



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO MAGÍSTER EN AGROINDUSTRIAS DE CUARTO NIVEL

MODALIDAD:

TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA:

POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN GRANOS DE CACAO EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO Y PISOS ALTITUDINALES DEL CULTIVO EN LA ZONA 4

AUTORA:

ING. DIANA MARIANELLA PINCAY FIGUEROA

TUTOR:

ING. GALO CEDEÑO GARCÍA, M. Sc

COTUTOR:

ING. CARLOS BANCHÓN, Mg.

CALCETA, AGOSTO 2019

DERECHOS DE AUTORÍA

DIANA MARIANELLA PINCAY FIGUEROA, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito 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.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

DIANA MARIANELLA PINCAY FIGUEROA

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

ING. GALO CEDEÑO GARCIA, M. Sc, certifica haber tutelado el trabajo de titulación **POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN GRANOS DE CACAO EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO Y PISOS ALTITUDINALES DEL CULTIVO EN LA ZONA 4**, que ha sido desarrollado por **DIANA MARIANELLA PINCAY FIGUEROA**, previa la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. GALO CEDEÑO GARCIA, M. Sc

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN GRANOS DE CACAO EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO Y PISOS ALTITUDINALES DEL CULTIVO EN LA ZONA 4**, que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por **DIANA MARIANELLA PINCAY FIGUEROA**, previa la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Ing. Benito Valarezo Valdez, PhD

MIEMBRO

Ing. Sofia Velásquez Cedeño, M.Sc

MIEMBRO

Ing. Ely Sacón Vera, PhD

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A Dios, porque estoy firmemente segura que esto ha sido posible solo por su voluntad y su provisión.

A mi alma mater, la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me ha dado una educación superior de calidad tanto de pregrado como posgrado, a través de sus excelentes docentes con lo cual he forjado mis conocimientos profesionales.

A mi tutor, por su acertada orientación, por el profesionalismo y ánimo demostrado, por el tiempo dedicado y el aporte crítico que permitió un buen aprovechamiento en el desarrollo de la investigación.

A mi cotutor por su valiosa asesoría y su apoyo incondicional.

A mis muy estimadas ingenieras Katerine Loor y Mercedes Solórzano porque estoy segura que ellas fueron el instrumento que Dios uso para que fuera posible que yo realizaré mis estudios de posgrado.

Al ingeniero Paúl Cedeño por estar conmigo en todas las etapas de mi investigación.

DIANA MARIANELLA PINCAY FIGUEROA

DEDICATORIA

A mis cuatro pilares que no permitieron que cayera o renunciara en el proceso, Dios que me demostró que cuando ya no tenía fuerzas contaba con su poder, mi madre y mi padre los motores que me impulsan a mejorar cada día y me han apoyado con todo lo que tienen y lo que son, a mis hermanas que al igual que mis padres son las primeras en celebrar mis logros y con las que puedo contar en cualquier circunstancia, a mi amado esposo que ha estado conmigo incondicionalmente dejándome volar en busca de mis sueños y uniéndose a mí en el camino.

A mis queridos amigos, Sandra, Yandry y Juan Carlos con los que además de compartir muchas madrugadas estudiando, compartimos momentos que afianzaron nuestros lazos de amistad que sé, que permanecerán por siempre.

DIANA MARIANELLA PINCAY FIGUEROA

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA.....	i
CERTIFICACIÓN DE TUTOR.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO GENERAL	vii
CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS	ix
RESUMEN	x
PALABRAS CLAVE	x
ABSTRACT	xi
KEY WORDS.....	xi
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Planteamiento y formulación del problema	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
1.4. Hipótesis	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Producción de cacao en el Ecuador	4
2.2. Genotipos y factores agroclimáticos del cultivo de cacao.....	5
2.2.1. Genotipos de cacao	5
2.2.2. Factores agroclimáticos que influyen en el cultivo de cacao	6
2.3. Polifenoles y capacidad antioxidante.....	10
2.3.1. El cacao: fuente de polifenoles	10
2.3.2. Capacidad antioxidante de polifenoles en granos de cacao	12

2.3.3.	Determinación de la composición fenólica total y capacidad antioxidante	13
2.4.	Materiales genéticos y pisos altitudinales que se evaluaron.....	14
2.4.1.	Material genético	14
2.4.2.	Pisos altitudinales.....	16
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO		18
3.1.	Ubicación.....	18
3.2.	Duración.....	18
3.3.	Factores de estudio	18
3.4.	Tratamientos	19
3.5.	Diseño experimental y análisis estadístico.....	19
3.6.	Unidad experimental.....	20
3.7.	Manejo del experimento	20
3.7.1.	Muestreo	20
3.7.2.	Preparación de la muestra	20
3.7.3.	Desengrase y extracción	20
3.7.4.	Preparación del extracto de polifenoles de la muestra de granos de cacao	21
3.7.5.	Preparación de disoluciones patrón de ácido gálico para cuantificación de polifenoles totales	21
3.7.6.	Preparación de la curva de calibración para determinar capacidad antioxidante	22
3.8.	Variables respuestas: métodos y técnicas	22
3.8.1.	Determinación de polifenoles totales (variable y1: mg de ácido gálico eq/100 g (mg eag/100 g)).....	22
3.8.2.	Determinación de la capacidad antioxidante (variable y2: mg trolox eq/g muestra (mg et/100 g)).....	23
3.8.3.	Correlación del contenido polifenólico total y la capacidad antioxidante	23

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Mapa georeferencial de pisos altitudinales de los genotipos muestreados del cultivo de cacao	24
4.2. Polifenoles totales y su capacidad antioxidante en granos de cacao.....	25
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
5.1. Conclusiones.....	30
5.2. Recomendaciones.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXOS.....	38

CONTENIDO DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS:

1: Tratamientos (Combinación de los niveles de los factores).....	19
2: Esquema ADEVA	19
3.: Efecto de los factores genéticos, pisos altitudinales e interacción sobre el contenido polifenólico total y capacidad antioxidante en granos de cacao (medias*).....	25
4: Coloración de las almendras de granos de cacao de los genotipos evaluados	28

FIGURAS:

1: Mapa georeferencial de pisos altitudinales de la toma de muestra de los genotipos de cacao	24
2: Correlación del contenido de polifenoles totales vs capacidad antioxidante.....	29

RESUMEN

Evaluar el contenido polifenólico y su capacidad antioxidante en granos de tres materiales genéticos de cacao a tres niveles altitudinales en la zona 4, fue el principal objetivo de esta investigación. Se recolectó muestras aleatorizadas de mazorcas maduras provenientes de árboles adultos de 3 materiales genéticos de cacao: EET 103, Complejo Nacional x Trinitarios y CCN 51; en tres pisos altitudinales: bajo (14 msnm), medio (165 msnm) y alto (379 msnm). El experimento se desarrolló bajo un DCA en arreglo factorial A (materiales genéticos de cacao) x B (pisos altitudinales) con cuatro replicas a un nivel de confianza del 95%. El mayor contenido polifenólico y la menor capacidad antioxidante frente al radical DPPH correspondieron a la variante ETT-103, en piso medio (165 msnm) y en lo que respecta a la interacción a ETT-103 con piso bajo (14 msnm) quedando así establecido que los factores evaluados si influyeron significativamente en las variables respuestas evaluadas y adicionalmente de determinó una correlación inversa con un coeficiente de determinación R^2 de 0,92 entre ellas. Se concluye que el contenido polifenólico total y su capacidad antioxidante en cacao varía con el genotipo, el piso altitudinal del cultivo, además, la capacidad antioxidante disminuye conforme los polifenoles aumentan.

PALABRAS CLAVE

Cacao, material genético, pisos altitudinales, polifenoles totales y capacidad antioxidante.

ABSTRACT

Evaluating the polyphenolic content and antioxidant capacity in beans of three cocoa genetic materials at three altitudinal levels in zone 4 was the main objective of this research. Randomized samples of mature cobs from adult trees were collected from three cocoa genetic materials: TSE 103, National Complex x Trinitarians and CCN 51; in three altitudinal levels: low (14 masl), medium (165 masl) and high (379 masl). The experiment was developed under a DCA in factorial arrangement A (cocoa genetic materials) x B (altitudinal floors) with four replicas at a 95% confidence level. The higher polyphenolic content and the lower antioxidant capacity against the radical DPPH corresponded to the variant ETT-103, in medium floor (165 msnm) and with respect to the interaction to ETT-103 with low floor (14 msnm) being thus established that the factors evaluated if they influenced significantly in the variables evaluated responses and additionally of determined an inverse correlation with a coefficient of determination R² of 0.92 between them. It is concluded that the total polyphenolic content and its antioxidant capacity in cocoa varies with the genotype, the altitudinal floor of the crop, in addition, the antioxidant capacity decreases as the polyphenols increase.

KEY WORDS

Cocoa, genetic material, altitudinal floors, total polyphenols, and antioxidant capacity.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La motivación de progresivo interés que actualmente incita a la investigación de componentes naturales presentes en vegetales y frutas son sus propiedades funcionales, es decir, que además de nutrir proporcionan beneficios en la salud.

El contenido y propiedades de los polifenoles en granos de cacao son complejos y variados lo que incide en la heterogeneidad de la calidad de los productos procesados derivados de ellos, tanto en sus características sensoriales, nutricionales y fisicoquímicas.

Los polifenoles se asocian con procesos de maduración de plantas y tejidos, mecanismos de defensa, y características importantes de productos alimenticios de origen vegetal; se destacan por ser atractivos en el campo de la nutrición, la salud y la medicina, debido a evidencias de que pueden actuar como potentes antioxidantes, anticancerígenos, antifúngicos, antiinflamatorios, antitrombóticos, antimutagénicos, antibacteriales, analgésicos y modular rutas metabólicas importantes en mamíferos (Quiñones, Trujillo, Capdesuñer, Quirós y Hernández de la Torre, 2013).

Identificar la composición cualitativa y cuantitativa de estos compuestos polifenólicos en cacao, incluso dentro de una misma especie, es muy diverso y depende de muchos factores, tales como: genotipo, área de árboles de cacao cultivado, condiciones climáticas durante el crecimiento, manejo del cultivo, tiempo de almacenamiento después de la cosecha, madurez de los granos; procesamientos tecnológicos de los granos y sus derivados a temperaturas relativamente altas que afectan negativamente el contenido; además de las condiciones fisicoquímicas, microbiológicas y los cambios organolépticos dan como resultado una disminución considerable de su concentración (Oracz, Zyzelewicz y Nebesny, 2015).

El MAGAP (2017) indica que la Zona 4 está constituida por las provincias de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas y el cultivo de cacao representa el 37% de los productos prioritarios de la zona; además expresa también que los

cultivos de cacao son muy heterogéneos en cuanto al genotipo y los pisos altitudinales, hallándolos desde el nivel del mar hasta los 625 msnm de altitud.

Ante lo expuesto se plantea la siguiente pregunta: En función del genotipo y los pisos altitudinales del cultivo de cacao en la Zona 4, ¿cuánto varía el contenido de polifenoles totales y su capacidad antioxidante?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Los polifenoles forman el mayor grupo de compuestos entre los antioxidantes naturales, que en gran parte afectan la actividad antioxidante general y anti-radicales libres de los granos de cacao. La composición cualitativa y cuantitativa de los compuestos polifenólicos y su actividad antioxidante ha sido demostrado en estudios que varían en función del genotipo y que incluso en una misma especie resultan ser muy diversa por la influenciada de factores externos como las condiciones agroecológicas, aunque no se ha profundizado en la evaluación de estos factores, pero si se lo ha realizado en cultivos se café (Oracz *et al*, 2015). Mientras que Lara y Vaast (2007) en su estudio realizado en café demostraron que si existe influencia en el contenido de polifenoles en función de la altura donde se encuentra el cultivo.

Una de las principales razones que promovieron la domesticación y uso alimentario de los granos de cacao por los pueblos precolombinos de Mesoamérica, incluso hoy en día, son: el sabor y aroma; características ligadas estrechamente al contenido de polifenoles; compuestos químicos, precursores de aroma, determinantes y responsables de su calidad sensorial, pues inciden de manera directa en el sabor y palatabilidad (Vázquez, Obando, Adriano, Betancur y Salvador, 2016).

Numerosos estudios en los últimos años, confirman los efectos fructuosos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular; tales efectos son consecuencia de sus propiedades antioxidantes que atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), efectos vasodilatadores y demás son capaces de mejorar el perfil lipídico (Quiñones *et al.*, 2013).

El conocimiento actual de los beneficios de salud aportados por muchas sustancias de origen natural, y los adelantos técnicos que permiten la detección,

la cuantificación y el análisis de las propiedades químicas y biológicas de estas sustancias, ha posicionado a muchos alimentos y productos naturales en el rango de beneficiosos para la salud. El chocolate es justamente uno de ellos, y el beneficio de su consumo se asocia directamente con el poder antioxidante de sus componentes (Valenzuela, 2007).

Siendo el cacao un producto agrícola de gran valor resulta importante generar información con respecto a la variabilidad de los metabolitos fundamentales como los polifenoles y su capacidad antioxidante, previa a su industrialización y a la vez forjar pautas en la investigación de procesos que permitan conservarlos durante todas las etapas hasta el producto terminado.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante en granos de cacao en función del genotipo y pisos altitudinales del cultivo en la Zona 4.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar el contenido de polifenoles totales en granos de tres genotipos de cacao establecidos en tres pisos altitudinales de la Zona 4.
- Determinar la capacidad antioxidante en granos de tres genotipos de cacao establecidos en tres pisos altitudinales de la Zona 4.

1.4. HIPÓTESIS

El contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante en granos de cacao varía con el genotipo y los pisos altitudinales del cultivo en la Zona 4.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. PRODUCCIÓN DE CACAO EN EL ECUADOR

Según la nueva distribución territorial realizado por la Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo, la producción de cacao se realiza a lo largo del territorio nacional excepto en las zonas de Carchi, Imbabura correspondientes a la Zona 1 y en la Zona 3 Tungurahua. La mayor producción de cacao se encuentra en las zonas de Guayas, Los Ríos en la Zona 5, Manabí en la Zona 4, y en la Amazonía su producción es en todo su territorio, concentrándose en Sucumbíos, Orellana y Napo (León, Calderón y Mayorga, 2016).

2.1.1. PRODUCCIÓN DE CACAO EN LA ZONA 4

Según el MAGAP (2017), la Zona 4 está integrada por las provincias de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas y posee un área de 22.463,46 Km² de acuerdo con Instituto Geográfico Militar (IGM), la cual representa el 8,73% del territorio ecuatoriano. El cultivo de cacao representa el 36,62%, considerado de gran importancia económica; seguido por el maíz duro seco con el 23,60%, el plátano con 18,47%, café con el 16,27%, y arroz con 5,04%, respecto a la producción en la zona.

De las dos provincias que conforman la Zona 4, el cultivo de cacao en Manabí es más antiguo que además de que es un rubro de gran importancia en el contexto agrícola con 100.961 hectáreas y genera una gran dependencia del funcionamiento de los eslabones de la cadena de valor que genera (MAGAP, 2016).

En Santo Domingo de los Tsáchilas hasta hace unos años no se apostaba al cultivo de cacao, existían pocas hectáreas de cultivos y con nula tecnificación en cuanto al manejo; en el 2012 según el MAGAP, el cultivo había ganado terreno en el mapa de producción nacional gracias a los avances técnicos y los proyectos de capacitación; y para esa fecha la provincia formaba parte del top de producción nacional, ocupando el quinto lugar, con 19.837 hectáreas sembradas y 13.603 hectáreas de superficie cosechada; es decir, por debajo de Manabí, Los

Ríos, Guayas y Esmeraldas (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao [ANECACAO], 2015).

2.2. GENOTIPOS Y FACTORES AGROCLIMÁTICOS DEL CULTIVO DE CACAO

2.2.1. GENOTIPOS DE CACAO

Genéticamente el cacao se divide en tres grandes grupos: los Criollos, los Forasteros, y una mezcla de ellos que se les denomina Trinitarios.

- **CACAO CRIOLLO**

Tipo genético de cacao cuyo cultivo se dispersó desde México a Centro América, de alta calidad y sabor agradable. Ha sido domesticado y adaptado a diferentes zonas; de poca productividad y susceptible a enfermedades, presenta una almendra de color blanco, con sabor y aroma a chocolate, superior a cualquier tipo de cacao en el mundo, teniendo gran demanda. El cacao criollo es muy fino, relativamente suave de poco astringentes y de sabor amargo, son suficientes 3 días para su fermentación (Cerrato, 2015).

- **CACAO FORASTEROS (AMAZÓNICOS)**

Variedad originaria de la cuenca del Amazonas, son árboles robustos y grandes, almendras aplanadas y pigmentadas, tolerantes a plagas y se adaptan muy bien a diversos ambientes. Se caracteriza principalmente porque las mazorcas cuando están inmaduras son de color verde y al madurar se tornan de color amarillo. Sus almendras son pequeñas, aplanadas y de color morado en estado maduro, de este tipo de cacao se obtiene un chocolate con sabor básico de cacao, además es un cacao muy común ya que el 90% de la producción mundial es de este tipo (Guillín y Lara, 2010).

- **CACAO TRINITARIOS**

Es el cacao que más se cultiva en América. Se le considera como un híbrido natural proveniente de los dos primeros tipos de cacao criollo y forastero, por esta razón presentan una gran variabilidad y es donde han surgido excelentes genotipos de gran resistencia a plagas y mayor rendimiento. El nombre

Trinitarios viene de Trinidad, isla de las Antillas Menores (Guido, Martínez y Valdivia, 2016).

- **CACAO NACIONAL**

Si bien es cierto en el Ecuador se lo ubica en el grupo de los forasteros amazónicos el cacao Nacional se diferencia por tener características únicas como el sabor, aroma y calidad lo que le ha representado al país la adjudicación de una denominación de origen; además de que en su morfología interna las almendras son de color violeta, pálido o lila, aunque en ocasiones se encuentran almendras de color blanco. En la parte externa las mazorcas son amelonadas de color amarillo con estrangulaciones en la base y la corona, posee surcos y lomos poco profundos. Este cacao se lo utiliza para la obtención de los mejores chocolates del mundo por su aroma floral y su sabor (Vera *et al.*, 2014).

- **CACAO CCN-51 (COLECCIÓN CASTRO NARANJAL)**

El clon CCN51 fue seleccionado y estudiado por Homero Castro hace más de 30 años, investigó la población de cacao del alto Amazonas del Ecuador, coleccionando material genético para usarlos en programas de cruzamiento con variedades Trinitarias y otros cultivos, buscando un clon de alta calidad y gran productividad resistente a las enfermedades. Este clon es el resultado del cruce de los clones ICS 95 y el IMC 67 en 1965 en la zona de Naranjal en la hacienda "Soff" (Navia y Pazmiño, 2012).

2.2.2. FACTORES AGROCLIMÁTICOS QUE INFLUYEN EN EL CULTIVO DE CACAO

Las condiciones medioambientales de la zona donde se cultiva cacao es un factor determinante en cuanto al crecimiento, desarrollo y la buena producción del cacao. Es por ello que los factores climáticos influyen en la producción de una plantación; por lo tanto, las condiciones térmicas y de humedad deben ser satisfactorias para el cultivo por ser una planta perenne y que su período vegetativo como: la época de floración, brotamiento y cosecha está regulado por el clima cuya relación del transcurso climático y el periodo vegetativo que permiten establecer los calendarios agroclimáticos (Yáñez, 2015).

La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario [AGROCALIDAD] (2016) manifiesta que las condiciones ambientales bajo las cuales debe manejarse el cultivo de cacao son primordiales antes de instalar una plantación, para lo cual es importante considerar las siguientes condiciones climáticas:

- **PRECIPITACIÓN O LLUVIA**

Las zonas cacaoteras se encuentran en zonas con precipitaciones anuales entre 1.250 y 3.000 mm anuales. El rango para su mejor desempeño comercial está entre 1.500 y 2.000 mm, en zonas con precipitación superior a los 2.500 mm aumenta el riesgo de incidencia de enfermedades y de saturación de agua en el suelo, disminuyendo la disponibilidad de nutrientes del suelo sembrado con cacao. Si el promedio de precipitación anual cae por debajo de 1.200 mm el cacao se cultiva con éxito solo aplicando riego suplementario. En sitios con alto nivel freático como los bancos de ríos, demanda menor frecuencia del riego (Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura [IICA], 2017).

- **LA HUMEDAD ATMOSFÉRICA**

Por el hecho de haber evolucionado como especie en el ambiente cálido-húmedo de la selva tropical, a la sombra de árboles más altos, el cacao es una especie muy sensible a la falta de agua. Una atmósfera cálida y húmeda son las indicadas u óptimas para el cultivo de cacao, pero esto también conlleva a desarrollar enfermedades por hongos, por lo que una humedad elevada es particularmente deseable cuando es insuficiente el agua utilizable del suelo porque permite disminuir la transpiración de la planta, además existen otros factores que deben ser controlados como los vientos y la sombra para mantener una humedad atmosférica ideal (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2010).

- **LA LUZ Y EL PAPEL DEL SOMBRAJE**

Palacios, (2008) considera que la planta de cacao es típicamente de sombra porque en su área de origen normalmente está abrigado bajo la densa sombra de la selva tropical; por lo que las radiaciones luminosas juegan un papel muy importante en su fisiología por lo que hay que tomar cuidados para evitar un

exceso de luz. La sombra actúa como regulador térmico, constituye un seguro de vida para las plantaciones. En los casos más desfavorables el sombrote en las plantaciones no debe superar el 50% de la luz, puede ser más ligero si la planta es más densa.

- **LA TEMPERATURA**

La temperatura, así como sus fluctuaciones estacionales o diarias afectan a varios de los más importantes procesos fisiológicos del cacao. Una de las partes del árbol que depende de esto son las flores, cuando la temperatura es inferior a 21°C la floración es muy reducida, pero es mucho más abundante cuando la temperatura nocturna no sobrepasa los 27°C. De igual manera temperaturas constantes de 30°C día y noche impide la floración, es decir la temperatura óptima es mantener alrededor de los 25°C no bajar de los 21°C y no sobrepasar los 30°C. Las condiciones de temperatura son particularmente buenas en las cercanías de la línea ecuatorial y a baja altitud (Alvaro y Azócar, 2002).

- **VIENTOS**

El cacao es una planta muy sensible al viento. A medida que la velocidad del viento se incrementa, por ejemplo, más allá de 5m/segundo, aumenta la transpiración y probabilidad de daño directo a las hojas. La duración e intensidad del viento puede variar de un lugar a otro y el principal efecto de los vientos fuertes es que causan la defoliación del cacao. En áreas expuestas a vientos frecuentes, el cultivo requiere de cortinas rompe-vientos para su desarrollo normal. Estas deben alinearse de manera perpendicular a la dirección del viento y tener en cuenta la topografía del terreno (IICA, 2017).

- **LATITUD**

La mayoría de las plantaciones de cacao están localizadas entre los 10° de latitud norte y sur de la línea ecuatorial; no obstante, algunas se han extendido hasta los 20°. Los paralelos más apropiados para cacao son entre el 22° N y 21° S (Avendaño *et al.*, 2011).

- **ALTITUD**

La planta se adapta desde los 4 msnm a los 800 msnm, considerándose idónea aquella entre los 10 msnm y los 400 msnm. El cacao no debería cultivarse por encima de una altura de 700 msnm; sin embargo, existen plantaciones situadas entre 1.000 msnm y 1.300 msnm con buenos resultados económicos. Parece ser que las temperaturas bajas son la principal dificultad de altitudes elevadas. Aunque el cultivo de cacao, se desarrolla en algunas zonas con altitudes de hasta 1.000 metros como límite superior sobre el nivel del mar, su potencial óptimo se encuentra por debajo de los 600 metros (Avendaño *et al.*, 2011).

AGROCALIDAD (2016) manifiesta que a medida que los cultivos de cacao se alejan del eje de la línea ecuatorial y la altura aumenta, se obtienen excelentes resultados en cuanto a la producción, razón por la que el cultivo se ha extendido hasta los 20° de latitud Norte o Sur, a veces incluso algo más allá.

En la actualidad no se han desarrollado investigaciones en como los factores agroclimáticos, como la altitud en la que se manejan los cultivos de cacao influye en la calidad de los granos, sin embargo, comparte la características comunes con el cultivo de café de producir los mismos metabolitos secundarios como teobromina, cafeína y polifenoles aromáticos; y en los cultivos de café la altitud si ha sido considerada en la evaluación como fuente de variabilidad en la producción de polifenoles y su capacidad antioxidante.

Ferreira, Queiroz, Silvac, Simões y Correa (2016) determinaron las diferencias entre los granos de café evaluados con base en nivel de altitud, variedades y exposición al sol; de manera individual, es decir como un solo factor de influencia no se asocian a su calidad; pero si la interacción de los factores.

Avelino *et al.* (2005) afirma que, a pesar de la limitada amplitud de altitudes muestreadas en su investigación para evaluar la influencia en características de sabor, si obtuvieron una relación positiva y significativa en cuanto a la acidez, probablemente a mayores altitudes aumenta.

Lara y Vaast (2007) establecen que la altitud es un factor determinante por su fuerte influencia en los rasgos físicos, organolépticos, calidad y composición

bioquímica en granos de café. La altitud favorece en la producción de frijoles de gran tamaño y peso; la composición de materia grasa aumenta la intensidad de las características organolépticas como aroma, cuerpo, acidez y sabor.

2.3. POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los compuestos polifenólicos, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados como metabolitos secundarios. Caracterizados por la presencia de más de un grupo fenol por molécula, estas moléculas son importantes para la fisiología de las plantas porque contribuyen a la resistencia al ataque de microorganismos, insectos y ayudan a preservar su integridad debido a su exposición a ambientes estresantes incluyendo radiaciones ultravioletas y temperaturas relativamente altas (Condezo, 2010).

Los polifenoles junto con otras moléculas son responsables de la astringencia poco deseable en derivados como cacaos, pero también de propiedades antioxidantes deseables por los consumidores (Vázquez *et al.*, 2016).

2.3.1. EL CACAO: FUENTE DE POLIFENOLES

Gil (2012), menciona que los polifenoles ocupan un lugar muy importante entre los antioxidantes naturales, por lo que una gran variedad de alimentos de origen vegetal, tanto en su estado natural como procesados, constituyen una fuente variable pero importante de antioxidantes. El cacao y sus productos derivados se caracterizan por tener una alta porción de estos compuestos, encontrándolos almacenados en todas las partes de la planta y particularmente en sus granos en las células pigmentadoras de los cotiledones, y dependiendo del contenido de antocianinas influyen en la tonalidad púrpura oscura. Los grupos de polifenoles más abundantes en cacao son metabolitos tipo flavonoides: catequinas 37%, antocianinas 4%, proantocianidinas 58%.

Para Suazo (2012), aunque en la semilla de cacao se encuentran diversos compuestos, los de interés son aquellos que pertenecen a los flavonoides, que han adquirido notoriedad por la actividad biológica que ejercen en la salud del hombre que, al consumirlos a través de derivados del cacao, ejercen funciones

anti inflamatorias, antioxidantes y por tanto preventivas ante diversas enfermedades como las del tipo cancerígenas.

El mismo autor estima que del total de polifenoles en granos de cacao, el 60% son flavanoides (monómeros individuales: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas; y procianidinas: (+)- catequinas y (-)-epicatequinas condensadas y, aunque actualmente estos compuestos son objeto de mucha investigación, existe consenso sobre su efecto antioxidante y, su influencia en varios procesos bioquímicos y fisiológicos del ser humano.

El contenido de antioxidantes en granos de cacao es superior a los del vino y el té y algunos polifenoles identificados de cacao y subproductos son catequinas, flavonoides, antocianinas y procianidinas, Estudios in vitro demuestran que los polifenoles del chocolate tienen capacidad de controlar reacciones de oxidación del LDL o de daños oxidativos al ADN (López y Banilla, 2016).

La cantidad de polifenoles presentes en el grano de cacao depende de: la variedad de los granos, la región de cultivo y el manejo pos cosecha durante la fermentación y secado (Acevedo, Mejía, Acostado, Valencia y Penados, 2017).

La semilla es el órgano del que se produce el chocolate, alimento rico en compuestos fenoles, que pueden estar relacionados con que la síntesis de estos compuestos se realiza tempranamente en las hojas, después se promueve por sus diferentes funciones y se almacena una gran parte en la semilla; contribuyen con 12 a 18% de la masa seca en su contenido de polifenoles a los que se los asocia con el color y el sabor del chocolate (Quiñones *et al.*, 2013).

Un estudio realizado por los mismos autores, al evaluar el contenido de polifenoles totales de los extractos de semillas de 7 clones (datos no mostrados), expresados como equivalentes de ácido clorogénico; arrojó que el comportamiento de los 7 clones fue diferente, lo cual indica que el genotipo influye en el contenido de esos compuestos en *T. cacao*.

Oracz *et al.* (2015) mencionan que la variedad Forastero es una de las variedades más rica en compuestos polifenólicos con respecto a otras y que en los últimos años diversos autores han demostrado que el cacao y sus productos

son alimentos ricos en polifenoles que contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante.

2.3.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIENOLES EN GRANOS DE CACAO

Según Condezo (2010), los antioxidantes son sustancias, que a bajas concentraciones reducen, retrasan o previenen la oxidación de un sustrato significativamente; prolongan la vida útil de los alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la oxidación, inhiben la propagación de radicales libres por eso son utilizados para prevenir el deterioro de los alimentos, evitando la rancidez de las grasas y los cambios de color.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos está basada en su capacidad para donar átomos de hidrógeno a radicales libres. Muchos compuestos polifenólicos, particularmente flavonoides, exhiben un amplio rango de efectos biológicos. Estudios verifican que algunos de esos compuestos son potentes asimiladores de radicales libres y como tales, útiles en la prevención de arterioesclerosis, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y artritis (Quiñones *et al.*, 2013).

La capacidad antioxidante en granos de cacao varía según la variedad botánica, variables ambientales, factores de manufactura como: manejo pos cosecha, fermentación, secado y tostado. Además, el contenido de polifenoles totales es un factor predominante en la capacidad antioxidante, es decir, si existe mayor presencia de polifenoles totales, mayor actividad antioxidante o menor, quedando demostrada la importancia de los polifenoles en las propiedades funcionales del cacao (Nazario, Ordoñez, Mandujano y Arévalo, 2014).

Zapata, Tamayo y Rojano (2015) expresan que la capacidad antioxidante aumenta significativamente en función de la variedad de los clones de cacao en las diferentes etapas del proceso de industrialización.

2.3.3. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA TOTAL Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La cuantificación de polifenoles totales y la capacidad antioxidante se realiza a los extractos de granos de cacao, para así precisar la concentración natural de los polifenoles totales y capacidad antioxidante. Para cuantificar polifenoles totales en los extractos de la semilla, se empleará el clásico método de FOLIN-CIOCALTEU y, DPPH para determinar la capacidad antioxidante.

- **CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES-ENSAYO FOLIN-CIOCALTEU**

Se basa en que el contenido en compuestos fenólicos totales de productos vegetales a un pH básico reacciona con el reactivo Folin-Ciocalteu; el cual está formado por mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3HW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). Los fenoles contenidos en la muestra se oxidan ocasionando la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico y se expresa en mg Eq de ácido gálico/100 g de muestra (Leyva, 2009).

Además, el autor mencionado manifiesta que el contenido en compuestos fenólicos totales de productos vegetales a un pH básico reacciona con el reactivo Folin-Ciocalteu; el cual está formado por mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3HW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). Los fenoles contenidos en la muestra se oxidan ocasionando la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico y se expresa en mg Eq de ácido gálico/100 g de muestra.

Gil (2012) describe el método Folin-Ciocalteu que consiste en: preparar una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración sea de 0 a 16 ppm y una mezcla de agua bidestilada, con la muestra tratada con fluoruro de sodio para inhibir la degradación de los polifenoles, una solución de carbonato

de sodio 20 % y reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M. La mezcla se incubó 120 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, transcurrido el tiempo se registra la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro; la oxidación de los polifenoles presentes en la muestra causa la coloración azulada que se cuantifica en base a la recta patrón de ácido gálico con el fin de expresar los resultados en términos de mg de ácido gálico Eq/100 g de muestra (mg EAG/100 g).

- **CAPACIDAD ANTIOXIDANTE: MÉTODO ABTS**

Este método se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini y Fett, 2005).

Entre las ventajas de este método está que los valores de equivalentes de Trolox, de una amplia gama de alimentos están reportados, lo que permite establecer comparaciones; adicionalmente puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica, además de que el ABTS es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. También el ABTS no es un radical fisiológico, por lo que el punto final de medición de la reacción no se fija arbitrariamente y en función de la cinética de reacción de algunos antioxidantes como otros métodos (Londoño, 2012).

2.4. MATERIALES GENÉTICOS Y PISOS ALTITUDINALES QUE SE EVALUARON

2.4.1. MATERIAL GENÉTICO

A nivel botánico se reconocen tres grandes grupos de cacao que son: Criollos, Forasteros y Trinitarios, los materiales genéticos que se evaluarán son los que se describen a continuación:

- **COMPLEJO NACIONAL X TRINITARIO**

Actualmente en el Ecuador encontramos el 95% de la superficie cacaotera del país corresponde a complejo "Nacional x Trinitario" con cultivos que tienen más

de 50 años. Se caracteriza por su sabor y aroma básicamente, que son las que hacen al cacao ecuatoriano muy apetecido y puesto que no existe una caracterización de su composición molecular (Loyola, 2011).

A partir de la década de 1940, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP), a través del Programa Nacional de Cacao ha sumado esfuerzos para recolectar, estudiar y explotar el potencial del complejo “Nacional x Trinitario” mediante la selección de clones con características de interés (Escobar, 2008).

La coloración en los estambres de las flores varía entre rojo a amarillo pálido, fruto de forma amelonada de lomos pareados y lisos, en estado inmaduro es de color verde y maduro es amarillo, semilla de forma cilíndrica grande de color púrpura oscuro, su peso fermentada y seca de 1,05 g. Rinde aproximadamente 1250 Kg por hectárea, entre 16 y 17 mazorcas rinden 1 Kg de cacao fermentado seco, hay materiales susceptible a la escoba de bruja y monilla, tiene un contenido graso de 46,40% y los perfiles de sabor varían entre frutales y florales (Quiroz, Mestanza y Parada, 2015).

- **ETT-103**

Este clon es el resultado de una rigurosa selección fenotípica de la explotación del potencial del complejo “Nacional x Trinitario”, basada en los caracteres sabor, aroma, de producción y resistencia a enfermedades, tuvo lugar en varias fincas cacaoteras de la zona central, y el producto fue un grupo de seis clones comerciales (EET-19, EET-48, EET-62, EET-95, EET-96, y EET-103) que son distribuidos desde 1978 (Escobar, 2008).

Este clon se caracteriza por adaptarse a todas las zonas de producción, la pigmentación roja de los estambres de las flores, la mazorca es de forma amelonada, lomos pareados y rugosos, la semilla tiene forma cilíndrica, grande de color púrpura oscuro, su peso fermentada y secada es de 1,5 g. Su rendimiento es de 2000 Kg por hectárea, 18 a 20 mazorcas fermentadas y secas rinde 1 Kg, susceptible a la escoba de bruja, medianamente susceptible a la monilla; sabor frutal medio, aroma floral bajo y 48% de grasa (Quiroz, Mestanza y Parada, 2015).

- **CCN-51**

El clon CCN51 fue seleccionado y estudiado por Homero Castro hace más de 30 años, investigó la población de cacao del alto Amazonas del Ecuador, coleccionando material genético para usarlos en programas de cruzamiento con variedades Trinitarias y otros cultivos, buscando un clon de alta calidad y gran productividad resistente a las enfermedades (Quintana y Gómez, 2011). Navia y Pazmiño (2012) señalan que este clon es el resultado del cruce de los clones ICS 95 y el IMC 67 en 1965 en la zona de Naranjal en la hacienda “Soff”, se han realizado diversos análisis del grano de cacao del CCN51, comparándolo con el cacao de las huertas tradicionales, con excelentes resultados.

Se adapta a todas las zonas de producción, la pigmentación de los estambres de la flor es blanca, la mazorca es de forma cundeamor, en estado inmaduro es de color púrpura oscuro y maduro es rojo con halos amarillos, la semilla tiene forma achatada, grande de color purpura a violeta, rinde 1,6 g fermentada y seca. Rinde 2500 Kg por hectárea, susceptible a la roselline, moderadamente susceptible a la escoba de bruja, tolerante a la monilla y mal de machete, perfiles de sabor son básicos (Quiroz, Mestanza y Parada, 2015).

2.4.2. PISOS ALTITUDINALES

Las características climatológicas de los pisos altitudinales que se evaluarán se describen a continuación según (Weather Spark, s.f.):

- **NIVEL BAJO - CANTÓN BOLÍVAR (10-150 msnm)**

Este piso altitudinal se caracteriza porque la temperatura se encuentra entre 21°C la mínima promedio y la máxima es de 32°C, con 12 horas de luz natural con una energía solar entre 5,5 y 6,7 kWh; la humedad en los meses de invierno es elevada casi del 100% y en los meses de verano oscila entre el 48% y 61%; los vientos tienen velocidades promedio entre 11,9 kilómetros por hora y 14,7 kilómetros por hora. Las coordenadas geográficas son Latitud: -0,846°, Longitud: -80,164°.

- **NIVEL MEDIO - CANTÓN EL CARMEN (151-300 msnm)**

Entre las características de este nivel altitudinal tenemos que las épocas secas son mucho más lluviosas que los inviernos, la temperatura mínima promedio 22°C y la máxima 31°C, las precipitaciones son de 1532 mm al año, cuenta con 12 horas de luz natural con una energía solar entre 6,1 y 5,1 kWh y; la humedad varía entre 37% y 90%, los vientos tienen velocidades promedio de 11,1 kilómetros por hora y 13,0 kilómetros por hora. Las coordenadas geográficas son Latitud: -0,353°, Longitud: -79,660°.

- **NIVEL ALTO - PROVINCIA SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS (301-450 msnm)**

A este nivel altitudinal tenemos un clima suave, y generalmente cálido y templado, una temperatura entre 17 y 27°C, la precipitación es de 872 mm al año, 12 horas de luz natural, la velocidad promedio de los vientos esta entre 12 y 61 kilómetros por hora, la humedad varía entre 25 y 65%. Las coordenadas geográficas son Latitud -0.25305 y Longitud -79.1753616.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

El trabajo de investigación se realizó tomando las muestras en las provincias de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas; la extracción de los granos de cacao en el laboratorio de poscosecha de la Carrera de Ingeniería Agrícola de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicada en Calceta-Bolívar–Manabí, geográficamente ubicada a 0°39´ de Latitud Sur y 80°10´ de Longitud Oeste, con una altitud de 15 msnm.

Los análisis de contenido de polifenoles totales y su capacidad antioxidante se realizaron en los laboratorios de la facultad de Investigación de Alimentos de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

3.2. DURACIÓN

Esta investigación se la llevó a cabo en un tiempo de 6 meses.

3.3. FACTORES DE ESTUDIO

Factor a (tres clones de cacao):

- a1: COMPLEJO NACIONAL X TRINITARIO
- a2: EET-103
- a3: CCN - 51

Factor b (pisos altitudinales):

- b1: Bajo, entre 10 y 150 msnm (cantón Bolívar)
- b2: Medio, entre 151 y 300 msnm (cantón Flavio Alfaro)
- b3: Alto, entre 301 y 450 msnm (provincia Santo Domingo de los Tsáchilas)

3.4. TRATAMIENTOS

Tabla 1: Tratamientos (Combinación de los niveles de los factores)

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
T1	EET 103-Bajo (cantón Bolívar)
T2	EET 103-Medio (cantón Flavio Alfaro)
T3	EET 103-Alto (provincia Santo Domingo de los Tsáchilas)
T4	Complejo NacionalxTrinitario-Bajo (cantón Bolívar)
T5	Complejo NacionalxTrinitario-Medio (cantón Flavio Alfaro)
T6	Complejo NacionalxTrinitario-Alto (Sto. Domingo de los Tsáchilas)
T7	CCN 5-Bajo (cantón Bolívar)
T8	CCN 51-Medio (cantón Flavio Alfaro)
T9	CCN 51-Alto (provincia Santo Domingo de los Tsáchilas)

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El experimento se desarrolló bajo un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) en arreglo factorial A (materiales genéticos de cacao) x B (pisos altitudinales) con cuatro réplicas.

Los datos fueron sometidos previamente a análisis de normalidad y homogeneidad, cumpliéndose estos se realizó un análisis de varianza (ADEVA) con un $\alpha=0,05$ y comparación de medias por Tukey al 95% de confianza en INFOSTAT versión libre 2018l.

Tabla 2: Esquema ADEVA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
TRATAMIENTOS	$(A \times B) - 1 = 8$
FACTOR A	$A - 1 = 2$
FACTOR B	$B - 1 = 2$
INTERACCIÓN AXB	$(A - 1)(B - 1) = 4$
ERROR	$(A \times B)(r - 1) = 27$
TOTAL	$(A \times B \times r) - 1 = 35$

3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se tomó 100 g de cotiledón molido de granos de cacao de cada uno de los materiales genéticos evaluados: EET-103, Complejo Nacional x Trinitarios y CCN-51; a tres pisos altitudinales: alto (provincia Santo Domingo de Tsáchilas), medio (cantón Flavio Alfaro) y bajo (cantón Bolívar) en la Zona 4 (Anexo 1).

3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO

3.7.1. MUESTREO

Para este estudio se recolectaron muestras aleatorizadas de almendras de mazorcas maduras de árboles adultos de 3 materiales genéticos de cacao: Complejo Nacional x Trinitarios, ETT-103 y CCN 51; a tres pisos altitudinales: alto (provincia Santo Domingo de Tsáchilas), medio (cantón Flavio Alfaro) y bajo (cantón Bolívar), en la Zona 4 ver anexo 1, georreferenciando cada uno de ellos.

3.7.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para evitar variaciones de humedad por el almacenamiento de las almendras de cacao se sometió a un secado controlado, posteriormente se procedió a extraer la muestra del embrión y a molerla (Anexo 2).

3.7.3. DESENGRASE Y EXTRACCIÓN

La muestra se extrajo convencionalmente a temperatura ambiente, en matraces de vidrio de fondo plano con una mezcla de acetona/agua en proporción 60:40 v/v, durante 1 hora con agitación continua a 200 rpm, posteriormente se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se filtró y llevó a 25 mL en un matraz aforado y almacenó a 4°C y protegido de la luz hasta que se realizó el análisis de polifenoles totales y actividad antioxidante según Gil (2012) (Anexo 3).

3.7.4. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE POLIFENOLES DE LA MUESTRA DE GRANOS DE CACAO

Se realizó la extracción de los compuestos fenólicos de cacao de la muestra (Anexo 3) conforme al procedimiento que describen García, Fernández y Fuentes (2015):

- En un tubo se tomó la cantidad adecuada de muestra y añadió metanol en relación 1:2.
- Adicionando fluoruro de sodio (NaF) 2 mM se inactivó la enzima polifenol oxidasa, previniendo la degradación de los polifenoles durante el ensayo.
- Homogenizando el contenido de los tubos en el vortex y centrifugando a 10000 rpm durante 15 minutos a 10°C y se recuperó el sobrenadante.

3.7.5. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN DE ÁCIDO GÁLICO PARA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

La disolución de ácido gálico se preparó según a lo que García *et al.* (2015) detalla preparando una disolución concentrada o madre de ácido gálico de 100 mg/L y a partir de esta disolución se prepararon 10 mL de disoluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido gálico entre 0 y 16 ppm procediendo de la siguiente manera:

- Se enumeró previamente los tubos de ensayo.
- A cada tubo se añadió la cantidad correspondiente de agua destilada.
- Luego a cada tubo se agregó también la cantidad correspondiente de ácido gálico.
- En vortex se agitó y mantuvo en oscuridad y en refrigeración.

Se homogenizó los matraces y mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas.

- Finalmente se midió la absorbancia a 765 nm.

3.7.6. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se preparó una solución patrón, disolviendo 2 mg de Trolox en 10 mL de metanol al 80%, de la que se obtuvieron diluciones de 5, 20 y 35 mg Trolox acorde al método descrito por Leyva (2009).

3.7.7. PREPARACIÓN DEL RADICAL ABTS^{°+} PARA DETERMINAR CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Según la metodología de Kuskoski *et al.* (2005) el radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico)) se forma tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (140 mM) incubados a temperatura ambiente y oscuridad por 16 h. Una vez formado el radical ABTS se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia entre 0,7 a 1,2nm.

3.8. VARIABLES RESPUESTAS: MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.8.1. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES (VARIABLE Y1: mg de ácido gálico Eq/100 g (mg EAG/100 g))

García *et al.* (2015) detalla lo siguiente (Anexo 4):

- De la muestra de los compuestos polifenólicos se tomó 3 mL y colocó en matraces aforados de 25 mL.
- Se añadió 15 mL de agua destilada y 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Homogenizado el contenido de los matraces se dejó reposar 8 minutos en oscuridad.
- Transcurrido este tiempo, se adicionó a cada matraz 3,75 mL de la disolución de carbonato sódico al 7,5% y llevó a un volumen de 25 mL con agua destilada.
- Se homogenizó los matraces y mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas y midió la absorbancia a 765 nm.

3.8.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (VARIABLE Y2: mg Trolox Eq/g muestra (mg ET/100 g))

Kukoski *et al.* (2005) para determinar la capacidad antioxidante describe (Anexo 5):

- En una cubeta de poliestireno se adicionó 10µL de la solución concentrada de polifenoles de cacao y 990µL del radical ABTS.
- Se mantiene en ambiente oscuro y luego se registró su absorbancia a 734 nm (Espectrofotómetro UV/VIS Genesys10, USA).
- Se registra la capacidad antioxidante después de 8 minutos en la que se observó el valor de absorbancia constante.
- El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la ecuación 3.1:

$$\% \text{Inhibición ABTS} = \frac{(A_c - A_m)}{A_c} * 100 \quad [3.1]$$

Donde:

Ac: Absorbancia de control

Am: Absorbancia de muestra (8 min)

La actividad antioxidante fue calculó en IC₅₀ que nos indica la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% del radical ABTS y se expresó en mg Trolox Eq/g muestra (mg ET/100 g).

3.8.3. CORRELACIÓN DEL CONTENIDO POLIFENÓLICO TOTAL Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizó análisis de correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de las muestras de cacao de los clones Complejo Nacional x Trinitario, ETT-103 y CCN-51 obtenidas en los tres pisos altitudinales del cultivo establecidos de la Zona 4.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MAPA GEOREFERNCIAL DE PISOS ALTITUDINALES DE LOS GENOTIPOS MUESTREADOS DEL CULTIVO DE CACAO

La figura 1, se muestran los puntos georreferenciados en la toma de las muestras en fincas productoras que poseen los tres materiales genéticos evaluados: Complejo Nacional x Trinitario, ETT-103 y CCN-51. En el mapa se resaltan los tres pisos altitudinales correspondientes a: punto bajo al cantón Bolívar a 14 msnm, el punto medio al cantón Flavio Alfaro a 165 msnm y el punto alto a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas a 379 msnm.

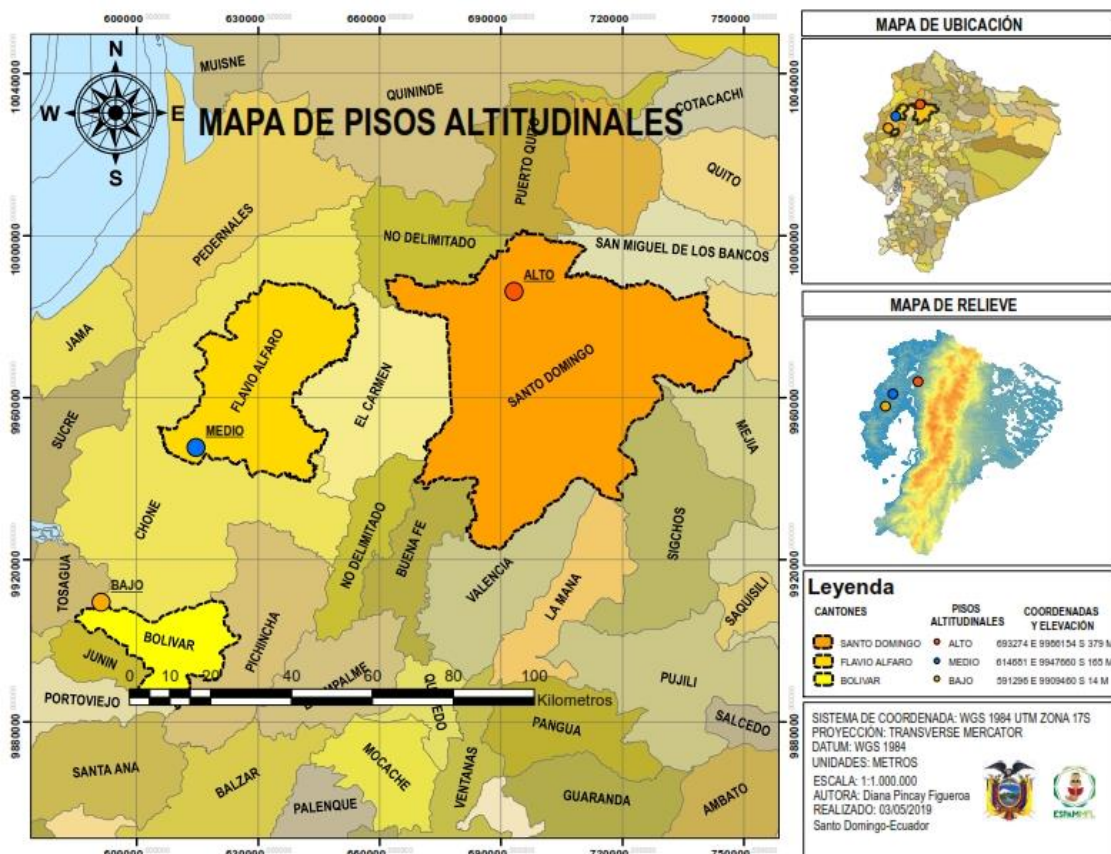


Figura 1: Mapa georreferencial de pisos altitudinales de la toma de muestra de los genotipos de cacao
Fuente: Ing. Diana Pincay e Ing. Veris Saldarriaga (CIIDEA, ESPAM-MFL)

4.2. POLIFENOLES TOTALES Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN GRANOS DE CACAO

Previo al análisis de varianza de los factores evaluados se realizó las pruebas de normalidad por Shapiro Wilk ($n \leq 50$) y homogeneidad de Levene, siendo en ambos casos $p > 0,05$; es decir que hay normalidad y homogeneidad.

El contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos fenólicos fueron influenciados significativamente ($p \leq 0,05$) por los genotipos, los pisos altitudinales y la respectiva interacción entre estos factores como se resumen en la tabla 3 (Anexo 6).

Tabla 3: Efecto de los factores genéticos, pisos altitudinales e interacción sobre el contenido polifenólico total y capacidad antioxidante en granos de cacao (medias*)

Tratamientos	Polifenoles totales mg EAG/100 g	Capacidad antioxidante mg ET/100 g	
Efecto de genotipos			
CCN-51	5,44 c	36,08 a	
Complejo N x T	5,47 b	35,44 a	
ETT-103	5,84 a	33,18 b	
P	<0,0001	<0,0010	
Efecto de pisos altitudinales			
Alto	5,39 c	38,96 a	
Bajo	5,59 b	33,58 b	
Medio	5,77 a	32,17 b	
p	<0,0001	<0,0001	
Efecto de interacción genotipo x pisos altitudinales			
Complejo N x T	Alto	4,91 h	42,90 a
CCN-51	Bajo	5,00 g	41,60 a
ETT-103	Alto	5,61 f	41,43 a
CCN-51	Medio	5,66 e	34,11 b
CCN-51	Alto	5,65 e	32,54 b
Complejo N x T	Medio	5,73 d	32,30 b
Complejo N x T	Bajo	5,76 c	31,11bc
ETT-103	Medio	5,92 b	30,09bc
ETT-103	Bajo	6,01 a	28,02 c
p	<0,0001	<0,0001	

(*) Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas entre los valores medios, con un 95% de confianza.

Los resultados obtenidos para el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en granos de cacao indican que el genotipo es una fuente de

variabilidad en ambos parámetros, siendo ETT-103 el de mayor influencia, coincidiendo con lo reportado por Quiñones et al (2013), que demostraron que el comportamiento en los 7 clones de cacao que evaluaron es diferente, lo cual indica que el material genético interviene en el contenido de estos compuestos y su capacidad antioxidante.

Así también, Oracz *et al.* (2015) al analizar el contenido fenólico total en granos de cacao de cinco cultivares en diversos países utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, definieron que los niveles de compuestos fenólicos en sus muestras de granos de cacao, tanto crudos como tostados, la variedad Forastero de Brasil contenía la mayor cantidad de compuestos fenólicos seguido por los Trinitario de Ecuador y Venezuela.

En cuanto a la influencia del piso altitudinal sobre el contenido de polifenoles totales y su capacidad antioxidante en granos de cacao, la tabla 3, evidencia ser un factor de variabilidad, mayormente en la altura media como factor independiente y baja al interactuar con el material genético ETT-103.

Weather Spark (s.f.) describe que, a una altura media, las épocas secas frecuentemente se mantienen húmedas, la temperatura está entre 22 y 31°C, 12 horas de luz y la humedad relativa promedio es de 85%; y que, a una altura baja, la temperatura oscila entre 24 y 34°C, 12 horas de luz, humedad relativa casi del 90%.

Oracz *et al.* (2015), precisaron al evaluar cultivos de cacao, que las regiones geográficas si influyen en la concentración de estos compuestos y su capacidad antioxidativa; en forma muy general AGROCALIDAD (2016) manifiesta que las condiciones de temperatura a baja altitud y cercanas a la línea Ecuatorial son particularmente buenas para el cultivo en cuanto a producción y calidad en las características de aroma y sabor, no así cuando el cultivo se aleja de la línea Ecuatorial y la altura aumenta por lo que recomiendan no cultivar por encima de los 700 msnm.

Debido a que no existen muchas investigaciones que han considerado el factor altitudinal para evaluar su efecto sobre el contenido de polifenoles en granos de cacao y la capacidad antioxidante, a continuación, se contemplarán resultados

obtenidos que determinaron diferencias significativas en cuanto a la producción de metabolitos secundarios como cafeína, teobromina y polifenoles aromáticos en granos café, los mismos que son características en común con el cacao.

Lara y Vaast (2007), expresan en sus resultados que la altitud es un factor determinante en la calidad de sabor y aroma del café coincidiendo con Avelino *et al.* (2005) que vincula positivamente a la altitud con estos atributos estrechamente relacionados al contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante, además los primeros autores determinaron también que la temperatura y humedad relativa del aire a niveles de altura cercanos al nivel del mar, prolongan la maduración y por lo tanto aumenta el tiempo para el crecimiento de los granos.

Ferreira *et al.* (2016) determinaron que las diferencias entre los granos de café evaluados, basados en nivel altitudinal, variedades y exposición al sol; como un solo factor de influencia no se asocian a su calidad; pero si al interactuar entre ellos, como se describe en el cuadro 4.1, la interacción del material genético ETT-103 con el piso altitudinal bajo dan la mayor concentración de polifenoles y la menor capacidad antioxidante, Escobar (2008) dice que este clon que resultó de una minuciosa selección fenotípica del aprovechamiento viable del complejo “Nacional x Trinitario” y Quiroz *et al.* (2015) reafirman, que se caracteriza por adaptarse a todas las zonas de producción.

Para terminar con los polifenoles totales, Gil (2012) manifiesta, que la concentración de los compuestos fenólicos se puede observar en la coloración de los granos de cacao, pues los mismos se almacenan en las células pigmentadoras de los cotiledones y a mayor contenido, la tonalidad púrpura se vuelve más intensa, tal como se pudo observar en los granos de cacao de los genotipos evaluados en los diferentes pisos altitudinales antes de ser procesados, notando en la tabla 4, que los que correspondientes a ETT-103 tienen una coloración púrpura más intensa con respecto a los demás.

Tabla 4: Coloración de las almendras de granos de cacao de los genotipos evaluados

MATERIAL GENÉTICO	DESCRIPCIÓN
	<p>Granos de cacao del genotipo Complejo Nacional x Trinitario, coloración púrpura oscuro, contenido promedio de polifenoles totales 5,47 mg EAG/100 g.</p>
	<p>Granos de cacao del genotipo ETT-103, coloración púrpura oscuro intenso, contenido promedio de polifenoles totales 5,84 mg EAG/1 g.</p>
	<p>Granos de cacao del genotipo CCN-51, coloración púrpura claro, contenido promedio de polifenoles totales 5,44 mg EAG/100 g.</p>

Finalmente, en la figura 2 se muestra la correlación inversa entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante, observando que a mayor contenido de los primeros menor será la segunda en granos de cacao con un coeficiente $R^2=0,922$. Ramírez, Cely y Ramírez (2013), establecieron la estrecha relación entre ambos parámetros, infiriendo que los polifenoles son componentes que aportan un porcentaje importante en la capacidad antioxidante y una

correlación inversa con un coeficiente $R^2=0,942$ entre el contenido polifenólico total y la capacidad antioxidativa, en el análisis del total de muestras de tres grupos de extractos de cacao, indicando que existe menor capacidad antioxidante a mayor presencia de polifenoles totales.

Sin embargo, Nazario *et al.* (2014) al realizar análisis de correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante en muestras de cacao de 7 clones encontraron una correlación positiva (directa) con un $R^2= 0,818$; además afirman que el hecho de que coincida un valor alto de polifenoles con una alta capacidad antioxidante, se debe al grupo de moléculas que conforman el valor total del polifenol, es decir, que el grupo de moléculas es muy variado y su respuesta antioxidante depende de las propiedades específicas y diferenciadas de cada una.

Los mismos autores determinaron que el mayor contenido de moléculas de antocianinas en los polifenoles totales se encontró en los chocolates con inclusión de nibs no fermentados de cacao CCN-51, los mismos que presentaron también, una mayor capacidad antioxidante frente a los radicales DPPH y ABTS.

Este alto coeficiente de determinación (R^2), tanto en los resultados obtenidos en esta investigación como los reportados por los autores citados quiere decir que el contenido de polifenoles totales es predominante en la capacidad antioxidante.

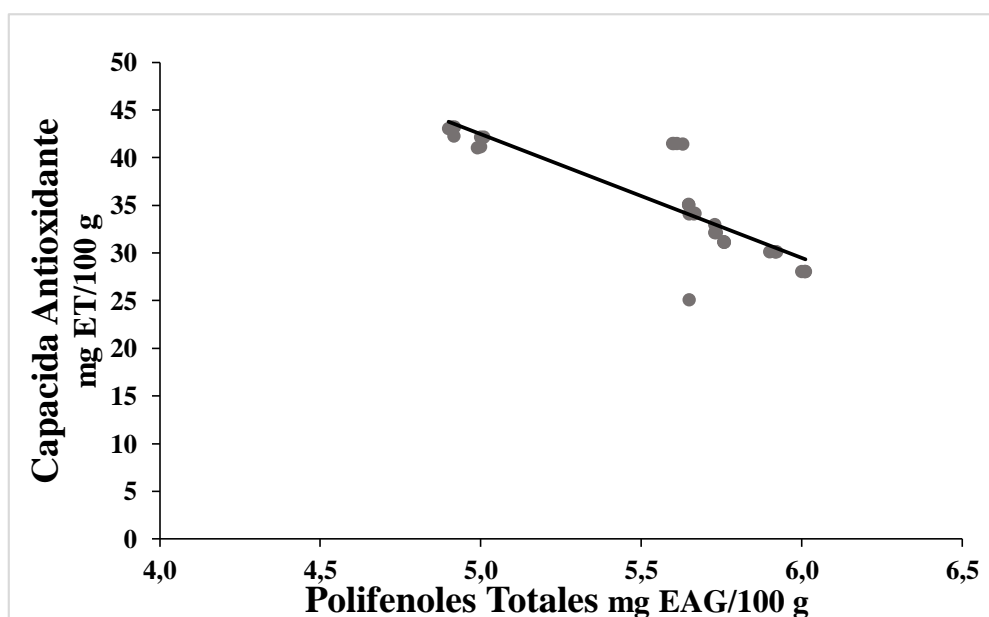


Figura 2: Correlación del contenido de polifenoles totales vs capacidad antioxidante

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Los polifenoles totales y la capacidad antioxidante de granos de cacao varían en función del genotipo y pisos altitudinales evaluados en la Zona 4.
- Cuantitativamente el mayor contenido polifenólico total correspondió al material genético ETT-103, el piso altitudinal medio y la combinación del mismo genotipo en el piso altitudinal bajo.
- Se determinó que la capacidad antioxidante resultó inversamente proporcional en relación al contenido polifenólico total de los granos de los genotipos de cacao establecidos en los tres pisos altitudinales de la Zona 4

5.2. RECOMENDACIONES

- Evaluar el comportamiento del contenido polifenólico total y su capacidad antioxidante en las diferentes etapas de industrialización de granos de cacao hasta la obtención de chocolate.
- Incluir parámetros físicos para determinar la influencia de los genotipos de cacao y los pisos altitudinales del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, L., Mejía D., Acosta, E., Valencia, W. & Penagos, L. (2017). Efecto de la temperatura del conchado sobre los polifenoles en un chocolate semi-amargo. Retrieved 28 October 2018, from <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/447/365>.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. [AGROCALIDAD]. (2016). Guía de Buenas Prácticas Agrícolas para Cacao Resolución Técnica N° 0183 emitida el 20 de septiembre del 2012. Retrieved 6 July 2018, from <http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/dia/guia-buenas-practicas-agricolas-cacao-13-12-2016.pdf>.
- Alvaro, M, & Azócar, A. (2002). Áreas potenciales para el desarrollo del cultivo cacao en el Estado Mérida. *Agronomía Tropical*, 52(4), 403-425. Recuperado en 12 de julio de 2019, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2002000400001&lng=es&tlng=es.
- Asociación Nacional de Exportadores de Cacao. [ANECACAO]. (2015). Santo Domingo de los Tsáchilas: aprenden sobre producción del cacao. Retrieved 12 July 2018, from <http://www.anecacao.com/es/noticias/santo-domingo-de-los-tsachilas-aprenden-sobre-produccion-del-cacao.html>.
- Avelino, J., Barboza, B., Araya, J., Fonseca, C., Davrieux, F., Guyot, B., & Cilas, C. (2005). Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitudeterroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1869-1876. doi:10.1002/jsfa.2188
- Avendaño, C., Villarreal, J., Fuentes, E., Campos, R., Arnoldo, A., Mendoza, J., Aguirre, A., Sandoval, Espinoza, S. (2011). Diagnóstico del cacao en México. [Fec-chiapas.com.mx](http://www.fec-chiapas.com.mx). Retrieved 7 July 2018, from http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca_digital/diagnostico-del-cacao-en-mexico.pdf
- Castañeda, B., Ramos, E., & Ibáñez V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Médico*, 8(1), 56-72. Recuperado de: <http://www.horizontemedicina.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/articulo/view/196/209>

- Cerrato, J. (2015). Competitividad comercial del cacao (*Theobroma cacao*) En el mercado Centroamericano, 2008-2013. (Tesis pre grado). Retrieved 6 July 2018, from <http://repositorio.una.edu.ni/3138/1/tne70c417.pdf>
- Condezo, O. (2010). Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (OPPH y Peroxilo) en granos de cacao (*Theobroma cacao*) Comercial de Tingo María y Tocache. (Tesis pre grado). Retrieved 7 July 2018, from <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/276/FIA195.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Escobar, R. (2008). Comportamiento de seis clones de "cacao" (*Theobroma cacao*) en Guasaganda, provincia de Cotopaxi, Ecuador. *La Granja*, 7(1). DOI <https://doi.org/10.17163/lgr.n7.2008.02>.
- Ferreira, W., Queiroz, D., Silvac, S., Rafael Simões, R. & Corrêa, P. (2016). Effects of the orientation of the mountainside, altitude and varieties on the quality of the coffee beverage from the "Matas de Minas" Region. *American Journal of Plant Sciences*, 07(08), 1291-1303. DOI: 10.4236/ajps.2016.78124.
- García, E., Fernández, I. & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Universidad Politécnica de Valencia. Retrieved 7 November 2018, from (2018). *Riunet.upv.es*. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>.
- Gil, J. (2012). Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre industrialización. (Tesis pre grado). Retrieved 7 July 2018, from <http://tesis.udea.edu.co/bitstream/10495/1621/1/TESIS%20Jorge%20Andres%20Gil%20FINAL.pdf>.
- Guido, D. Martínez, L. & Valdivia, K. (2016). El financiamiento y asistencia técnica de la producción de cacao de pequeños productores del municipio el Tuma-La Dalia en el departamento de Matagalpa. (Tesis de pre grado). Retrieved 9 July 2018, from <http://repositorio.unan.edu.ni/2007/1/17356.pdf>.
- Guija, E., Inoente, M., Ponce, J. & Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antio[idante]. *Horiz Med.* 15(1), 57-60. Retrieved 6 November 2018, from <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v15n1/a08v15n1.pdf>.
- Guillín, E. & Lara, M. (2010). Efecto de los sistemas de fermentación en la calidad del cacao de la variedad Complejo Nacional x Trinitario (*Theobroma cacao*) del cantón Las Naves provincia Bolívar. (Tesis de maestria).

Retrieved 5 July 2018, from <http://www.dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/902/1/043.pdf>.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. [IICA]. (2017). Manual Técnico del Cultivo de Cacao Buenas Prácticas para América Latina. *lica.int*. Retrieved 13 July 2019, from <https://www.iica.int/es/publications/manual-t%C3%A9cnico-del-cultivo-de-cacao-pr%C3%A1cticas-latinoamericanas>

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. [INIAP]. (2010). Manejo Técnico del cultivo de Cacao en Manabí. *Repositorio.iniap.gob.ec*. Retrieved 13 July 2019, from <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1292/4/iniappom75%20p1-9.pdf>

Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>.

Lara, L. & Vaast, P. (2007). Effects of altitude, shade, yield and fertilization on coffee quality (*coffea arabica* L. Var. Caturra) produced in agroforestry systems of the northern central zones of Nicaragua. Making ecosystem services count for farmers, consumers and the environment. Simposio llevado a cabo en el 2nd International Symposium on Multi-Strata Agroforestry Systems with Perennial Crops, Turrialba, Costa Rica. DOI: 10.13140/RG.2.1.4689.1289.

León, F., Calderón, J. & Mayorga, E. (2016). Estrategias para el cultivo, comercialización y exportación del cacao fino de aroma en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*, 9 (18), 45-55. Retrieved 9 July 2018, from <https://dialnet.unirioja.es/ejemplar/447331>.

Leyva, D. (2009). Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. (Tesis de pre grado). Retrieved 28 October 2018, from http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10876.pdf.

Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. (2019). *Repository.lasallista.edu.co*. Retrieved 19 May 2019, from <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%2012-9-162.pdf>.

López, O. & Banillas, M. (2016). Materiales de cacao de interés farmacológico (*Theobroma cacao* L.). *Revista Espacio I+D*, 5 (11), 84-103. Retrieved 24

- October 2018, from
<http://www.espacioimasd.unach.mx/articulos/num11/pdf/cacao.pdf>.
- Loyola, K. (2011). Análisis estadístico de la producción de cacao en el Ecuador. (Tesis de pre grado). *Dspace.espol.edu.ec*. Retrieved 28 October 2018, from
<http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/4104/1/6632.pdf>.
- Ministerio de Agricultura Ganadería Acuicultura y Pesca. (2016). Boletín zonales integrales y temáticos Zona 4. Retrieved 27 October 2018, Retrieved 16 November 2018, from
<http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/edicionimpresa/2016/enero/enero-16-zona-4.pdf>.
- Ministerio de Agricultura Ganadería Acuicultura y Pesca. (2017). Boletín agrícola integral Zona 4. Retrieved 7 July 2018, from
<http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/integraleszonales/2014/z4-ago-14.pdf>.
- Nazario, O., Ordoñez, E., Mandujano, Y. & Arévalo, J. (2014). Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao*) criollo y siete clones. *Investigación y Amazonía*, 3 (1): 51-59. Retrieved 7 July 2018, from
<http://revistas.unas.edu.pe/index.php/revia/article/view/85/69>.
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., & Nebesny, E. (2015). The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao*), depending on variety, growing region, and processing operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(9), 1176-1192. doi:10.1080/10408398.2012.686934
- Palacios, A. (2008). Establecimientos de parámetros (físicos, químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao (*Theobroma cacao*) producido en dos zonas identificadas al norte y sur del litoral ecuatoriano. *Iniap.gob.ec*. Retrieved 5 July 2018, from
http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/establecimientos_para_metros.pdf.
- Quintana, L. & Gómez, S., (2011). Perfil del sabor del clon CCN51 del cacao (*Theobroma cacao*) Producido en tres fincas del Municipio de San Vicente de Chucurí. *Publicaciones e Investigación*, 5(). Retrieved 28 October 2018, from <http://oaji.net/articles/2017/5082-1501176631.pdf>.
- Quiñones, J., Trujillo, R., Capdesuñer, Y., Quirós, Y., & Hernández de la Torre, M. (2013). Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18, 201-215. Recuperado en 6 de julio de 2018, de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962013000200004&lng=es&tlng=es.

- Quiroz, J., Mestanza, S. & Parada, N. (2015). Catálogo de clones de cacao recomendados por el INIAP. Retrieved 14 November 2018, from http://www.worldcocoafoundation.org/wpcontent/uploads/files_mf/1473869418FieldTripJ.Quiros.pdf.
- Ramírez, M., Cely, Víctor. & Ramírez, S. (2013). Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas-México. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 15(1), 27-40. Retrieved May 03, 2019, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012441082013000100002&lng=en&tlng=es.
- Suazo, Y. (2012). Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense. (Tesis Maestría). Universidad Pública de Navarra. Navarra, Nicaragua. Retrieved 28 October 2018, from <http://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/6534/tecnologiaycalidadenlasindustriasaa%20Yader%20Suazo.pdf?sequence=1>.
- Valenzuela B., A. (2007). El chocolate, un placer saludable. *Revista chilena de nutrición*, 34(3), 0. Retrieved 6 julio 2018, from <http://www.redalyc.org/pdf/469/46934302.pdf>.
- Vázquez, A., Ovando, I., Adriano, L., Betancur, D., & Salvador, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. Scielo.org, vol.66. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(3), 239-254. Recuperado en 7 de julio de 2018, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222016000300010&lng=es&tlng=es.
- Vera, J., Vallejo, C., Párraga, D., Morales, W., Macías, J., & Ramos, R. (2014). Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao*) en el Ecuador. Retrieved 24 October 2018, from http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_en%20construccion.pdf.
- Weather Spark. (s.f.). Retrieved 29 October 2018, from <https://es.weatherspark.com/y/18310/Clima-promedio-en-Ecuador-durante-todo-el-a%C3%B1o>.

- Yáñez, C. (2015). Plan de exportación de pasta de cacao hacia el país de Japón, ciudad de Tokio elaborado por la asociación Kallari ubicada en la ciudad del Tena, provincia de Napo. (Tesis pre grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved 24 October 2018, from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1220/1/52T00192.pdf>.
- Zapata, S., Tamayo, A., & Rojano, B. (2015). Efecto del tostado sobre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de clones de cacao colombiano. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 68 (1), 7497-7507. Retrieved 24 October 2018, from <http://www.redalyc.org/pdf/1799/179933010011.pdf>.

ANEXOS

ANEXO 1

Toma de muestra de los genotipos de cacao y georreferenciación de los pisos altitudinales



ANEXO 2

Preparación de las muestras de los materiales genéticos evaluados



ANEXO 3

Desangre y preparación de los extractos polifenólicos



ANEXO 4

Cuantificación de Polifenoles Totales

**ANEXO 5**

Determinación de Capacidad Antioxidante



ANEXO 6

ANEXO 6-A1

Análisis de la varianza- variable polifenoles totales

FV	SC	gL	CM	F	p-Valor
Modelo	4,58	8	0,57	8588,25	<0,0001
Material Genético	1,23	2	0,62	9227,37	<0,0001
Piso Altitudinal	0,86	2	0,43	6474,12	<0,0001
Material Genético*Piso Altitudinal	2,49	4	0,62	9325,75	<0,0001
Error	0	27	0		
Total	4,58	35			

ANEXO 6-A2

Comparación de medias de TUKEY AL $\alpha=0,05$

Material Genético	Medias	n	E.E.
ETT 103	5,84	12	0 A
Complejo N x T	5,47	12	0 B
CCN 51	5,44	12	0 C

ANEXO 6-A3

Comparación de medias de TUKEY AL $\alpha=0,05$

Piso Altitudinal	Medias	n	E.E.
Medio	5,77	12	0 A
Bajo	5,59	12	0 B
Alto	5,39	12	0 C

ANEXO 6-A4

Comparación de medias de TUKEY AL $\alpha=0,05$

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY AL $\alpha=0,05$				
Material Genético	Piso Altitudinal	Medias	n	E.E.
ETT 103	Bajo	6,01	4	0 A
ETT 103	Medio	5,92	4	0 B
Complejo N x T	Bajo	5,76	4	0 C
Complejo N x T	Medio	5,73	4	0 D
CCN 51	Medio	5,66	4	0 E
CCN 51	Alto	5,65	4	0 E
ETT 103	Alto	5,61	4	0 F
CCN 51	Bajo	5,00	4	0 G
Complejo N x T	Alto	4,91	4	0 H

ANEXO 6-B1

Análisis de la varianza- variable capacidad antioxidante

FV	SC	gL	CM	F	p-Valor
Modelo	996,74	8	124,59	43,43	<0,0001
Material Genético	55,75	2	27,87	9,72	0,0010
Piso Altitudinal	307,85	2	153,93	53,65	<0,0001
Material Genético*Piso Altitudinal	633,14	4	158,28	55,17	<0,0001
Error	77,46	27	2,87		
Total	1074,2	35			

ANEXO 6-B2Comparación de medias de TUKEY al $\alpha=0,05$

Material Genético	Medias	n	E.E.	
CCN-51	36,08	12	0,49	A
Complejo N x T	35,44	12	0,49	A
ETT-103	33,18	12	0,49	B

ANEXO 6-B3Comparación de medias de TUKEY al $\alpha=0,05$

Piso Altitudinal	Medias	n	E.E.	
Alto	38,96	12	0,49	A
Bajo	33,58	12	0,49	B
Medio	32,17	12	0,49	B

ANEXO 6-B4**Cuadro 1:** Comparación de medias de TUKEY al $\alpha=0,05$

Material Genético	Piso Altitudinal	Medias	N	E.E.	
Complejo N x T	Alto	42,9	4	0,85	A
CCN-51	Bajo	41,6	4	0,85	A
ETT-103	Alto	41,43	4	0,85	A
CCN-51	Medio	34,11	4	0,85	B
CCN-51	Alto	32,54	4	0,85	B
Complejo N x T	Medio	32,3	4	0,85	B
Complejo N x T	Bajo	31,11	4	0,85	B C
ETT-103	Medio	30,09	4	0,85	B C
ETT-103	Bajo	28,02	4	0,85	C