ml
- Jeringas de plástico 5 ml
- Membrana de nylon hidrófila de 25mm, 0,22 μ m marca Thermo Scientific
- Matraz Filtrador marca Ocean de 1000 ml
- Membrana de nylon hidrófila de 46mm, 0,22 μ m marca Thermo Scientific
- Columna LC C18, 150mm x 4,6 mm, marca Phenomenex
- Espátula
- Tamiz 180 μ m ASTM F1

2.2.2. Reactivos

- Metanol grado HPLC marca Baker

- Ácido acético glacial marca Spectrum
- Agua ultra pura
- Estándar analítico de teobromina 42993-100mg marca Sigma Aldrich

2.2.3. Equipos

- Balanza analítica marca Pesacon, Japón
- Potenciómetro PH-016 marca Kyntel
- Potenciómetro Hanna Instruments, Rumania
- Estufa marca Memmert UN55, Alemania
- Homogenizador Vortex, marca Selecta
- Conchadora marca Spectra 11, Eslovenia
- Molino marca Bosch MKM 600, India
- Purificador de agua micropure uv Thermo Scientific
- Ultrasonido Branson 3510, USA
- UHPLC – Ultimate 3000 – Thermo Scientific
- Bomba de vacío ¼ HP marca Value
- Cabina protectora marca Labconco

2.3. Metodología experimental

2.3.1. Proceso poscosecha de cacao

Para la obtención de las muestras de grano de cacao fermentado seco se siguió el diagrama de operaciones que se muestra en la figura 5, se evaluaron el pH, temperatura y acidez durante la fermentación y la humedad durante el secado. Al final del proceso de poscosecha se tomaron 7,5 kg de cacao fermentado seco que fueron trasladados al Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

2.3.1.1. Obtención de los granos de cacao fermentado seco

- A. Cosecha:** Este proceso se inició con la cosecha de cacao de los clones ICS-95 y CCN-51 de las parcelas productoras de la Cooperativa Allima Cacao ubicada en el distrito de Chazuta. La Norma Técnica Peruana NTP 208.04 (2008) que la cosecha se debe realizar cuando la mazorca está en condiciones de madurez, la madurez se

aprecia por cambio de pigmentación de verde a amarillo o rojo y otros similares al amarillo anaranjado fuerte o pálido, empleando unas tijeras para no dañar los cojines florales.

- B. **Selección y quiebre:** Se realizó la selección de las mazorcas de cacao eliminando aquellas que presentaban daños físicos, luego se procedió a realizar el quiebre de las mazorcas como mencionan González y Ruiz, (2009) con la ayuda del envés de un machete con el que se dio un golpe en la parte media para que quiebre sin que se despedace del todo y riegue los granos. De la misma manera Norma Técnica Peruana NTP. 208.040(2009) indica que se debe cortar los frutos en forma diagonal utilizando un cuchillo sin mucho filo para no lesionar las almendras y facilitar la extracción de las mismas, el tiempo entre el desgrane y la puesta en fermentación no debe exceder las 24 horas.

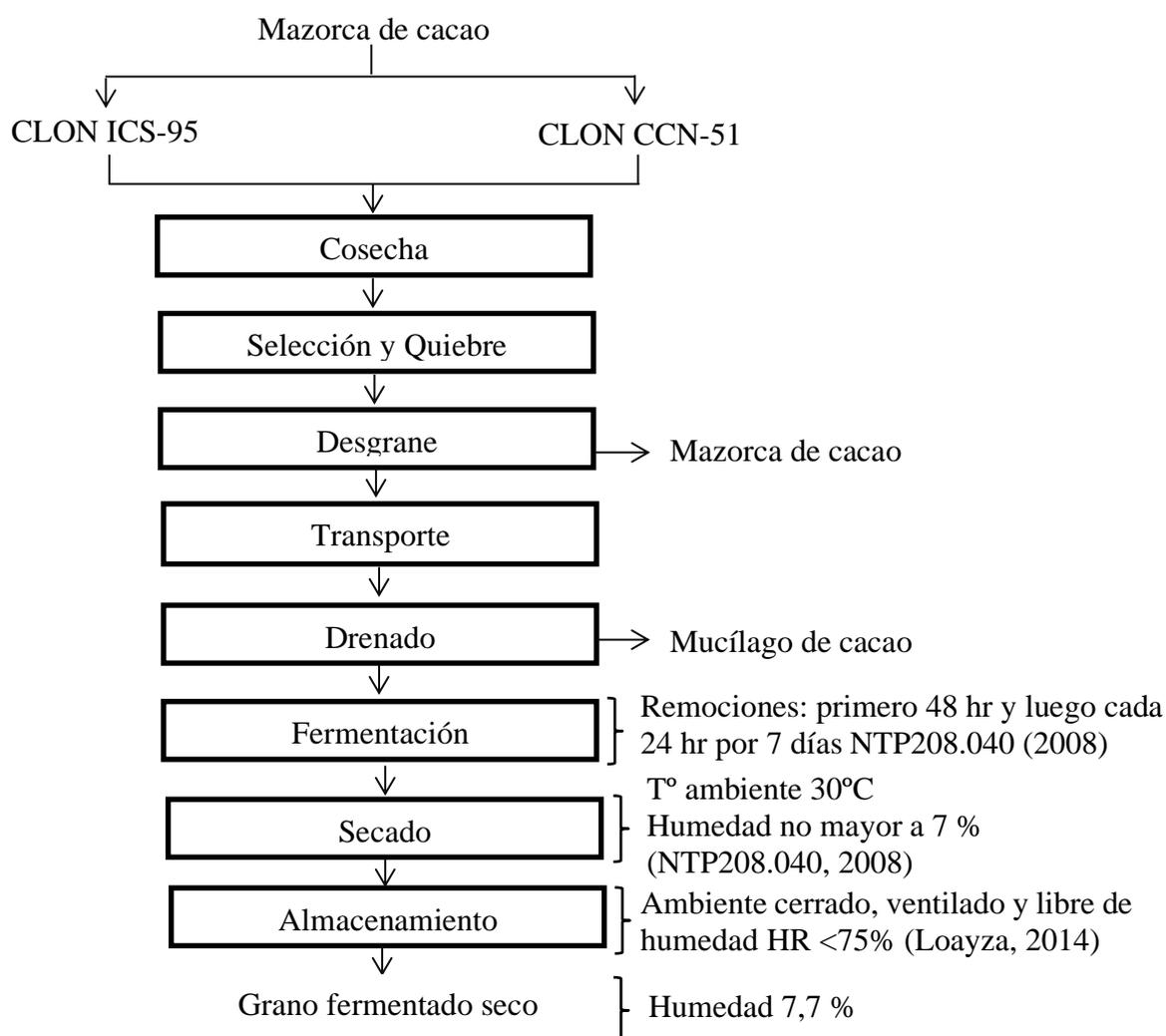


Figura 5. Diagrama de operaciones para la obtención de grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) fermentado seco.

- C. Desgrane:** Se realizó el desgrane manualmente como mencionan González y Ruiz (2009) que la extracción de los granos se hace entonces fácilmente con ayuda de los dedos, deslizándolos a lo largo de la placenta por uno y otro lado. Los granos de cacao se colocaron en baldes de plástico.
- D. Transporte:** Se realizó el transporte del cacao en baba a los módulos de fermentación de la Cooperativa Agraria ALLIMA CACAO Ltda., para empezar la fermentación en los cajones de madera.
- E. Drenado:** Los baldes con los granos en baba se colocaron en malla sobre una parihuela para drenar el mucilago del grano por unas 2 horas, para luego pasar a los cajones de fermentación.
- F. Fermentación:** Los granos de cacao en baba se colocaron en los cajones de madera tornillo de dimensiones 0,5 x 0,5 x 0,6 m³ con sacos de yute encima. Las remociones fueron primero a las 48 horas y luego cada 24 horas hasta completar el proceso de fermentación, el cambio de las almendras de un cajón a otro se hace de tal forma que las que estaban arriba vayan al fondo del otro cajón (NTP208.040, 2008). Durante el proceso de fermentación se monitoreó la temperatura, acidez y pH del grano de cacao
- G. Secado:** El secado se realizó al sol sobre plataformas de madera. Los dos primeros días el cacao se expuso directamente al sol entre 4 a 5 horas por día, extendido en capa gruesa (10 cm. de espesor), al tercer día el espesor óptimo de la masa de cacao no fue mayor de 5 cm (capa delgada) con remociones cada dos horas (volteos), hasta lograr 7 a 7,5 % de humedad (Torres, 2016).
- H. Almacenamiento:** Los granos de cacao se envasaron en sacos de yute y se almacenaron en un ambiente cerrado, ventilado y con humedad relativa inferior a 75 % (Loayza, 2014).

2.3.2. Control de parámetros durante poscosecha de cacao

2.3.2.1. Evaluación de pH

Se determinó mediante el método 970.21 AOAC (1995).

2.3.2.2. Evaluación de acidez

Se determinó mediante el método 942.15 AOAC (1995).

2.3.2.3. Evaluación de temperatura

Se realizó mediante la metodología de Portillo *et al.* (2011).

2.3.2.4. Evaluación de humedad durante el secado

Se determinó la temperatura mediante el método descrito por la Norma Técnica Peruana NTP ISO 2291 (2006).

2.3.3. Calidad física y prueba de corte

2.3.3.1. Calidad física

Se evaluó de acuerdo a la ficha de evaluación física y a la Norma Técnica Peruana NTP – ISO 2451 (2006) los ensayos de evaluación de la apariencia exterior se realizaron de manera visual, olor del grano entero y del grano después del corte mediante el olfato.

2.3.3.2. Prueba de corte

Esta prueba se realizó aplicando la NTP–ISO 1114 (2006) mediante la prueba de corte. Se tomó 100 granos al azar como muestra, se cortó longitudinalmente, se examinó los resultados de los granos adecuadamente fermentados, se asignaron a aquellos en los que sus cotiledones fueron de color marrón y agrietado con surcos pronunciados. Los granos que presentaban coloración violeta de sus cotiledones, fueron designados como granos mal fermentados o aquellos a los que les faltó más tiempo de fermentación, para lograr una coloración marrón. Los colores oscuros corresponden a los granos sobre fermentados y los granos planos o sin grietas son granos pizarrosos.

2.3.4. Análisis químico proximal

- Proteína cruda (N*6,25) (g/100gr); mediante el método AOAC 920.152/2002
- Ceniza (g/100gr); mediante el método AOAC 972.15/2002
- Grasa cruda (g/100gr); mediante el método AOAC 963.15/2002
- Humedad (g/100gr); mediante el método AOAC 977.10/2002
- Carbohidratos (g/100gr); se realizó mediante cálculo de diferencia
- Fibra cruda (g/100gr); mediante el método AOAC 978.10/2002

2.3.5. Proceso de obtención de licor de cacao

La obtención de licor de cacao fue realizada según los parámetros establecidos en la figura 6, en el Laboratorio de Análisis Sensorial y en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Al final las muestras de licor fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta su posterior análisis.

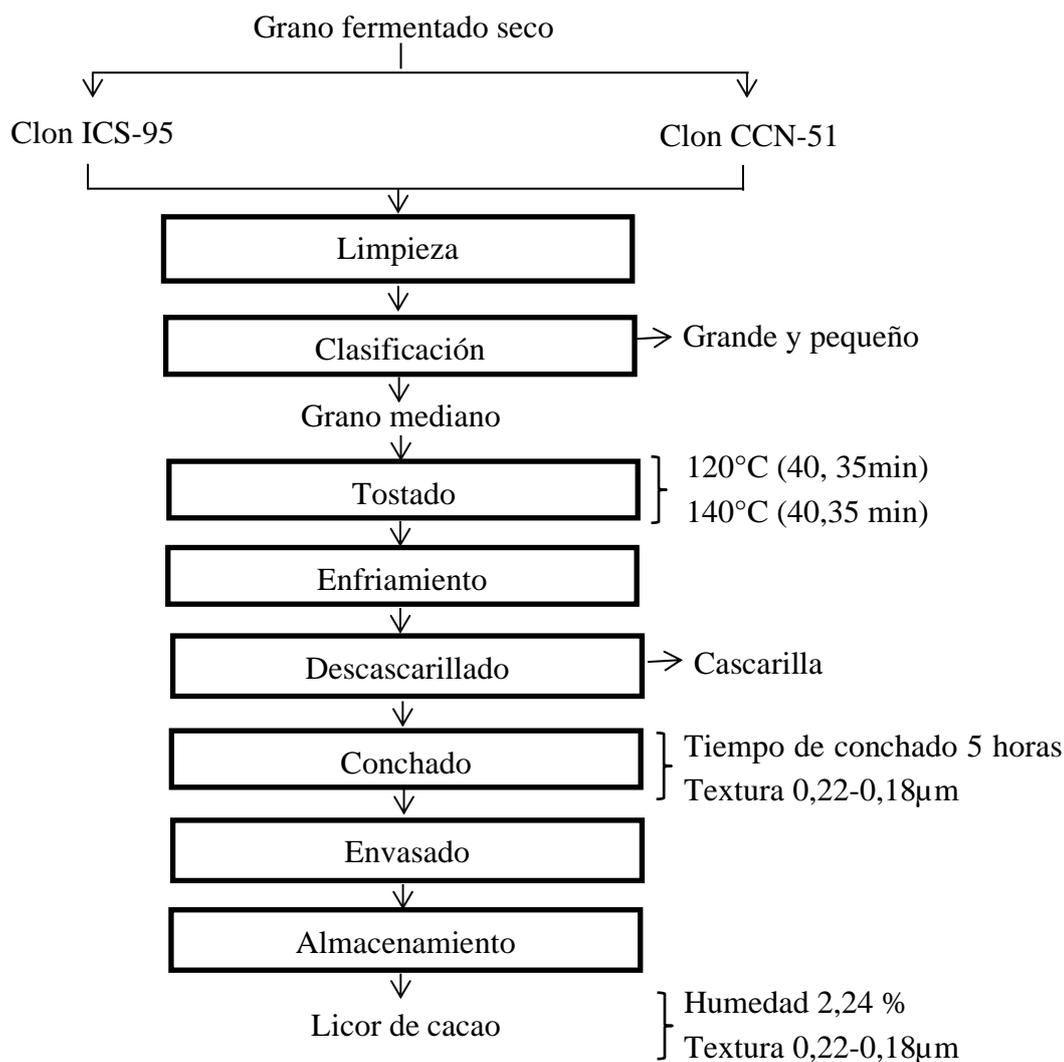


Figura 6. Diagrama de operaciones para la obtención de licor de cacao.

2.3.5.1. Descripción del proceso de obtención de Licor de cacao

A. Limpieza: Se realizó la limpieza de los granos de cacao separando los granos vanos, materia extraña, etc., para no afectar la calidad del licor de cacao. Es conveniente limpiar de impurezas al cacao a fin de obtener un producto de mejor valor comercial (INIAP, 2003).

- B. Clasificación:** Luego se clasificó los granos por tamaño (grande, mediano y pequeño) para una mejor optimización del tostado y evitar quemar los granos de cacao.
- C. Tostado:** Se realizó el tostado de los granos medianos en una estufa marca Memmert a 120°C y 140 °C por un tiempo de 40 min y 35 min con una remoción a los 20 min para obtener un tostado uniforme. En esta etapa se forman los aromas y sabores característicos a chocolate.
- D. Enfriamiento:** Después del tostado se enfrió el grano de cacao por un tiempo de 20 min para evitar la pérdida de aromas y sabores, Tal y como indica Hernández (2010) se enfría a 25°C/20 min para que no haya una pérdida de aroma
- E. Descascarillado:** Una vez enfriados los granos tostados se realizó el descascarillado de forma manual obteniendo así los nibs de cacao para su molienda. Tal y como menciona Enríquez (2004) el descascarillado es la operación de rotura de las habas de cacao, en donde se separa la cáscara y su interior “Nibs” de forma más rápida.
- F. Conchado:** Los nibs de cacao se introdujeron en una Conchadora marca Spectra 11, la cual ejerció presión y fricción, produciendo una mezcla líquida, pero espesa, de textura suave que es el licor de cacao (Beckett, 2008; Afoakwa, 2010).
- G. Envasado:** El licor de cacao fue envasado en frascos esterilizados de vidrio.
- H. Almacenamiento:** Los frascos conteniendo licor de cacao fueron almacenados a temperatura ambiente.

2.3.6. Determinación y cuantificación de teobromina mediante UHPLC.

Determinación de teobromina (F. Lo Coco et. al., 2007).

2.3.6.1. Condición de análisis

- Equipo cromatográfico líquido de alta resolución marca Thermo Scientific UHPLC
- Columna C18, 150mm x 4.6mm, marca Phenomenex
- Fase móvil: agua ultra pura/metanol HPLC/ácido acético (69,99:30:0,01)
- Solución extractora: ácido acético/metanol (85:15)
- Diluyente: agua ultra pura: metanol HPLC (90:10)
- Detector: Longitud de onda de 270 nm.
- Flujo: 1ml/min

- Volumen de inyección: 10 μ L
- Temperatura: 35°C
- Tiempo de análisis: 8 minutos

2.3.6.2. Preparación de fase móvil

Se preparó una mezcla de agua ultra pura/metanol HPLC/ácido acético en la proporción 69,99:30:0,01 respectivamente, teniendo en cuenta que el ácido acético es incluido para suprimir la ionización de los grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos, mejorando así la resolución y reproducibilidad de las corridas cromatográficas (Markham y Bloor, 1998). Luego se filtró mediante una bomba de vacío a través de una membrana de nylon de 0,22 μ m.

2.3.6.3. Preparación del estándar analítico de teobromina

Se pesó exactamente 20 mg del estándar analítico de teobromina y se llevó a una Fiola de 25 ml, luego se añadió 10 ml del diluyente agua ultra pura /metanol HPLC (90:10), se sometió a ultrasonido por 10 min, luego se enrasó con el diluyente y se mezcló, obteniendo así una solución madre de 800 ppm. Se tomaron alícuotas del estándar de teobromina para la curva de calibración en Fiolas de 10ml, como se muestra en la tabla 1. Posteriormente se enrasó a 10 ml con el diluyente, se filtró en un vial de 2 ml a través de una membrana de nylon de 0,22 μ m.

2.3.6.4. Preparación de la muestra de licor y grano de cacao

En la preparación de la muestra no se realizó el método de desengrasado de las muestras de grano y licor de cacao debido a que Quispe (2013) en su investigación determinó que las condiciones más adecuadas para la extracción de teobromina de la muestra fueron: cacao sin desengrasar, con extracción ácido acético/metanol (85:15 v/v).

Además, Gil (2012) realizó el perfil cromatográfico de muestra de cacao desengrasado y sin desengrasar en donde se observa que dicho perfil de compuestos no se ve alterado ni en composición ni cantidad de los mismos.

Muestra de 100 gr de grano de cacao fermentado seco con humedad de 7,7% y licor de cacao con humedad de 2,24 % respectivamente, fueron molidas en un molino marca Bosch, luego de esto se tamizó a 180 μm . Se pesó 0,04 g de muestra de licor y grano de cacao fermentado seco. Luego se añadió 10 ml de solución extractora de ácido acético/metanol HPLC (85:15), se agitó en Vortex por 15 min, luego se realizó la extracción por ultrasonido durante 10 min. Posteriormente fue microfiltrado en un vial de 2 ml a través de una membrana de nylon de 0,22 μm .

Tabla 1

Concentración del estándar de teobromina para la curva de calibración

Concentración (ppm)	Alícuota de solución madre (μl)	Volumen final (ml)
50	625	10
100	1250	10
200	2500	10
400	5000	10
800	10000	10

2.3.6.5. Procedimiento

Se inyectó en el cromatógrafo volúmenes iguales de 10 μl de las preparaciones del estándar y de la preparación de las muestras, registrando el cromatograma de teobromina y su cuantificación.

2.4. Diseño experimental y Análisis de datos

La investigación buscó determinar el efecto del clon de cacao, temperatura y tiempo de tostado en el contenido de teobromina en licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los clones CCN-51 e ICS-95. El presente trabajo experimental está basado en un Diseño factorial 2^3 , teniendo como factores a los clones de cacao (CCN-51 e ICS-95), temperatura de tostado del grano de cacao (120°C y 140 °C) y tiempo de tostado (35 y 40 min); con 3 repeticiones haciendo un total de 24 experimentos, con un nivel de confianza del 95%.

Donde;

Factor A: Clones de cacao (CCN-51 e ICS-95)

Factor B: Temperatura de tostado (120 y 140 °C)

Factor C: Tiempo de tostado (35 y 40 min)

De esta manera se realizaron 8 tratamientos los cuales se muestran a continuación

$T_1 = C_1T_1t_1$; $T_2 = C_1T_1t_2$; $T_3 = C_1T_2t_1$; $T_4 = C_1T_2t_2$; $T_5 = C_2T_1t_1$; $T_6 = C_2T_1t_2$; $T_7 = C_2T_2t_1$; $T_8 = C_2T_2t_2$;

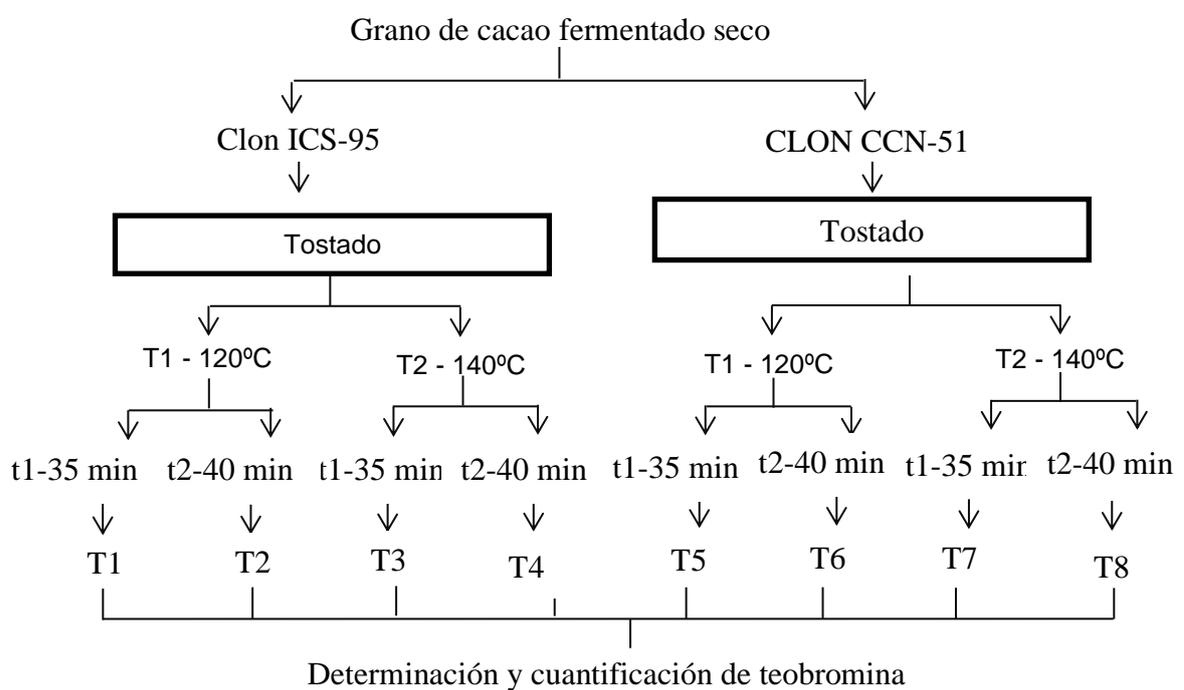


Figura 7. Diseño experimental factorial de tres factores con dos niveles.

El modelo es:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + e_{ijkl}$$

Donde;

Y_{ijkl} = Es el contenido de teobromina

μ = es la media general de las muestras

τ_i = es el efecto de las variedades de cacao i

β_j = es el efecto de la temperatura de tostado j

γ_k = es el efecto del tiempo de tostado k

$(\tau\beta)_{ij}$ = es la interacción de variedades de cacao i con la temperatura de tostado j

$(\tau\gamma)_{ik}$ = es la interacción de variedades de cacao i con el tiempo de tostado k

$(\beta\gamma)_{jk}$ = es la interacción de la temperatura de tostado j con el tiempo de tostado k

$(\tau\beta\gamma)_{ijk}$ = es la interacción de las variedades de cacao con la temperatura de tostado j y el tiempo de tostado k

e_{ijkl} = es el error experimental

A partir de esto se plantearon las siguientes hipótesis

$$H_0 = T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = T_5 = T_6 = T_7 = T_8$$

$$H_i = T_i \neq T_j \text{ para algún } i \neq j$$

Se realizó el análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos utilizados.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación poscosecha de cacao

3.1.1. Comportamiento de pH, temperatura y acidez durante la fermentación

La variabilidad de los parámetros durante la fermentación de grano de cacao de los clones CCN-51 e ICS-95 se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

Variabilidad de pH, temperatura y acidez durante la fermentación de cacao (Theobroma cacao L.) clones ICS-95 y CCN-51*

Día	pH		Temperatura (°C)		Acidez (%Ac. Acético)	
	CCN-51	ICS-95	CCN-51	ICS-95	CCN-51	ICS-95
0	4,65±0,036	4,66±0,013	25,40±0,41	26,10±0,29	0,38±0,020	0,64±0,024
1	5,32±0,012	4,76±0,024	35,40±0,24	32,00±0,33	0,45±0,031	0,70±0,015
2	5,02±0,018	4,72±0,035	38,80±0,33	38,40±0,25	0,77±0,022	0,51±0,026
3	4,71±0,022	4,53±0,017	49,40±0,14	44,20±0,29	0,90±0,018	1,15±0,022
4	4,49±0,016	4,38±0,013	45,10±0,44	44,50±0,30	1,22±0,029	1,41±0,029
5	4,33±0,031	4,30±0,025	50,90±0,29	48,90±0,21	1,92±0,023	1,52±0,012
6	4,44±0,024	4,32±0,036	46,80±0,18	47,60±0,19	1,34±0,030	1,22±0,017
7	4,28±0,013	4,40±0,011	50,30±0,14	50,90±0,22	1,66±0,032	1,41±0,020
X	4,66	4,51	42,76	41,58	1,08	1,07

*Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

El valor del pH para clon del CCN-51 se muestra en la figura 8 y la tabla 2, al inicio del proceso de fermentación fue de 4,65±0,036. Antes de la primera remoción a las 48 horas, presento un incremento alcanzando 5,02±0,018 después de las remociones empezó a descender presentando a las 72 horas de fermentación un valor de 4,71±0,022, luego a las 96 horas de fermentación fue de 4,49 ±0,016 y continuó descendiendo hasta un pH de 4,28±0,013 al final de la fermentación.

El valor del pH para clon ICS-95 se muestra en la figura 8 y la tabla 2 al inicio del proceso de fermentación fue de $4,66\pm 0,013$; antes de la primera remoción a las 48 horas, fue de $4,72\pm 0,035$ presentando un ligero incremento; luego de las remociones empezó a descender mostrando a las 72 horas de fermentación un valor de $4,53\pm 0,017$. A las 96 horas de fermentación fue de $4,38\pm 0,013$ y continuó descendiendo hasta $4,30\pm 0,025$ a las 120 horas de fermentación, para finalmente tener un incremento a $4,40\pm 0,011$ al final de la fermentación.

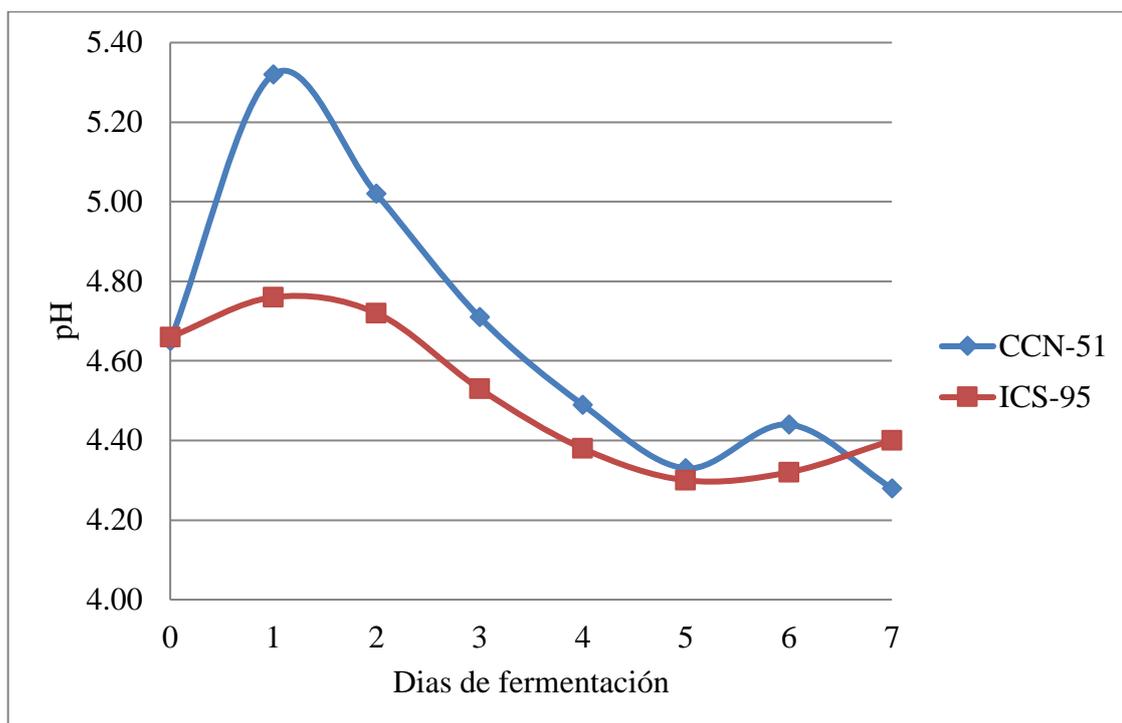


Figura 8. Variación del pH en función al tiempo de fermentación del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) clones ICS-95 y CCN-51

Esta variación es debida a que durante esta etapa el ácido acético formado migra hacia el cotiledón, descienda su pH y luego se incrementa debido a las reacciones entre ácido acético y las diversas fracciones de proteínas (García, 2000). Además, Enríquez (1985) afirma que durante las primeras 72 horas el pH es de 4 y a las 96 horas y hasta el final de la fermentación aumenta hasta un valor de 4,75. Al igual que Amores, Jiménez y Peña (2006) refieren que, durante la fermentación, se produce ácido acético que se infiltra en los cotiledones y reduce el pH de 6,4 a 4,5 a temperaturas mayores de 45°C , esta acidificación desintegra los compartimientos de la célula y su eventual muerte. El valor promedio de pH para los clones CCN-51 e ICS-95 fue de 4,66 y 4,55 respectivamente, lo

cual es inferior a lo reportado por Bravo (2010) que obtuvo un valor promedio de 5,84 y 5,28 para los clones CCN-51 e ICS-95 respectivamente.

Los valores de acidez para el clon CCN-51 se muestra en la figura 9 y la tabla 2, al inicio del proceso de fermentación fue de $0,38\pm 0,020$ %. Después de la remoción a las 72 horas presento un incremento de $0,90\pm 0,018$ % siguió incrementándose a un valor de $1,92\pm 0,023$ % a las 120 horas luego descendió a $1,66\pm 0,032$ % .al final de la fermentación.

Los valores de acidez para el clon ICS-95 se muestra en la figura 9 y la tabla 2, al inicio del proceso de fermentación fue de $0,64\pm 0,024$ %. Después de la remoción a las 72 horas presento un incremento de $1,15\pm 0,022$ % siguió incrementándose a un valor de $1,52\pm 0,012$ % a las 120 horas luego descendió a $1,41\pm 0,020$ % al final de la fermentación.

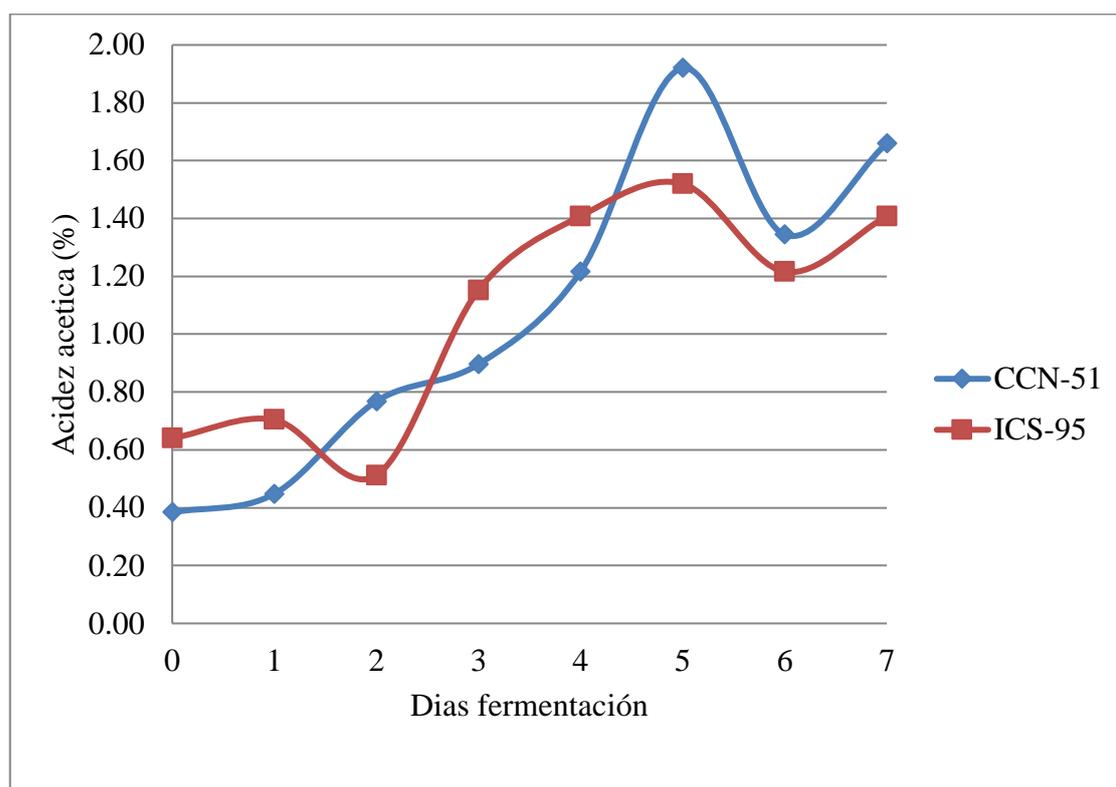


Figura 9. Variación de la acidez en función al tiempo de fermentación de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) clones ICS-95 y CCN-51

Con respecto al descenso de acidez de los últimos días de fermentación, García et al. (2002) mencionan que la concentración de ácido acético disminuye gradualmente debido a la volatilización del ácido acético, inducido por las remociones o aireación y a las altas

temperaturas. Además, la cantidad de baba o pulpa de cacao fue mayor en el clon CCN-51 con respecto al clon ICS-95, esto probablemente ha influenciado en la acidez inicial y final ya que esta baba es transformada en alcohol y posteriormente en ácido acético.

Portillo, Graziani de Farinas y Betancourt (2007) afirman que la acidez se inicia con valores bajos de 0,59% cuando las mazorcas se abren el mismo día de la cosecha. Además, Bravo (2010) reporta una acidez baja al inicio de la fermentación para los clones CCN-51 y ICS-95 de 0,38 % y 0,28% respectivamente. Así mismo Portillo et al. (2007) y Bravo (2010) reportaron un incremento de la acidez hasta el tercer día de iniciada la fermentación alcanzando un valor de 1,25%, esto debido a que durante la fermentación la testa se vuelve permeable dejando pasar muchas sustancias como el ácido acético hacia el cotiledón haciendo que la acidez aumente.

El control de la temperatura para clones CCN-51 e ICS-95 se muestra en la figura 10 y la tabla 2 al inicio del proceso de fermentación arrojó valores de $25,40\pm 0,41$ y $26,10\pm 0,29^{\circ}\text{C}$ respectivamente, para luego aumentar a $38,80\pm 0,33$ y $38,40\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ antes de la primera remoción. A las 72 horas de fermentación la temperatura fue de $49,4\pm 0,14$ y $44,2\pm 0,29^{\circ}\text{C}$, respectivamente. No obstante, el clon ICS-95 alcanzó la temperatura de $48,9\pm 0,29^{\circ}\text{C}$ a las 120 horas de fermentación.

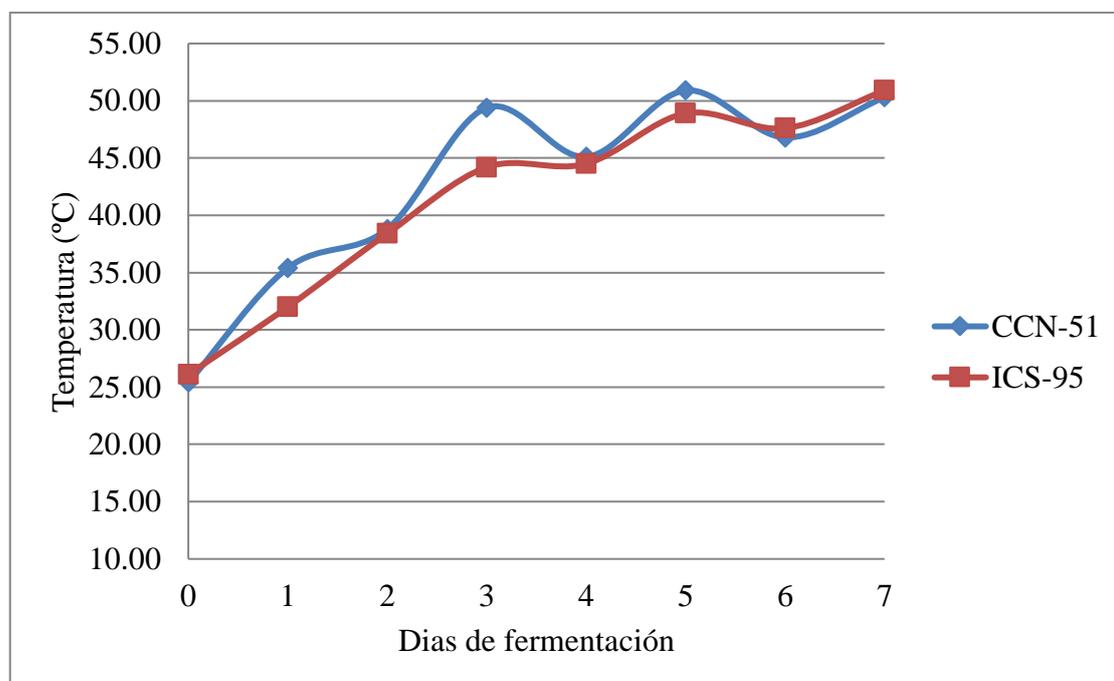


Figura 10. Variación de la temperatura en función al tiempo de fermentación de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) clones ICS-95 y CCN-51.

Ambos clones alcanzaron una temperatura máxima de 50,9 °C a las 120 horas y 144 horas respectivamente, esto debido al etanol y el ácido acético formados penetran en la semilla, y este cambia el pH y la temperatura acelerando la muerte de la semilla, es decir, la destrucción del poder de germinación; las células de la pared de las semillas también son destruidas. Los procesos bioquímicos son los responsables de la formación de los precursores del sabor del chocolate (Beckett, 2009; Afoakwa, 2010).

Además, la temperatura durante la fermentación alcanza hasta los 55°C (Paoletti *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2013). El valor promedio de temperatura para los clones CCN-51 e ICS-95 fue de 42,76 y 41,58°C respectivamente, lo cual es superior a lo reportado por Bravo (2010) quien obtuvo un valor promedio de 33,26 y 33,48 °C para los clones CCN-51 e ICS-95 respectivamente.

3.1.2. Comportamiento de la humedad durante el secado

En la tabla 3 se muestra los resultados de la pérdida de humedad durante el secado de granos de cacao.

Tabla 3

Variación del porcentaje de la humedad durante el secado de cacao (Theobroma cacao L.) clones ICS-95 y CCN-51*

Día	Humedad	
	Clon CCN-51	Clon ICS-95
1	56,80±0,047 %	58,40 ±0,042%
2	43,30±0,051%	45,20±0,038%
3	25,30±0,022%	27,30±0,035%
4	12,50±0,036%	12,10±0,042%
5	8,00±0,030%	8,40±0,039%
6	7,6±0,045%	7,80±0,024%

*Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

El proceso de secado fue realizado durante 6 días, tiempo necesario para obtener un contenido de agua adecuado para la conservación de los granos de cacao seco de los clones CCN-51 e ICS-95, que salieron de los cajones fermentadores con una humedad de

56,80±0,047 y 58,40±0,042% respectivamente teniendo una disminución gradual hasta obtener una humedad final de 7,6±0,045 y 7,8±0,024 % respectivamente. Los resultados coinciden con lo descrito en la Norma Técnica Peruana NTP208.040 (2008) que al final de la fermentación se tiene un contenido de humedad de los granos de cacao alrededor del 55% y para ser almacenados con seguridad se debe reducir a un límite no mayor a 7%. Al igual que Afoakwa, (2010) y Watson *et al.* (2013) afirman que la fermentación se detiene mediante el secado del grano, este paso está destinado a reducir la humedad inicial de 40-60% a una humedad del 6-7%.

3.1.3. Características físicas y grado de fermentación de grano de cacao

La calidad del grano seco fue evaluada mediante ensayos físicos, en la tabla 4 se muestra la evaluación física y en la tabla 5 se muestra el grado de fermentación según NTP – ISO 2451 (2006).

Tabla 4

Características físicas de los granos de cacao (Theobroma cacao L.) de cacao clones ICS-95 y CCN-51

Evaluación		Grano de cacao seco clon CCN-51	Grano de cacao seco clon ICS-95
Apariencia exterior	Color	Marrón oscuro	Marrón claro
	Acidez	Ácido	Poco ácido
Olor grano entero	Característica	Típico	Típico
	Observación	Acidez penetrante	Aroma a cacao leve
Olor grano cortado	Acidez	Poco ácido	Poco ácido
	Característica	Típico	Típico
	Observación	Aroma a chocolate	Aroma a chocolate

Las características físicas del grano de cacao se muestran en la tabla 4, los clones CCN-51 e ICS-95 en la apariencia externa presentaron un color marrón con tono oscuro y claro

respectivamente esto debido a que, según Nienenak *et al.* (2006) los granos frescos de cacao contienen pigmentos de antocianinas de color púrpura y durante la fermentación estos pigmentos son hidrolizados por glucósidos resultando un cambio del color del cotiledón de violeta a marrón. Respecto al olor en el grano entero y en el cortado en los clones CCN-51 posee una acidez en grano entero en cambio el ICS-95 posee poca acidez, además ambos clones tienen una ligera acidez y un aroma típico a chocolate luego de realizar el corte del grano. Según González, Pérez y Palomino (2012) las reacciones de los polifenoles con el azúcar y aminoácidos contribuyen al sabor, al aroma y al color de las almendras de cacao.

Tabla 5

Grado de fermentación del grano de cacao (Theobroma cacao L.) clones ICS-95 y CCN-51

Evaluación (%)	Grano de cacao seco clon CCN-51	Grano de cacao seco clon ICS-95
Enmohecidos	0	0
Pizarrosos	8	8
Violáceos	25	40
Pasillas	0	0
Porcentaje de fermentación	67	52

Se muestra en la tabla 5 un porcentaje de 67 y 52 % de grano fermentado (color marrón con grietas) para los clones CCN-51 e ICS-95 durante 7 días de fermentación, que indican que no alcanzaron una adecuada fermentación, ya que presentan 25 y 40 % de granos violáceos respectivamente, lo que indica un grano insuficientemente fermentado de color violeta por lo menos en la mitad de su superficie.

Bravo (2010) reporta un 75 y 80 % de fermentación para los clones CCN-51 e ICS-95 respectivamente para granos de cacao procedentes de la Empresa Romero Trading; de la región de San Martín – Perú, con 6 días de fermentación para ambos clones. Pero los porcentajes fueron superiores a lo reportado por Condori (2015) con 59% para granos de cacao chuncho procedentes de La Convención, Cusco, en el que el tiempo de fermentación fue de 5,5 días a temperaturas de 32,7 a 46,5 °C. Según Batista (2009)

mediante la prueba de corte se puede determinar los granos fermentados, violáceos, pizarrosos, entre otros, los cuales serán el reflejo de las condiciones de beneficio del cacao. Además, mediante la prueba de corte se obtuvo el 8% de granos pizarrosos para ambos clones que presentaron un color pizarroso (grisáceo), obteniendo la clasificación de grado II. Según la Norma Técnica Peruana NTP-ISO 2451 (2006) los lotes de cacao se clasifican de acuerdo a la proporción de granos defectuosos, de grado I se considera aquel que posee máx. 3% de granos mohosos, máx. 3% de granos pizarrosos y máx. 3% de dañados por insectos, germinados o planos y de grado II se considera aquel que posee máx. 4% de granos mohosos, máx. 8% de granos pizarrosos y máx. 6% de dañados por insectos, germinados o planos.

3.1.4. Composición químico proximal

En la tabla 6 se muestran la composición químico proximal para los granos de cacao fermentado seco de los clones CCN-51 e ICS-95.

Tabla 6

Composición químico proximal en base seca de granos de cacao (Theobroma cacao L.) fermentado seco clones ICS-95 y CCN-51*

Composición (g/100gr)	Clon CCN-51	Clon ICS-95
Carbohidratos totales	42,23±0,0535	45,18±0,4606
Proteína cruda	14,43±0,0076	13,84±0,0307
Grasa cruda	39,59±0,0535	36,35±0,0307
Ceniza	3,75±0,01147	4,62±0,0461
Fibra cruda	11,38±0,2753	12,77±0,4606
Humedad	7,6±0,045%	7,80±0,024%

*Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de 3 determinaciones.

El contenido de carbohidratos totales para los clones CCN-51 e ICS-95 fue calculado por diferencia, este incluye fibra y azúcares, siendo para las dos variedades estudiadas de 42,23±0,0535 y 45,18±0,4606 % respectivamente, encontrándose superior a lo reportado por Álvarez, Pérez y Lares (2007) cuyo valor varía de 26,68 a 30,0°8% en los 5 genotipos

(MAR-4, CMR-5, CRP-1, CRP-2 Y MCP-1) e incluyendo una muestra comercial y Aldave (2016) reporta valores de 36,78 y 35,82% en clones CCN-51 y ICS-6 respectivamente.

El contenido de proteína cruda para los clones CCN-51 y ICS-95 para las dos variedades estudiadas de $14,43 \pm 0,0076$ y $13,84 \pm 0,0307$ % respectivamente, el cual es similar a lo reportado por Cardona (2016) con un 13,2 % para cacao sembrado en Arauca, Colombia. Lares, Gutiérrez y Álvarez (2012) reporta un valor de 12,21% para cacao de la región del estado de Miranda, Venezuela. Asimismo, Álvarez *et al.* (2007) reporta un rango de variabilidad de 12,31 a 14,00% de proteína cruda en los genotipos MAR-4, CMR-5, CRP-1, CRP-2 y MCP-1. Además, Aldave (2016) reporta valores de 15,24 y 16,16 % en clones CCN-51 e ICS-6 respectivamente. Estos resultados se encuentran dentro del rango establecido de 12-15 % (Cardona, 2016).

El contenido de grasa cruda para los clones CCN-51 e ICS-95 fue de $39,59 \pm 0,0535$ y $36,35 \pm 0,0307$ % respectivamente. Vera *et al.* (2014) reportan valores de grasa cruda de 15 clones de cacao nacional en el Ecuador con un valor mínimo de 20,31 % y un valor máximo de 33,53 % teniendo como muestra testigo al clon CCN-51 e IMC-67 con valores de 41,44 y 37,72 % respectivamente siendo similares a los reportados en esta investigación.

Sin embargo, autores como Steimberg *et al.* (2003) citados por Jahurul *et al.* (2012) quienes indican que el porcentaje de grasa, en las almendras de cacao, debe estar entre 50 y 57% ya que es el responsable directo de las propiedades y el aroma del licor del cacao. Los bajos porcentajes de grasa encontrados pueden estar relacionados con los factores genéticos. Además, el tamaño del grano y el proceso de beneficio, son considerados los factores más directos en las variaciones del contenido graso en granos de cacao (Cross 1997).

El contenido de ceniza para los clones CCN-51 e ICS-95 fueron de $3,75 \pm 0,01147$ y $4,62 \pm 0,0461$ % respectivamente, siendo los resultados encontrados superiores a los reportados por Cardona (2016) de ceniza de 3,81 a 2,81 % y Álvarez *et al.* (2007) de 2,86 a 3,32%. Además, Aldave (2016) reporta valores de 2,85 y 3,26 % en clones CCN-51 e ICS-6 respectivamente encontrando un poco de variación respecto a las muestras estudiadas que pueden ser debidas a la condición actual del suelo de las parcelas en el distrito de Chazuta.

El contenido de fibra cruda para los clones CCN-51 y ICS-95 fueron de $11,38 \pm 0,2753$ y $12,77 \pm 0,4606$ % respectivamente, siendo superior a lo reportado por Aldave (2016) de 9,18 y 9,41 % en clones CCN-51 e ICS-6 respectivamente.

El contenido de humedad para los clones CCN-51 y ICS-95 fue de 7,55 y 7,88 % respectivamente. De acuerdo a la Norma Técnica Peruana NTP208.040 (2008) con este valor de humedad pueden ser almacenados con seguridad.

3.2. Contenido de teobromina en grano y licor de cacao clones ICS-95 y CCN-51

3.2.1. Contenido de teobromina en grano de cacao fermentado seco.

En la tabla 7 se presentan los resultados del contenido de teobromina (Tb), de los clones ICS-95 y CCN-51 antes del proceso de industrialización. Los resultados obtenidos de teobromina (mg Tb/g) para los clones ICS-95 y CCN-51 son de $16,6088 \pm 0,32$ y $15,8140 \pm 0,34$ mg/g respectivamente.

Tabla 7

Contenido de teobromina en granos de cacao (Theobroma cacao L.) fermentado seco clones ICS-95 y CCN-51 en base seca.*

Materia prima	ICS-95 (Tb mg/g)	CCN-51 (Tb mg/g)
Grano de cacao fermentado seco	$16,6088 \pm 0,32$	$15,8140 \pm 0,34$

*Los resultados se expresan como el promedio \pm la desviación estándar de 3 determinaciones.

Estos resultados son superiores a lo reportado por Quispe (2013) que reporta valores de $9,68 \pm 0,05$ a $11,20 \pm 0,008$ mg Tb/g en las localidades Pucacaca y Huingoyacu, del mismo modo Bardón (2017) reportó contenidos de teobromina en granos fermentados secos de $8,54 \pm 0,011$ – $11,56 \pm 0,005$ mg Tb/g en las regiones de Huánuco (Tingo María), Ucayali (San Alejandro) y Curimana, (Oriente del Perú). Los valores de teobromina reportados en esta investigación se encuentran en el rango reportado por Brunetto *et al.* (2007) que ha determinado que la concentración de los granos de cacao varía entre 7 mg Tb/g y 20,0 mg Tb/g y por Amores *et al.* (2009) que reporto valores superiores en

teobromina para cacao Esmeraldeño en época lluviosa y seca de 17,3 mg Tb/g y 18,0 mg Tb/g respectivamente.

Además, Gil (2012) citando a Brunetto *et al.* (2007) atribuyen un alto contenido de teobromina en grano seco puede darse debido a que durante la fermentación la testa del cacao se hace permeable a las metilxantinas y dado que estas se encuentran en la pulpa, la cáscara y el interior del grano, es posible que ocurra una migración hacia el interior y debido a esto se observe un incremento en sus concentraciones.

3.2.2. Contenido de teobromina en licor de cacao

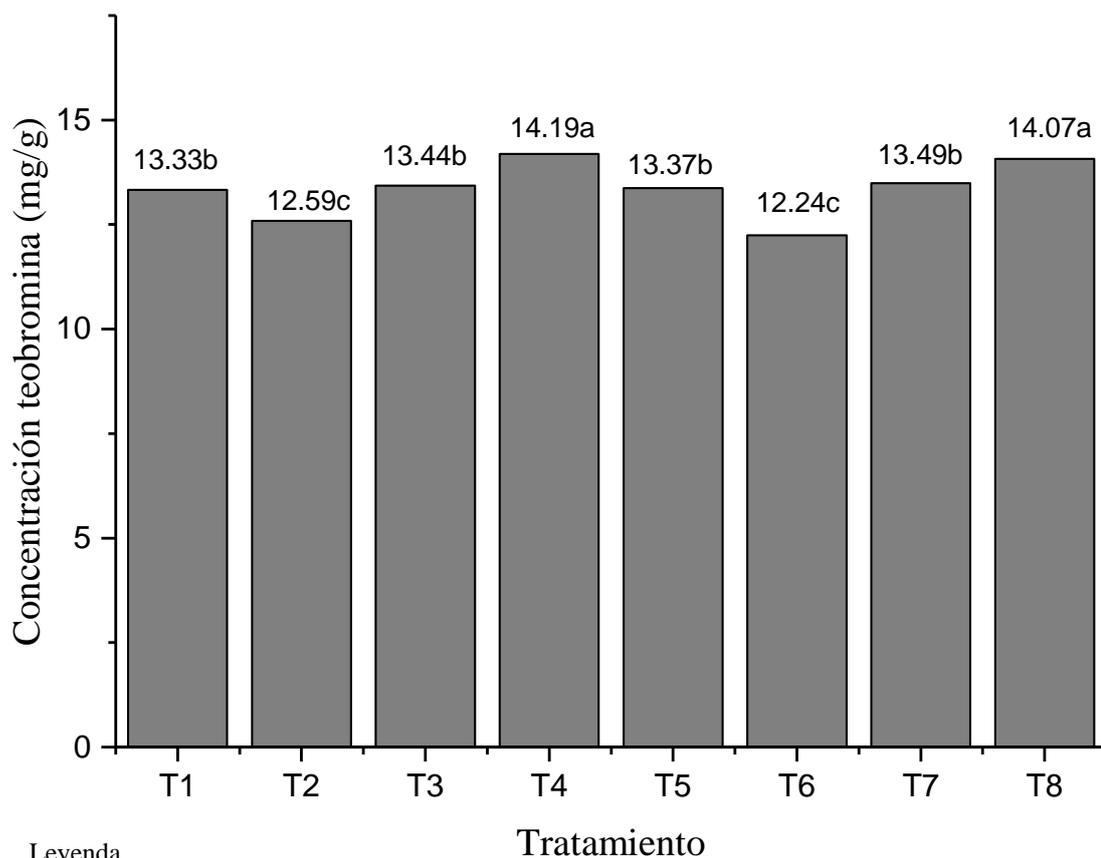
En la figura 11 y tabla 8, se observa la influencia del contenido de teobromina entre los tratamientos en el licor de cacao, de los clones ICS-95 y CCN-51 (Anexo A) considerando tiempo y temperatura de tostado teniendo una disminución de teobromina debido a la industrialización del grano de cacao. Destacando el mayor contenido de teobromina el clon ISC-95 a una temperatura y tiempo de tostado de 140°C y 40 min respectivamente.

Tabla 8

Contenido de teobromina en el licor de cacao clones ICS-95 y CCN-51 en base seca.

Clon de cacao	Temperatura de tostado (°C)	Tiempo de tostado (min)	Teobromina (mg/g)
ICS-95	120	35	13,3333 ± 0,086 ^b
		40	12,5900 ± 0,136 ^c
	140	35	13,4367 ± 0,417 ^b
		40	14,1900 ± 0,057 ^a
CCN-51	120	35	13,3667 ± 0,053 ^b
		40	12,2433 ± 0,077 ^c
	140	35	13,4867 ± 0,029 ^b
		40	14,0700 ± 0,313 ^a

*Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de 3 determinaciones. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).



Leyenda

T1 – ICS-95 120°Cx35min T5 – CCN-51 120°Cx35min

T2 – ICS-95 120°Cx40min T6 – CCN-51 120°Cx40min

T3 – ICS-95 140°Cx35min T7 – CCN-51 140°Cx35min

T4 – ICS-95 140°Cx40min T8 – CCN-51 140°Cx40min

Figura 11. Comportamiento del contenido de teobromina (mg/g) en diferentes tiempos y temperatura de tostado en granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) clones ICS-95 y CCN-51

Medias seguidas de la misma letra en la columna no presentan diferencia significativa a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Estos resultados son superiores a los reportados por Quispe (2013) quien determinó teobromina en licor de cacao en las localidades de Huingoyacu y Pucacaca el contenido de teobromina en licor de cacao es de $8,83 \pm 0,02 - 12,39 \pm 0,03$ mg Tb/g., la preparación del licor de cacao fue a una temperatura de tostado de 115°C por 20 min y conchado de 8 horas, del mismo modo Bardón (2017) reporto contenido de teobromina en licor de cacao es de $8,36 \pm 0,011 - 11,40 \pm 0,010$ mg Tb/g en las regiones de Huánuco (Tingo María), Ucayali (San Alejandro) y Curimana, (Oriente del Perú), la preparación del licor de cacao fue a una temperatura de tostado de 115°C por 30 min y conchado de 8 horas.

Mladenovic *et al.* (2018) reportó contenido de teobromina en licor de cacao provenientes de Costa Rica el resultado obtenido fue de 7,39 mg Tb/g. Por otro lado, Nazaruddin *et al.* (2001) cuantificó teobromina mediante el método HPLC, reportó contenidos de licor de cacao de Malasia y Ghana de $17,72 \pm 1,66$ y $25,28 \pm 0,56$ mg Tb/g respectivamente. Los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango de concentración de teobromina reportado por los autores mencionados.

En la figura 12 y 13, se observa la interacción de la temperatura y tiempo de tostado frente al contenido de teobromina de los clones ICS-95 y CCN-51 respectivamente donde las zonas rojas muestran el mayor contenido de teobromina que se acercan a la temperatura de 140°C en ambos clones.

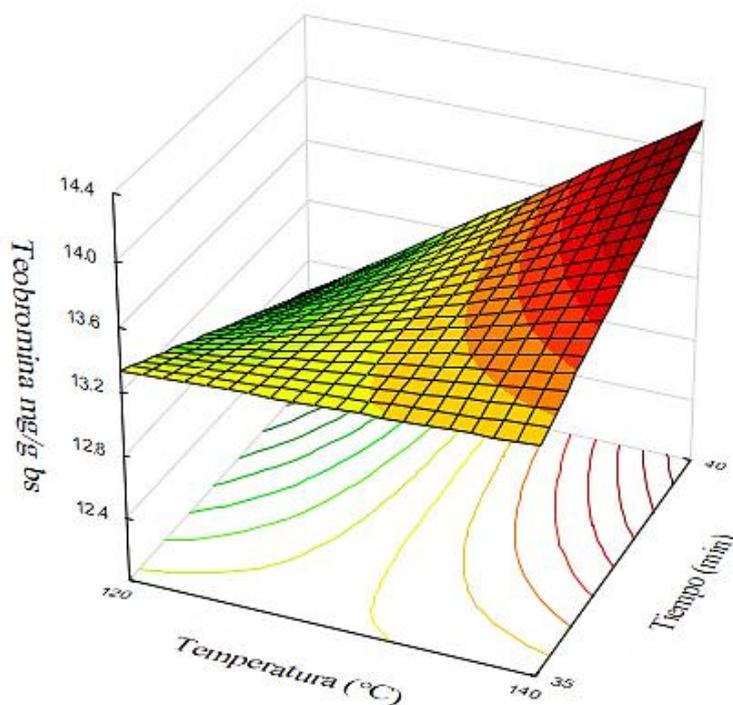


Figura 12. Interacción de la temperatura y tiempo de tostado en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao clon ICS-95.

El análisis estadístico para los resultados de Teobromina (Anexo C), obtuvo un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9587$ que demuestra la buena aplicación del modelo experimental, un coeficiente de variación de 1,18 que nos indica la variabilidad de la toma de datos y el efecto de los factores en estudio y la media alcanzó 13,34 mg/g de contenido de teobromina.

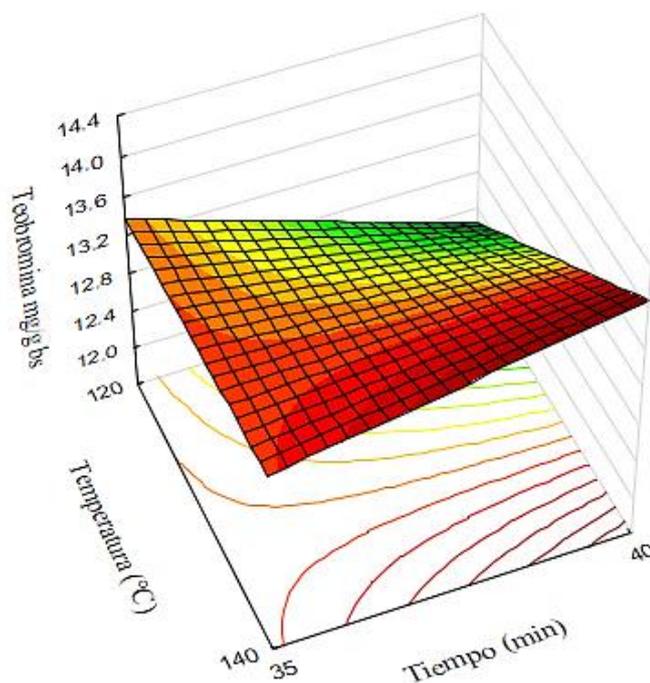


Figura 13. Interacción de la temperatura y tiempo de tostado en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao clon CCN-51.

El análisis de varianza (Anexo C), demostró que existe diferencia estadística ($p < 0,05$) influyendo en el contenido de teobromina el factor de Temperatura de tostado, la interacción de los factores temperatura/tiempo de tostado y la interacción de los factores de clon de cacao/tiempo de tostado. Mediante la agrupación de Tukey ($p < 0.05$) (Anexo B) se muestra que los tratamientos $T_1 = T_3 = T_5 = T_7$; $T_2 = T_6$ y $T_4 = T_8$ son iguales observando así que no hubo cambios bruscos en el contenido de teobromina, manteniendo un contenido uniforme independientemente de los factores de estudio.

La prueba de Tukey (Anexo D) aplicada al efecto de clones de cacao, establece que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el clon ICS-95 y CCN-51 con media de 13,39 y 13,29 Tb mg/g respectivamente, como se muestra en la figura 14.

La prueba de Tukey (Anexo E) aplicada al efecto de temperatura de tostado, establece que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la temperatura de 120 y 140°C, ya que

a la temperatura de tostado de 140°C existe un mayor contenido de teobromina en ambos clones con una media de 12,88 y 13,80 Tb mg/g respectivamente como se indica en la figura 15.

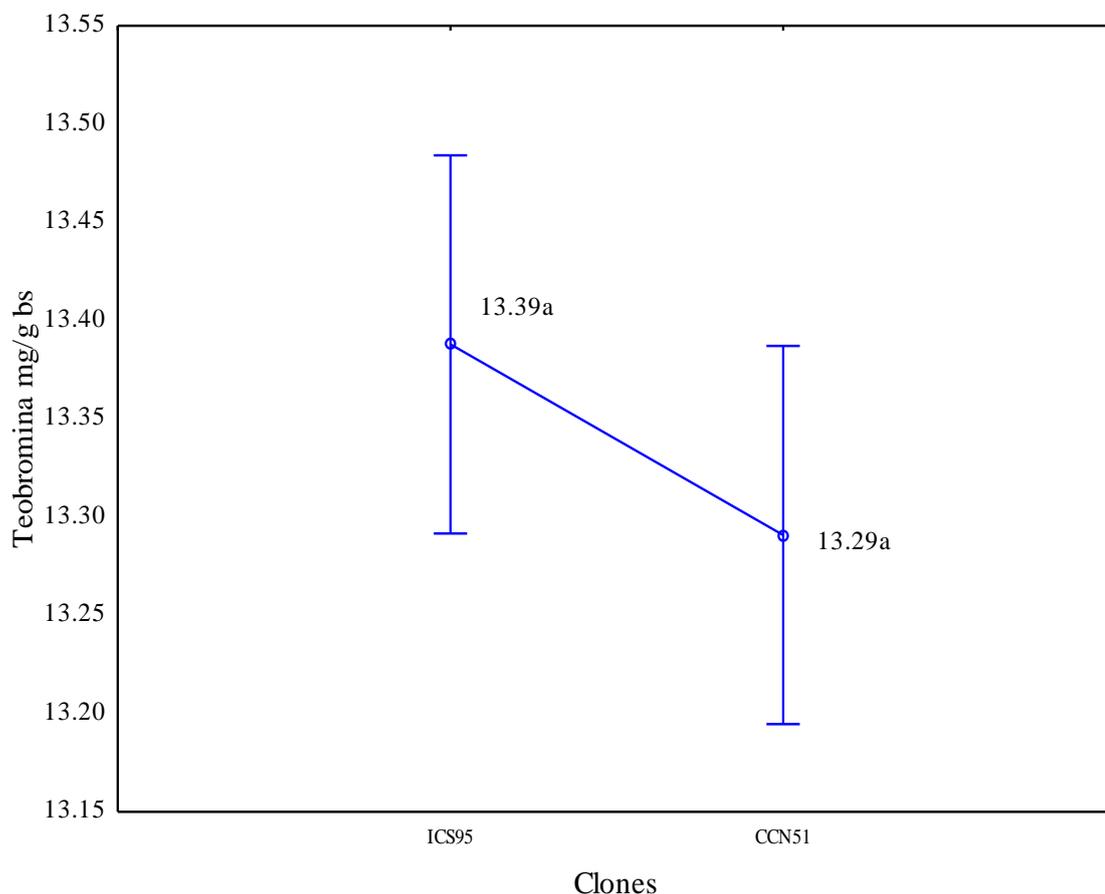


Figura 14. Interacción de los clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao.

Dicha concentración puede haber sido influenciada por la vaporización de agua, eliminación de esteres, ácido acético y volatilización de componentes orgánicos que concentran el contenido de teobromina en la muestra analizada. Pero a pesar de mostrar un alto contenido no existe una diferencia grande en concentración de teobromina con respecto a los demás tratamientos. Por lo que Gil (2012) menciona que, a pesar de que no hay cambios bruscos en la concentración de las metilxantinas durante las etapas de procesamiento, si se observa una disminución progresiva y consistente desde el inicio del secado al sol de los granos de cacao, hasta la obtención del licor en la planta de

producción de chocolates ya que aproximadamente un 5 y 15% adicional de pérdida, durante la industrialización.

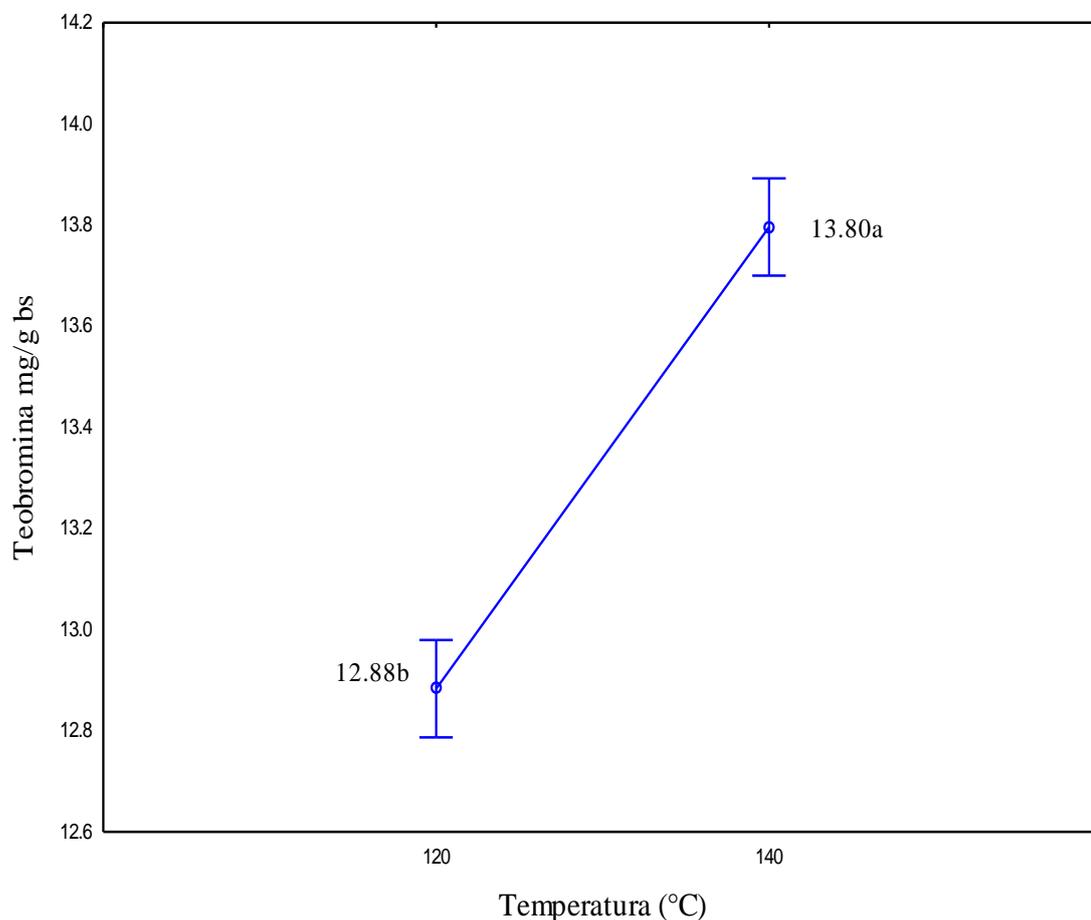


Figura 15. Interacción de la temperatura de tostado en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao.

La prueba de Tukey (Anexo F) aplicada al efecto de tiempo de tostado, establece que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el tiempo de 35 y 40 min, con una media de 13,41 y 13,27 Tb mg/g respectivamente como se indica en la figura 15, manteniéndose constante la concentración de teobromina. Pero en la etapa de procesamiento los clones ICS-95 y CCN-51 existe una disminución con respecto al grano fermentado seco pero que la concentración se mantiene uniforme durante el proceso de industrialización, Esta disminución de teobromina según Bonvehi y Ventura (2000) citado por Zapata *et al.* (2014) afirma que el contenido de metilxantinas (teobromina y cafeína) en los granos de cacao disminuye después del proceso de tostado ya que durante el tostado del cacao, hay un incremento en el contenido de algunas sustancias relacionadas con dicetopiperazinas

(DKPs o dipéptidos cíclicos), influenciando negativamente en la calidad sensorial del cacao. Estos compuestos interactúan con los alcaloides de purinas, disminuyendo el contenido de teobromina y cafeína. Durante el tostado, puede originarse un sabor metálico amargoso de las DKPs y pronunciarse cuando estas DKPs se combinan con alcaloides de la purina.

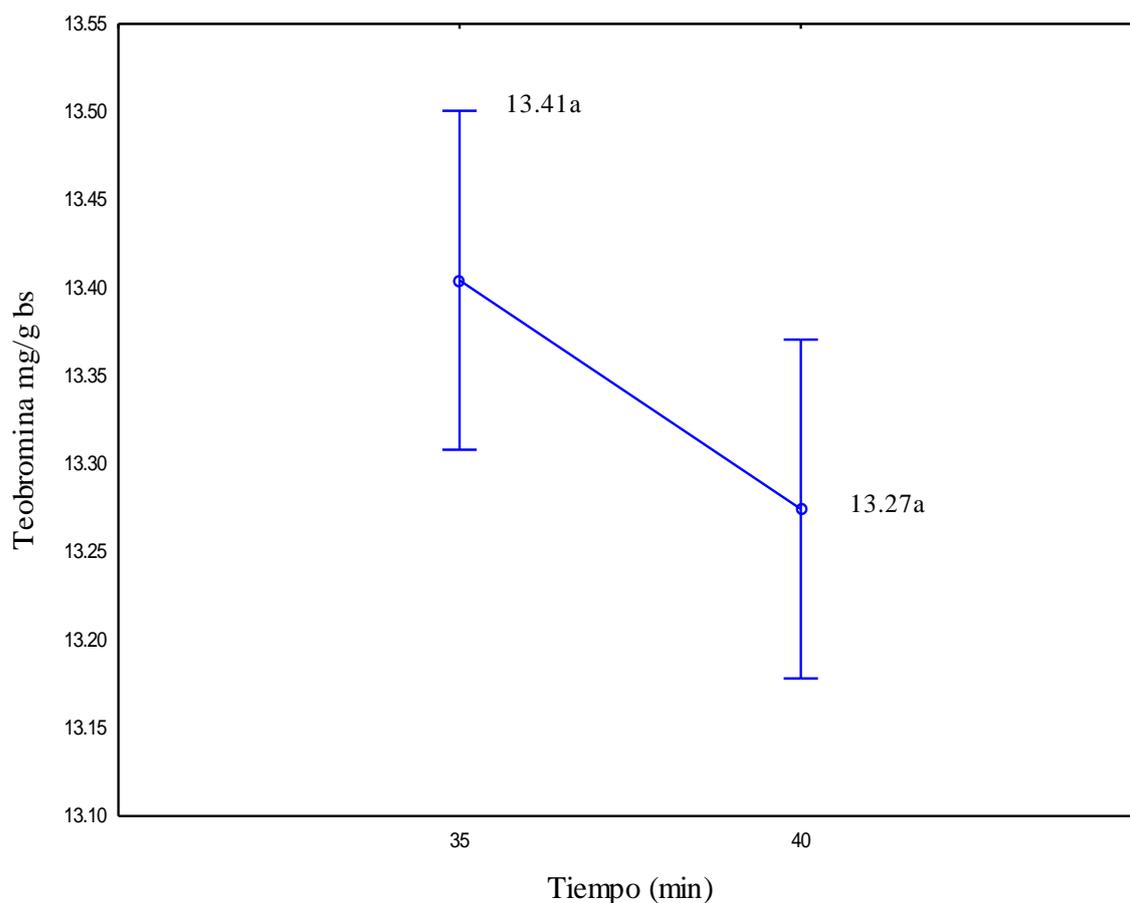


Figura 16. Interacción del tiempo de tostado en el contenido de teobromina (mg/g) en licor de cacao.

Además, Nazaruddin et al. (2006) quienes establecieron que el contenido de metilxantinas no se ve afectado en gran medida por la fermentación, secado o los procedimientos durante la industrialización, observándose un contenido más homogéneo durante estos procesos, a pesar de que existe una tendencia clara a su disminución. Estos autores sugieren que, debido a este comportamiento, las metilxantinas no juegan un papel importante dentro de los cambios fisiológicos que le ocurren a los granos de cacao durante la fermentación.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados se obtuvo las siguientes conclusiones:

- 1- Durante la poscosecha se controló los siguientes parámetros:
CCN-51: al final de la fermentación el pH fue 4,28; la acidez acética fue 1,66 % y la temperatura máxima fue 50.90 °C; Al final del secado la humedad fue 7,6 %.
ICS-95: al final de la fermentación el pH fue de 4,40; la acidez acética fue 1,41% y la temperatura máxima fue 50.90 °C. Al final del secado la humedad fue 7,80 %.
- 2- La composición químico proximal de los granos de cacao para los clones ICS-95 y CCN-51, expresada en base seca, fue:
Granos de cacao CCN-51: carbohidratos 42,23%; proteína 14,43%; grasa 39,59%; ceniza 3,75%; fibra cruda 11,38%.
Granos de cacao ICS-95: carbohidratos 45,18%; proteína 13,84%; grasa 36,35%; ceniza 4,62%; fibra cruda 12,77%.
- 3- Calidad física para ambos clones ICS-95 y CCN-51 presentaron un color marrón característico, una acidez típica y un aroma a chocolate después del corte del grano. El grado de fermentación fue de 67 % y 52 % para los clones CCN-51 y ICS-95 respectivamente.
- 4- El contenido de teobromina en licor de cacao de los clones ICS-95 y CCN-51 no presento cambios bruscos, manteniendo un contenido homogéneo independientemente de los factores (clon de cacao, temperatura y tiempo de tostado) por lo que no influye en el proceso de industrialización, pero destaca un mayor contenido de teobromina a 140°C x 40 min de $14,1900 \pm 0,057$ y $14,0700 \pm 0,313$ mg/g para el clon ICS-95 y CCN-51 respectivamente.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a las conclusiones del trabajo de investigación, se plantean las siguientes recomendaciones:

- 1- Realizar estudios del comportamiento de la Teobromina durante el pre y la industrialización de grano de cacao (grano fresco, grano fermentado, grano seco y licor)
- 2- Realizar la determinación de Teobromina a diferentes relaciones de tiempo y temperatura de tostado
- 3- Realizar la determinación de la capacidad antioxidante y polifenoles totales de los granos y licor de cacao
- 4- Realizar la determinación del contenido de catequinas y xantinas de los granos y licor de cacao
- 5- Realizar la determinación de la relación teobromina/cafeína para la selección de granos de cacao
- 6- Realizar la determinación de teobromina en otros clones de granos y licor de cacao de la región San Martín.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afoakwa, E. (2010). *Chocolate Science and Technology*, Singapore, Wiley Blackwell 275.27-33; 35-37; 64-66; 108-109
- Aldave, G. (2016). Efecto de la temperatura y tiempo de tostado en los caracteres sensoriales y en las propiedades químicas de granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) procedente de Uchiza, San Martín – Perú para la obtención de NIBS (tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Álvarez, C.; Pérez, E.; Lares, M. (2007). Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, Estado de Aragua. *Agronomía Tropical* 57 (4): 249-256.
- Amores, F., Jiménez, J., Peña, G. (2006). Influencia del tiempo de fermentación y el tostado sobre el desenvolvimiento de los compuestos aromáticos asociados al sabor a chocolate de las almendras de cacao de la variedad nacional. En 15va Conferencia Internacional de Investigaciones en Cacao (p. 7). San José, Costa Rica.
- Amores, F., Palacios, A., Jiménez, J. y Zhang, D. (2009). Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nor oriente de la provincia de Esmeralda. *Boletín Técnico* N°135. Quevedo, Ecuador.
- AOAC Official Methods of Analysis (1995). *Official Methods of analysis of the Association of Official Agriculture Chemistry*. 16ava Ed. Arlington, V.A, USA. 16 p.
- AOAC Official Methods of Analysis, charper. (2002) 31 p 1 – 17, 17ed
- Bardón, M. (2017). Selección de cacaos (*Theobroma cacao* L.) según índice de teobromina – cafeína, determinación de metilxantinas, catequinas en grano fresco, fermentado, seco, licor y análisis sensorial del licor (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú.
- Batista, L. (2009). *Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana*. Santo Domingo, República Dominicana. CEDAF, 250pp.
- Beaudoin, M., Graham, T. (2011). "Methylxanthines an h human health: epidemiological and experimental evidence." *Handbook of Experimental Pharmacology* 200: 509-548.

- Beckett, S. (2009). Industrial chocolate manufacture and use. Oxford, Blackwell Publishers.732.135-137; 137-139; 170-172; 276-278; 331-336; 623- 625; 625-628
- Beckett, S.T. (2008). The science of chocolate. York, U.K., The Royal Society of Chemistry.240.54-57; 59-68; 103; 133-144; 197-198
- Bonvehi, J. y Ventura, F. (2000). Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder. *European Food Research and Technology* 210(3): 189–195.
- Bravo, D. (2010). Evaluación fisicoquímica del comportamiento de Las almendras de cacao (*Theobroma Cacao* L.) de seis clones: Ics -1 (Imperial Collage Selection), Ics – 95 (Imperial Collage Selection), Uf – 613 (United Fruit), Imc – 67 (Iquitos Marañón Colección), Tsh – 565 (Trinidad Selection Hybrida), Ccn-51 (Colección Castro Naranjal) y el cacao criollo durante el proceso de fermentación y secado (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú.
- Brunetto, M, Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., Ramos, G. y Romero, C. (2007). "Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system." *Food Chemistry* 100(2): 459-467.
- Cardona, L. (2016). Influencia del proceso de fermentación sobre las características de calidad del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) (tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Clegg, B. (2014). Theobromine. Recuperado de <http://www.rsc.org/chemistryworld/podcast/CIIEcompounds/transcripts/theobromine.asp>
- Condori, D. (2015). Optimización del manejo pos cosecha del cacao proveniente de La Convención (Cusco) para el mejoramiento de su calidad organoléptica y del contenido de fotoquímicos beneficiosos para la salud. (Tesis de grado de Magíster en Química de la Biodiversidad). Universidad Cayetano Heredia. Lima.
- Cross, E. (1997). Torréfaction In: Cacao et Chocolat - Production et caractéristiques. Lavoisier (Paris), á paraitre. Memorias del I Congreso del Cacao y su Industria, Maracay, Estado Aragua.

- Cross, E. (2004). Factores que afectan el desarrollo del sabor a cacao, bases bioquímicas del perfil aromático, Taller Internacional de Calidad Integral de Cacao. Quevedo, Ecuador. 20 p.
- Doestert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. y Weigend, M. (2012). Hoja botánica: Cacao (*Theobroma cacao* L.). Cooperación Alemana al Desarrollo – Agencia de la Giz, en el Perú. Lima. 159.
- Enríquez, G. (1985). Curso sobre el cultivo del cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Calidad del Cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 22:394-406.
- Enríquez, G. (2004). Cacao Orgánico. Guía para productores ecuatorianos. Botánica del cacao. Grupos genéticos. Instituto nacional de investigaciones agropecuarias iniap. Manual n° 54. Quito - Ecuador. P 39 -294.
- García, A. (2000). Caracterización microbiana, bioquímica y cinética del proceso de fermentación tradicional durante el beneficio de cacao (Tesis de grado de Magíster en Ciencias e Ingeniería Química). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D. F.
- García, P; Urrieta, J; Morales, R; García, M. (2002). Perfiles de concentración interna de acidez y temperatura a través de la fermentación de cacao. Memorias in extensor del III Encuentro Internacional de Biotecnología UPIBI2002. Querétaro, Qro 107-116.
- Gil, Q. (2012). Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. (tesis de postgrado). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 119p.
- González, K. y Ruíz, J. (2009). Valoración Económica y Financiera de la Sustitución de Cultivos de Cacao Nacional por un Tipo de Clon de Cacao denominado CCN-51. Caso Finca San Miguel. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- González, M., Perez, S. y Palomino, C. (2012). Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. Actualización en nutrición, Venezuela. 13(4):314-331.
- Hernández, A. (2010). Tecnología de cacao. Universidad Nacional Agraria y a Distancia. 170 p.

- Instituto Nacional de investigaciones Agropecuarias. (INIAP). (2003). Prácticas del beneficio del cacao y su calidad organoléptica. Estación Experimental Tropical Pichilingue. Quevedo, Ecuador. 16 p.
- Jahurul, M., Zaidul, M., Norulaini, N., Sahena, F., Jinap, S., Azmir, J., Sharif, K. y Mohd, A. (2012). Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. *Journal of Food Engineering* 117: 467-476.
- Lares, M., Gutiérrez, E. y Álvarez, C. (2012). Efecto del tostado sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas, composición proximal y perfil de ácidos grasos de la manteca de granos de cacao del estado de Miranda, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola* 12 (2) 439-446.
- Lo Coco, F., Lanuzza, F., Micali, G., Cappellano, G. (2007). Determination of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in by-Products of Cupuacu and Cacao Seeds by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 45,
- Loayza, W. (2014). Influencia de la frecuencia de remoción, durante la fermentación, en la calidad sensorial del cacao (*Theobroma cacao*, L.) de Satipo (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Markham, K. y Bloor, S. (1998). Analysis and identification of Flavonoids in practice. In C. A. Rice-Evans, & L. Packer, *Flavonoids in health and disease*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.
- Ministerio de Agricultura y Riego (Minagri). (2016). Estudio del cacao en el Perú y el mundo un análisis de la producción y el comercio. Lima, Perú.
- Ministerio de Agricultura y Riego (Minagri). (2012). Catálogo de cultivares de cacao del Perú. Lima, Perú. Editorial Q&P Impresores S.R.L. Recuperado de http://repositorio.minagri.gob.pe/bitstream/handle/MINAGRI/508/cultivares_cacao_3edicion.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Mladenovic, K., Root, Y. y Ramanathan, D. (2018). UHPLC-HRMS Analysis of Theobromine in *Theobroma cacao* and its Products. *J Nutr Food Sci* 8: 737. doi: 10.4172/2155-9600.1000737.

- Nazaruddin, R. N., Mohd A., Said, M., y Cheng, H., (2001). HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Levels in Cocoa and Chocolate Products. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 7(2), 377-386.
- Nazaruddin, R., Seng, L., Hassan O. y Dijo, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*, L.) during fermentation. *Ind Crop Prod* 24: p. 87–94.
- Nienenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Omokolo, D. y Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) Clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J. Of foodcomposition and analysis*. Hamburg, Germany. 19:612-619.
- NTP 208.012, (2007). Norma Técnica Peruana. Cacao y chocolate, cacao en pasta (licor de cacao/chocolate) y torta de cacao. Lima, Perú.
- NTP. 208.040, (2008). Norma Técnica Peruana. Buenas prácticas para la cosecha y beneficio. Lima, Perú.
- NTP-ISO 1114, (2006). Norma Técnica Peruana. Granos de cacao. Prueba de corte. Lima, Perú
- NTP-ISO 2291, (2006). Norma Técnica Peruana. Granos de cacao. Determinación del contenido de humedad. Lima, Perú
- NTP-ISO 2451, (2006). Norma Técnica Peruana. Granos de cacao. Especificaciones. Lima, Perú
- Paoletti, R., Poli, A., Conti, A. y Visioli, F. (2012). *Chocolate and Health*. Italy, Springer.153.1-13; 23-26; 42-60; 128
- Portillo E., Graziani de Farinas, L., Betancourt, E. (2007). Análisis Químico del Cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. Venezuela.
- Portillo, E., Labarca, M., Grazziani, L., Cross, E., Assemats, S., Davrieux, F. y Boulager, R. (2011). Influencia de las condiciones del tratamiento poscosecha sobre la temperatura y acidez en granos de cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*. Zulia, Venezuela.

- Portillo, E., Portillo, A., Grazziani, I., Cros, E., S. Assemat, S., Davrieux, F. y Boulanger, R. (2014). Efecto del tratamiento poscosecha sobre el contenido de teobromina y cafeína en Cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.). Revista de la Facultad de Agronomía. Zulia, Venezuela.
- Quispe, L. (2013). Teobromina, cafeína y catequinas, en granos de cacao de Pucacaca y Huingoyacu e influencia del cacao ccn-51 y del beneficio (tesis de pregrado). Universidad Agraria de la Selva, Tingo Maria, Perú.
- Ramli, N.; Hassan, O.; Said, M.; Samsudin, W.; Idris, N.A. (2006). Influencia de las condiciones de tostado en el sabor volátil de tostar los granos de cacao de Malasia. Diario de procesamiento y conservación de alimentos, 30, 280-298.
- Sanchez, J. (2015). Extracción y cuantificación de teobromina existente en las semillas de cuatro variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) producidas en la provincia de el oro, 2014(Tesis de grado). Universidad técnica de Machala. Machala, Ecuador.
- Sivasankar, B. (2004). Food processing and preservation. New Delhi, India, Prentice-Hall. pp. 320 – 322.
- Sobreiro, A. (2013). Validação da Determinação de Teobromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (tesis de maestría). Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Thermo Scientific (2015). Teoría de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Lima – Perú.
- Thompson, S., Miller, K. y Lopez, A. (2001). Cocoa & Coffee Food Microbiology: Fundamentals and Frontier, Second Edition, ASM, Washington, D.C. – USA, Pág 724-728.
- Torres, P. (2016). Manual de proceso de la calidad de cacao fino de aroma. Editado C.A.C Pangoa Ltda. Lima, Perú.
- Vera, J., Vallejo, C., Párraga, D., Morales, W., Macias, J. y Ramos, R. (2014). Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador. Ecuador, Quevedo.
- Wakao, H. (2002). Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional durante el proceso de beneficio, (Tesis de

Licenciatura en Ciencias Químicas, especialidad Química Analítica). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito-Ecuador.

Watson, R., Preedy, V. y Zibadi, S. (2013). *Chocolate in Health and Nutrition*, Springer.542.12-16; 20-23;40-45; 290-292.

Weston, A. y Brown, P. (1997). *HPLC and CE Principles and practice*. London, Academic Press.295.2-12; 24-56; 71-100.

Zapata, S., Tamayo, A. y Rojano, B. (2014). Efecto del Tostado Sobre los Metabolitos Secundarios y la Actividad Antioxidante de Clones de Cacao Colombiano. *Revista Fac.Nal.Agr. Medellín. Colombia*.

ANEXOS

Anexo A. Resultados de contenido de teobromina

Tratamiento	Clon	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Humedad (%)	Teobromina (mg/g) *	Teobromina (mg/g) **
T1r1	ICS-95	120	35	2.34	13.08	13.39
T1r2	ICS-95	120	35	2.34	12.96	13.27
T1r3	ICS-95	120	35	2.34	13.03	13.34
T2r1	ICS-95	120	40	2.31	12.40	12.69
T2r2	ICS-95	120	40	2.31	12.21	12.5
T2r3	ICS-95	120	40	2.31	12.29	12.58
T3r1	ICS-95	140	35	2.14	13.44	13.73
T3r2	ICS-95	140	35	2.14	12.86	13.14
T3r3	ICS-95	140	35	2.14	13.15	13.44
T4r1	ICS-95	140	40	2.12	13.85	14.15
T4r2	ICS-95	140	40	2.12	13.93	14.23
T4r3	ICS-95	140	40	2.12	13.89	14.19
T5r1	CCN-51	120	35	2.35	13.09	13.4
T5r2	CCN-51	120	35	2.35	13.01	13.32
T5r3	CCN-51	120	35	2.35	13.07	13.38
T6r1	CCN-51	120	40	2.34	12.00	12.29
T6r2	CCN-51	120	40	2.34	11.90	12.19
T6r3	CCN-51	120	40	2.34	11.96	12.25
T7r1	CCN-51	140	35	2.16	12.99	13.28
T7r2	CCN-51	140	35	2.16	13.39	13.69
T7r3	CCN-51	140	35	2.16	13.20	13.49
T8r1	CCN-51	140	40	2.14	13.96	14.27
T8r2	CCN-51	140	40	2.14	13.53	13.83
T8r3	CCN-51	140	40	2.14	13.81	14.11

*Valores de teobromina (mg/g) en base húmeda

** Valores de teobromina (mg/g) en base seca

Anexo B. Agrupamiento de Tukey ($p < 0.05$) de los valores medios de los tratamientos

Clon de cacao	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Tratamientos	Agrupamiento de Tukey	Media	N
ICS-95	120	35	T ₁	b	13,3333	3
ICS-95	120	40	T ₂	c	12,5900	3
ICS-95	140	35	T ₃	b	13,4367	3
ICS-95	140	40	T ₄	a	14.1900	3
CCN-51	120	35	T ₅	b	13.3667	3
CCN-51	120	40	T ₆	c	12,2433	3
CCN-51	140	35	T ₇	b	13,4867	3
CCN51	140	40	T ₈	a	14,0700	3

Anexo C. ANOVA de los datos experimentales correspondientes a la concentración de teobromina.

Factores	Grado de libertad (df)	Suma de cuadrados (SS)	Cuadrado medio (MS)	F-Valor	P valor
A: Clon de cacao	1	0.0551	0.0551	2.23	0.1544
B: Temperatura de tostado	1	4.9959	4.9959	202.26	<.0001
C: Tiempo de tostado	1	0.1053	0.1053	4.26	0.0553
AxB	1	0.0222	0.0222	0.90	0.3568
AxC	1	0.1134	0.1134	4.59	0.0477
BxC	1	3.8480	3.8480	155.79	<.0001
AxBxC	1	0.0165	0.0165	0.67	0.4249
Error	16	0.3945	0.0247		
Total corregido	23	9.5509			

R²=0.9587

CV=1.1772

Media=13.3396

Anexo D. Prueba de Tukey de teobromina por efecto de clon de cacao

Clon de cacao	Media	Casos	Agrupamiento de Tukey
ISC-95	13.38750	12	A
CCN-51	13.29167	12	a

Anexo E. Prueba de Tukey de teobromina por efecto de temperatura de tostado

Temperatura de tostado	Media	Casos	Agrupamiento de Tukey
140 °C	13.79583	12	a
120°C	12.88333	12	b

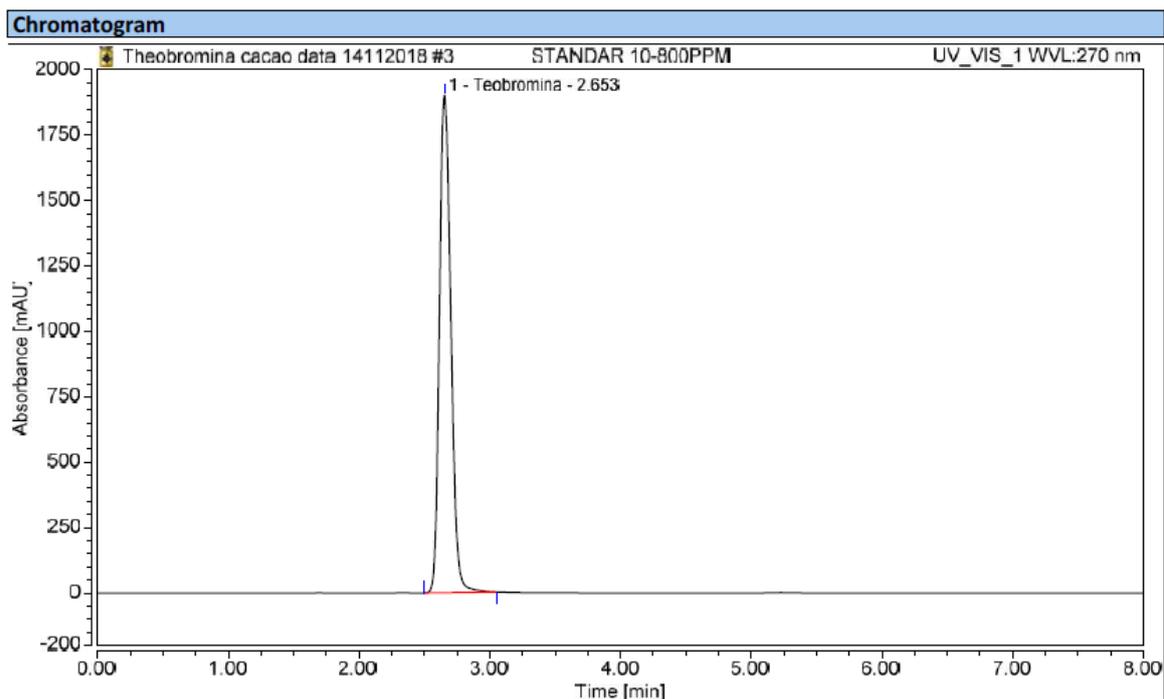
Anexo F. Prueba de Tukey de teobromina por efecto de tiempo de tostado

Tiempo de tostado	Media	Casos	Agrupamiento de Tukey
35 min	13.40583	12	a
40 min	13.27333	12	a

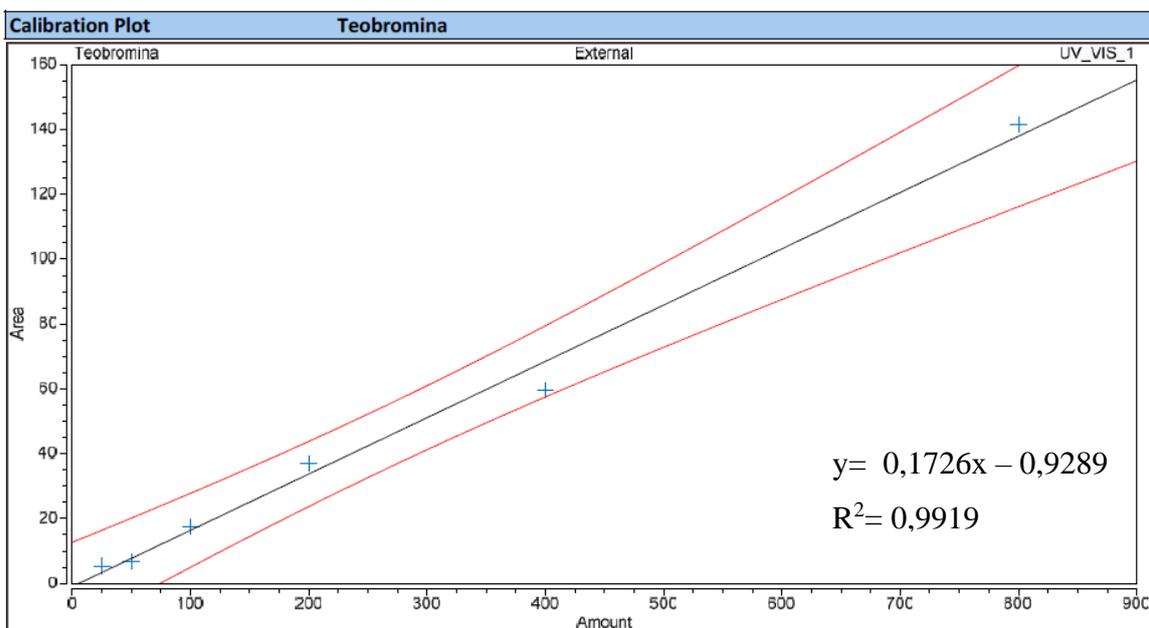
Anexo G. Datos para obtener la curva patrón de teobromina

Concentración (ppm)	Área mAU*min	Tiempo de retención (min)	Contenido de teobromina de UHPLC (ppm)
800	141,366	2,537	819,951
400	59,609	2,54	349,043
200	37,060	2,527	218,976
100	17,550	2,54	106,483
50	6,637	2,54	43,595
25	5,473	2,517	36,952

Anexo H. Perfil cromatográfico del estándar de teobromina



Anexo I. Linealidad y curva de calibración de teobromina



Anexo J. Requisitos de grano de cacao Norma Técnica Peruana NTP - ISO 2451

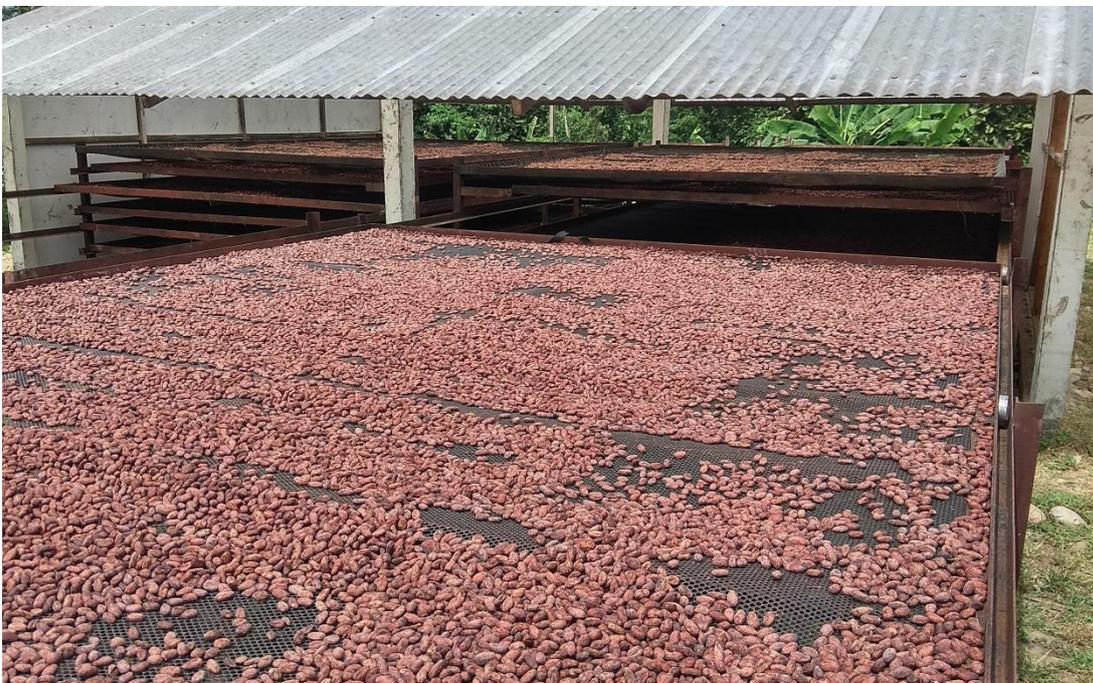
Requisitos generales

- Color uniforme: de pardo claro a marrón oscuro
- Olor: libre de olores extraños como ahumado, mohoso, podrido o sobre fermentado
- Sabor: agradable dado por la acidez, el amargor y el sabor a chocolate
- Tamaño: uniforme
- Adulteración: los lotes de granos de cacao deben estar libres de cualquier evidencia de adulteración
- Cuerpos extraños: los lotes de cacao deben estar prácticamente libres de cualquier materia extraña

Anexo K. Cosecha y drenado de grano de cacao ISC-95 y CCN-51 en la Cooperativa Agraria ALLIMA CACAO Ltda.



Anexo M. Fermentación y secado de grano de cacao ISC-95 y CCN-51 en la Cooperativa Agraria ALLIMA CACAO Ltda.



Anexo N. Prueba de corte realizada en el Laboratorio de Investigación de la facultad de Ingeniería Agroindustrial



Anexo O. Muestras de licor de cacao del clon ICS-95 y CCN-51 en viales de 2 mL. Para su inyección en el UHPLC.

