



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Unidad Integración Curricular
previo a la obtención del título de
Ingeniera en Alimentos.

Título de la Unidad de integración Curricular:

“ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE HOJAS DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.) (NACIONAL, FORASTERO, TRINITARIO) EN DOS ESTADOS
FISIOLÓGICOS FOLIARES”

Autora:

Veintimilla Ruiz Karol Stefani

Tutora de la Unidad Integración Curricular:

Ing. Cynthia Erazo M.Sc.

Mocache – Los Ríos – Ecuador

2020



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, VEINTIMILLA RUIZ KAROL STEFANI, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

f.

Veintimilla Ruiz Karol Stefani.

C.I: 094136502-5



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

La suscrita, Ing. Cyntia Erazo M. Sc. Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante Veintimilla Ruiz Karol Stefani **“ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE HOJAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) (NACIONAL, FORASTERO, TRINITARIO) EN DOS ESTADOS FISIOLÓGICOS FOLIARES”**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

f.

Ing. Cyntia Yadira Erazo Solórzano M.Sc.

DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INTEGRACION CURRICULAR



CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, “ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE HOJAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) (NACIONAL, FORASTERO, TRINITARIO) EN DOS ESTADOS FISIOLÓGICOS FOLIARES”, el suscrito Ing. Cynthia Erazo M.Sc., en calidad de Director del Proyecto de Investigación, realizado por el Srta. Estudiante de la Carrera de Ingeniería en Alimentos Veintimilla Ruiz Karol Stefani, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el **Sistema URKUND** es de 9% el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.

URKUND

Document Information

Analyzed document	VEINTIMILLA RUIZ KAROL tesis.docx (D78174146)
Submitted	8/26/2020 3:27:00 AM
Submitted by	Gabriela Galeas
Submitter email	ggaleas@uteq.edu.ec
Similarity	9 %
Analysis address	ggaleas.uteq@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO / VEINTIMILLA RUIZ KAROL tesis.docx Document VEINTIMILLA RUIZ KAROL tesis.docx (D78168997) Submitted by: karol.veintimilla2013@uteq.edu.ec Receiver: mgonzalez.uteq@analysis.arkund.com	 1
-----------	---	---

f.

Ing. Cynthia Yadira Erazo Solórzano M.Sc.

DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INTEGRACION CURRICULAR



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Título:

**“ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE HOJAS DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.) (NACIONAL, FORASTERO, TRINITARIO) EN DOS
ESTADOS FISIOLÓGICOS FOLIARES”**

**Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título
de Ingeniera en Alimentos.**

Aprobado por

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Mocache – Los Ríos –Ecuador

2020

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y a toda mi familia por estar siempre presentes.

Mi profundo agradecimiento a mis amigos que me ayudaron de una manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

De igual manera mis agradecimientos a la Universidad Técnica estatal de Quevedo, a toda la Facultad de Ciencias Pecuaria, a mis profesores quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a cada una de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a la Ing. Cyntia Erazo, principal colaboradora durante todo este proceso, quien, con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional a toda la naturaleza y el universo por llenarme de mucha energía.

A mi madre, por ser el pilar importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones.

A mi hija que me dio fortaleza para seguir con mis estudios y mi esposo quien me apoyo y alentó para continuar, cuando parecía que me iba a rendir.

Karol Veintimilla

RESUMEN EJECUTIVO

Theobroma cacao L., se considera un árbol nativo del trópico americano, sus hojas son simples alargadas, enteras y de color verde. Sus colores van desde el café claro, morado al rojizo y verde pálido. Los compuestos bioactivos normalmente están en cantidades muy pequeñas en los alimentos que consumimos como parte de nuestra dieta regular y en casi todos los casos provienen de fuentes de alimentos vegetales. El presente trabajo investigativo tuvo como objetivo estudiar los compuestos bioactivos de las hojas de tres variedades de cacao en dos estados foliares, analizando sus propiedades físicas y químicas así como el contenido de carotenoides y polifenoles. Para esto se utilizó un DCA con arreglo factorial AxB, donde el factor A fueron las variedades de cacao: Nacional Forastero y Trinitario, y el factor B fue los estados foliares: Joven y Adulto. Los análisis realizados fueron el contenido de humedad, cenizas totales y grasas; también el contenido de carotenoides y polifenoles. Los resultados indicaron que en las variables de humedad, cenizas totales y grasa existieron diferencias significativas a nivel de factores al igual que en la interacción AxB. El T5 fue el que obtuvo los valores más altos de humedad con 82.36%; y cenizas totales con 1.40%; mientras que el T2 presentó 5.59% de grasa. Finalmente se pudo conocer el contenido de carotenoides en estado adulto de las hojas de cacao y el contenido de polifenoles.

Palabras claves: cacao, hojas de cacao, compuestos bioactivos, carotenoides, polifenoles

ABSTRACT

Theobroma cacao L., is considered a native tree of the American tropics, its leaves are simple elongated, whole and green in color. Its colors range from light brown, purple to reddish, and pale green. Bioactive compounds are normally in very small amounts in the foods we consume as part of our regular diet and in almost all cases they come from plant food sources. The objective of this research work was to study the bioactive compounds in the leaves of three varieties of cocoa in two leaf states, analyzing their physical and chemical properties, as well as the content of carotenoids and polyphenols. For this, a DCA with AxB factorial arrangement was used, where factor A was the cocoa varieties: Nacional Forastero and Trinitario, and factor B was the foliar states: Joven and Adulto. The analyzes carried out were the content of humidity, ash and total fat; Also the content of carotenoids and polyphenols. The results indicated that in the humidity, ash and total fat variables there were significant differences at factor level, as well as in the AxB interaction. T5 was the one that obtained the highest humidity values with 82.36%; and total ashes with 1.40%; while T2 had 5.59% fat. Finally, it was possible to know the content of carotenoids in the adult state of cocoa leaves and the content of polyphenols.

Keywords: *cocoa, cocoa leaves, bioactive compounds, carotenoids, polyphenols*

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE HOJAS DE CACAO (<i>Theobroma cacao L.</i>) (NACIONAL, FORASTERO, TRINITARIO) EN DOS ESTADOS FISIOLÓGICOS FOLIARES”
Autora:	
Palabras clave:	cacao, hojas de cacao, compuestos bioactivos, carotenoides, polifenoles
Editorial:	Quevedo. UTEQ, 2020
Resumen:	<p><i>Theobroma cacao L.</i>, se considera un árbol nativo del trópico americano, sus hojas son simples alargadas, enteras y de color verde. Sus colores van desde el café claro, morado al rojizo y verde pálido. Los compuestos bioactivos normalmente están en cantidades muy pequeñas en los alimentos que consumimos como parte de nuestra dieta regular y en casi todos los casos provienen de fuentes de alimentos vegetales. El presente trabajo investigativo tuvo como objetivo estudiar los compuestos bioactivos de las hojas de tres variedades de cacao en dos estados foliares, analizando sus propiedades físicas y químicas así como el contenido de carotenoides y polifenoles. Para esto se utilizó un DCA con arreglo factorial AxB, donde el factor A fueron las variedades de cacao: Nacional Forastero y Trinitario, y el factor B fue los estados foliares: Joven y Adulto. Los análisis realizados fueron el contenido de humedad, cenizas totales y grasas; también el contenido de carotenoides y polifenoles. Los resultados indicaron que en las variables de humedad, cenizas totales y grasa existieron diferencias significativas a nivel de factores al igual que en la interacción AxB. El T5 fue el que obtuvo los valores más altos de humedad con 82.36%; y cenizas totales con 1.40%; mientras que el T2 presentó 5.59% de grasa. Finalmente se pudo conocer el contenido de carotenoides en estado adulto de las hojas de cacao y el contenido de polifenoles.</p>
Descripción:	hojas A4, 21x29.7 cm +CD-ROM.
URL:	(En blanco hasta cuando se disponga los repositorios).

INDICE

PORTADA.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	iii
CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN EJECUTIVO	viii
ABSTRACT	ix
CÓDIGO DUBLÍN	x
CAPITULO I: CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
Diagnóstico.....	1
Pronóstico.....	2
1.1.2. Formulación del problema.....	2
1.1.3. Sistematización del problema.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo General.....	3
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Justificación.....	3
CAPITULO II.....	5
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	5
2.1. Marco conceptual.....	6
2.2. Marco referencial.....	7
2.2.1. Descripción del cacao.....	7
2.2.2. Taxonomía.....	8
2.2.4. Variedades de cacao.....	8
2.2.3. Prácticas Culturales.....	9
2.2.3.1. Preparación del suelo.....	9
2.2.3.2. Eliminación de malas hiervas.....	9

2.2.3.3.	Poda.....	10
2.2.4.	Aspectos fisiológicos.....	10
2.2.5.	Usos.....	11
2.2.5.1.	Usos medicinales.....	11
2.2.6.	Cultivo y producción en el Ecuador.....	12
2.2.7.	Compuestos Fenólicos: Fenoles y Flavonoides.....	12
2.2.8.	Propiedades medicinales atribuidas al Cacao.....	13
2.2.9.	Compuestos bioactivos.....	13
2.2.11.	Potencial agroindustrial de compuestos bioactivos.....	15
CAPITULO III.....		16
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION.....		16
3.1.	Localización.....	17
3.2.	Tipos de investigación.....	17
3.2.1.	Investigación exploratoria.....	17
3.2.2.	Investigación descriptiva.....	17
3.3.	Método de investigación.....	17
3.3.1.	Método inductivo.....	17
3.3.2.	Método estadístico.....	18
3.3.3.	Método analítico.....	18
3.4.	Fuentes de recopilación de información.....	18
3.4.1.	Fuentes primarias.....	18
3.4.2.	Fuentes secundarias.....	18
3.5.	Diseño de la investigación.....	18
3.5.1.	Andeva del experimento.....	19
3.5.2.	Factores de los tratamientos.....	19
3.5.3.	Tratamiento de los datos.....	20
3.5.4.	Esquema del experimento.....	20
3.5.5.	Modelo matemático.....	21
3.6.	Instrumentos de investigación.....	21
3.6.1.	Análisis físico – químico.....	21
3.7.	Recursos humanos y materiales.....	28
3.7.1.	Recursos humanos.....	28
3.7.2.	Recursos materiales.....	28
CAPÍTULO IV.....		30
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....		30
4.1.	Análisis físico-químicos.....	31
4.1.1.	Variable humedad.....	32
4.1.2.	Variable cenizas totales.....	33
4.1.3.	Variable contenido de grasa.....	34

4.2. Contenido de carotenoides.....	35
4.3. Contenido de polifenoles.	36
CAPÍTULO V	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
5.1. Conclusiones.....	38
5.2. Recomendaciones.	38
CAPÍTULO VI.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	39
6.1. Referencias citadas.	40
CAPÍTULO VII.....	42
ANEXOS.....	42
7.1. Anexos.	43

Índice de ilustraciones

Tabla	Página
Ilustración 1. Cacao forastero	¡Error! Marcador no definido.
Ilustración 2. Valores promedios de humedad, respecto al factor A (Variedad de cacao) y factor B (Estados foliares) en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares	32
Ilustración 3. Valores promedios de cenizas totales, respecto al factor A (Variedad de cacao) y factor B (Estados foliares) en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares	33
Ilustración 4. Valores promedios de cenizas totales, respecto al factor A (Variedad de cacao) y factor B (Estados foliares) en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares	34
Ilustración 5. Contenido de carotenoides en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares	35
Ilustración 6. Polifenoles presentes en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares	36

INTRODUCCIÓN

El cacao es una fruta tropical, sus cultivos se encuentran principalmente en el litoral y en la Amazonía. Es un árbol con pequeñas flores que se observan en las ramas y producen una mazorca que contiene granos cubiertos con una pulpa rica en azúcar. La producción de cacao se concentra principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos. En el país se cultivan dos tipos de cacao: CCN-51 Cocoa y el llamado National Cocoa. Es un cacao de aroma fino conocido como 'Arriba', de la época colonial. Ecuador es el país con mayor participación en este segmento del mercado mundial con un 63% según las estadísticas de Pro Ecuador (1).

El creciente interés en los últimos años por el consumo de alimentos que además de nutrir tengan un impacto favorable en la salud, ha incentivado el estudio de componentes naturales como los polifenoles presentes en plantas y frutos, los cuales han recibido especial atención debido a sus propiedades funcionales como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antitrombóticos, antimutagénicos, antibacteriales y analgésicos (2).

Los usos medicinales de la hoja de cacao no han sido tan estudiadas como las almendras. Sin embargo, hay informes sobre su capacidad antioxidante, antimicrobiano, propiedades anticancerígenas. y sus radicales libres eliminan capacidad de envejecimiento (3). Los bioactivos son antioxidantes previenen daño a moléculas biológicas por parte de los radicales libres. Una ingesta adecuada de legumbres, frutas, café, hierbas medicinales y verduras aseguraría los requerimientos necesarios para evitar el estrés oxidativo. Una dieta acorde a los requerimientos diarios debería determinarse de forma individual según las necesidades propias de cada individuo (4).

Numerosos investigadores han demostrado que los alimentos fotoquímicos con potencial antioxidante han tenido fuertes efectos protectores contra los principales riesgos de enfermedades, incluyendo el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Además el aprovechamiento de extractos naturales que poseen capacidades antioxidantes ayudan a reducir la corriente dependencia a antioxidantes sintéticos en aplicaciones alimentarias, también ayudan a fomentar la biodiversidad y al explotación controlada de los recursos. Especialmente en el aprovechamiento de recursos vegetales valiosos como son las hojas de cacao que normalmente se desperdician en las podas frecuentes(5).

El sector de plantas medicinales, aromáticas y derivados en el Ecuador viene presentando un crecimiento sostenido con muchas posibilidades de desarrollar productos para la exportación, siendo sus principales mercados el alimenticio, el farmacéutico y el cosmético. La producción de hierbas aromáticas y medicinales, se encuentra presente en diversas regiones del territorio nacional, esta dispersión hace que cada especie cuente con las características propias de la zona en la que es cultivada, motivado ello por las condiciones edáficas, climáticas y culturales propias de cada región (6).

Por lo expuesto, la presente investigación tuvo como objetivo, determinar los compuestos bioactivos de las hojas de variedades de cacao (Nacional, Forastero, Trinitario) en dos estados fisiológicos foliares; para alcanzar este objetivo se estudiaran las características fisicoquímicas el contenido de caratenoides y contenido de polifenoles. Este estudio nos permitirá demostrar el aprovechamiento sostenible del recurso vegetal de las hojas de cacao normalmente se desperdician en las podas frecuentes.

CAPITULO I: CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

La mayor producción de hojas de cacao se encuentra en época de verano ya que la humedad ayuda al crecimiento de la planta generando mayor materia verde, el cacao que da mayor emisión en las hojas verde es la variedad de cacao nacional, las hojas verdes son emitida en las podas que se realizan en la labranza de mantenimiento.

La causa del problema de la siguiente investigación es la falta de información y poco conocimiento de los beneficios o antioxidante que poseen las hojas de cacao, buscando una alternativa de industrialización para el agro sin afectar las plantaciones.

Diagnóstico.

Las plantaciones generan una cantidad considerables de hojas que caen al suelo y son utilizadas como abono desconociéndose los beneficios nutricionales que puedan contener. Los compuestos bioactivos o fitoquímicos, constituyentes de alimentos de origen vegetal, son considerados en la actualidad como uno de los puntos de anclaje en la reducción de ciertas patologías generadoras de importantes problemas de salud y elevados costes económicos, tal como afirman Herrera et al. (2). El estudio de la presencia de fibra dietaria es importante porque produce Ácidos grasos de cadena corta, modifica el pH colónico, mantiene la microflora, estimula la producción de hormonas gastrointestinales, mejora las defensas de la barrera intestinal y controla la traslocación bacteriana.

Pronóstico.

De esta investigación se pretende conocer los compuestos bioactivos de las hojas de cacao y la afectación de los estados foliares en estos componentes.

1.1.2. Formulación del problema.

¿Las hojas de cacao forastero, trinitario y nacional tendrán en su composición compuestos bioactivos?

1.1.3. Sistematización del problema.

¿Qué variedad de cacao presentara mejores características fisicoquímicas?

¿En qué manera influirán los estados fisiológicos foliares en el contenido de carotenoides?

¿En qué manera influirán los estados fisiológicos foliares en el contenido de polifenoles?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo General.

Determinar los compuestos bioactivos de hojas cacao variedades (*Theobroma cacao* L.) (Nacional, forastero y trinitario) en dos estados fisiológicos foliares.

1.2.2. Objetivos específicos.

- Analizar las características físico-químicos de las hojas de tres variedades de cacao en dos estados foliares.
- Determinar el contenido de carotenoides en las hojas de cacao adulto comparando las tres variedades.
- Evaluar el comportamiento del contenido de polifenoles por variedad y estado de madurez.

1.3. Justificación.

Uno de los principales problemas que tiene la población y los agricultores es la falta de información o poco conocimiento de los beneficios que poseen las hojas de cacao. En el Ecuador no se da el uso a los desechos de las plantaciones de cacao si los desechos fueran considerados como recursos, se dejaría escapar recursos económicos, además se reducirían los efectos contaminantes (7). Ancestralmente las hojas de cacao se utilizaban como remedios naturales para dolores musculares o estomacales, sin conocer los beneficios que poseen dichas hojas. Según datos de la FAO actualmente no se exporta ningún tipo de infusión de hojas de cacao a pesar de que el mercado del té tiene una amplia acogida por mercados internacionales como Japón (8). Con esta investigación se pretende conocer los bioactivos de las hojas o valor nutricional, ya que las hojas de cacao no son aprovechadas en la industria

alimentaria. Esta investigación se la realizo con la finalidad de maximizar el uso de los recursos vegetales como son las hojas de cacao que son desechadas en la podas frecuentes y que la acumulación de estas causan contaminación biológica por microorganismos e insectos haciendo susceptible a la plantación. Este estudio busca generar nuevas alternativas de industrialización.

CAPITULO II.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

Hojas de cacao.

Las hojas de cacao son grandes, coriáceas o cartáceas, alternas, dísticas con ramas normales, verdes, pecíolo pubescente o tomentoso, pelos de difusión simples y densos, engrosados y pulvinados en los extremos; láminas de 12 a 60 cm de largo, 4 a 20 cm de ancho de elípticas a obovadas u oblongas, enteras, y glabras (poco pelo) (9). Los usos medicinales de la hoja de cacao no han sido tan estudiadas como las almendras. Sin embargo, hay informes sobre su capacidad antioxidante, antimicrobiano, propiedades anticancerígenas. y sus radicales libres eliminan capacidad de envejecimiento (3).

Cacao

El cacao es una fruta originaria de América, que recuerda su historia de hace más de 2000 años. Las civilizaciones del sur de México y América Central, como los olmecas, los mayas y los aztecas, fueron los primeros pueblos en reconocer y utilizar las valiosas cualidades del grano de cacao, adaptándolo a su dieta diaria.

Compuestos bioactivos.

Los compuestos bioactivos son aquellos que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas y ciertos alimentos (como frutas, verduras, nueces, aceites y granos integrales). Los compuestos bioactivos cumplen funciones en el cuerpo que pueden promover la buena salud. Están en estudio para la prevención del cáncer, las enfermedades del corazón y otras enfermedades. Los ejemplos de compuestos bioactivos incluyen el licopeno, el resveratrol, los lignanos y los taninos.

Carotenoides.

Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales que son sintetizados por las plantas, algas y bacterias fotosintéticas. Los carotenoides son las fuentes de los colores amarillo,

naranja y rojo de muchas plantas, p. ej., el color rojo y anaranjado de las naranjas, los tomates y las zanahorias y el amarillo de muchas flores.

Polifenoles.

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción(10).

2.2. Marco referencial.

2.2.1. Descripción del cacao.

El cacao fino y de aroma tiene características distintivas de aroma y sabor buscadas por los fabricantes de chocolate. Representa únicamente 5% de la producción mundial de cacao. Ecuador, por sus condiciones geográficas y su riqueza en recursos biológicos, es el productor por excelencia de Cacao Arriba fino y de aroma (63% de la producción mundial) proveniente de la variedad Nacional cuyo sabor ha sido reconocido durante siglos en el mercado internacional. Este tipo de grano es utilizado en todos los chocolates refinados. Sin embargo, los que muchos no saben que el chocolate fino se distingue por su pureza, específicamente, el sabor y fragancia que el cacao tiene. Éste es el tipo de cacao que promueve Anecacao. (1)

2.2.1.1. Generalidades.

Theobroma pertenece a la familia Malvaceae, subfamilia Sterculioideae (antes Sterculiaceae) y comprende 22 especies en seis secciones (10, 50, 54). Todas las especies crecen bajo el dosel de bosques tropicales lluviosos. El área de distribución natural se

extiende desde la cuenca del Amazonas por el sur hasta la región meridional de México (18°N a 15°S) (46). Su centro de diversidad se encuentra en la región amazónica en lo que hoy es Brasil, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia (27, 59, 60). Las especies del género *Theobroma* son árboles ramificados con hojas simples y con un fruto indehisciente carnoso (mazorca).(11)

2.2.2. Taxonomía.

2.2.3.

La sistemática de la especie *Theobroma cacao* ha sido relativamente la sistematización de la especie *Theobroma cacao* es bien investigada y la especie está claramente delimitada. Aún hay preguntas abiertas con relación a la filogenia de los géneros *Theobroma* y *Herrania*, así como sobre algunas secciones dentro de los géneros (20, 54). La posición sistemática exacta y el contexto evolutivo de *Theobroma cacao* dentro del género *Theobroma* no han sido aun completamente clarificados (4, 20, 46, 47).(11).

2.2.4. Variedades de cacao.

Se clasifican tradicionalmente en tres grupos genéticos, criollo, Forastero y Trinitario; nuevos estudios han mostrado que esta clasificación no describe suficientemente la variabilidad de la especie, el grupo Forastero abarca una alta variabilidad genética, mientras que las formas Criollo son genéticamente más estrechamente definidas. El grupo Trinitario comprende híbridos entre los dos primeros grupos. La mayoría de las formas de cacao cultivadas mundialmente hoy en día son híbridos de orígenes mixtos que no pueden ser completamente incluidos dentro de esta división clásica. (11)

Se distinguen dos razas de cacao:

a) Forastero (= Trinitario) o cacao amargo.

Originario de las Américas es la raza más cultivada en las regiones cacaoteras de África y Brasil. Se caracteriza por sus frutos de cáscara dura y leñosa, de superficie relativamente tersa y de granos aplanados de color morado y sabor amargo. Dentro de esta raza destacan distintas variedades como Cundeamor, Amelonado, sambito, Calabacillo y angoleta.(12)

b) Criollo, híbridos o cacao dulce.

Actualmente están sustituyendo a las plantaciones antiguas de Forasteros debido a su mayor adaptabilidad a distintas condiciones ambientales y por sus frutos de mayor calidad. Se caracterizan por sus frutos de cáscara suave y semillas redondas, de color blanco a violeta, dulces y de sabor agradable. La superficie del fruto posee diez surcos longitudinales marcados, cinco de los cuales son más profundos que los que alternan con ellos. Los lomos son prominentes, verrugosos e irregulares. (12)

2.2.3. Prácticas Culturales.

2.2.3.1. Preparación del suelo.

El suelo es el medio fundamental en el desarrollo de cacaotales. Se debe proteger contra los rayos directos del sol ya que éstos degradan rápidamente la capa de humus que puedan contener. Por ello se recomienda un adecuado sombreo y el mantenimiento de la hojarasca, no practicar labores profundas y cortar las malas hierbas lo más bajo posible. La hojarasca y el sombreo ayudan a mantener la humedad necesaria durante los meses de sequía. El cacao es una planta muy sensible a terrenos encharcados por lo que se recomienda el empleo de drenajes adecuados que impidan el anegamiento. Se recomienda la construcción de canales que recolecten y conduzcan el exceso de agua de lluvia para evitar que ésta elimine la hojarasca y el horizonte húmico del suelo. (13)

2.2.3.2. Eliminación de malas hiervas.

La eliminación de malas hierbas en cacao se realiza fundamentalmente mediante escarda química. Las plantas que salen del vivero son muy susceptibles al daño de los herbicidas por lo que deben aplicarse con precaución. Los productos más empleados son el diuron, el dalapon y el gesapax. Cuando se realicen aplicaciones de herbicidas es importante que no entren en contacto con la planta de cacao. Por ello es común el empleo de protectores cilíndricos de plástico que protejan a las plantas. No existen ensayos que especifiquen el

efecto de estos herbicidas sobre los árboles de sombra de los cacaotales, por lo que se recomienda extremar las precauciones y no rociar cerca de los mismos.(13)

2.2.3.3.Poda.

Es una técnica que consiste en eliminar todos los chupones y ramas innecesarias, así como las partes enfermas y muertas del árbol. La poda ejerce un efecto directo sobre el crecimiento y producción del cacaotero ya que se limita la altura de los árboles y se disminuye la incidencia de plagas y enfermedades. Hay varios tipos de poda:(13)

2.2.4. Aspectos fisiológicos.

Adaptación. Especie de fácil adaptación. Presenta una gran variabilidad genética y adaptación a distintos pisos térmicos, en condiciones muy variables de clima y suelo.(14)

Crecimiento. Los cotiledones abren exponiendo a la plúmula, la cual empieza a crecer al mismo tiempo que la raíz pero es mucho más pequeña. La primera fase de crecimiento termina con la maduración de las primeras hojas. Aparecen brotes subsecuentes a intervalos de 6 semanas, cuyas hojas se encuentran bien espaciadas con un arreglo en espiral. La planta emprende su siguiente fase de crecimiento entre el segundo y cuarto año de edad mediante la formación de su primer molinillo. Cinco yemas en un eje común del extremo terminal de la planta crecen simultáneamente y en apariencia al mismo nivel, debido a la reducción extrema de los entrenudos entre las hojas. Las yemas que emergen muestran un hábito de crecimiento horizontal, lateral o plagio trópico y se denominan brotes de "abanico", mientras que el tallo crece hacia arriba y es de naturaleza ortotrópica. Después de algunos años puede empezar a crecer un nuevo chupón justo debajo de la unión del primer molinillo y cuando alcanza cierta longitud se forma un nuevo molinillo. (14)

Descomposición. No disponible.

Establecimiento. No disponible.

Interferencia. No disponible.

Producción de hojas, frutos, madera y/o semillas. Los árboles del cacao en plantación comienzan a producir flores entre el tercer y sexto año, dependiendo de las condiciones ecológicas y del genotipo. Algunos clones llegan a producir 3.7 toneladas/ha/año de grano(estación experimental en Ghana) y un promedio de 18a 22 mazorcas por kilogramo de producto seco. La producción de mazorcas es muy variable de año a año. Se estima que en plantación deben mantenerse de 25a 30 años. (14)

2.2.5. Usos.

Aromatizante [semilla]. La semilla encierra un aceite esencial que le da un sabor aromático particular. Comestible [semilla]. Las semillas se muelen y tuestan para obtener la cocoa y el chocolate, sustancias apreciadas en la fabricación de dulces , confituras, helados y bebidas. La industria de chocolate en Europa se desarrolló a lo largo del siglo XIX. En 1828 se registra una patente para la fabricación de chocolate en polvo y el chocolate se pone en venta por primera vez en 1847. En 1876 se impulsa la fabricación del chocolate con leche. (14)

Cosmético / Higiene [semilla]. La manteca de cacao se usa para elaborar cosméticos, perfumería. Las semillas contienen hasta 50 % de aceite. El aceite esencial contiene 50 % de linalol, un ácido alifático y algunos ésteres.

Estimulante [semilla]. El contenido de alcaloides tales como teobromina (1.5 a 3 %) y cafeína, le confiere propiedades estimulantes.

Medicinal [semilla, hoja, raíz, corteza]. Las semillas, hojas y raíces contienen los alcaloides teobromina y cafeína que tiene propiedades diuréticas y vasodilatadoras. Se ha encontrado actividad.(14)

2.2.5.1.Usos medicinales.

La planta de cacao es originaria de las zonas tropicales del continente americano, creciendo de manera silvestre desde México hasta Paraguay, no obstante, sus múltiples usos lo han llevado a ser cultivo en diferentes lugares del globo terráqueo, desde África Occidental hasta las islas de Java (15).

El cacao, conocido también como bakau, cocoa o uchpa, es un árbol de tallo erecto y ramificado que alcanza hasta 9 m de altura, provisto de hojas perennes ovaladas, de color verde intenso y alternas de hasta 15 cm de longitud. Sus flores axilares, pequeñas y de color blanco con tintes rojizos crecen casi sin peciolo de los tallos y ramas, y están provistas de cinco pétalos. El fruto es una drupa de más de 20 cm de diámetro, la cual contiene en su interior una sustancia mantecosa y hasta 40 semillas de color rojizo en el exterior y marrón en el interior. Este árbol puede producir excelente cacao por un periodo de hasta 30 años, pero su fruto no crecerá hasta el tercer o cuarto año de vida(15).

2.2.6. Cultivo y producción en el Ecuador.

De acuerdo a las estimaciones del MAGAP, en el año 2011 la superficie sembrada fue de 521.091 hectáreas, en las cuales se ha estimado una cosecha de 224.163 TM, con un rendimiento de 0,56 TM/ha. De la superficie sembrada aproximadamente el 80% corresponde a la producción de Cacao Fino o de Aroma y la diferencia corresponde a la variedad CCN-51. Es importante consignar que esta última variedad se está propagando aceleradamente pues es altamente productiva, lo que atrae a los productores. De hecho, se estima que en los 20 últimos años el 90% de la superficie que fue renovada corresponde a la variedad CCN-51.(16)

La producción anual de cacao en grano en el Ecuador tiene una tendencia creciente, de hecho, la producción se ha incrementado significativamente rebasando 200 mil TM en 2010, debido a que las siembras implementadas por varios proyectos entre 2005 y 2010 están ya en fase de producción. Por otro lado, la estabilidad de precios internacionales de los últimos años y en general un mejor manejo del cultivo tanto en la producción primaria como en el beneficio del grano han incidido de forma positiva en la producción.(16).

2.2.7. Compuestos Fenólicos: Fenoles y Flavonoides.

Los compuestos fenólicos agrupan a un amplio grupo de moléculas caracterizadas por poseer un anillo aromático con al menos un sustituyente hidroxilo y una cadena lateral. Poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante. Se trata de un grupo de compuestos producto del metabolismo

secundario de las plantas, como productos Finales De las vías shikimato y acetato, desde moléculas relativamente sencillas (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides) a compuestos Altamente Polimerizados como las ligninas, melaninas, taninos,etc (17).

2.2.8. Propiedades medicinales atribuidas al Cacao.

En la medicina popular al cacao se le atribuyen propiedades para combatir las infecciones intestinales, diarreas y para disminuir las secreciones. Se usa también para regular la tiroides y como un estimulante suave. La cáscara de la semilla de Cacao es usada para afecciones hepáticas, de la vejiga y los riñones y en la diabetes. También se usa como tónico general y como astringente en las diarreas por su alto contenido de taninos(18).

El cocimiento de semillas y hojas de Cacao se usa para tratar asma, debilidad, diarrea, fracturas, inapetencia, malaria, parasitismo, pulmonía, tos, cólico y envenenamiento. La manteca de cacao se usa para tratar heridas, afecciones dérmicas, quemaduras, labio rajado, fatiga. Las hojas tiernas se usan para desinfectar herida (18)

2.2.9. Compuestos bioactivos.

Los compuestos bioactivos son conocidos como nutraceuticos, son aquellos compuestos esenciales y no esenciales que se producen en la naturaleza siendo parte de la cadena alimentaria (Biesalski et al., 2009a). A finales del siglo XX se presentaron avances importantes en el conocimiento sobre alimentación y nutrición así como en salud y enfermedad con base en la gran cantidad de estudios epidemiológicos, experimentales y estadísticos sobre la composición de los alimentos para determinar actividades biológicas. Todo ello contribuyó a la identificación de determinados componentes de la dieta (fitoquímicos) como factores potencialmente implicados en la prevención de procesos patológicos. Posteriormente varios autores han coincidido en la definición básica de los compuestos bioactivos como aquellos metabolitos secundarios no nutricionales de origen vegetal que son vitales para el mantenimiento de la salud humana(19)

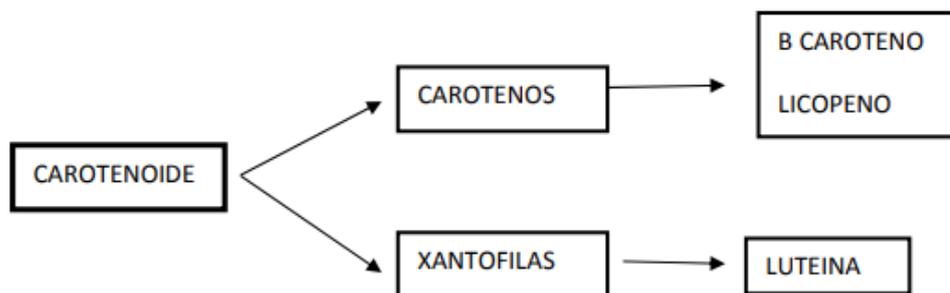
2.2.9.1.Carotenoides.

Los pigmentos carotenoides, en particular la astaxantina, son antioxidantes naturales que estimulan la respuesta inmunológica, disminuyen los efectos adversos del estrés y favorecen el crecimiento de los organismos acuáticos durante su cultivo. Además, se ha documentado

el efecto benéfico de los carotenoides en la salud humana, sobre todo contra algunas enfermedades degenerativas (20).

2.2.9.2. Clasificación.

Clasificación Existen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno en sus anillos terminales (ejemplo β caroteno, licopeno) y las xantofilas que contienen oxígeno en sus anillos terminales (ejemplo luteína) (21)



Los factores que influyen en la presencia de carotenoides son el manejo pre cosecha, estado de madurez, así como las operaciones de procesado y conservación. Entre éstos la temperatura e intensidad de la luz tienen una gran influencia en el contenido de los carotenoides. Durante el procesamiento y almacenamiento la oxidación y los cambios estructurales al aplicar calor son los principales factores que los alteran. El empacado de alimentos congelados y esterilizados en atmósferas libres de oxígeno ayuda a mantener el contenido de carotenoides. Sin embargo, el tipo de suelo, riego y fertilización no afectan significativamente el contenido de éstos (21).

2.2.10. Polifenoles.

Los alimentos de origen vegetal en especial las frutas y los vegetales presentes en la dieta de acuerdo a estudios epidemiológicos realizados, pueden ejercer un efecto protector contra algunas enfermedades tales como el cáncer y trastornos cardiovasculares. Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante como la vitamina C, E, β caroteno, y una mezcla compleja de compuestos fenólicos. El objetivo de este trabajo fue estudiar en una serie de productos de origen vegetal, la relación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante(22).

2.2.11. Potencial agroindustrial de compuestos bioactivos.

La continua aparición de evidencias científicas acerca del papel de la dieta y sus componentes en el bienestar y la salud, ha favorecido la aparición de los alimentos funcionales que en la actualidad constituyen uno de los principales impulsores del desarrollo de nuevos productos. La forma más versátil de modificar la composición de los alimentos surge de la enorme posibilidad de introducir cambios en los ingredientes utilizados en su elaboración y en consecuencia sobre la presencia de diversos compuestos bioactivos provenientes en su mayoría de frutas y vegetales. En este contexto, se pretende exponer los últimos avances biotecnológicos sobre el desarrollo de nuevos productos cuya base principal ha sido la utilización de compuestos bioactivos de origen vegetal como ingredientes funcionales (20)

CAPITULO III.
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION

3.1. Localización.

La siguiente investigación se realizará en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad Ciencias Pecuarias en la Finca Experimental “La María”, ubicada en el km 7 ½ vía Quevedo – El Empalme, provincia de Los Ríos, cuya situación geográfica es de 01°06′′ de latitud Sur y 79°29′ de longitud Oeste a una altura de 75msnm.

La obtención de las hojas de cacao se realizará en el recinto Faita, de la parroquia San Carlos perteneciente al cantón Quevedo de la provincia de Los Ríos, en la finca “La Represa”, cuya ubicación geográfica es de 1° 03′18′′ de latitud Sur y de 79° 25′24′′ de longitud Oeste a una altura de 90msnm, propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

3.2. Tipos de investigación.

Se realizó una investigación exploratoria, descriptiva y experimental, ya que no se han encontrado datos sobre esta metodología de bioactivos a partir de hojas de cacao.

3.2.1. Investigación exploratoria.

Para resaltar los aspectos desconocido o poco estudiados de los bioactivos de las hojas de cacao.

3.2.2. Investigación descriptiva.

Se propone este tipo de investigación describir de modo sistemático las características de una población, situación o área de interés. La investigación descriptiva responde a las preguntas: quién, qué, dónde, por qué, cuándo, cómo. (4)

3.3. Método de investigación.

3.3.1. Método inductivo.

Se empleó este tipo de investigación, buscando darle solución al análisis de hechos particulares con una tecnología adecuada, para descubrir su aplicación.

3.3.2. Método estadístico.

Este método se utilizó para encontrar los resultados de variables cualitativas y cuantitativas que mediante un software se clasificaran, tabularan y ordenaran los datos obtenidos durante la investigación.

3.3.3. Método analítico.

Se analizaron los tratamientos y se estudiaron los compuestos bioactivos de las hojas de cacao.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

En el presente trabajo investigativo cuenta con las siguientes fuentes de investigación.

3.4.1. Fuentes primarias.

- Pre- ensayo
- Trabajo de campo

3.4.2. Fuentes secundarias.

- Tesis
- Libros
- Páginas oficiales del Estado Ecuatoriano
- Artículos científicos
- Revistas

3.5. Diseño de la investigación.

Se empleó un diseño de arreglo factorial completamente al azar, con 2 factores de estudio, 3 variedades de cacao (Nacional, Forastero y trinitario) y 2 estados foliares hojas de cacao (jóvenes –parte alta del árbol y maduras–parte baja del árbol), con 4 repeticiones 6

tratamientos. Para la comparación de las medias de los tratamientos se utilizará la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.5.1. Andeva del experimento.

En la siguiente tabla 1, se muestra el esquema del análisis de varianza.

Tabla 1. *Esquema del ANDEVA*

Fuente de Variación (FV)		Grados de Libertad (GL)
Tratamiento	(t-1)	5
Variedades C	(vc-1)	1
Tipo M	(tm-1)	2
Interacción VxT	(vc*tm)	6
Error	t (r-1)	18
Total	(t * r)-1	23

Elaborado por: Autora

3.5.2. Factores de los tratamientos.

Para llevar a cabo la siguiente investigación se realizó el siguiente diseño que se presenta a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. *Factores de los tratamientos*

Factores	Subnivel
A (variedades de hojas de cacao)	a1 Nacional
	a2 Forastero
	a3 Trinitario
B (estado foliares)	b1 Joven
	b2 Adulto

Elaborado por: Autora

3.5.3. Tratamiento de los datos.

Tabla 3. *Detalle de los tratamientos en estudio*

Nº	Código	Detalle
1	V1h1	Variedad Nacional con hojas jóvenes (parte alta del árbol)
2	V1h2	Variedad Nacional con hojas adultas (parte baja del árbol)
3	V2h1	Variedad Forastero con hojas jóvenes (parte alta del árbol)
4	V2h2	Variedad Forastero con hojas adultas (parte baja del árbol)
5	V3h1	Variedad Trinitario con hojas jóvenes (parte alta del árbol)
6	V3H2	Variedad Trinitario con hojas adultas (parte baja del árbol)

Elaborado por: Autora

3.5.4. Esquema del experimento.

Tabla 4. *Esquema del experimento*

Repeticiones	Tratamiento	Variedad hoja de cacao	Estado foliares
1	1	Nacional	Joven
1	2	Nacional	Adulta
1	3	Forastero	Joven
1	4	Forastero	Adulta
1	5	Trinitario	Joven
1	6	Trinitario	Adulta
2	1	Nacional	Joven
2	2	Nacional	Adulta
2	3	Forastero	Joven
2	4	Forastero	Adulta
2	5	Trinitario	Joven
2	6	Trinitario	Adulta
3	1	Nacional	Joven
3	2	Nacional	Adulta
3	3	Forastero	Joven
3	4	Forastero	Adulta
3	5	Trinitario	Joven
3	6	Trinitario	Adulta
4	1	Nacional	Joven
4	2	Nacional	Adulta
4	3	Forastero	Joven
4	4	Forastero	Adulta
4	5	Trinitario	Joven
4	6	Trinitario	Adulta

Elaborado por: Autora

3.5.5. Modelo matemático.

Las fuentes de variación para la presente investigación se efectuaron con el siguiente modelo matemático, cuyo esquema corresponde a:

$$Y_{ijk} = \mu + Ti + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Total, de las observaciones en estudio.

μ = Efecto de la media general.

Ti = Efecto de los tratamientos en estudio.

ϵ_{ij} = Efecto aleatorio o error experimental.

3.6. Instrumentos de investigación.

3.6.1. Análisis físico – químico.

Los análisis realizados en siguiente investigación fueron:

3.6.2. Contenido de humedad.

Contenido de humedad de las hojas de cacao; es la pérdida de masa determinada por el método especificado en la norma técnica expresado como un porcentaje en masa.

Procedimiento.

1. Pesar 10 gramos de muestra de hojas de cacao.
2. Se tritura mortero en partículas gruesas, evitando la formación de pasta.
3. Colocar en un crisol la muestra triturada.
4. Luego colocar el crisol con la muestra en la estufa a 105°C, por un tiempo de 16 horas.
5. Luego se ingresa al desecador dejándolo enfriar por espacio de 40 minutos, para luego proceder a pesar.

$$H = \frac{W_0 - W_1}{W_0} * 100$$

Dónde:

W0= Peso inicial de la muestra en gramos (g).

W1= Peso final de la muestra en gramos (g).

3.6.3. Cenizas totales.

Es una medida del total de minerales presentes en un alimento.

Preparación de la muestra.

- Preferiblemente las muestras para el ensayo deber estar en recipientes herméticos, limpios y secos.
- La muestra extraída de un lote determinado deber ser representativa y no debe exponerse al aire por mucho tiempo.
- Se homogeniza la muestra colocándola varias veces en el recipiente.

Procedimiento.

- La determinación debe realizarse por duplicado sobre las mismas muestras.
- Lavar y secar el crisol de porcelana en la estufa ajustada a una temperatura 60° por 3 horas, luego dejar enfriar en el desecador y pesar con una aproximación al 0.1mg.
- Luego colocar la muestra dentro del crisol pesado.
- Introducir el crisol en la mufla a una temperatura de 60°por 3 horas hasta obtener cenizas libres.
- Sacar el crisol con las cenizas, dejar enfriar en el desecador y pesar.

Cálculos.

$$C = \frac{W_2 - W_1}{W_0} * 100$$

Dónde:

W0= peso de la muestra (g).

W1= peso del crisol vacío.

W2= peso del crisol más la muestra calcinada.

3.6.4. Contenido de grasa.

- Para este procedimiento se utiliza un papel filtro el cual debe estar numerado
- Se pesa 1 g de hoja
- Luego se coloca en el papel filtro se pesa y se registra el peso.
- Es depositado en la porta dedal y el contenido en el vaso Beaker.
- Se lleva a los ganchos metálicos del aparato de golfish, se le adiciona 40ml del solvente en este caso éter de petróleo y abrimos el flujo de agua.
- Es colocado en el vaso y llevamos a las hornillas del aparato golfish y se ajusta los tubos, procurando que queden en perfectas condiciones.
- Se sometemos a una temperatura de 55°C x 3horas

Una vez que pasan las 3 horas retiramos la muestra y luego se coloca el vaso para la recuperación del solvente. Los vasos beaker con el contenido de grasa lo llevamos a la estufa a 100°C por 2 horas, pasado este tiempo lo ubicamos en el desecador y luego se procede a pesar y anotar los valores para aplicarlos en la siguiente formula.

Cálculos:

$$\text{Grasa (\%)} = \frac{W2 - W1}{W0} * 100$$

Donde:

W0 = Peso de la muestra en gramos

W1 = Peso del vaso beaker vacío

W2 =Peso del vaso más la grasa

3.6.5. Polifenoles totales.

Los polifenoles totales de hojas de cacao son extraídos con una solución acuosa del metanol a 70%, mediante agitación magnética continua por 45 minutos. El extracto obtenido se filtra, se toma una alícuota del mismo y se realiza una reacción colorimétrica con el reactivo de Folin y Ciocalteu, obteniendo una coloración azul, la misma que es cuantificada en un espectrofotómetro UV-VIS, a una longitud de onda de 760nm.

Procedimiento

Extracción de la muestra

1. En un Erlenmeyer de 125mL se pesa 1 g de muestra desengrasada.
2. Se adiciona 75mL de solución acuosa de metanol al 70% y se coloca en un agitador magnético.
3. Se lleva la muestra a la plancha de agitación y se agita por 45 minutos a temperatura ambiente.
4. Se filtra el extracto a través de papel Whatman N° 4, en un balón volumétrico de 100 mL, se lava de filtrado y se afora solución acuosa de metanol al 70%.

Cuantificación en el espectrofotómetro UV- VISIBLE

1. Transferir cuantitativamente 1 ml del extractor a un tubo de ensayo, añadir 9 ml de agua destilada (disolución A).
2. Tomar 1 ml de la dilución A, añadir 6 ml de agua destilada y 1ml de reactivo de Folin y Ciocalteu, luego de tres minutos añadir 2 ml de la solución de carbonato de sodio al 20% inmediatamente agitar en vortex y calentar en baño maria a 40°C por 2 minutos (este procedimiento se realiza tantop para las muestras como para los estandares).
3. Pasar la solución a una cubeta de vidrio y cuantificar en el espectometro UV-VIS bajo las siguientes condiciones:
 - Longitud de onda: 760nm.
 - Temperatura: Ambiente.
 - Slit: 0.2nm.

Cálculo y expresión de los resultados

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo, utilizando la siguiente formula:

$$\frac{mg}{g} \text{Acido Galico} = \frac{a * b * d * f}{P}$$

Dónde:

a= concentración de ácido gálico obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L)

b=volumen total de extracto (100mL)

d=factor dilución (10)

f=factor para transformar unidades

P= peso de la muestra (g).

3.6.6. Carotenoides

Los extractos de carotenoides fueron analizados por cromatografía líquida de rápida resolución (RPLC) en un sistema Agilent 1260 equipado con detector DAD. Como fase estacionaria se utilizó una columna C30 (150 x 4,6 mm, 3 µm) (YMC, Wilmington, NC) protegida por una pre-columna de C30 correspondiente (3 µm, 10 ´ 4 mm). Esta columna es muy eficiente para la separación de isómeros geométricos de carotenoides, debido a que la separación depende tanto de la planaridad como de la forma de los mismos (Breitenbach *et al.*, 2001; Melendez-Martinez *et al.*, 2007; Sander *et al.*, 2000). Los disolventes utilizados en la fase móvil fueron: Fase A: Metanol (MeOH), Fase B: Metil-t-butil eter (MTBE) y Fase C: Agua MilliQ El gradiente de elución utilizado fue el siguiente:

Tiempo (min)	Mezcla de eluyentes
0	90% de MeOH + 5% de MTBE + 5% de agua
5	95% de MeOH + 5% de MTBE
10	89% de MeOH + 11% de MTBE
16	75% de MeOH + 25% de MTBE
20	40% de MeOH + 60% de MTBE
22,5	15% de MeOH + 85% de MTBE
25	90% de MeOH + 5% de MTBE + 5% de agua
28	90% de MeOH + 5% de MTBE + 5% de agua

El flujo utilizado fue de 1 mL/min y el volumen de inyección según la Tabla 1. Las longitudes de onda seleccionadas fueron 285, 350, 410, 450 y 472 nm usando el software Openlab. La temperatura de columna se mantuvo a 20 °C. Cada día, al finalizar los análisis, la columna se limpio con MTBE: MeOH (50:50) durante 20 minutos.

Material

Aparatos e instrumentación:

- Cromatógrafo liquido Agilent Technologies HP 1260, equipado con:
 - Bomba cuaternaria.
 - Desgasificador de vacío.
 - Compartimento termostatzado para columna.
 - Inyector automático.
 - Detector de diodos.
 - Columna YMC C30 (3 µm, 150 ´ 4.6 mm) (YMC Wilmington, NC, EEUU).
 - Pre-columna de YMC 30 (3 µm, 10´ 4 mm) (YMC Wilmington, NC, EEUU).
 - Software Openlab.

Reactivos

- Acetato de etilo (Panreac; Barcelona, Espana), Ref.351318
- Metanol calidad HPLC (MeOH) (Merck, Ref 1.06018)
- Metil-*t*-butil eter (MTBE) calidad HPLC (Merck, Ref. 1.01845)
- Agua MilliQ obtenida de un equipo de filtracion NANOpure Dlamond (Barnsted Inc.

Dubuque, IO).

Procedimiento analítico

Inyeccion

Los extractos se redisuelven en los μL de acetato de etilo indicados (Tabla 2) y se centrifugan

a 14.000 rpm, durante 5 minutos a 4 °C. Se toman 30 μL del sobrenadante y se introduce en el vial, para su posterior inyección en el RPLC.

Nombre	Peso muestra (g)	Vol. Disol (μL)	Vol. Inyect (μL)	Nombre	Peso muestra (g)	Vol. Disol (μL)	Vol. Inyect (μL)
RHA-1	0,2166	50	5	AHA-1	0,5054	100	5
RHA-2	0,2017	50	5	AHA-2	0,5092	100	5
RHA-3	0,2112	50	5	AHA-3	0,5106	100	5
RHB-1	0,2036	50	5	AHB-1	0,5069	100	5
RHB-2	0,2043	50	5	AHB-2	0,5001	100	5
RHB-3	0,2070	50	5	AHB-3	0,5107	100	5
RHC-1	0,2070	100	2	AHC-1	0,5132	100	5
RHC-2	0,2039	100	2	AHC-2	0,5129	100	5
RHC-3	0,2081	100	2	AHC-3	0,5054	100	5
RL-1	0,2088	100	5	AB-1	0,5023	100	5
RL-2	0,2096	100	5	AB-2	0,5014	100	5
RL-3	0,2006	100	5	AB-3	0,5012	100	5
RB-1	0,2100	100	5	AL-1	0,5148	100	5
RB-2	0,2076	100	5	AL-2	0,5054	100	5
RB-3	0,2011	100	5	AL-3	0,5000	100	5
RC-1	0,2021	100	2	AC-1	0,4999	100	2
RC-2	0,2059	100	2	AC-2	0,5072	100	2
RC-3	0,2055	100	2	AC-3	0,5055	100	2

Identificación de los carotenoides.

La identificación de los carotenoides presentes en las muestras analizadas se llevo a cabo por comparación de su comportamiento espectroscópico y cromatógrafo con los de estándares aislados de acuerdo a protocolos recomendados (Rodríguez-Amaya, 2001).

Además, se utilizaron diversos índices como:

- %III/II: que se define como la relación entre la altura de la tercera banda de absorción (III) y la de la segunda (II), considerando como línea base el mínimo entre ambas bandas, multiplicado por 100.

3.7. Recursos humanos y materiales.

3.7.1. Recursos humanos.

Los recursos humanos que contribuyeron con la elaboración del proyecto investigativo, se nombran a continuación:

- Directora del proyecto de investigación Ing. Cynthia Erazo. M. Sc.
- Srta. Karol Veintimilla Ruiz autora del proyecto investigativo.

3.7.2. Recursos materiales

3.7.2.1. Materia prima

- Hojas de cacao de origen nacional forastero y trinitario.

3.7.2.2. Materiales de laboratorio

- Matraz Erlenmeyer
- Gotero
- Bureta Graduada
- Soporte Universal
- Crisoles
- Vasos de precipitación
- Matraz volumétrico
- Estufa
- Desecador
- Mortero
- Guillotina
- Balanza analítica
- Papel de Whatman N° 4

3.7.2.3. Reactivos

- Fenolftaleína
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Agua libre de CO₂
- Metanol grado reactivo al 99,5%
- Estándar Acido Galico monohidratado 97,5-102.5%
- Reactivo de Folin y Ciocalteu
- Carbonato de sodio 99,5%
- Agua destilada
- Éter de petróleo

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1. Análisis físico-químicos.

Como se puede observar en la tabla 5, se aprecian las medias de datos de humedad, cenizas y grasas que se realizaron.

Como se observa, a nivel de factor A (Variedad de cacao) y Factor B (Estados foliares) existieron diferencias significativas.

Tabla 5. Resultados de las medias de humedad, cenizas y grasas realizados

Factor A	Humedad	Cenizas	Grasas
A1	69.27 ^b	3.55 ^a	0.79 ^c
A2	68.07 ^b	3.32 ^a	0.94 ^b
A3	73.81 ^a	2.06 ^b	1.56 ^a
Factor B			
B1	81.51 ^a	1.48 ^b	0.94 ^b
B2	59.26 ^b	4.47 ^a	1.24 ^a
A*B			
T1	81.87 ^a	1.51 ^c	0.80 ^c
T2	56.68 ^c	5.59 ^a	0.76 ^c
T3	80.30 ^a	1.52 ^c	0.90 ^{bc}
T4	55.85 ^c	5.12 ^a	0.98 ^{bc}
T5	82.36 ^a	1.40 ^c	1.13 ^b
T6	65.25 ^b	2.72 ^b	1.99 ^a
CV %	2.62	7.27	9.96

Elaborado por: Autora

4.1.1. Variable humedad.

En la variable humedad, de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), existió diferencia significativa en la interacción A*B con un coeficiente de variación (CV) de 2.62%, donde el T4 (Forastero; Adulto) presenta el valor más bajo con 55.85%, mientras el T5 (Trinitario; Joven) obtuvo el más alto con 82.36% (tabla 5). A nivel de factores, en el factor A (Variedad de cacao) el valor más alto fue en a3 (Variedad Trinitario) con 73.81% y para el factor B, el más bajo se obtuvo en b1 (Estado joven) con 59,26% (ilustración 2).

Esto permite indicar que las hojas en estado foliar joven, presentan un mayor contenido de humedad, el mismo que puede ir disminuyendo al llegar a la etapa adulta. Las condiciones de humedad en los tejidos vegetales pueden reflejar el estado fisiológico de la planta, tal como lo afirman Yi et al. (5). Al respecto de esto, Aasama (6) indica que la conductancia en los estomas es sensible a cambios en el potencial hídrico de las hojas, y considerando esta actividad estomática determinante en la supervivencia y el éxito del cultivo frente a la alta competencia por los recursos (5),

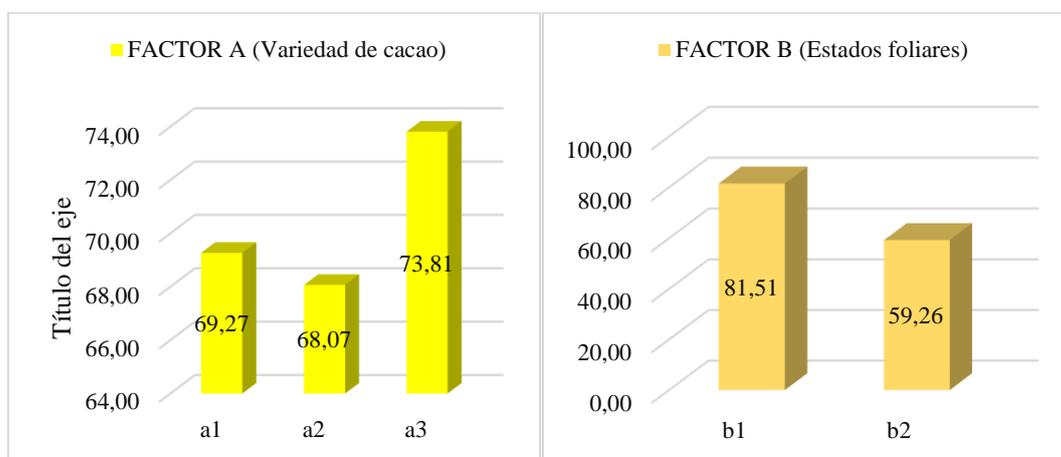


Ilustración 1. Valores promedio de humedad, respecto al factor A (Variedad de cacao) y factor B (Estados foliares) en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares

4.1.2. Variable cenizas totales.

En la determinación de cenizas totales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), existió diferencia significativa en la interacción A*B con un coeficiente de variación (CV) de 7,27%, donde el T2 (Nacional; adulta) indico el valor más alto con 5,59%, mientras el T5(Trinitario; jóvenes) obtuvo el más bajo con 1,40% (tabla 5). A nivel de factor A (Variedad de cacao) el valor más alto se dio en a1 (Variedad Nacional) con 3,55% y para el factor B, el más alto se obtuvo en b2 (Estado adulto) con 4,47% (ilustración 3).

Las cenizas en los alimentos están formadas por los residuos inorgánicos que quedan después de que la materia orgánica se haya quemado. Como se puede apreciar, a medida que las hojas llegan a la etapa adulta, el contenido de materia inorgánica es mayor. Márquez (7), escribe que las cenizas normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes. Cabe destacar que determinar el contenido de cenizas totales es importante ya que nos indica la cantidad de materia inorgánica presente en la muestra, lo cual nos da indicios de su calidad. En la determinación de las cenizas totales, la muestra debe quemarse lentamente, pues de lo contrario se pierden los cloruros alcalinos, volátiles a altas temperaturas.

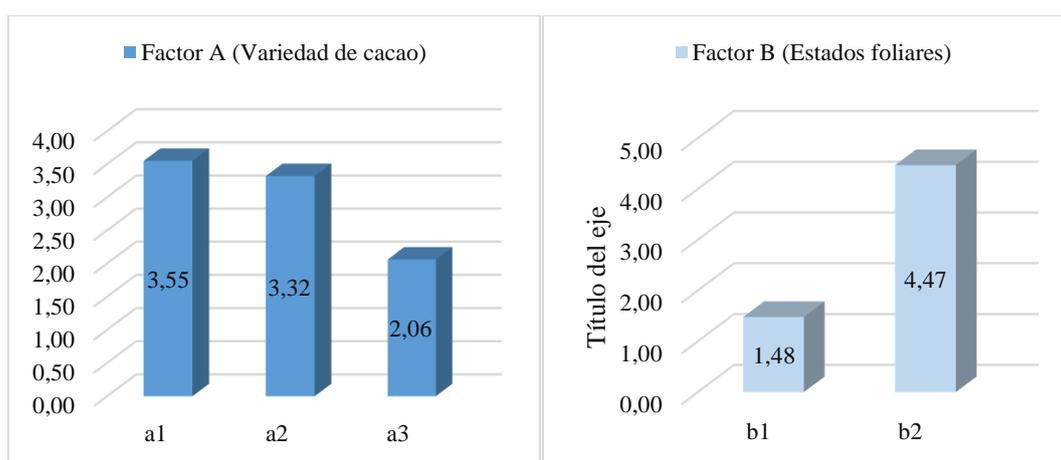


Ilustración 2. Valores promedios de cenizas totales, respecto al factor A (Variedad de cacao) y factor B (Estados foliares) en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares

4.1.3. Variable contenido de grasa.

En cuanto al contenido de grasa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), existió diferencia significativa en la interacción A*B con un coeficiente de variación (CV) de 9,96%, donde el T6 (Trinitario; Adulto) con 1,99% fue el valor más alto, mientras el T2 (Nacional; Adulto) obtuvo el más bajo con 0,76% (tabla 5). En el factor A (Variedad de cacao) el valor más alto se dio en a3 (Variedad Trinitario) con 1,56% y para el factor B, el más alto se obtuvo en b2 (Estado adulto) con 1,24% (ilustración 4).

Como se observa, cuando las hojas alcanzan el estado adulto, se incrementa su contenido de grasa.

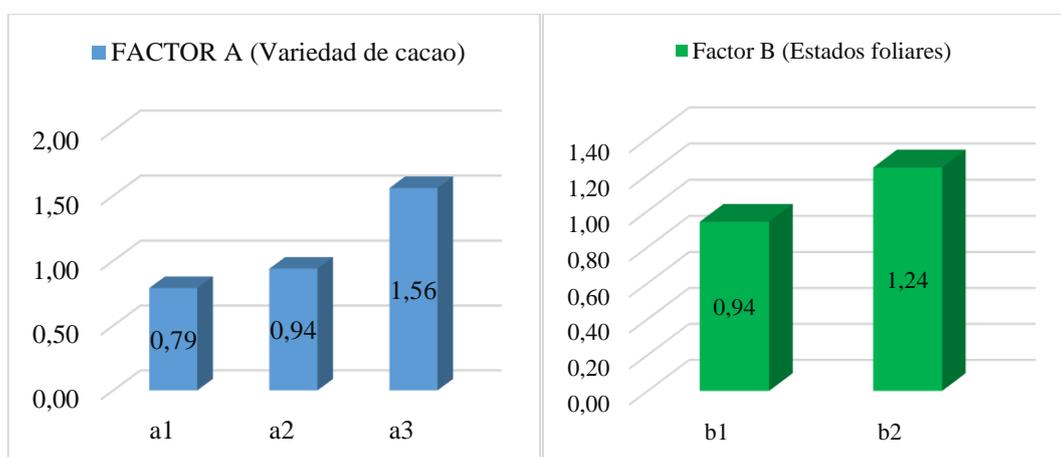


Ilustración 3. Valores promedios de cenizas totales, respecto al factor A (Variedad de cacao) y factor B (Estados foliares) en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares

4.2. Contenido de carotenoides.

Como se observa, el contenido de carotenoides fue mayor en las hojas de cacao variedad Forastero con 325.62 ug β -caroteno/g a diferencia de las hojas provenientes de la variedad Nacional con 322.21 ug β -caroteno/g y Trinitario con 306.98 ug β -caroteno/g

Estos carotenoides son compuestos naturales presentes en diversas estructuras de plantas y son considerados compuestos indispensables para la vida, fundamentalmente debido a las funciones que llevan a cabo en relación con la fotosíntesis (captación de luz, foto protección) (8).

Inicialmente, estos estudios se llevaron a cabo principalmente en base a β -caroteno; Constituyendo uno de los indicadores de la capacidad fotosintética de las plantas, ya que representa una medida de las dimensiones del sistema fotosintético y su eficiencia (9); determina la producción de biomasa de la planta en diferentes condiciones.

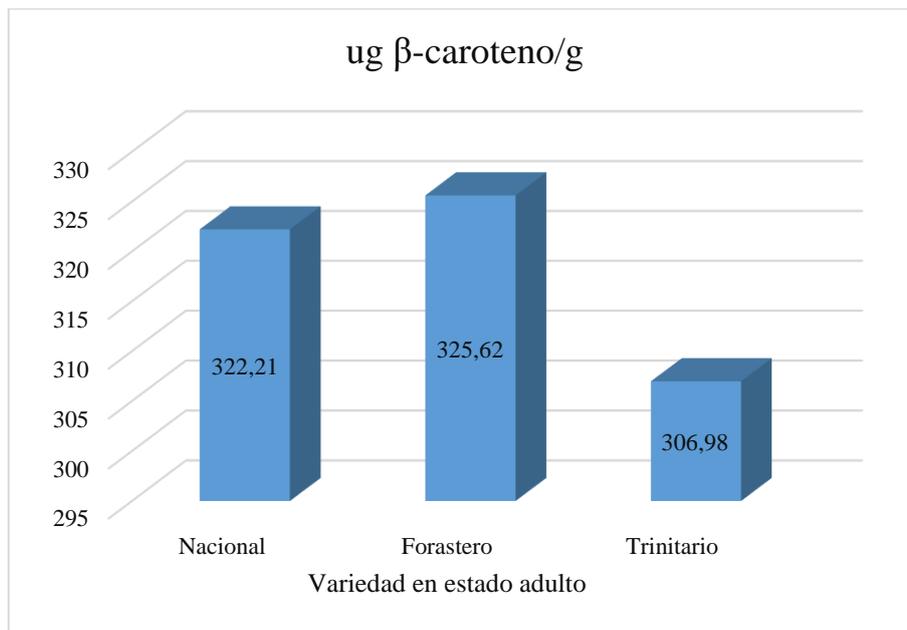


Ilustración 4. Contenido de carotenoides en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares

4.3. Contenido de polifenoles.

Se pudo determinar la representación gráfica del contenido de polifenoles totales en los tratamientos establecidos, observando que el T4 (Forastero; Adulto), presento mayor cantidad de polifenoles con 0.3227g AGE/100g, siendo el T5 (Trinitario; Joven) con 0.1808g AGE/100g, el valor más bajo (ilustración 6).

Esta capacidad de polifenoles sirve como modulador de la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción (10). Es importante resaltar que no existen estudios realizados en hojas de cacao; por lo que se puede destacar que el contenido de polifenoles presentes en las hojas de cacao es bajo en comparación a otros subproductos como por ejemplo la cascarilla, Elba et al (11) reportaron valores entre 2.40-2, 51 g AGE/100; mientras que Carpio (12) reportó entre 1,47-5,74 mg GAE/100g. Todos los valores son superiores a los obtenidos en el presente trabajo investigativo.

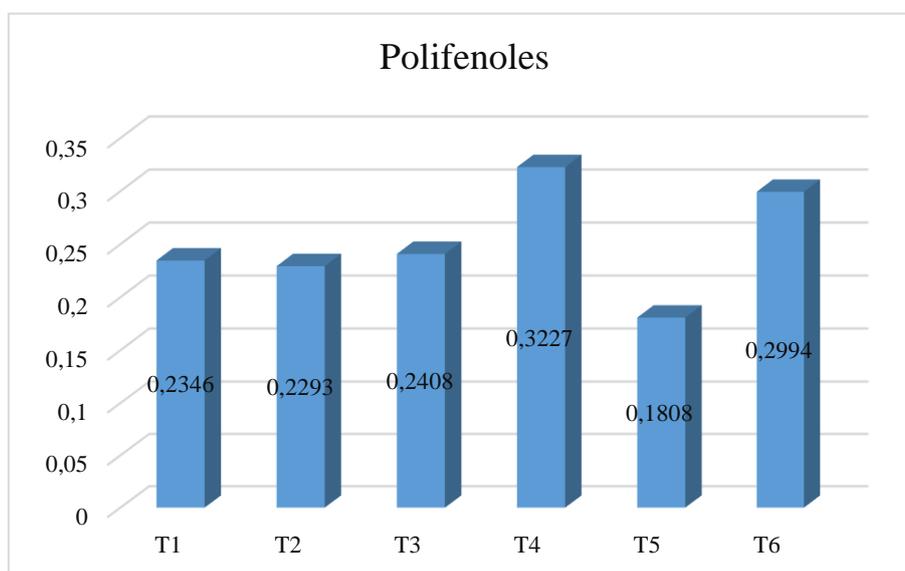


Ilustración 5. Polifenoles presentes en el Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao en dos estados fisiológicos foliares

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- En las características físicas y químicas se pudo determinar que existieron diferencias significativas en los parámetros de humedad, cenizas totales y grasa, a nivel de factor A (Variedad de cacao) y factor B (Estados foliares), así como también en la interacción AxB, donde se aprecia que el T5 (Trinitario; Joven) obtuvo los valores más altos de humedad con 82.36%; y cenizas totales con 1.40; mientras que el T2 (Nacional; Adulto), presentó el resultados más alto de grasa.
- El contenido de carotenoides fue superior en las hojas adultas de la variedad forastero con 325.62 ug β -caroteno/g, siendo comparable a la variedad Nacional de 322.21 ug β -caroteno/g; y muy superior a la variedad Trinitario que presentó un valor 306.98 ug β -caroteno/g.
- En cuanto al contenido de polifenoles, la variación fue mínima entre los tratamientos 4 (Forastero; Adulto) y 6 (Trinitario; Adulto) con 0.3227 g AGE/100 y 0.2994 g AGE/100 respectivamente. Se vale destacar que este parámetro es inferior a comparación de otras partes del cacao como pueden ser de las almendras o la cascarilla.

5.2. Recomendaciones.

- Realizar comparaciones de componentes bioactivos entre las hojas y cascarilla de cacao, como desechos agroindustriales.
- Incorporar hojas de cacao en productos alimenticios para evaluar cómo influyen los compuestos bioactivos en las características finales.
- Realizar investigaciones sobre como varía el contenido de polifenoles y carotenoides a medida que las hojas pasan de jóvenes a adulto.
- Comparar las hojas de cacao con hojas de diferentes cultivos similares.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Referencias citadas.

1. Anecacao. Historia del Cacao | Anecacao Ecuador. Hist del cacao. 2015;1.
2. Perea J, Cadena T, Herrera J. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes Efecto del procesamiento The cocoa and its products as antioxidant source Processing effect. Rev la Univ Ind Santander Salud. 2009;41(2):128–34.
3. Irondi EA, Olanrewaju S, Oboh G, Boligon AA. Inhibitory Potential of Cocoa Leaves Polyphenolics-Rich Extract on Xanthine Oxidase and Angiotensin 1-Converting Enzyme. 2017;1866(February).
4. Coronado H. M, Vega Y León S, Gutiérrez T. R, Marcela VF, Radilla V. C. Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. Rev Chil Nutr. 2015;42(2):206–12.
5. Osman H, Nasarudin R, Lee SL. Food Chemistry Extracts of cocoa (Theobroma cacao L .) leaves and their antioxidation potential. 2004;86:41–6.
6. Almeida M. SECTOR DE HIERBAS AROMÁTICAS Y CERTIFICACIÓN DEL SISTEMA DE GESTIÓN. 2011;5–12.
7. Chóez Bravo TC. Vino de cacao: una propuesta novedosa para la utilización de los desechos del cacao. 2018;2017–8.
8. Profile SEE. Ciencia , Tecnología e Innovación Plan Estratégico de del Sector Agropecuario Colombiano Cadena de Plantas aromáticas , medicinales ,. 2018;(January).
9. Poscosecha C De. Operaciones Poscosecha -.
10. Quiñones M, Aleixandre MMA. Los polifenoles , compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular COMPOUNDS WITH BENEFICIAL EFFECTS. 2012;27(1):76–89.
11. Dostert N, Roque Gamarra J, Echeverría A, Torre M, Weigend M. Hoja botánica: Cacao - Theobroma cacao L. 2012.
12. EL CACAO Y SUS BENEFICIOS.
13. Puro Cacao: VARIEDADES COMERCIALES.

14. Haya L. Agricultura. El cultivo del cacao. 1a parte. 1997.
15. Halevy AH. CRC Handbook of flowering. CRC Handb Flower. 2018;5(1753):1–414.
16. Usos Medicinales del Cacao - Salud y Homeopatía : MiSabueso.com.
17. Secretaría Técnica del Comité Interinstitucional para el Cambio de la Matriz Productiva- Vicepresidencia del Ecuador, Cepal. Diagnóstico de la Cadena Productiva del Cacao en el Ecuador. 2014;10.
18. Porras-Loaiza AP L-MA. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Vol. 3, Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2009. p. 121–34.
19. Bibliografía - Farmacognosia. Plantas medicinales.
20. Cárdenas Baquero GD, Arrazola Paternina G, Villalba Cadavid M. Frutas tropicales: fuente de compuestos bioactivos naturales en la industria de alimentos. Ingenium Rev la Fac Ing. 2016;17(33):29.
21. Quintana A, Oliva H, Hern C, Mechetnov EP. Carotenoides . ¿Qué son y para qué se usan?
22. Tobergte DR, Curtis S. Carotenoides. J Chem Inf Model. 2013;53(9):1689–99.
23. Rincon M. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. 2014;(January 2008).

CAPÍTULO VII
ANEXOS

7.1. Anexos.

ANDEVA de análisis físico-químicos

Nueva tabla : 27/07/2020 - 14:03:02 - [Versión : 20/09/2019]

Análisis de la varianza

Humedad %

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Humedad %	24	0,98	0,98	2,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3196,91	5	639,38	187,85	<0,0001
A (Variedades de cacao)	146,39	2	73,20	21,50	<0,0001
B (Estados foliares)	2970,82	1	2970,82	872,84	<0,0001
A (Variedades de cacao)*B ..	79,70	2	39,85	11,71	0,0006
Error	61,27	18	3,40		
Total	3258,18	23			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,35424

Error: 3,4036 gl: 18

A (Variedades de cacao)	Medias	n	E.E.	
a3	73,81	8	0,65	A
a1	69,27	8	0,65	B
a2	68,07	8	0,65	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,58236

Error: 3,4036 gl: 18

B (Estados foliares)	Medias	n	E.E.	
b1	81,51	12	0,53	A
b2	59,26	12	0,53	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,14587

Error: 3,4036 gl: 18

A (Variedades de cacao)	B (Estados foliares)	Medias	n	E.E.	
a3	b1	82,36	4	0,92	A
a1	b1	81,87	4	0,92	A
a2	b1	80,30	4	0,92	A
a3	b2	65,25	4	0,92	B
a1	b2	56,68	4	0,92	C
a2	b2	55,85	4	0,92	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cenizas %

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cenizas %	24	0,99	0,99	7,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	72,95	5	14,59	311,39	<0,0001
A (Variedades de cacao)	10,37	2	5,19	110,68	<0,0001
B (Estados foliares)	53,91	1	53,91	1150,66	<0,0001
A (Variedades de cacao)*B ..	8,67	2	4,33	92,48	<0,0001
Error	0,84	18	0,05		
Total	73,79	23			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,27621

Error: 0,0469 gl: 18

A (Variedades de cacao) Medias n E.E.

a1	3,55	8	0,08	A
a2	3,32	8	0,08	A
a3	2,06	8	0,08	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18565

Error: 0,0469 gl: 18

B (Estados foliares) Medias n E.E.

b2	4,47	12	0,06	A
b1	1,48	12	0,06	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,48641

Error: 0,0469 gl: 18

A (Variedades de cacao) B (Estados foliares) Medias n E.E.

a1	b2	5,59	4	0,11	A
a2	b2	5,12	4	0,11	A
a3	b2	2,72	4	0,11	B
a2	b1	1,52	4	0,11	C
a1	b1	1,51	4	0,11	C
a3	b1	1,40	4	0,11	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Grasa %

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Grasa %	24	0,95	0,94	9,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,21	5	0,84	70,90	<0,0001
A (Variedades de cacao)	2,72	2	1,36	114,61	<0,0001
B (Estados foliares)	0,54	1	0,54	45,47	<0,0001
A (Variedades de cacao)*B ..	0,95	2	0,47	39,89	<0,0001
Error	0,21	18	0,01		
Total	4,42	23			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13906

Error: 0,0119 gl: 18

A (Variedades de cacao) Medias n E.E.

a3	1,56	8	0,04	A
a2	0,94	8	0,04	B
a1	0,78	8	0,04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,09347

Error: 0,0119 gl: 18

B (Estados foliares)	Medias	n	E.E.	
b2	1,24	12	0,03	A
b1	0,94	12	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,24488

Error: 0,0119 gl: 18

A (Variedades de cacao)	B (Estados foliares)	Medias	n	E.E.	
a3	b2	1,99	4	0,05	A
a3	b1	1,13	4	0,05	B
a2	b2	0,98	4	0,05	B C
a2	b1	0,90	4	0,05	B C
a1	b1	0,80	4	0,05	C
a1	b2	0,76	4	0,05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXOS DE FOTOGRAFIA



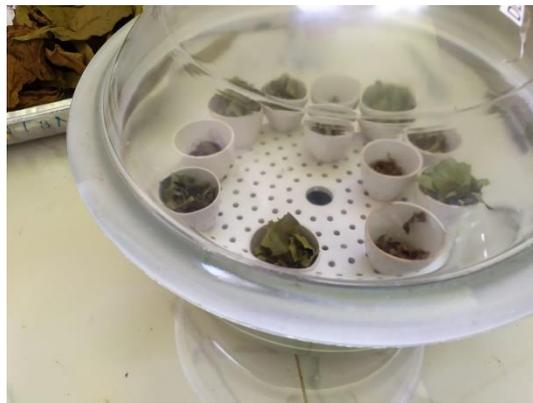
Recolección de la materia prima



Determinación de grasa



Determinacion de cenizas



Determinacion de humedad