

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ciencias y Humanidades

"CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA GRASA DE SEMILLAS DE *Theobroma bicolor* DE GUATEMALA"

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Julieta Eugenia Ortíz Chacón

Guatemala
2005



**"CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA
GRASA DE SEMILLAS DE *THEOBROMA BICOLOR*
DE GUATEMALA"**

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad De Ciencias y Humanidades

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA GRASA DE SEMILLAS DE *Theobroma bicolor* DE GUATEMALA

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Julieta Eugenia Ortíz Chacón

Trabajo de investigación presentado para optar al grado académico
de Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos

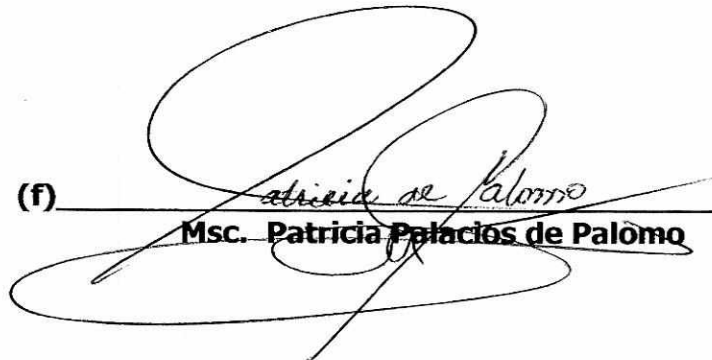
Septiembre, 2005

Vo.Bo. :

(f) 
Dr. Ricardo Bressani

Tribunal:

(f) 
Dr. Ricardo Bressani

(f) 
Msc. Patricia Palacios de Palomo

(f) 
Msc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz

Fecha de aprobación: 16/11/2004

PREFACIO

Este estudio sobre la caracterización fisicoquímica de la grasa de semillas de *Theobroma bicolor* de Guatemala, fue realizado como trabajo de tesis para optar al grado de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. El desarrollo del trabajo fue posible por el apoyo de la Universidad Del Valle de Guatemala en colaboración con el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Agrícola bajo el Proyecto *Theobroma bicolor* 0192002.

Se agradece profundamente la orientación y colaboración, principalmente del Dr. Ricardo Bressani Castignoli, asesor de este trabajo, así como del Msc. Ricardo García y las Msc. Patricia Palacios de Palomo y Ana Silvia Colmenares de Ruiz.

La mayor parte del trabajo experimental fue realizado en los laboratorios de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad del Valle de Guatemala con la estrecha colaboración del Sr. Carlos Arias, la Sra. Ingrid de Morales y las Licenciadas infieri Olivia Beteta y Elsa Gudiel.

Los análisis de ácidos grasos se realizaron en la Unidad de Análisis Químico Instrumental, de la Universidad del Valle de Guatemala, por lo que se agradece la participación de los Licenciados Gerardo Pirir y Ana Luisa Mendizábal de Montenegro, así como del Dr. Adrián Gil, quien facilitó la utilización del equipo.

Se agradece también a la Unidad de Análisis Instrumental, al Departamento de Fisicoquímica y a la Unidad de Informática y Bioestadística de la Universidad de San Carlos de Guatemala, especialmente al Lic. Rony Ayala Jiménez, al Msc. Francisco Pérez Sabino, al Msc. Jorge Luís de León, al Dr. Alfredo Gálvez Sinibaldi y a los licenciados Pedro Jayes y Rodolfo Orozco, por su valioso apoyo en la realización de esta investigación y por permitirme realizar parte de los análisis en sus respectivas dependencias.

CONTENIDO

	Página
PREFACIO.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE GRÁFICOS.....	v
RESUMEN.....	vi

Capítulos

I. INTRODUCCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
IV. JUSTIFICACIÓN.....	11
V. OBJETIVOS.....	12
VI. HIPÓTESIS.....	13
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
VIII. RESULTADOS.....	15
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	19
X. CONCLUSIONES.....	26
XI. RECOMENDACIONES.....	28
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	29
XIII. APÉNDICES.....	33

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
1. Porcentaje de almendra y cáscara de las semillas de <i>T. bicolor</i> y <i>T. cacao</i>	15
2. Contenido de humedad y de grasa para las harinas obtenidas de las almendras de las muestras de <i>T. bicolor</i> y <i>T. cacao</i>	15
3. Punto de fusión, índice de refracción, índice de yodo e índice de saponificación de la grasa extraída de las almendras molidas, para cada una de las muestras de <i>T. bicolor</i> y <i>T. cacao</i>	16
4. Perfil de ácidos grasos obtenido para la grasa extraída de las almendras molidas, para cada una de las muestras de <i>T. bicolor</i> y <i>T. cacao</i>	18

LISTA DE GRÁFICOS

Figura	Página
1. Perfil de ácidos grasos de <i>T. bicolor</i>	17
2. Perfil de ácidos grasos de <i>T. cacao</i>	17
3. Localidades muestreo para <i>T. bicolor</i> y <i>T. cacao</i> (Apéndice)	34
4. Análisis Estadístico (Apéndice).....	35
4 Cromatogramas <i>T. bicolor</i> (Apéndice).....	54
5. Cromatogramas <i>T. cacao</i> (Apéndice).....	61

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio de algunas características físicas y químicas de la grasa de semillas de *Theobroma bicolor* obtenidas de frutos recolectados en siete distintas localidades de Guatemala, así como de una muestra de *Theobroma cacao*. A las semillas descascaradas y molidas se les realizó análisis de contenido de grasa y humedad. A la grasa extraída de las semillas, se le determinó punto de fusión, índice de refracción, índice de saponificación, índice de yodo y perfil de ácidos grasos. Los resultados para el promedio de las siete localidades de *T. bicolor* en cuanto al contenido de grasa de la almendra, en base seca, fue de 37.7%, con las localidades de Patulul y San Marcos presentando los mayores contenidos, 42.9 y 42.8%, respectivamente. La muestra de *T. cacao* presentó un promedio de 53.3% de grasa. El porcentaje de humedad, punto de fusión, índice de refracción, índice de yodo e índice de saponificación, en promedio, para las muestras de *T. bicolor* y *T. cacao*, fueron 5.3 y 4.6%; 37.8 y 34.5°C; 1.4584 y 1.4577; 43.8 y 36.6 g I₂/100 g grasa; y 192.8 y 195.5 mg. KOH g⁻¹ grasa, respectivamente. Los ácidos grasos presentes en las grasas tanto de *T. bicolor* como de *T. cacao* fueron, en porcentaje: 5.9 y 28.1% de palmítico; 46.0 y 36.0% de esteárico; 45.3 y 34.3% de oleico y linoleico; y 2.6 y 1.2% de araquídico, para las dos especies, respectivamente.

Los análisis estadísticos indican que no existe diferencia entre las siete distintas localidades de *T. bicolor* ni entre éstas y *T. cacao* en cuanto a contenido de humedad, índice refracción e índice de saponificación. Para el contenido de grasa, las muestras provenientes de Patulul fueron estadísticamente distintas a todas las demás localidades de *T. bicolor*, a excepción de las muestras de San Marcos, y esta última localidad, es estadísticamente diferente a las muestras provenientes de Coatepeque, Chicacao y San Antonio.

Todas las muestras de *T. bicolor* presentaron un porcentaje estadísticamente menor de grasa que *T. cacao*. Para el punto de fusión, no se encontró diferencia significativa entre ninguna de las muestras de *T. bicolor*, pero dicho punto fue estadísticamente mayor al obtenido para *T. cacao*. En cuanto al índice de yodo, las muestras de *T. bicolor* de la localidad San Antonio fueron estadísticamente distintas a las localidades Patulul, Coatepeque y Chicacao, y todas las muestras de *T. bicolor* presentaron un valor estadísticamente mayor que el de *T. cacao*.

Para los contenidos de ácidos palmítico, esteárico, oleico + linoleico y araquídico, todos los valores obtenidos para *T. bicolor* son estadísticamente iguales, y todos (a excepción del ácido araquídico de la localidad de Samayac) difieren significativamente de los obtenidos para *T. cacao*.

I. INTRODUCCIÓN

La manteca del cacao es el ingrediente mayoritario en el chocolate, representando del 25 al 36%. La manteca es responsable de la textura, contractibilidad, liberación de sabor y brillo del producto (Chaisieri y Dimick 1989).

Las características de fusión de la manteca del cacao son únicas pues ésta posee un alto contenido de grasa sólida a temperatura ambiente y funde en un rango estrecho de temperatura, justo por debajo de la temperatura del cuerpo. Su precio alto hace necesaria la búsqueda de grasas más económicas que posean características térmicas similares (Chaisieri 1989).

El material crudo para preparar chocolate y cocoa es la semilla del género *Theobroma* (Matz 1986). Muchas especies de plantas tropicales pertenecen a este género (Sotelo 1990). De éstas, el *T. cacao* ha sido ciertamente la más estudiada (Sotelo y Álvarez 1991, Liendo *et al.* 1997, Willson 1999).

La importancia comercial de *T. cacao* ha resultado en una continua selección de cultivares para incrementar su producción. Ésta, sin embargo, se ve constantemente amenazada por distintos factores, como envejecimiento de las plantas, enfermedades y parásitos (Hunter 1990; Wilson 1999). Esto provoca la necesidad de realizar investigación en otras especies que pertenezcan al mismo género, las cuales han desarrollado, en forma natural, resistencia a entes etiológicos, y al mismo tiempo, pueden proveer substitutos de la manteca de cacao (Bruni *et al.* 2000). Además, estas especies son fuentes de compuestos de alto valor agregado, como antioxidantes (Torres *et al.* 2002).

Desde el punto de vista agronómico y genético, el estudio de estas especies puede ser útil para establecer las características del cultivo y la fuente de resistencia contra plagas y enfermedades (Furlán y Bressani 1997).

En este trabajo se realizó un estudio de algunas características de la grasa de *Theobroma bicolor*, especie del género *Theobroma* que crece en Guatemala en forma silvestre. Con fines de comparación, también se analizó una muestra de *T. cacao*. Las muestras de *T. bicolor* fueron recolectadas en tres regiones distintas de las siguientes localidades: Patulul, Coatepeque, Chicacao, Mazatenango, Samayac, San Antonio y San Marcos. La muestra de *T. cacao* fue recolectada en una población en la región de Chicacao. Las semillas secas fueron descascaradas y molidas, y a la harina obtenida se le determinó el contenido de humedad y grasa, después de lo cual fue sometida a extracción con hexano. La grasa obtenida para cada muestra fue analizada para determinar punto de fusión, índice de refracción, índice de yodo, índice de saponificación y perfil de ácidos grasos. Todas las extracciones y determinaciones se realizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente por un análisis de varianza de una vía aplicando la prueba de Tuckey para comparaciones múltiples y un nivel de significancia $P < 0.05$. El programa utilizado fue el STATA versión 7.0.

Los resultados indican que la grasa de *T. bicolor* es estadísticamente igual a la de *T. cacao* en cuanto a sus índices de refracción y saponificación. El contenido de grasa de la semilla es menor en *T. bicolor*. La grasa de *T. bicolor* es muy similar a la de *T. cacao* aunque funde a una temperatura un poco mayor y es más blanda. La grasa de *T. cacao* es más saturada que la de *T. bicolor*, especialmente por su mayor contenido de ácido palmítico, y menor de oleico + linoleico.

No se encontró diferencia significativa entre las distintas localidades de *T. bicolor* para los parámetros evaluados, a excepción de una localidad (Patulul), que presentó un porcentaje de grasa significativamente mayor, y otra (San Antonio), que presentó un índice de yodo también mayor.

Se concluye que la grasa de *T. bicolor* es una manteca vegetal no hidrogenada que puede ofrecer diversas aplicaciones en la industria de alimentos y ser un sustituto potencial de la manteca de cacao.

II. ANTECEDENTES

A. MARCO TEÓRICO

1. *Theobroma cacao*

a. Resumen histórico del cacao. Los mayas plantaban cacao en Centro América desde los principios del siglo VI. Para ellos las semillas de cacao tenían dos funciones: para preparar una bebida agradable y también como moneda. En el siglo XVI el chocolate llegó a Europa. Luego en 1875, Daniel Peters preparó el primer chocolate con leche en Suiza y en 1880, Rodolphe Lindt hizo un chocolate suave agregando manteca de cacao a la masa de chocolate (Charalambous e Inglett 1978).

El *Theobroma* es un género de árboles de Centro y Sudamérica. De las 22 especies conocidas, solo el *T. cacao* (o cacao) se cultiva comercialmente. El *Theobroma cacao* recibió su nombre científico del botánico Linnaeus en 1753 (West 1992).

b. Susceptibilidad del cacao. El cacao es una planta que es muy susceptible a plagas y enfermedades producidas por hongos (Hernández 1989). La *Phytophthora spp* es endémica en las áreas cacaoteras y responsable de hasta un 50% de las pérdidas en la producción. La *Phytophthora* causa necrosis en varias partes de la planta, pero su efecto más importante ocurre en el fruto (Phillips-Mora y Galindo 1989). Otras enfermedades incluyen las producidas por *Crinipellis perniciosa* y *Oncobasidium theobromae*. Las enfermedades y los insectos que se alimentan del cacao pueden reducir el cultivo mundial de un 10 a un 30% anualmente (Osei y colaboradores 1995).

Los entrecruzamientos para la selección de plantas de cacao de alto rendimiento y alta resistencia a enfermedades e insectos, ha sido muy lenta e incierta (Fritz y colaboradores 1995). Es por ello que existe una necesidad grande de investigar otras especies para estudios genéticos en el sentido de mejorar el cacao como cultivo y aumentar su resistencia a enfermedades (West 1992).

c. Descripción y procesamiento de las semillas de cacao. Las semillas del cacao crecen en frutas en forma de almendra, de 7 a 12 pulgadas de largo (Peckham y Freeland-Graves 1979; Justin y colaboradores 1956). Para la elaboración de chocolate los frutos son cortados cuidadosamente. Un día o dos después de la cosecha, los frutos se abren (West 1992). Cada fruto contiene de 25 a 40 semillas ordenadas en filas rodeadas de una capa pulposa y mucosa. El color de las semillas puede ser blanco o púrpura pálido y son mayores que la semilla del café, (Potter 1968). Las semillas son colocadas en cajas de madera (West 1992) y/o apiladas y cubiertas de hojas (Potter 1968) para ser sometidas a fermentación. Esta es causada por levaduras, hongos y bacterias que obtienen sus nutrientes de la pulpa. El proceso de fermentación toma de cinco a siete días (West 1992). La

fermentación remueve la pulpa, elimina los gérmenes y modifica el sabor (Potter 1968). La mayoría de hidroxifenoles o taninos que contiene, que son astringentes y amargos, son convertidos a polímeros sin sabor por la polifenoloxidasas (Wong y colaboradores 1990). Al mismo tiempo forman importantes componentes y precursores del sabor (Charalambous e Inglett 1978) y permiten que la semilla tome una coloración canela a café, (Potter 1968), debida a su oxidación (Peckham y Freeland Graves 1979). Las semillas fermentadas son lavadas y posteriormente secadas al sol en plataformas por 3 a 5 días, hasta alcanzar de 5-7% de humedad para ser almacenadas (West 1992; Potter 1968). Arriba de 7% de humedad son contaminadas por hongos, que alteran el sabor y reducen el valor de la semillas considerablemente (West 1992). Después del secado se someten al proceso de tostado, que mejora el sabor y facilita la separación de la cáscara delgada que recubre la semilla (Charalambous e Inglett 1978). Las reacciones más importantes que se llevan a cabo durante el proceso de tostado incluyen reacciones de Maillard, rearrreglos de Amadori y degradaciones de Strecker (Mohr 1974), así como pardeamiento enzimático (Peckham y Freeland-Graves 1979). Después son machacadas y separadas de la cáscara. Luego son molidas a una temperatura lo suficientemente alta para producir un chocolate líquido o jarabe (Peckham y Freeland-Graves 1979).

d. **Composición y características de los productos.** El chocolate es uno de los alimentos más concentrados, con alto valor energético. Los principales componentes del chocolate y sus subproductos son grasa, carbohidratos y proteínas. Todos ellos contribuyen a la textura y al valor nutricional. Los polihidroxifenoles producen el color y son precursores del sabor. Se conocen más de 400 sustancias volátiles, la mayoría de ellas contribuye al sabor. La composición de las semillas procesadas de cacao es la siguiente: agua, 3%; cenizas, 2.8%; proteína, 10.5%; grasa, 55%; fibra, 2.6%; alcaloides, 1.45%; carbohidratos, 25.2%; pH: 4.9 (Matz 1993). La composición varía de acuerdo a la variedad, la localidad, la época de cosecha y la edad de la planta (Cubero y colaboradores 1992).

El chocolate es la combinación de jarabe de chocolate, manteca de cacao agregada, azúcar, leche en polvo y otros ingredientes (Potter 1968).

La manteca de cacao, es la grasa removida del jarabe de chocolate, y es uno de los componentes más importantes de éste (Charalambous e Inglett 1978). Se distingue de las otras grasas por su olor y sabor característico. Está compuesta de los siguientes ácidos: 24.4- 26.7% de ácido palmítico, 34.4-35.4% de ácido esteárico, 37.7-38.1% de ácido oleico, 2.1% de ácido linoleico. Posee un 59.8% de ácidos grasos saturados (Bernardini 1985). La manteca de cacao permite que el chocolate se derrita fácilmente en la boca liberando el máximo de sabor y también le provee de textura (Potter 1986). Es responsable, junto al contenido de azúcar, del alto valor energético. Tiene las desventajas de tener un precio alto y su bajo punto de fusión constituye un problema en climas cálidos y en ciertas aplicaciones. No es muy adecuado para cubiertas de helados, galletas y dulces (Charalambous e Inglett 1978). La manteca de cacao es una grasa muy apreciada, por lo que frecuentemente

es adulterada con otras grasas, como estearina de cacao o de palmiste, sebo de Borneo, parafina, grasas hidrogenadas y manteca de Illip, (Bernardini 1985).

La cocoa en polvo, que es el sedimento comprimido que queda después de remover la manteca de cacao, es la materia prima para la manufactura de cocoa y cocoa en polvo (Potter 1968). Tiene las desventajas de tener un precio variable y elevado, baja solubilidad y bajo contenido de proteínas y minerales. La semilla del árbol de carobo, *Ceratonia siliqua* es un buen sustituto de la cocoa en polvo, así como ciertas preparaciones patentadas de levadura (Charalambous 1978).

La calidad del sabor del chocolate se debe en gran parte al tipo y origen de las semillas de cacao a partir de las cuales se prepara. En la producción de chocolate o productos chocolatados, se utilizan mezclas de distintos cacaos. Cada variedad de cacao contribuye a la calidad total. Las mezclas son difíciles de imitar y el sabor puede ser desarrollado o modificado variando el tratamiento térmico, por lo que los productores deciden no especificar la mezcla y así se guardan el derecho de afirmar que su producto tiene un sabor único (Peckham y Freeland-Graves 1979).

Existen estándares federales para la identidad de productos de cacao, que cubren las semillas de cacao, el jarabe de chocolate, la cocoa de desayuno, la cocoa, la cocoa baja en grasa, la cocoa con dioctil sulfosuccinato de sodio, el chocolate dulce, el chocolate de leche, el chocolate de mantequilla y el chocolate de leche dietética (Matz 1992).

e. Substitución del chocolate y sus subproductos. La tecnología moderna de alimentos permite crear nuevos productos alimenticios relacionados con el chocolate con propiedades igualmente atractivas pero partiendo de otros materiales. Para saber que, componentes pueden ser substituidos y cómo hacerlo deben identificarse todas las propiedades deseadas y los posibles materiales a utilizar (Charalambous e Inglett 1978).

2. *Theobroma bicolor*

a. Diseminación, hábitat y producción. El *T. bicolor*, es una planta silvestre que crece en América desde México hasta Brasil (Furlán y Bressani 1985). En México y Centro América se le llama pataste, pataxte o cushta; en Ecuador se conoce como cacao blanco; en Colombia, como cacao silvestre o bacao; en Venezuela, como himare y en Brazil, como cacao de Nueva Granada, macambo o cacao de Para. En Venezuela, el *T. bicolor* se encuentra cerca del origen del río Orinoco y en Pantonogueytari, en las áreas moderadamente montañosas. En Guatemala se encuentra en la selva húmeda al norte de Huehuetenango, así como en las tierras planas, especialmente al pie de las montañas frente al Océano Pacífico, y también en Alta Verapaz, Chiquimula, Santa Rosa, Suchitepequez y Quetzaltenango (Hardy 1960; Sánchez y colaboradores 1989; Sánchez y Jaffé 1989, Sotelo y Álvarez 1991, Standley y Steymark 1941).

El rendimiento por árbol del *T. bicolor* es de aproximadamente 15 a 40 frutos y el árbol empieza a florecer en mayo. Al madurar el fruto, las hojas que lo rodean caen, indicando que es tiempo para cosechar. La cosecha se hace durante los meses de junio a agosto, y, si hay abundancia de agua, los árboles producen frutas todo el año (Furlán y Bressani 1997).

b. Descripción. El árbol del *T. bicolor* puede alcanzar los 14 m. de altura. Las flores son rojo-violetas. El fruto es de forma elipsoidal u oval, de aproximadamente 15 cm. de largo. El fruto es verde pálido o grisáceo. La pulpa es blanca (Hardy 1960). El peso aproximado del fruto es de 550 a 1071 g., con un 23.8% correspondiente a la pulpa, 62.5% a la cáscara y un 13.7 % a las semillas. El promedio de semillas por fruto es de 38 y el peso y largo promedio de la semilla es de 1.11 g. y 2.41 cm., respectivamente (Furlán y Bressani 1997).

Se dice que las semillas de *T. bicolor* contienen una cantidad considerable de manteca de buena calidad (Jee 1984). También presentan actividad antioxidante comparable o mayor al BHT, presumiblemente por su contenido de ácidos salicílico, transcinámico, sinapínico, clorogénico, protocatequínico, gálico, quínico y p-hidroxibenzoico, por lo que se estudia su utilización como antioxidantes en alimentos, especialmente en aceites (Torres y colaboradores 2002).

B. INVESTIGACIONES PREVIAS

Las semillas de *T. cacao* han sido extensamente investigadas. Por ejemplo, en cultivares criollos e híbridos de la colección del banco de germoplasma de Venezuela, se reporta que la grasa, que está presente en la semilla entre un 51.5 y un 54.2%, presenta las siguientes características: 34.5 a 36.5 de punto de fusión, 1.4546 a 1.4571 de índice de refracción, 32.5 a 34.5 de índice de yodo, 193.2 a 195.9 de índice de saponificación, 20.3 a 30.1% de ácido palmítico, 33.8 a 38.8% de ácido esteárico, 34.7 a 40.8% de ácido oleico, y valores menores al 3.2% para ácido linoleico (Liendo y colaboradores 1997, Padilla y colaboradores 2000).

En otros materiales del género *Theobroma*, Bruni y colaboradores estudiaron la composición lipídica de semillas de *Theobroma subincanum* ecuatorianas y los contenidos de tocoferoles. La obtención de la grasa la efectuaron por extracción con fluidos supercríticos y el análisis lo realizaron por cromatografía en capa fina preparativa, seguida de cromatografía de gases. Los resultados mostraron que *T. subincanum* contenía ácidos grasos de cadena más larga, y concluyeron que la manteca de *T. subincanum* presentaron una calidad inferior a la manteca de cacao (Bruni y colaboradores 2000, Bruni y colaboradores 2002).

Gilbert-Escriva y colaboradores determinaron los ácidos grasos, la composición de triglicéridos y el comportamiento térmico de las grasas de semillas de especies de *Theobroma* de Brasil (*T. cacao*, *T. bicolor*, *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. silvestre* y *T. microcarpum*). Encontraron que todas las especies presentaban niveles de ácido palmítico significativamente menor que *T. cacao*. Solamente *T. microcarpum* presentó un valor significativo de ácido linoléico.

Las grasas de *T. silvestre* y *T. speciosum* presentaron valores de índice de yodo similares al cacao y puntos de fusión más altos. Ninguna de las grasas presentó un perfil de fusión similar al de la manteca de cacao. Concluyeron que *T. silvestre* y *T. bicolor* fueron las grasas más similares a la grasa de *T. cacao*, por lo que las recomendaron como substitutos de la manteca de cacao (Gilabert-Escriva *et. al.*, 2002).

En *T. bicolor*, Berbert determinó la composición de ácidos grasos y las características de las semillas de *T. bicolor* de Brasil y las comparó con las del cacao, encontrando que la manteca de *T. bicolor* era más suave que la del cacao. El consideró que la suavidad, además de relacionarse con la composición de triglicéridos, probablemente se debía a la presencia de otras sustancias, como alcoholes y ésteres de cadena larga (Berbert 1981).

Jee estudió la composición de la grasa extraída de las semillas de *T. bicolor*, encontrando que esta consistía de 96.5% de triglicéridos, 2.5% de diglicéridos y 1.7% de ácidos grasos libres. Los ácidos grasos mayoritarios fueron C18:0, 42.3%; C18:1, 45.2 %; y C16:1, 6% (Jee 1984).

Chaisieri y colaboradores estudiaron las características químicas y la composición de grasas de la especie *Theobroma* y encontraron, para *T. bicolor* de Costa Rica y Brasil, respectivamente, los siguientes porcentajes: C16:0, 6.8 y 7.2%; C18:0, 43.5 y 34.0%; C18:1, 43.4 y 51.0%; C18:2, 4.3 y 5.0%; C20:0 1.9 y 1.9% (Chaisieri y colaboradores 1989).

Sotelo y colaboradores estudiaron las características y el contenido de ácidos grasos de las semillas de nueve plantas silvestres de México, entre ellas el *T. bicolor*, encontrando que las semillas de éste contenían 34.23% de grasa, un índice de yodo de 40.72, un punto de fusión de 36°C y un índice de saponificación de 180.94, indicando que estas características se asemejaban a las de *T. cacao* (Sotelo y colaboradores 1990).

Sotelo y Álvarez realizaron otra investigación concerniente a la composición proximal y al contenido de cafeína, teofilina y teobromina en *T. bicolor* y *T. cacao*. Encontraron que la cantidad de grasa de *T. bicolor* fue un poco menor que la de *T. cacao* (17 y 23.92%, respectivamente). Los contenidos de proteína y fibra fueron mayores en *T. bicolor* que en *T. cacao* (11.36 y 7.88% de proteína y 8.8 y 3.13% de fibra, respectivamente). Determinaron que en *T. cacao* los tres alcaloides se encontraban en mayor concentración en las semillas, mientras que en *T. bicolor* la mayor concentración de teobromina se encontró en la cáscara, la de cafeína en las flores y la de teofilina en las flores y hojas (Sotelo y Álvarez 1991).

Furlán y Bressani realizaron una descripción botánica del *T. bicolor* de Guatemala y compararon la composición química del *T. bicolor* y del *T. cacao*. El contenido de humedad en *T. bicolor* y cacao en las muestras de Guatemala fue el mismo, 5.6%, levemente mayor al del *T. bicolor* y cacao de México (5.3% para las tres muestras). El contenido de proteína fue mayor para el *T. bicolor* de Guatemala

(23.1%) y menor para el cacao de México (15.7%). El contenido de grasa fue menor para el *T. bicolor* de Guatemala (24%) y mayor para el cacao de México (47.7%). El contenido de fibra fue mayor para el *T. bicolor* de Guatemala (29.1%) y menor para el cacao de México (6.2%). El contenido de ceniza fue mayor para una muestra de *T. bicolor* de México (4.1%) y menor para la otra muestra de *T. bicolor* mexicano (3.4%). El total de carbohidratos fue mayor en el *T. cacao* de México (20.9%) y menor para una de las muestras de *T. bicolor* mexicano (13.9%). Concluyeron que los datos presentados indicaban que el *T. bicolor* es una especie que tiene potencial para ser utilizado con *T. cacao* (Furlán y Bressani 1997).

Torres y colaboradores realizaron un estudio sobre el contenido de grasa y la actividad antioxidante de *T. bicolor*, encontrando un 33% de grasa y actividades antioxidantes entre 47 y 93%, comparado con el 64% de actividad presentado por el BHT (Torres *et. al.*, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales analizados fueron semillas del fruto de *T. bicolor* recolectadas de las siguientes localidades del país: Patulul, Coatepeque, Chicacao, Mazatenango, San Antonio, Samayac y San Marcos. A la vez se analizó una muestra de *T. cacao* obtenida en una plantación en la región de Chicacao. (Ver Apéndice) Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Los frutos se abrieron y se retiró la pulpa que rodea la semilla. Las semillas se lavaron y secaron por 12 horas a 95°C en un deshidratador de convección Food Dehydrator Modelo FD/30. Se pesaron aproximadamente 100 gramos de semillas deshidratadas. Éstas fueron descascarilladas manualmente reportándose el peso de la cáscara total y de la almendra total. Las almendras fueron molidas en un molino eléctrico Grinding Mill, Model 4E a un mesh de 20.

La harina obtenida fue homogenizada y constituyó el lote de muestras a partir del cual se tomaron al azar tres porciones, para realizarle los análisis de humedad y grasa, y para las posteriores extracciones.

El porcentaje de humedad se hizo de acuerdo al método AOAC (AOAC, 1984) en un horno Fisher Scientific Modelo 516G. Posteriormente se procedió a determinar y extraer la grasa presente. La determinación de grasa se llevó a cabo por el método de AOAC (1984) en un aparato tipo Goldfish LABCONCO Modelo 3500100 utilizando porciones de 2 g de muestra. El resto de harina fue extraída con hexano para obtener la grasa que constituiría el material de partida para los análisis de la manteca. Esto se hizo en soxlet utilizando porciones de 10 g de muestra. Cada porción de grasa obtenida se almacenó, por separado, en desecadora. Cada una de estas extracciones constituyeron las distintas repeticiones para los análisis que se describen a continuación.

Los puntos de fusión de la manteca se realizaron llenando capilares sin heparina y sumergiéndolos en tubos de Thiele llenos de glicerina. La temperatura de fusión se tomó como el punto en el que todos los cristales habían fundido.

El índice de refracción se determinó a 40°C en un refractómetro Baush and Lomb ABBE 3L. El índice de yodo y el índice de saponificación se llevaron a cabo por las técnicas descritas por James, (James 1999).

El perfil de ácidos grasos se hizo por cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo Hewlett Packard Modelo 58-90 con detector de ionización de llama, y una columna SPB 5 de 30 m x 0.53 mm 0.5 µm. Se utilizó la técnica de saponificación y preparación de derivados metílicos recomendada por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP (INCAP 1996). El programa utilizado para la separación fue el siguiente: Presión de nitrógeno, 47 psi con split, y 2 psi en la cabeza de la columna; presión de hidrógeno, 12 psi, presión de aire, 35 psi; temperatura del inyector, 250°C y temperatura del detector, 260°C. La temperatura

inicial del horno fue de 200°C con una rampa de 10°C por min hasta llegar a 250°C y luego 10 min más a dicha temperatura. El volumen de inyección fue de 0.5 μ l.

Además del equipo mencionado anteriormente se utilizó lo siguiente: balanza analítica Denver Instruments, Modelo M-120, termómetro, mechero de bunsen, termoplate, agitadores magnéticos, magneto, buretas y cristalería en general.

IV. JUSTIFICACIÓN

La industria del cacao es importante para la obtención de cocoa, manteca de cacao, jarabe de cacao y chocolates de todo tipo. Por esta razón, existe una demanda creciente de la semilla de cacao, y su precio va en aumento constante (Sotelo 1991). Sin embargo, el cacao es una planta que es muy susceptible a plagas y a enfermedades producidas por hongos (Hernández 1989). Esto motiva a desarrollar investigación para encontrar especies resistentes o para hacer manipulaciones genéticas adecuadas con el fin de mejorar su resistencia (West 1992).

Los factores ambientales y ecológicos pueden ser responsables de diferencias en la composición química de especies de distinta variedad en cacao (Offem 1990). Si en *T. bicolor* existen diferencias de composición entre muestras de distintas regiones, se podrían aprovechar dichas diferencias para encontrar variedades cuyas características fisicoquímicas presentaran mayor similitud con las del cacao, haciéndolas, probablemente, adecuadas para su utilización como sustitutos o extensores del cacao y sus subproductos.

V. OBJETIVOS

A. General

Caracterizar física y químicamente las grasa de semillas de *T. bicolor* y *T. cacao* provenientes de distintas localidades de Guatemala.

B. Específicos

1. Analizar el contenido de grasa y humedad de las semillas descascaradas y molidas de *T. bicolor* y *T cacao*.
2. Determinar las siguientes características físicas y químicas de la grasa extraída de las semillas de *T. bicolor* y *T. cacao*: punto de fusión, índice de refracción, índice de saponificación, índice de yodo y perfil de ácidos grasos.
3. Determinar las diferencias en las características fisicoquímicas de la grasa entre las muestras obtenidas de cada región de *T. bicolor*.
4. Determinar las diferencias fisicoquímicas entre las muestras de *T. bicolor* y las de *T. cacao*.

VI. HIPÓTESIS

- A. La grasa de las muestras de *T. bicolor* recolectadas de las distintas regiones de Guatemala presentan diferencias en por lo menos una de sus características fisicoquímicas.
- B. Por lo menos una de las muestras de *T. bicolor* que serán analizadas posee características fisicoquímicas en su grasa similares a las de la grasa de *T. cacao*.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

A. UNIDAD EXPERIMENTAL

Las muestras analizadas fueron semillas de *T. bicolor*, las cuales fueron recolectadas en las siguientes regiones de Guatemala: Patulul, Coatepeque, Chicacao, Mazatenango, San Antonio, Samayac y San Marcos. Para cada localidad, se obtuvieron frutos (3 a 4) a partir de tres regiones distintas, las cuales se mezclaron para constituir un sólo lote por localidad. Así mismo se recolectaron semillas de *T. cacao* de la región de Chicacao. La harina homogenizada de las semillas secas, descascaradas y molidas constituyó la muestra a partir de la cual se realizaron los diversos análisis.

B. TAMAÑO DE MUESTRA

Los análisis de cada muestra proporcionada de *T. bicolor*, así como de la muestra de cacao, se hicieron por triplicado, teniéndose así 8 (7 de bicolor y 1 de cacao) \times 3 = 24. Se realizaron siete análisis a cada muestra, teniéndose así 24 \times 7 = 168 análisis.

C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada característica analizada se construyó una tabla de localidad (Kx contra rx, en donde K representa la localidad y r representa la repetición). Para ver la homogeneidad de varianzas de los resultados de cada una de las determinaciones, se siguió el modelo lineal clásico de análisis de varianza, ANDEVA de 1 vía, utilizando la siguiente fórmula:

$Y_{ij}^2 = m$ = la medida global a nivel nacional

t = efecto por estar en determinada región

y e_{ij} = error aleatorio de la metodología, localidad...etc.

La variación total fue igual a la variación de la región + la variación del error.

Se utilizó el programa STATA versión 7.0 y un nivel de significancia $P < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

El porcentaje de almendra y cáscara para las semillas de *T. bicolor* y *T. cacao* se presentan en la tabla 1. Las semillas de *T. bicolor* contienen aproximadamente un 25% de cáscara, aunque hay variabilidad entre localidades, desde un 20% para las semillas provenientes de las muestras de Patulul, hasta un 31% para las semillas de San Antonio. Las semillas de *T. cacao*, contienen aproximadamente tres veces menos porcentaje de cáscara.

Tabla 1. Porcentaje de almendra y cáscara de las semillas de *T. bicolor* y *T. cacao*.

MATERIAL	% DE ALMENDRA	% CÁSCARA
<i>T. bicolor</i> Patulul	79.7	20.3
<i>T. bicolor</i> Coatepeque	77.1	22.9
<i>T. bicolor</i> Chicacao	76.4	23.6
<i>T. bicolor</i> Mazatenango	73.5	26.5
<i>T. bicolor</i> San Antonio	69.0	31.0
<i>T. bicolor</i> Samayac	76.5	23.5
<i>T. bicolor</i> San Marcos	78.4	21.6
<i>T. Cacao</i>	91.9	8.1

El contenido de humedad de la harina obtenida a partir de las almendras molidas es relativamente homogéneo para todas los materiales, aunque un poco menor para la muestra de *T. bicolor* proveniente de Patulul y la muestra de *T. cacao*, (tabla 2). En la misma tabla se muestran los contenidos de grasa, que para las distintas localidades de *T. bicolor* varían desde 34.2 hasta 42.8%, con 37.7% en promedio. Estos datos se presentan en base seca. El valor promedio obtenido para *T. cacao* es mayor, de 53.3%.

Tabla 2. Contenidos de humedad y grasa para las harinas obtenidas de las almendras de las muestras de *T. bicolor* y *T. cacao*.

MATERIAL	CONTENIDO DE HUMEDAD (%)	CONTENIDO DE GRASA (% base seca)
<i>T. bicolor</i> Patulul	4.6 +/- 0.4	42.8 +/- 1.9
<i>T. bicolor</i> Coatepeque	5.7 +/- 0.2	36.0 +/- 0.6
<i>T. bicolor</i> Chicacao	5.3 +/- 0.3	36.8 +/- 1.9
<i>T. bicolor</i> Mazatenango	5.3 +/- 0.3	37.2 +/- 2.6
<i>T. bicolor</i> San Antonio	5.4 +/- 0.3	34.2 +/- 0.7
<i>T. bicolor</i> Samayac	5.6 +/- 0.6	35.2 +/- 0.9
<i>T. bicolor</i> San Marcos	5.6 +/- 0.4	41.8 +/- 1.3
<i>T. Cacao</i>	4.6 +/- 0.1	53.3 +/- 0.8

En la tabla 3 se presentan los puntos de fusión, índices de refracción, índices de yodo e índices de saponificación para la grasa extraída de las almendras de las semillas de las siete localidades de *T. bicolor*, y de la muestra de *T. cacao*.

Los puntos de fusión son esencialmente iguales para todas las localidades de *T. bicolor*, con un rango de 1 grado de diferencia, desde 37.2 hasta 38.2. El punto de fusión para el cacao, es de 3 a 4 grados por debajo, con un mismo valor para las tres repeticiones, de 34.5.

Los índices de refracción también son similares tanto para las muestras de *T. bicolor* como para las de *T. cacao*, con un valor promedio de 1.4583.

El índice de yodo varía entre 41.8 y 47.6 para las muestras de *T. bicolor*, y es menor, 36.6 para la muestra de *T. cacao*.

Los índices de saponificación son similares para todas las muestras, tanto para las de *T. bicolor* de las distintas localidades, como para las de *T. cacao*, aunque en esta última, la desviación estándar obtenida es muy alta.

Tabla 3. Punto de fusión, índice de refracción, índice de yodo e índice de saponificación obtenido para la grasa extraída de las almendras molidas, para cada una de las muestras de *T. bicolor* y *T. cacao*.

MATERIAL	PUNTO DE FUSIÓN (%)	ÍNDICE DE REFRACCIÓN (% base seca)	ÍNDICE DE YODO (g l/100 g grasa)	ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN (mg KOH g ⁻¹ grasa)
<i>T. bicolor Patulul</i>	37.8 +/- 0.3	1.4580 +/- 0.0000	42.3 +/- 1.0	192.2 +/- 1.5
<i>T. bicolor Coatepeque</i>	38.2 +/- 0.3	1.4583 +/- 0.0005	42.1 +/- 0.2	187.7 +/- 2.0
<i>T. bicolor Chicacao</i>	37.8 +/- 0.3	1.4577 +/- 0.0002	41.8 +/- 1.0	190.1 +/- 1.4
<i>T. bicolor Mazatenango</i>	37.8 +/- 0.3	1.4583 +/- 0.0006	44.4 +/- 2.6	191.3 +/- 3.4
<i>T. bicolor San Antonio</i>	37.7 +/- 0.3	1.4590 +/- 0.0000	47.6 +/- 1.0	194.1 +/- 7.1
<i>T. bicolor Samayac</i>	37.2 +/- 0.6	1.4592 +/- 0.0002	46.3 +/- 0.7	195.5 +/- 4.6
<i>T. bicolor San Marcos</i>	38.2 +/- 0.3	1.4582 +/- 0.0005	45.2 +/- 1.6	198.4 +/- 2.8
<i>T. Cacao</i>	34.5 +/- 0.0	1.4577 +/- 0.0002	36.6 +/- 0.8	195.5 +/- 10.5

En la figura 1 se muestra un cromatograma típico obtenido para las muestras de *T. bicolor* (en éste caso, la muestra San Marcos, repetición 1). En la figura 2 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos para la muestra de *T. cacao* (repetición 1). Todos los cromatogramas para cada repetición, tanto para las muestras de *T. cacao*, como para las siete localidades de *T. bicolor*, se muestran en la sección de apéndices.

Figura 1. Perfil de ácidos grasos de *T. bicolor*

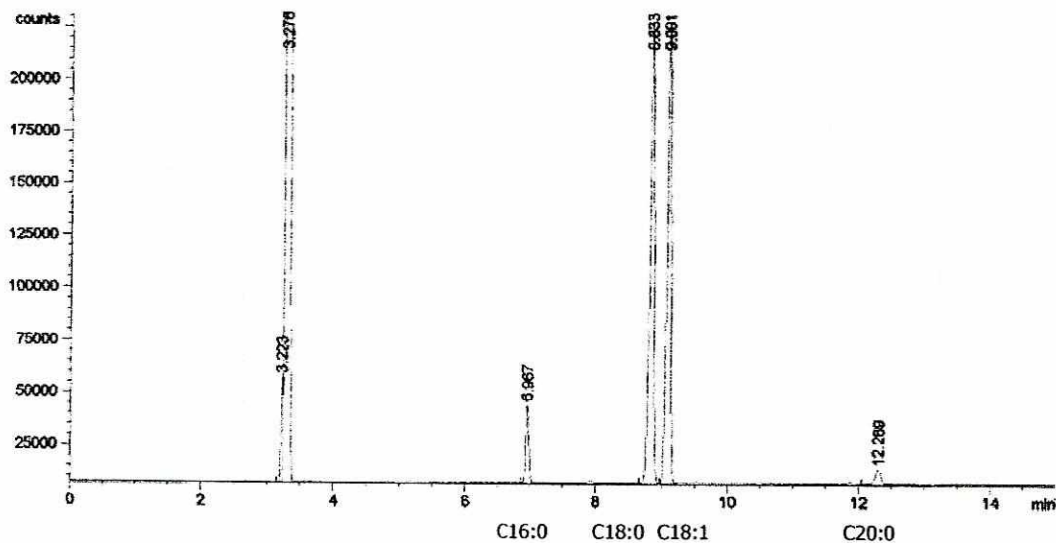
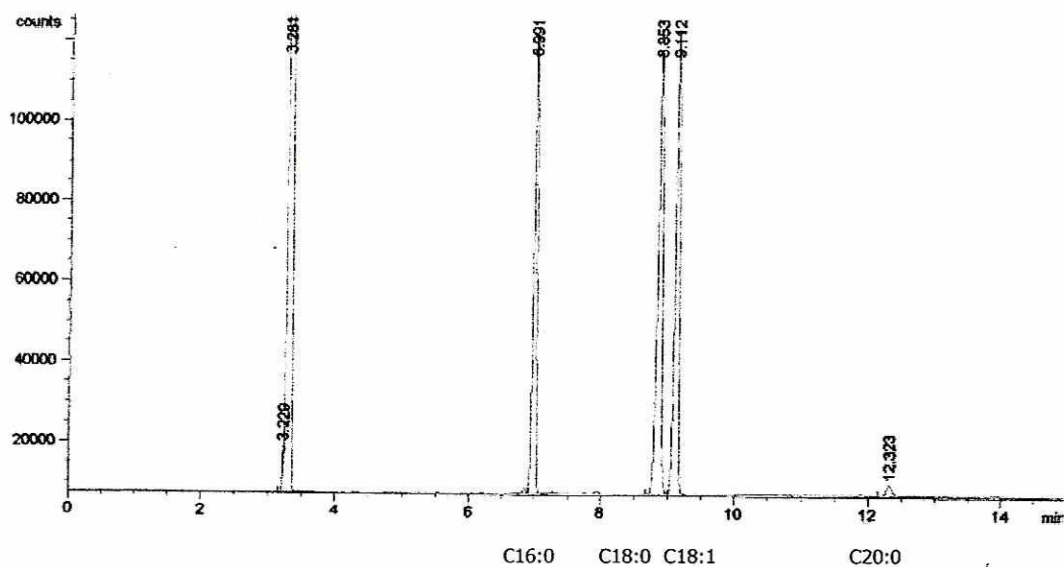


Figura 2. Perfil de ácidos grasos de *T. cacao*



Los contenidos de ácidos grasos de la manteca obtenida para las siete localidades de *T. bicolor* y la muestra de *T. cacao*, se muestran en la tabla 4. Se observan valores de alrededor de 6% de ácido palmítico (C16:0) para todas las localidades de *T. bicolor*, mientras que el porcentaje de dicho ácido en *T. cacao*, es

mucho mayor, 28.1%. El ácido esteárico (C18:0) es alrededor de un 10% menor en *T. cacao* que en *T. bicolor*. Esto también ocurre para los ácidos grasos insaturados, oleico (C18:1) + linoleico (C18:2), los cuales se presentan en un sólo pico, pues no se logró su separación aún utilizando distintas columnas, distintos cromatógrafos y distintas condiciones de separación. Las cantidades de ácidos esteárico, y oleico + linoleico, se presentan en porcentajes similares en todas las localidades de *T. bicolor*. El ácido araquídico (C20:0) es el ácido que se presenta en menor porcentaje, tanto en *T. bicolor* como en *T. cacao*. Otros ácidos, aunque pueden estar presentes, no pudieron ser detectados.

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos obtenido para la grasa extraída de las almendras molidas, para cada una de las muestras de *T. bicolor* y *T. cacao*.

MATERIAL	PALMÍTICO	ESTEÁRICO	OLEICO + LINOLEICO	ARAQUÍDICO
<i>T. bicolor Patulul</i>	6.0 +/- 0.5	45.1 +/- 1.3	46.2 +/- 2.1	2.7 +/- 0.5
<i>T. bicolor Coatepeque</i>	6.3 +/- 0.3	44.3 +/- 1.5	46.4 +/- 2.5	3.1 +/- 0.5
<i>T. bicolor Chicacao</i>	5.7 +/- 0.1	45.6 +/- 0.8	45.2 +/- 1.4	2.4 +/- 0.4
<i>T. bicolor Mazatenango</i>	5.6 +/- 0.4	45.8 +/- 1.0	46.0 +/- 1.2	2.5 +/- 0.1
<i>T. bicolor San Antonio</i>	5.7 +/- 0.2	48.2 +/- 0.3	43.6 +/- 0.5	2.5 +/- 0.3
<i>T. bicolor Samayac</i>	5.6 +/- 0.1	47.4 +/- 0.4	44.8 +/- 0.4	2.2 +/- 0.1
<i>T. bicolor San Marcos</i>	6.2 +/- 0.2	45.7 +/- 1.4	45.1 +/- 0.5	2.5 +/- 0.2
<i>T. Cacao</i>	28.1 +/- 0.6	36.0 +/- 0.2	34.4 +/- 1.2	1.2 +/- 0.1

IX DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El promedio del porcentaje de grasa de *T. bicolor* obtenido en este estudio, de 37.7%, está en el rango de los valores obtenidos por otros investigadores en semillas de esta especie. Torres encontró que la grasa de macambo (*T. bicolor*) de la región amazónica representaba un 33% de la semilla (Torres 2002). Chaisieri reporta un 27% de grasa para *T. bicolor* de Costa Rica, y 34.1% en *T. bicolor* de Brasil. Este valor es similar al obtenido por Berbert, 36.1%, también en semillas brasileñas (Berbert 1981). Sotelo y colaboradores encontraron 34.23% y 23.9% en las semillas de *T. bicolor* de la región de Chiapas, México (Sotelo y colaboradores 1990). En otro estudio llevado a cabo por los mismos investigadores, se encontró un valor menor, 17%, aunque este valor parece reportarse en base húmeda, el cual, en base seca, aumentaría a 35.6% (Sotelo y Álvarez 1991). Furlán y Bressani, reportan un valor de 24% en semillas guatemaltecas de *T. bicolor* (Furlán y Bressani 1997). Dicho valor podría corresponder a la semilla entera, no descascarada, con lo que, considerando que la cáscara puede constituir un 25% de la semilla, el valor podría representar un 32% de la almendra.

La comparación del contenido de grasa de *T. bicolor* con otras especies del género *Theobroma* distintas al cacao se dificulta, pues los datos reportados por distintos autores difiere. Por ejemplo, para *T. angustifolia*, Chaisieri y colaboradores reportan un valor de 58.6% de grasa, mientras que Sotelo y Álvarez, reportan 17.5% (31.3% en base seca), (Chaisieri *et. al.* 1989, Sotelo y Álvarez 1991). Para *T. grandiflorum*, Berbert reporta un 60.5% (Berbert 1981), mientras que Chaisieri, un 36.7%, (Chaisieri *et. al.* 1989). En *T. mammosa*, Chaisieri reporta un 49.6% (Chaisieri *et. al.* 1989).

Es bien conocido que la grasa es el componente principal de las almendras de cacao (Liendo *et. al.* 1998). El resultado obtenido en esta investigación para la muestra analizada de *T. cacao* fue de 52.9%, similar al obtenido en materiales de otras regiones. Berbert reporta un 56% en *T. cacao* de Brasil (Berbert 1981). En dos estudios realizados a materiales de la colección del germoplasma del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela, Liendo y colaboradores obtuvieron valores de 52.4% de grasa en materiales Criollos y 51.5% en materiales Híbridos (Liendo *et. al.* 1998); mientras que Padilla y colaboradores, valores entre 47.3 y 54.2% para cultivares Híbridos (Padilla *et. al.* 2000). Los autores de estos estudios encontraron diferencias significativas entre cultivares, por lo que concluyeron que la hibridación, en general, produce una disminución en el contenido de grasa (Padilla *et. al.* 2000). En un cultivar de Nigeria de la variedad Amazónica, Offem reportó un valor de 46.3% de grasa (Offem 1990). Furlán y Bressani obtuvieron un valor de 47.7% en un material de origen mexicano (Furlán y Bressani 1997). Sotelo y Álvarez reportaron el valor más bajo, 19.6%, aunque no se explica si éste valor es en base húmeda, el cual, considerando un 52.5% de humedad en la semilla, se elevaría a 50.3% de grasa, valor que se encontraría dentro del rango normal.

Debe considerarse que, al menos, parte de las diferencias obtenidas entre autores puedan deberse al método de extracción utilizado. Wessels y Toxopeus concluyen que las diferencias significativas en la grasa de diferentes híbridos de cacao son causadas por factores genéticos (Wessels y Toxopeus 1969). Por otro lado, el ambiente en el que el árbol de cacao crece parece tener un efecto significativo en el contenido de grasa (Padilla 2000). La forma de expresar el porcentaje, por ejemplo, si se refiere sólo a la almendra, o a la semilla entera, o si se trata de la semilla fresca o de la harina obtenida a partir de semillas previamente secadas, resultan en errores de interpretación. Estos aspectos no están claros en todas las publicaciones consultadas. Aún así, es interesante que algunas variaciones son muy grandes específicamente entre los materiales *T. angustifolium* y *T. grandiflora*, pues, para *T. bicolor* y *T. cacao*, las variaciones no se presentan en tan grande magnitud.

En cuanto a los valores obtenidos de grasa de las siete localidades de *T. bicolor* de este estudio, las muestras provenientes de Patulul y San Marcos presentaron valores estadísticamente mayores a los de las demás localidades. Esto parece indicar que en cuanto a contenido de grasa, el ambiente (posiblemente el suelo) puede tener un efecto importante. Sin embargo, a pesar de que estas localidades presentan los valores más altos, éstos son estadísticamente distintos (menores) que los obtenidos en *T. cacao*. No se encontraron diferencias significativas entre las localidades Coatepeque, Chicacao, Mazatenango, San Antonio y Samayac.

Para el porcentaje de humedad obtenida a partir de las semillas deshidratadas y molidas, los valores obtenidos en esta investigación, 5.3 y 4.6% para *T. bicolor* y *T. cacao*, son comparables con las obtenidas por Furlán y Bressani, de 5.6% para *T. bicolor* de Guatemala, y 5.3% para *T. bicolor* y *T. cacao* de México (Furlán y Bressani 1997).

El análisis estadístico indica que no hay diferencia significativa entre los datos de humedad para ninguna de las localidades de *T. bicolor*, así como tampoco para la comparación de éstas con *T. cacao*.

El punto de fusión obtenido en promedio para las siete localidades de *T. bicolor* fue 37.8; y para *T. cacao*, 34.5. Gilabert-Escrivá y colaboradores, reportaron valores de 36.3 para *T. bicolor* y 28.4 para *T. cacao* (Gilavert-Escrivá *et. al.* 2002). Berbert obtuvo valores de 35 para *T. bicolor* y 32 para *T. cacao* (Berbert 1981). Chaisieri, reportó puntos de fusión menores, de 29.7 y 28.3 para *T. bicolor*, y de 29.9 para *T. cacao* (Chaisieri, 1989). Sotelo y colaboradores reportaron un punto de fusión de 36 para *T. bicolor* (Sotelo 1990). Valores similares para *T. cacao* a los obtenidos en este estudio son los reportados por Liendo y colaboradores, entre 34.5 y 36.5 (Liendo *et. al.* 1997); y Padilla y colaboradores, de 35.5 y 36 (Padilla *et. al.* 2000). Bruni y colaboradores, obtuvieron puntos entre 32.6 y 33.3 para dos variedades de *T. cacao*, aunque reportan un rango de 29 a 35 °C (Bruni *et. al.* 2002).

Comparado a los puntos de fusión obtenido por otras especies del género *Theobroma*, Berbert reportó un punto de fusión de 32 para *T. grandiflorum* (Berbert 1981). Chaisieri, por su parte, reportó un valor de 28.2, 28.3 y 27.0, para *T. grandiflorum*, *T. mammosa* y *T. angustifolia*, respectivamente (Chaisieri 1989); y Bruni y colaboradores, de 39.1 para *T. subincanum* (Bruni 2002).

La temperatura de fusión de la manteca de cacao es un factor importante para la industria chocolatera. El espectro del punto de fusión de la manteca de cacao es amplio: una fusión incipiente ocurre entre 31.2 y 32.7°C, y una completa fusión ocurre entre 32 y 34°C. No se puede hablar de un punto de fusión específico, sólo de rangos de fusión (Martin 1987). Los métodos y los criterios en los que se decide que una temperatura corresponde al punto de fusión pueden variar. Por ejemplo, Chaisieri y colaboradores, midieron el punto por la temperatura de inicio de fusión de las endotermas, de acuerdo al método propuesto por Manning y Dimick (Chaisieri y colaboradores 1989, Manning y Dimick 1983). Dicho método favorece la formación de los cristales estables tipo V, y explica las diferencias obtenidas entre estos autores y otros, incluyendo los obtenidos en este trabajo, en el que el criterio utilizado fue el punto en el que todos los cristales habían fundido.

El comportamiento físico del chocolate, o de otro sistema alimenticio, es determinado por su microestructura, incluyendo la cantidad, tamaño, aspecto, y forma polimórfica de los cristales presentes (Tietz y Hartel 2000). Los cristales de la forma β_1 , son los que funden a mayor temperatura (34-36°C), (Tannenbaum 2004). Esta observación explica el hecho de haber obtenido un valor de 34.5, valor medio entre el rango de fusión de los cristales β_1 .

Utilizando una misma técnica de medición, Lehrian y colaboradores indicaron que, generalmente, las características de fusión de la manteca de cacao son relativamente constantes, y que variantes a dicho comportamiento son causadas por cambios en el tipo de triglicéridos (Leherian 1980).

El análisis estadístico indica que el punto de fusión de *T. bicolor* es significativamente mayor que el punto de fusión de *T. cacao*, pero que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de *T. bicolor* de las distintas localidades.

Los valores de índice de refracción obtenidos para *T. bicolor*, para las siete distintas localidades analizadas, variaron entre 1.4580 y 1.4592, aunque dichas diferencias no son estadísticamente significativas. Tampoco son diferentes al valor obtenido para *T. cacao*, de 1.4577.

Los resultados para el índice de refracción de *T. cacao* se asemejan a los obtenidos para *T. cacao* de Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Costa Rica, República Dominicana, México, Panamá, Costa de Marfil, Nigeria y Malasia, que varían entre 1.4572 y 1.4580 (Chaisieri y Dimick 1989); a los obtenidos por Bruni y colaboradores, de 1.4560 y 1.4573 para materiales Criollos e Híbridos,

respectivamente (Bruni *et. al.* 2002); y a los reportados por Padilla y colaboradores, de 1.4546 y 1.4571 (Padilla *et. al.* 2000).

El índice de yodo obtenido en promedio para *T. bicolor* fue de 43.8 $\text{gI}_2/100\text{g}$ de grasa. Dicho valor concuerda con el reportado por Berbert para *T. bicolor* de semillas brasileñas, de 43.7 (Berbert 1981). La localidad que presentó un índice mayor (estadísticamente distinto a las localidades de Patulul, Coatepeque y Chicacao,) fue San Antonio, de 47.6. Todas las muestras de *T. bicolor* presentaron un índice de yodo significativamente mayor que el índice de yodo de *T. cacao*.

El valor obtenido para *T. cacao* de 36.6, es comparable al obtenido por Berbert, de 35.1 (Berbert 1981); aunque mayor al obtenido por Bruni y colaboradores, quienes reportaron valores en el rango de 33.1 a 34.7 (Bruni *et. al.* 2002); y Padilla, de 32.5 a 34.1 (Padilla *et. al.* 2000).

Berbert y Alvim (1972) sugirieron que de zonas muy cercanas al Ecuador, con muy pocas variaciones estacionales y altas temperaturas, se podría esperar un bajo índice de yodo en la manteca de cacao. Guatemala se encuentra un poco más alejada del Ecuador que, por ejemplo, Brasil, Costa Rica y Venezuela, lo que podría explicar el leve aumento en dicho valor, aunque la región de donde el material para este estudio fue obtenida, probablemente presenta variaciones estacionales y temperaturas similares a las de los otros países mencionados.

La determinación del índice de yodo se relaciona con el contenido de ácidos grasos insaturados y provee una medida muy útil para estimar la dureza de la manteca (Chaiseri y Dimick 1989).

Era de esperarse de acuerdo a lo mencionado anteriormente, que la localidad que presentó un mayor índice de yodo, San Antonio, también presentara el mayor porcentaje de ácidos oleico + linoleico. Sin embargo, dicha localidad es la que menor contenido de estos ácidos presenta. Este resultado, aparentemente contradictorio probablemente se deba a la variabilidad de las metodologías. El análisis estadístico indica que no hay diferencia significativa en los porcentajes de ácidos oleico + linoleico, para ninguna de las siete localidades de *T. bicolor*.

El índice de saponificación obtenido, en promedio, para *T. bicolor*, fue de 192.8 y no difiere estadísticamente con el obtenido para *T. cacao*, de 195.5. Chaiseri y Dimick obtuvieron valores para *T. cacao* de distintas regiones del mundo desde 193.6 a 196.7 (Chaiseri y Dimick 1989), mientras que Padilla y colaboradores obtuvieron valores comprendidos entre 193.4 y 194.6. Por su parte, Bruni y colaboradores, obtuvieron valores desde 189.4 hasta 191.7, indicando un rango normal de 189 a 200 (Bruni *et. al.* 2002). Liendo reporta valores para *T. cacao* de 193.2 a 195.9, y Padilla, de 193.4 a 194.6 (Liendo *et. al.* 1997; Padilla *et. al.* 2000).

Ekpa y colaboradores encontraron que las grasas de las líneas Amazona F3 Amazon, Amelonado y Trinitario presentaban variaciones en los índices de saponificación, desde 191.21 a 198.68 mg KOH g^{-1} grasa, dependiendo en la

localización geográfica en la que las semillas de cacao fueron cosechadas. El análisis estadístico realizado a los datos de este estudio, indica que no hay diferencia significativa entre los índices de saponificación para ninguna de las localidades de *T. bicolor*, así como tampoco para la comparación de éstas con *T. cacao*. Esto puede deberse a que las muestras fueron recolectadas en localidades de características geográficas similares.

Las regulaciones Venezolanas estipulan que la manteca de cacao debe llenar los siguientes requisitos físicos y químicos: Índice de refracción de 1.456 a 1.458, punto de fusión de 28 to 35°C; índice de yodo (Wijs) de 33 a 40 gI₂ /100g e índice de saponificación de 188 a 200 mg KOH g⁻¹ (Padilla *et. al.* 2000). La manteca de cacao del material guatemalteco estudiado cumple con todos estos requisitos, y la manteca de *T. bicolor* cumple con todos, a excepción del punto de fusión, que es aproximadamente dos grados mayor, y el índice de refracción, también levemente superior.

En el perfil de ácidos grasos para *T. bicolor*, se obtuvieron valores para los ácidos palmítico, esteárico y araquídico, de 5.9, 46.0 y 2.6%, respectivamente. Los datos obtenidos por Berbert en semillas brasileñas fueron de 9.8, 41.4 y 1.9%, respectivamente (Berbera 1981). Con las columnas utilizadas y las distintas condiciones probadas, no fue posible separar el ácido oleico del linoleico, por lo que el valor que aquí se presenta es una suma de ambos, 45.3%, en promedio. Para el ácido oleico, Berbert reporta un valor de 43.2%, mientras que de linoleico, de 3.8% (Berbera 1981). Chaisieri y colaboradores reportaron valores de palmítico de 6.8 y 7.8%; esteárico, de 43.5 y 34.0%; oleico, de 43.4 y 51.8%, linoleico, de 4.3 y 5.0%; y araquídico, de 1.9 y 1.9%, para *T. bicolor* de Costa Rica y Brasil, respectivamente (Chaisieri *et al.* 1989). Gilavert-Escrivá y colaboradores, reportaron en *T. bicolor* brasileño, valores de 8.1, 47.8, 41.0, 1.2, y 1.6%, respectivamente (Gilavert-Escrivá *et. al.* 2002). Jee reportó valores similares a los aquí presentados, 6% de palmítico, 42.3% de esteárico y 45.2% de oleico (Jee 1984).

Para *T. cacao*, los valores obtenidos de ácidos palmítico, esteárico, oleico + linoleico y araquídico fueron de 28.1, 36.0, 34.3 y 2.5%, respectivamente. Berbert obtuvo valores de 28.1, 33.4, 35.6, 2.6 y 0.2% para los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, y araquídico, respectivamente; Chaisieri, de 28.9, 32.0, 34.0, 3.8 y 1.0%, y Gilavert-Escrivá y colaboradores, de 30.6, 33.9, 31.4, 2.5 y 0.9%, respectivamente (Berbert 1981; Chaisieri 1989; Gilavert-Escrivá *et. al.* 2002.).

En otros materiales del género *Theobroma*, Bruni reporta valores de 7.49, 40.7, 46.4, 3.19 y 1.31% en el endospermo de *T. subincanum* (Bruni *et. al.* 2002). Berbert, en *T. grandiflorum*, reporta, en el mismo orden, valores de 11.5, 31.8, 40.3, 5.6 y 9.8% (Berbert 1981). Chaisieri reporta para *T. angustifolia*, *T. grandiflora*, *T. mammosa* y *T. gileri*, valores de 4.8, 10, 5.6 y 11.8% de ácido palmítico; 25.9, 21.7, 25.9 y 12.2%, de esteárico; 48.8, 47.4, 44.1, y 34.2%, de oleico; 7.5, 8.6, 10.7 y 27.5% de linoleico; y 12.7, 12.1, 13.0 y 11.2% de araquídico, respectivamente (Chaisieri 1989).

En el análisis estadístico efectuado, no se observan diferencias significativas para el ácido palmítico entre ninguna de las siete localidades de *T. bicolor*, de este estudio, mientras que las diferencias son significativas entre cada una de las muestras de *T. bicolor* (5.9% en promedio) y *T. cacao*, (28.1%).

Para el ácido esteárico, las muestras de Coatepeque (44.3%) son estadísticamente diferentes a las de San Antonio (48.2%), y para cada una de las localidades (46.0% de dicho ácido, en promedio), existe diferencia significativa comparada con la muestra de *T. cacao* (de 36.0%).

Para el ácido oleico + linoleico (insaturados), no se observa diferencia significativa entre ninguna de las localidades de *T. bicolor*, pero sí entre cada una de ellas (45.3% en promedio, para el total de las 7 localidades) y la de *T. cacao* (35.3%).

Por último, para el ácido araquídico, no existen diferencias significativas entre localidades de *T. bicolor*, pero todas las localidades de *T. bicolor* son estadísticamente diferentes a las muestras de *T. cacao*, a excepción de las muestras provenientes de Samayac, que según la estadística aplicada, son iguales a la muestra de cacao.

La grasa de *T. cacao* de este estudio presentó un total de ácidos grasos saturados de 65.5%, mientras que su contenido de insaturados fue de 34.3%. En el caso de *T. bicolor*, que presenta una apariencia más suave, su contenido de saturados es de 54.6%, y de insaturados, de 45.4%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Berbert, tanto en *T. cacao*, con un 61.7% de saturados y un 38.2% de insaturados, como en *T. bicolor*, de 53.1% de saturados y 47.0% de insaturados (Berbert 1981).

Un alto contenido de ácidos grasos insaturados contribuyen a una textura suave en la manteca de cacao. Esto pudo observarse claramente en este trabajo, ya que la manteca obtenida de todas las muestras de *T. bicolor* era más suave que la obtenida a partir de *T. cacao*. De hecho, la manteca de *T. bicolor* daba la impresión de consistir en dos fases, una sólida embebida en una oleosa. Fue muy interesante notar que el punto de fusión era mayor para *T. bicolor* que para *T. cacao* (fenómeno que concuerda con los hallazgos de otros autores, como Berbert 1981, y Gilavert-Escrivá y colaboradores 2002), ya que los ácidos grasos insaturados presentan *menores* puntos de fusión que sus homólogos saturados. El *T. bicolor* contiene un mayor porcentaje de ácidos insaturados que *T. cacao*, pero su contenido de ácido esteárico, saturado, es también mayor. El cacao presenta un mayor porcentaje de ácidos saturados, pero su contenido de palmítico es casi cinco veces mayor que el de *T. bicolor*. El punto de fusión de los ácidos grasos de una cadena homóloga aumenta con el número de carbonos. El ácido palmítico funde a una temperatura de (61°C) comparado con el esteárico (69°C). Debe considerarse también aquí, una vez más, que la temperatura de fusión depende de la estructura dimensional o, dicho de otra forma, del tipo de cristales presentes, así como de la disposición de los ácidos grasos en la molécula de glicerol (Badui 1995, Charley 1998).

Berbert señala que la textura más suave de la grasa de *T. bicolor* comparada con la de *T. cacao*, aparentemente la hace inadecuada para la fabricación de chocolates en barra (Berbert 1981). Pero esto podría cambiar si dicha grasa fuera sometida a una purificación o modificación posterior mínima, a fin de disminuir su cantidad de ácidos grasos insaturados, o su separación física de los cristales más blandos. Sin embargo, otros autores, indican que la grasa de *T. bicolor* es una de las grasas más recomendadas como substitutos de la manteca de cacao (Gilavert-Escriva *et. al.* 2002).

Debe estudiarse la posibilidad de utilizar la grasa proveniente de estas semillas en la industria de margarinas suaves, en la industria repostería y en otras aplicaciones de la industria de alimentos. Además la producción y comercialización de *T. bicolor* presenta un potencial grande como fuente de productos naturales de bajo costo en la industria cosmética, farmacéutica y nutracéutica.

X. CONCLUSIONES

1. Las almendras de las muestras de *T. bicolor* analizadas presentaron un contenido de grasa significativamente menor que las almendras de las muestras de *T. cacao*. Entre las muestras de *T. bicolor* de las distintas localidades, la de Patulul presentó un contenido significativamente mayor de grasa. Las muestras de las demás localidades fueron estadísticamente iguales.
2. La grasa de las almendras de *T. bicolor* presentó un índice de yodo significativamente mayor que la grasa de las almendras de *T. cacao*. De las muestras de *T. bicolor*, la localidad de San Antonio presentó el valor más alto, y estadísticamente distinto a las localidades Patulul, Coatepeque y Chicacao.
3. La grasa de las almendras de *T. bicolor* presentó un punto de fusión significativamente mayor que el obtenido en las almendras de *T. cacao*. No se encontraron diferencias significativas en el punto de fusión para ninguna de las siete localidades de *T. bicolor* estudiadas.
4. No se encontraron diferencias significativas en el índice de refracción entre las distintas localidades de *T. bicolor*, ni entre éstas y las muestras de *T. cacao*.
5. No se encontraron diferencias significativas en el índice de saponificación entre las distintas localidades de *T. bicolor*, ni entre éstas y las muestras de *T. cacao*.
6. El porcentaje de ácido palmítico de la grasa de *T. cacao* fue significativamente mayor que el de todas las localidades de *T. bicolor* estudiadas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de las distintas localidades de *T. bicolor* para éste ácido.
7. El porcentaje de ácido esteárico de la grasa de *T. cacao* fue significativamente menor que el de todas las localidades de *T. bicolor* estudiadas. Entre las distintas localidades de *T. bicolor*, la muestra de San Antonio fue significativamente distinta (mayor) a la muestra de Coatepeque. Las demás muestras de *T. bicolor* fueron estadísticamente iguales en cuanto al contenido de ácido esteárico.
8. El contenido de ácido oleico (u oleico + linoleico) fue significativamente mayor en la grasa de las muestras de *T. bicolor* comparado con la grasa

de las muestras de *T. cacao*. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de dicho ácido entre las distintas localidades de *T. bicolor*.

9. El porcentaje de ácido araquídico de la grasa de *T. cacao* fue significativamente menor que el de todas las localidades de *T. bicolor* estudiadas, a excepción de la muestra de *T. bicolor* proveniente de Samayac, que fue estadísticamente igual a las muestras de *T. cacao*. Todas las demás localidades de *T. bicolor* fueron estadísticamente iguales en cuanto al contenido de este ácido.

XI RECOMENDACIONES

1. Se recomienda analizar la composición de triglicéridos y caracterizar los perfiles de cristalización y fusión, así como distinguir el tipo de polimorfismo presente en la manteca de *T. bicolor* para completar así su caracterización.
2. Se recomienda estudiar el potencial que esta manteca ofrece. Podría ser un sustituto de mantecas vegetales hidrogenadas, así como ser utilizada en otras aplicaciones en la industria de alimentos, como en pastelería, fabricación y cubierta de helados, rellenos y jarabes de chocolate. Las aplicaciones podrían extenderse a la industria cosmética.
3. Se recomienda fomentar el cultivo de esta especie pues posee muchas características interesantes para la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y nutracéutica.

XII BIBLIOGRAFÍA

1. Association of Official Analytical Chemists, 1984. *Official Methods of Analysis*. 14th ed., Williams, S., Ed., Ass. Off. Anal. Chem., Arlington, V. A., pp. 1141.
2. Aurand, L.U.U., Woods, A.E., Wells, M. R. 1987. *Food Composition and Analysis*. pp 210-223. Van Nonstrand Reinhold, USA.
3. Badui S. 1993. *Química de los Alimentos*. 3ª ed. Alambra Mexicana S.A. de C.V. Méxco DF., 648 p.
4. Berbert,, P.R.F. y Alvim, P. Fatores que afetam o indice de iodo de manteiga de cacau do Brasil. R. *Theobroma*. 1972;2: 3-16.
5. Berbert P.R.F. 1981. Determination of fatty acid composition and physical characteristics of fats of the seeds of *Theobroma gandiflora* L. and of *Theobroma bicolor* L. and comparison with the fat of *Theobroma cacao* L. *Revista Theobroma* 11: 91-58.
6. Bernardini, E. 1985. Oil Seeds and Fats. II. *Oils and Fats Processing*. 2nd ed. pp. 28-29. Publishing House, Italia.
7. Bruni, R., et al. 2002. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. *Food Chem* 77:337-341.
8. Bruni, R. et al. 2000. Lipid composition of wild ecuatorian *Theobroma subincanum* Mart seeds and comparison with two varieties of *Theobroma cacao* L. *J Agric Food Chem* 48:691-694.
9. Cubero, et al. 1992. Calidad del cacao en Costa Rica. *Turrialba* 42: 288-292.
10. Chaiseri, S., et al. 1989. Thermal characteristics and composition of fats from *Theobroma* species. *Turrialba* 39: 468-472.
11. Charalambous, G., Inglett, G. E. 1978. *Flavor of Foods and Beverages, Chemistry and Technology*. pp. 81-90. Acad. Press Inc., USA.
12. Charley, H. 1998. *Tecnología de Alimentos. Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos*. Limusa, S.A. de C.V. México, D.F. 767 p.
13. Fritz, P. J., et al. 1995. Backcross populations for genetic analysis of *Theobroma cacao*. Catongo X Tree 33 (Catongo X Pound 12). *Turrialba* 45:49-56. et.al.

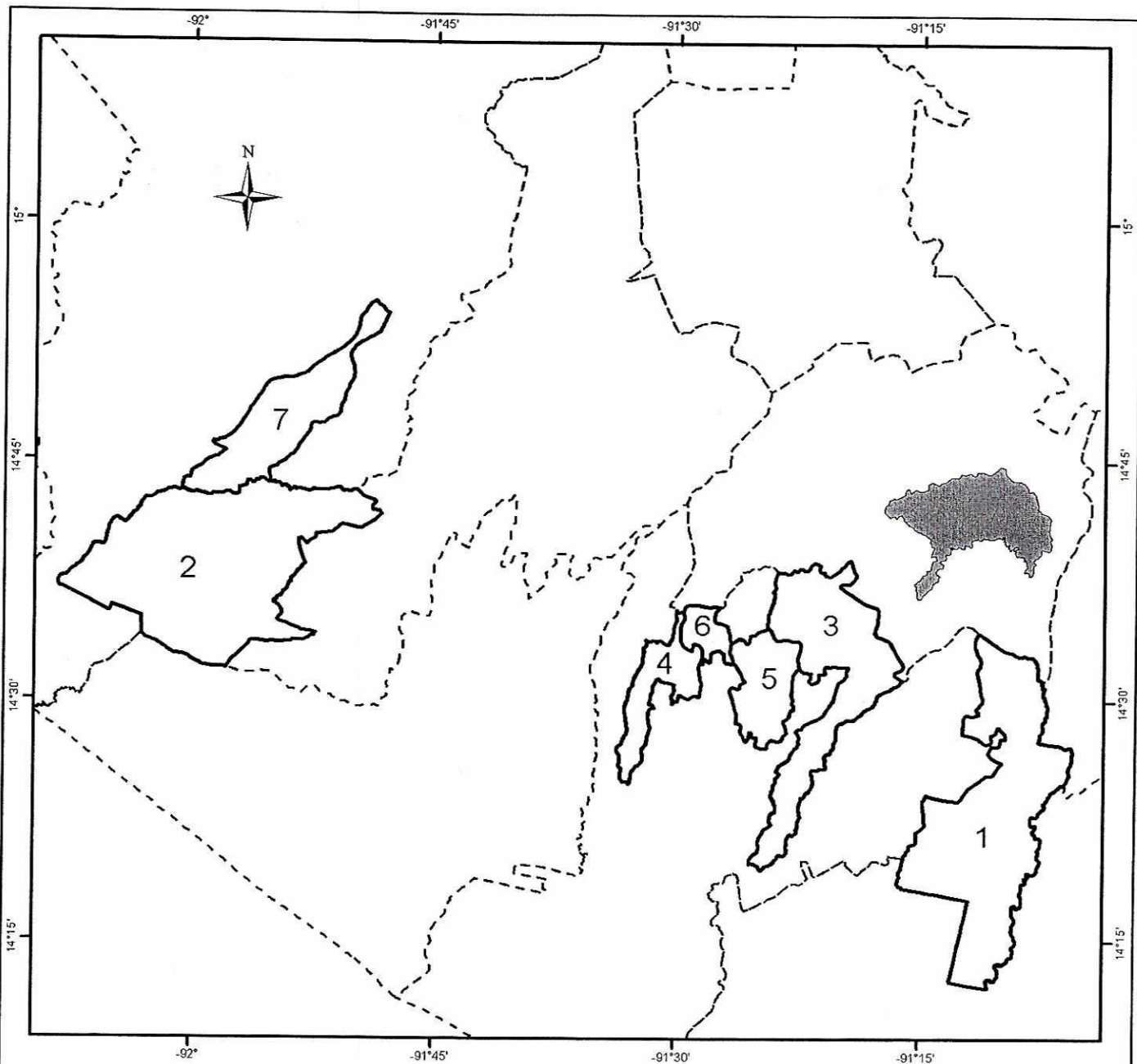
14. Furlán, A. L., Bressani, R. 1997. Chemical characterization of the seed and pulp of *Theobroma bicolor*. *Coffe and Cocoa News*. Nestl, 2:17-22.
15. Furlán, A. L., Bressani, R. 1997. Recursos vegetales con potencial de explotación agroindustrial de Guatemala. 1. Caracterización química de la pulpa y las semillas de *Theobroma bicolor* L. *Sometido a Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Caracas, Venezuela*.
16. Gilavert-Escriva, M.V., Goncalves, L.A., Silva, C.R.S., Figuera, A. 2002. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seed of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. *J Sci Food Agric* 82:1425-1431.
17. Hardy, F. (ed) 1960. *Cacao Manual*. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
18. Hernández, J.A. 1989. *Análisis de la Tecnología Empleada en la Producción de Cacao (T. cacao L) en el Municipio de San Antonio Suchitepéquez*. Tesis de Ingeniería Agronómica, Fac. de Agr., USAC, Guatemala.
19. INCAP. 1996. *Técnica de Determinación de Ácidos Grasos por Cromatografía de Gases*. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Laboratorio de Composición de Alimentos, 1a Revisión, Guatemala.
20. James, C.S. 1999. *Analytical Chemistry of Foods*. pp. 140-151. Gaithersburg, Aspen, USA.
21. Jee, M. H. 1984. Composition of the fat extracted from the seeds of *Theobroma bicolor*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61:751-753.
22. Justin, M. M., Rust, L. O., Vail, G. E. 1956. *Foods*. 4th ed. pp. 138. Riverside Press, USA.
23. Lehrian D.W, Kenney PG and Butler D.R. Triglyceride characteristics of cocoa butter from cacao fruit matured in a microclimate of elevated temperature. *J Am Oils Chem Soc* 1980;57: 66-69.
24. Liendo, R., Padilla, F.C., Quintana, A. 1997. Characterization of cocoa butter extracted from criollo cultivars of *Theobroma cacao*. *Food Res. Int.* 30:727-731.
25. Manning, D. M. Diminick, P.S. 1983. Interpreting the thermal characteristics of cocoa butter using the differential scanning calorimeter. *Manufacturing Confectioner* 63:73-80.
26. Martin Jr R.A. Chocolate. *Adv Food Sci* 1987;31: 211-342.

27. Matz, S. A. 1993. *Snack and Food Technology*. 3a ed. pp. 118-119. Van Nonstrand Reinhold, USA.
28. Mohr, W. 1974. *Ist International Congress on Cocoa and Chocolate Research*. pp. 135. Institut fur Lebensmitteltechnologie und Verpackung. Munchen, West Germany.
29. Offem, J. O. 1990. Individual variation in the amino acid and chemical composition of defatted cocoa bean meal of three varieties of cocoa (*Theobroma cacao*) from South-eastern Nigeria. *J. Sci. Food Agric.* 52:129-135.
30. Osei J. K., *et al.* 1995. Construction of a low-density linkage map of *Theobroma cacao* using random amplified polymorphic DNA markers and an anthocyanin biosynthetic locus. *Turrialba* 45:128.
31. Padilla, F.C. 2000. Liendo, R. y Quintana, A. Characterization of cocoa butter extracted from Irbid cultivars of *Theobroma cacao* L. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50:
32. Peckham, G. C., Freeland-Graves J. H. 1979. *Foundations of Food Preparations*. 4th ed. pp. 155-157. Mc Millan Publisher Co Inc, USA.
33. Phillips-Mora, W., Galindo, J. J. 1989. Método de inoculación y evaluación de la resistencia a *Phytophthora palmivora* en frutos de Cacao (*Theobroma cacao*). *Turrialba* 39:448-497.
34. Potter, N. N. 1968. *Food Science*. pp. 528-534. Avi Publishing Co Inc, USA.
35. Ribeiro, N. C. A., Bezerra, J. L., Lopez, A. S. 1968. Mycobiota of cacao fermentation in Bahia State, Brazil. *Revista Theobroma* 16: 47-55.
36. Rogez, H., *et. al.* 2004. Chemical composition of the pulpo of three typical Amazonian fruits: araca-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). *Eur Food Res Tech* 218:380-384.
37. Sánchez, P. A., Jaff,, K. 1989. El género *Theobroma* en el Territorio Federal Americano (Venezuela). II. Distribución geográfica. *Turrialba* 39: 446-454.
38. Sanchez, P., Jaff,, K., Muller, M. C. 1989. El género *Theobroma* en el Territorio Federal Americano (Venezuela). I. Nota etnobotanica y consideraciones agronómicas. *Turrialba* 39: 440-446.

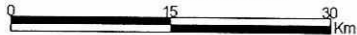
39. Sotelo, A., Álvarez, R. G. 1991. Chemical composition of wild Theobroma species and their comparison to the cacao bean. *J. Agr. Food Chem.*, 39:1940-1943.
40. Sotelo, A, *et al.* 1990. Chacarcteristics and fatty acid content of the fat of the seeds of nine wild mexican plants. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1503-1505.
41. Standley, P., Steymark, J. 1941. Flora of Guatemala. Vol. 24, Part vi. pp. 424-432. Chicago National History Museum, USA.
42. Tanenbaum, G. Chocolate: A marvelous Natural Product of Chemistry. *J. Chem. Educ.* 81:1134.
43. Torres, D.E.G, *et. al.* 2002. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. *Eur J Lipid Sci Tech*, 104 (5): 278-281.
44. Wessels M and Toxopeus H. 1969. Seasonal influence on pod and bean values of West African Amelonado Cacao. In: Second International Cacao Research Conference, Babia Brasil. Centro de Pesquisas du Cacao, Bahía. *Proceedings*: 351-355.
45. West, J. A. 1992. *A Brief History and Botany of Cacao*. En Foster, N. y Cordell, L. S. (ed) *Chillies to Chocolate*. pp. 105-115. Univ. Arizona Press, USA.
46. Willson, K. C. 1999. *Cofee, Cocoa and Tea*. CABI Publishing: New York, p. 300.
47. Wong, M. K., Dimick, P. S., Hammerstedt, R. H. 1990. Extraction and high performance liquid chromatographic enrichment of polyphenol oxidase from *Theobroma cacao* seeds. *J. of Food Sci.* 55:1108.

41. Standley, P., Steymark, J. 1941. Flora of Guatemala. Vol. 24, Part vi. pp. 424-432. Chicago National History Museum, USA.
42. Tanenbaum, G. Chocolate: A marvelous Natural Product of Chemistry. *J. Chem. Educ.* 81:1134.
43. Torres, D.E.G, et. al. 2002. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. *Eur J Lipid Sci Tech*, 104 (5): 278-281.
44. Wessels M and Toxopeus H. 1969. Seasonal influence on pod and bean values of West African Amelonado Cacao. In: Second International Cacao Research Conference, Bahia Brasil. Centro de Pesquisas du Cacao, Bahía. *Proceedings*: 351-355.
45. West, J. A. 1992. *A Brief History and Botany of Cacao*. En Foster, N. y Cordell, L. S. (ed) *Chillies to Chocolate*. pp. 105-115. Univ. Arizona Press, USA.
46. Willson, K. C. 1999. *Coffee, Cocoa and Tea*. CABI Publishing: New York, p. 300.
47. Wong, M. K., Dimick, P. S., Hammerstedt, R. H. 1990. Extraction and high performance liquid chromatographic enrichment of polyphenol oxidase from *Theobroma cacao* seeds. *J. of Food Sci.* 55:1108.

XIII APÉNDICES



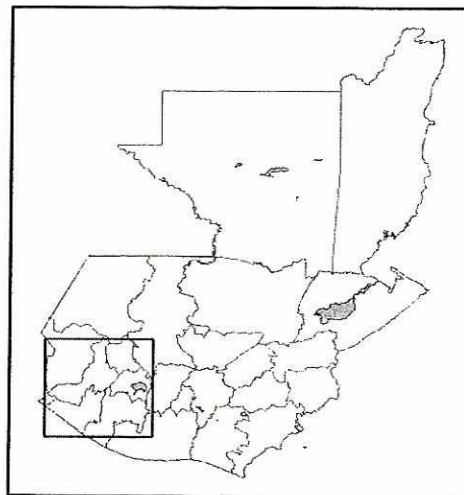
Escala 1:650,000



Cuadrícula UTM Zona 15
Datum Horizontal WGS84

Localidades de muestreo para *T. bicolor* y *T. cacao*

1. Patulul, Suchitepéquez
2. Coatepeque, Quetzaltenango
3. Chicacao, Suchitepéquez
4. Mazatenango, Suchitepéquez
5. San Antonio, Suchitepéquez
6. Samayac, Suchitepéquez
7. Nuevo Progreso, San Marcos



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Localidad
- 1: *T. bicolor* Patulul
 - 2: *T. bicolor* Coatepeque
 - 3: *T. bicolor* Chicacao
 - 4: *T. bicolor* Mazatenango
 - 5: *T. bicolor* San Antonio
 - 6: *T. bicolor* Samayac
 - 7: *T. bicolor* San Marcos
 - 8: *T. cacao*

1. GRASA

oneway grasa local, scheffe

Analysis of Variance						
Source	SS	df	MS	F	Prob > F	
Between groups	836.179417	7	119.454202	51.97	0.0000	
Within groups	36.7781225	16	2.29863265			
Total	872.957539	23	37.9546756			

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(7) = 6.9690$ Prob> $\chi^2 = 0.432$

Comparison of GRASA by local						
(Scheffe)						
Row Mean-						
Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	-6.81333					
	0.007					
3	-6.08	.733335				
	0.019	1.000				

4	-5.64667	1.16667	.433333			
	0.034	0.995	1.000			
5	-8.68	-1.86667	-2.6	-3.03333		
	0.001	0.931	0.725	0.558		
6	-7.68	-8.66667	-1.6	-2.03334	.999999	
	0.002	0.999	0.969	0.897	0.998	
7	-1.04667	5.76667	5.03333	4.6	7.63333	6.63333
	0.997	0.029	0.073	0.123	0.002	0.009
8	10.4533	17.2667	16.5333	16.1	19.1333	18.1333
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Row Mean-|

Col Mean | 7

-----|-----

8 | 11.5

| 0.000

2. HUMEDAD

. edit

- preserve

(1 var, 23 obs pasted into editor)

(1 var, 23 obs pasted into editor)

. oneway humedad reg, scheffe

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	3.35326111	7	.479037301	3.69	0.0160
Within groups	1.94500036	15	.129666691		
Total	5.29826147	22	.240830067		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(7) = 5.1025$ Prob> $\chi^2 = 0.647$

Comparison of HUMEDAD by REG
(Scheffe)

Row Mean-	1	2	3	4	5	6
2	1.06667					
	0.144					
3	.7	-.366667				
	0.593	0.974				
4	.666667	-.4	-.033333			
	0.647	0.959	1.000			
5	.8	-.266667	.1	.133333		
	0.435	0.996	1.000	1.000		
6	1	-.066667	.3	.333333	.2	

	0.196	1.000	0.992	0.985	0.999	
7	1.03333	-.033333	.333333	.366667	.233333	.033333
	0.168	1.000	0.985	0.974	0.998	1.000
8	.05	-1.01667	-.65	-.616667	-.75	-.95
	1.000	0.288	0.778	0.818	0.640	0.364

Row Mean-|

Col Mean | 7

-----|-----

8 | -.983334

3. PUNTO DE FUSIÓN

oneway fusion local, scheffe

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	31.0729167	7	4.4389881	42.61	0.0000
Within groups	1.66666667	16	.104166667		
Total	32.7395833	23	1.42346014		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(6) = 1.8655$ Prob> $\chi^2 = 0.932$

Note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:

1 multiple-observation cells not used

Comparison of PUNTO DE FUSIÓN by local (Scheffe)						
Row Mean-						
Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	.333333					
	0.972					
3	0	-.333333				
	1.000	0.972				
4	0	-.333333	0			
	1.000	0.972	1.000			
5	-.166667	-.5	-.166667	-.166667		
	1.000	0.811	1.000	1.000		
6	0	-.333333	0	0	.166667	
	1.000	0.972	1.000	1.000	1.000	

7	.333333	0	.333333	.333333	.5	.333333
	0.972	1.000	0.972	0.972	0.811	0.972
8	-3.33333	-3.66667	-3.33333	-3.33333	-3.16667	-3.33333
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Row Mean-|

Col Mean | 7

-----|-----

8 | -3.66667

| 0.000

4. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Row Mean-|

Col Mean | 1 2 3 4 5 6

```

-----|-----
2 | -.199999
  | 1.000
  |
3 | -.466667 -.266668
  | 1.000 1.000
  |
4 | -.933333 -.733334 -.466666
  | 1.000 1.000 1.000
  |
5 | 5.26667 5.46667 5.73333 6.2
  | 0.945 0.934 0.917 0.882
  |
6 | 3.9 4.1 4.36667 4.83333 -1.36667
  | 0.989 0.986 0.980 0.965 1.000
  |
7 | 2.93333 3.13333 3.4 3.86666 -2.33333 -.966667
  | 0.998 0.997 0.995 0.990 1.000 1.000
  |
8 | -5.7 -5.5 -5.23333 -4.76667 -10.9667 -9.6
  | 0.920 0.932 0.947 0.967 0.318 0.475

```

Row Mean-|

Col Mean | 7

```

-----|-----
8 | -8.63333
  | 0.601

```

5. ÍNDICE DE YODO

oneway yodo local, scheffe

Analysis of Variance						
Source	SS	df	MS	F	Prob > F	
Between groups	245.284976	7	35.0407109	20.86	0.0000	
Within groups	26.873325	16	1.67958281			
Total	272.158301	23	11.8329696			

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(7) = 10.0954$ Prob> $\chi^2 = 0.183$

Comparison of ÍNDICE DE YODO by local (Scheffe)						
Row Mean-						
Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	-1.99999					
	1.000					
3	-4.66667	-2.66668				
	1.000	1.000				
4	2.06667	2.26667	2.53333			
	0.788	0.706	0.586			
5	5.26667	5.46667	5.73333	3.2		
	0.017	0.013	0.008	0.309		
6	4.03333	4.23333	4.5	1.96666	-1.23333	
	0.107	0.081	0.055	0.826	0.982	
7	2.93333	3.13333	3.4	.866665	-2.33333	-1.1
	0.410	0.333	0.245	0.998	0.676	0.991

8	-5.7	-5.5	-5.23333	-7.76667	-10.9667	-9.73333
	0.009	0.012	0.018	0.000	0.000	0.000

Row Mean-|

Col Mean | 7

-----|-----

8 | -8.63333

| 0.000

6. ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN

```
. edit
- preserve
(1 var, 21 obs pasted into editor)
- drop var1
(1 var, 24 obs pasted into editor)
- rename var1 SAPON
```

```
. oneway  SAPON reg, scheffe
```

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	254.204027	7	36.314861	1.41	0.2687
Within groups	412.735417	16	25.7959636		
Total	666.939444	23	28.9973671		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(7) = 11.6635$ Prob> $\chi^2 = 0.112$

Comparison of ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN by REG
(Scheffe)

Row Mean-	1	2	3	4	5	6
2	-4.56333					
	0.987					
3	-2.18333	2.38				
	1.000	1.000				
4	-0.923335	3.64	1.26			
	1.000	0.997	1.000			
5	1.93333	6.49667	4.11667	2.85667		
	1.000	0.918	0.993	0.999		

6	3.32	7.88334	5.50334	4.24334	1.38667		
	0.998	0.809	0.964	0.992	1.000		
7	6.22	10.7833	8.40333	7.14333	4.28666	2.89999	
	0.933	0.487	0.757	0.873	0.991	0.999	
8	3.35333	7.91667	5.53667	4.27667	1.42	.03333	
	0.998	0.806	0.963	0.991	1.000	1.000	

Row Mean-|

Col Mean | 7

-----|-----
 8 | -2.86666
 | 0.999

Row Mean-

Col Mean | 7

-----|-----

8 | 21.9

| 0.000

8. ÁCIDO ESTEÁRICO

. oneway est reg

Analysis of Variance						
Source	SS	df	MS	F	Prob > F	
Between groups	297.649651	7	42.5213786	43.10	0.0000	
Within groups	15.7866887	16	.986668043			
Total	313.436339	23	13.6276669			

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(7) = 10.8973$ Prob> $\chi^2 = 0.143$

. oneway est reg, scheffe

Analysis of Variance						
Source	SS	df	MS	F	Prob > F	
Between groups	297.649651	7	42.5213786	43.10	0.0000	
Within groups	15.7866887	16	.986668043			
Total	313.436339	23	13.6276669			

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(7) = 10.8973$ Prob> $\chi^2 = 0.143$

Comparison of ESTEÁRICO by REG
(Scheffe)

Row Mean-						
Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	-.766666					
	0.995					
3	.466666	1.23333				
	1.000	0.929				

```

4 | .700001  1.46667  .233335
  |  0.997   0.844   1.000
  |
5 |   3.1  3.86667  2.63334   2.4
  |  0.106   0.024   0.235   0.333
  |
6 |  2.33333   3.1  1.86667  1.63333  -.766666
  |  0.366   0.106   0.630   0.763   0.995
  |
7 |   .6  1.36667  .133334  -.100001  -2.5  -1.73333
  |  0.999   0.885   1.000   1.000   0.288   0.708
  |
8 | -9.13333 -8.36667  -9.6  -9.83333 -12.2333 -11.4667
  |  0.000   0.000   0.000   0.000   0.000   0.000

```

Row Mean-|

Col Mean | 7

```

-----|-----
8 | -9.73333
  |  0.000

```

9. ÁCIDOS OLEICO + LINOLEICO

. oneway oleico reg, scheffe

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	332.859606	7	47.5513723	22.89	0.0000
Within groups	33.2400151	16	2.07750094		
Total	366.099621	23	15.9173748		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(7) = 9.5981$ Prob> $\chi^2 = 0.213$

Comparison of OLEICO + LINOLEICO by REG

(Scheffe)

Row Mean-						
Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	.166665					
	1.000					
3	-1.06667	-1.23333				
	0.996	0.990				
4	-.233334	-.399999	.833333			
	1.000	1.000	0.999			
5	-2.66667	-2.83333	-1.6	-2.43333		
	0.647	0.579	0.959	0.739		
6	-1.46667	-1.63333	-.4	-1.23333	1.2	
	0.974	0.955	1.000	0.990	0.992	
7	-1.1	-1.26667	-.033333	-.866666	1.56667	.366667
	0.995	0.989	1.000	0.999	0.964	1.000

```
|  
8 | -11.8667 -12.0333 -10.8 -11.6333 -9.2 -10.4  
| 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000
```

Row Mean-|

Col Mean | 7

```
-----|-----  
8 | -10.7667  
| 0.000
```

10. ÁCIDO ARAQUÍDICO

. oneway araq reg, scheffe

Analysis of Variance						
Source	SS	df	MS	F	Prob > F	
Between groups	6.42666668	7	.918095239	10.30	0.0001	
Within groups	1.42666653	16	.089166658			
Total	7.8533332	23	.34144927			

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(7) = 13.5778$ Prob> $\chi^2 = 0.059$

Comparison of ARAQUÍDICO by REG
(Scheffe)

Row Mean-						
Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	.466667					
	0.804					
3	-.3	-.766667				
	0.976	0.267				
4	-.133333	-.6	.166667			
	1.000	0.553	0.999			
5	-.133333	-.6	.166667	0		
	1.000	0.553	0.999	1.000		
6	-.5	-.966667	-.2	-.366667	-.366667	
	0.747	0.085	0.998	0.932	0.932	
7	-.2	-.666667	.1	-.066667	-.066667	.3
	0.998	0.426	1.000	1.000	1.000	0.976

8	-1.46667	-1.93333	-1.16667	-1.33333	-1.33333	-.966667
	0.003	0.000	0.024	0.008	0.008	0.085

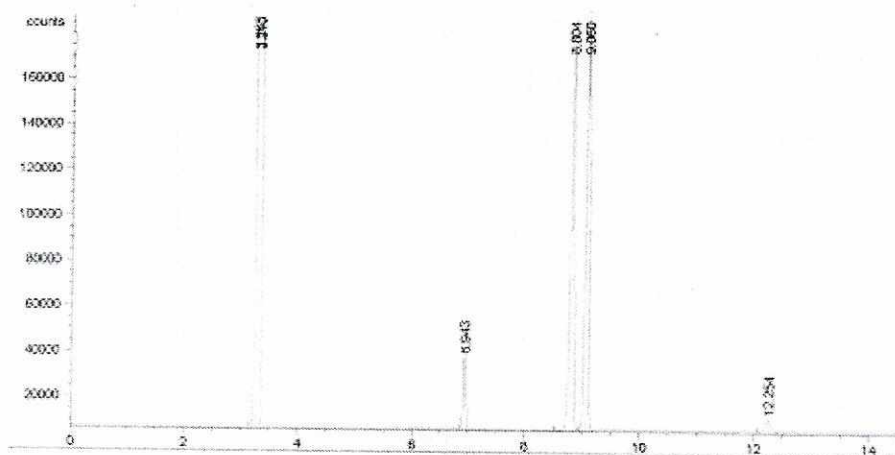
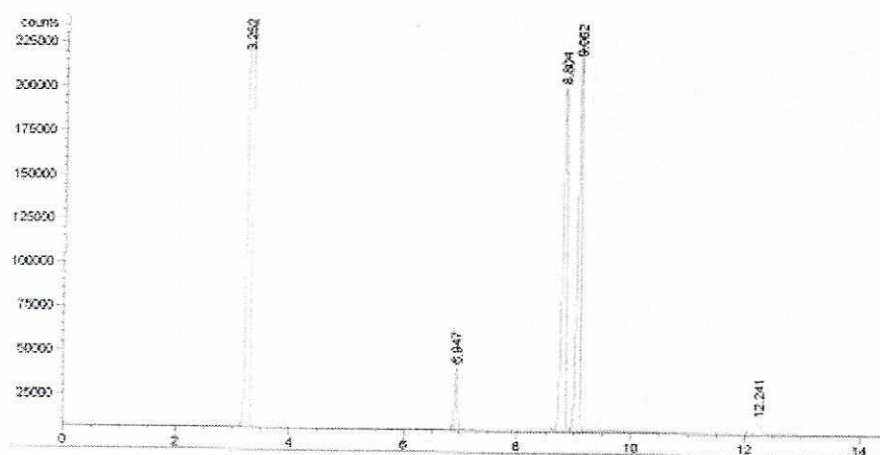
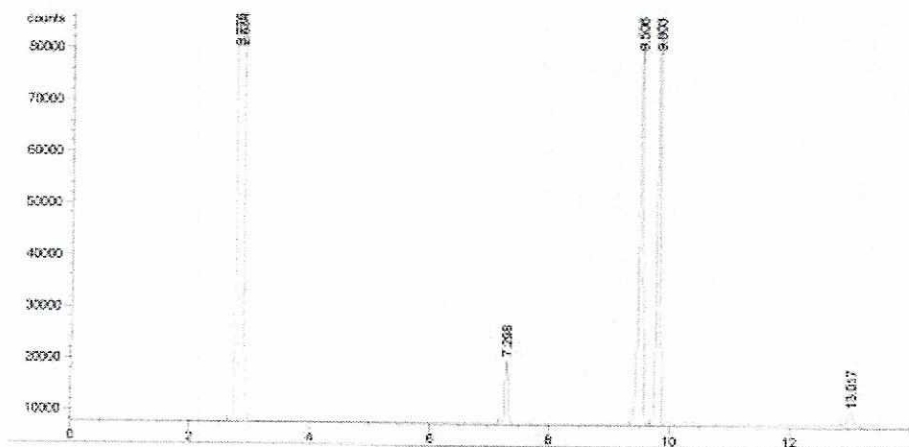
Row Mean-|

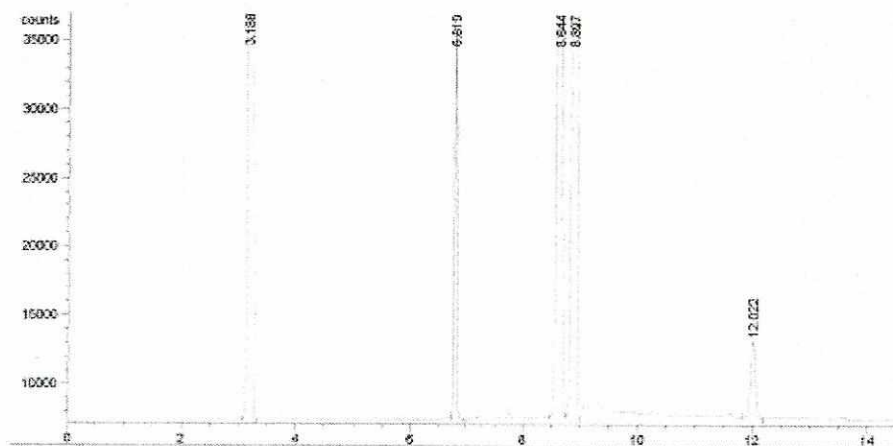
Col Mean | 7

-----|-----

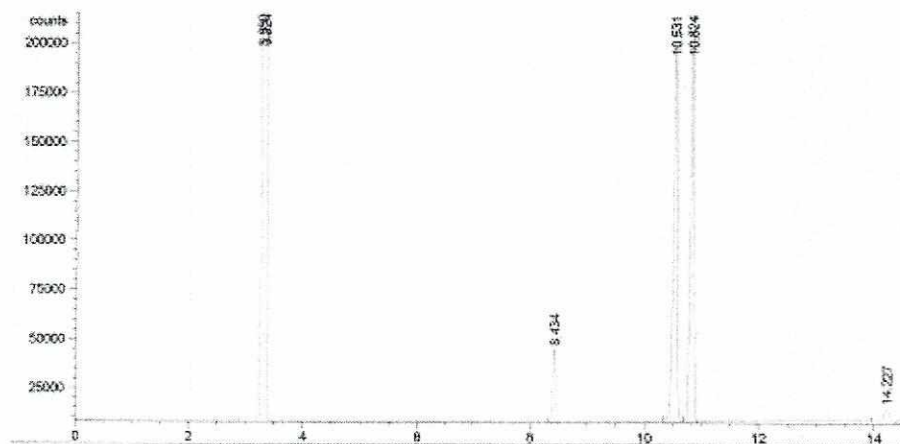
8 | -1.26667

| 0.012

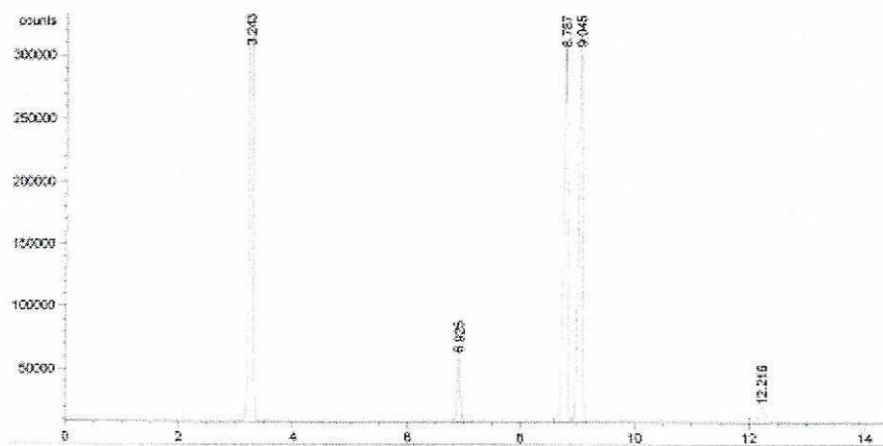
CROMATOGRAMAS 1a A 7c. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE *T. bicolor****Ia. PATULUL Repetición 1******Ib. PATULUL Repetición 2******Ic. PATULUL Repetición 3***



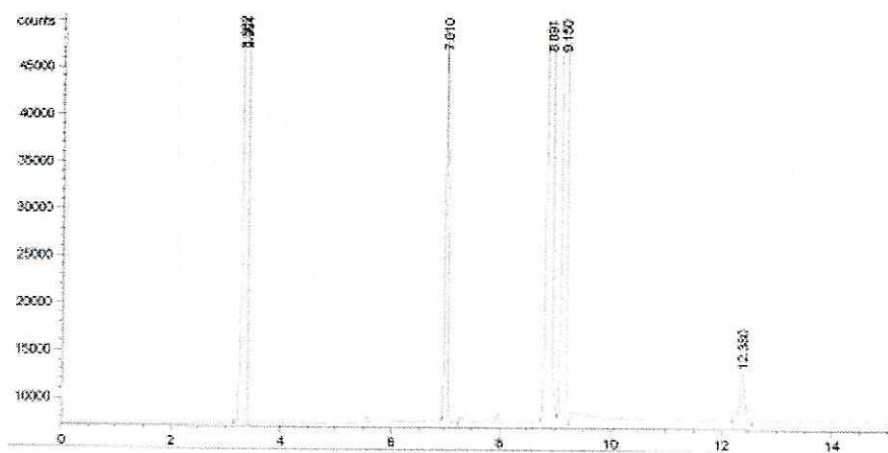
2a. COATEPEQUE Repetición 1



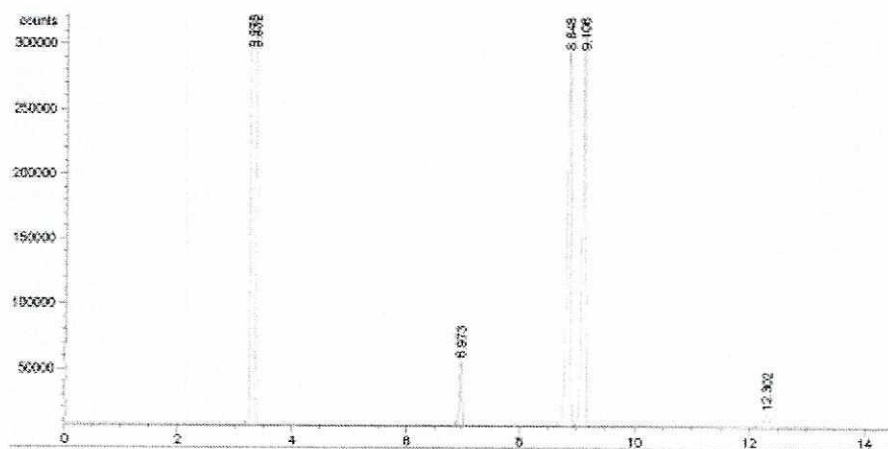
2b. COATEPEQUE Repetición 2



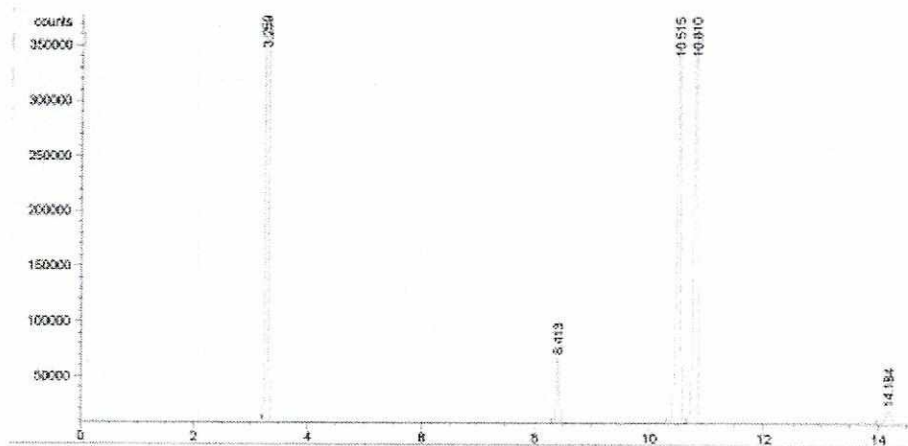
2c. COATEPEQUE Repetición 3



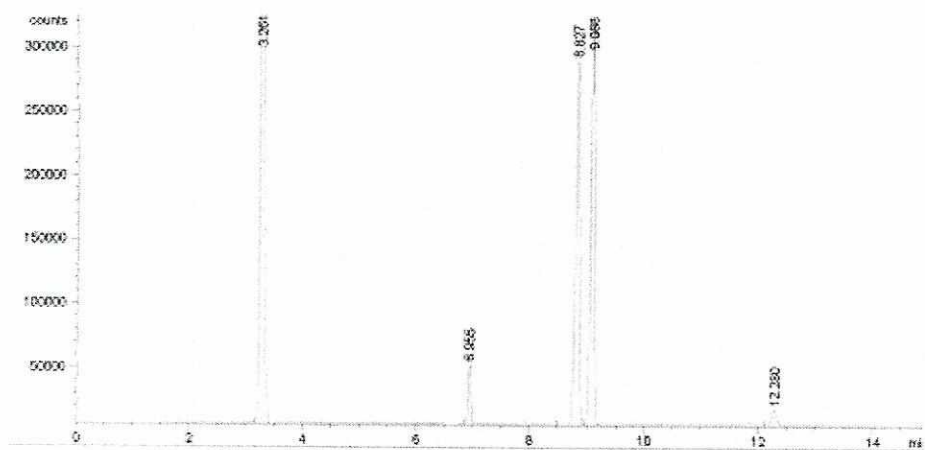
3a. CHICAO Repetición 1



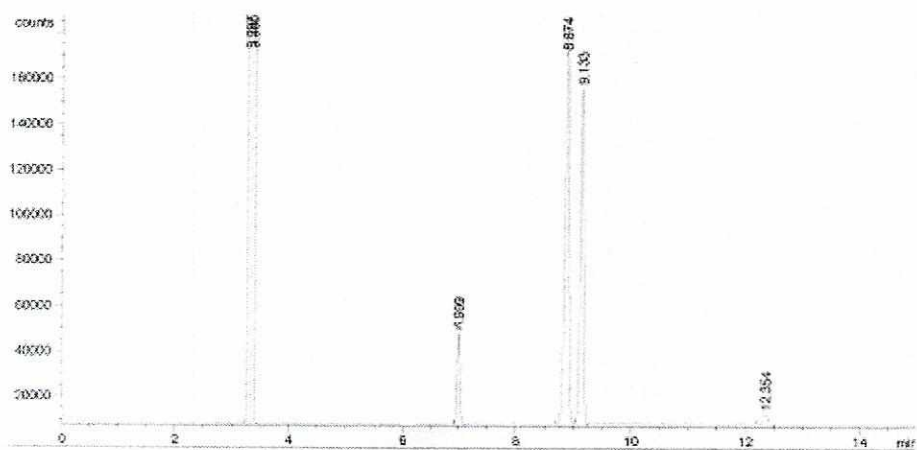
3b. CHICAO Repetición 2



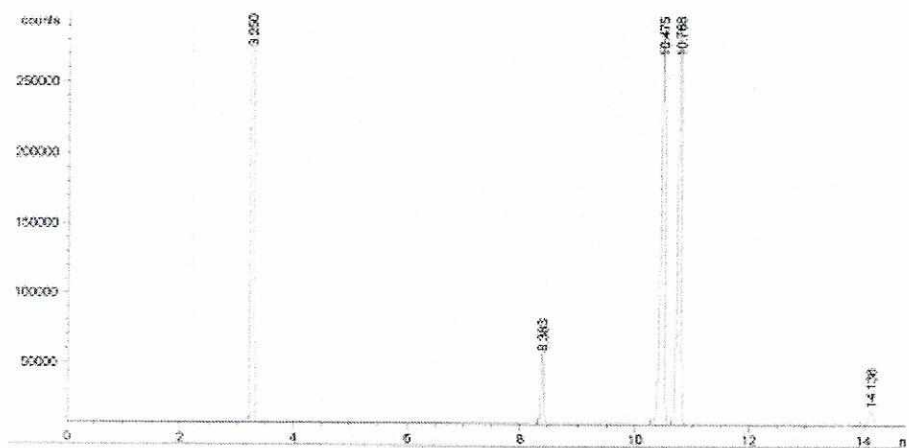
3c. CHICAO Repetición 3



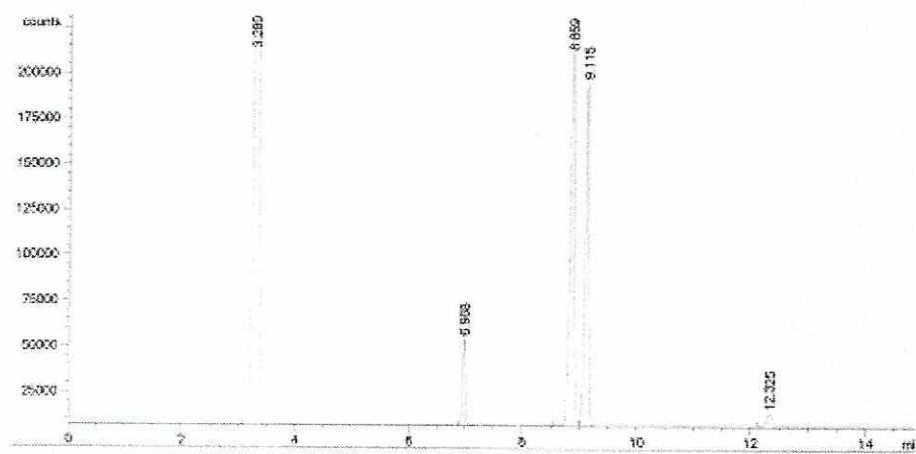
4a. MAZATENANGO Repetición 1



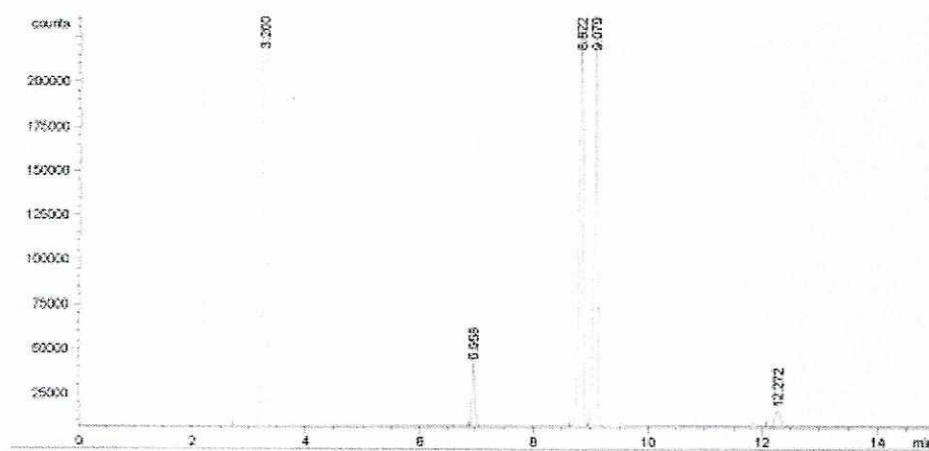
4b. MAZATENANGO Repetición 2



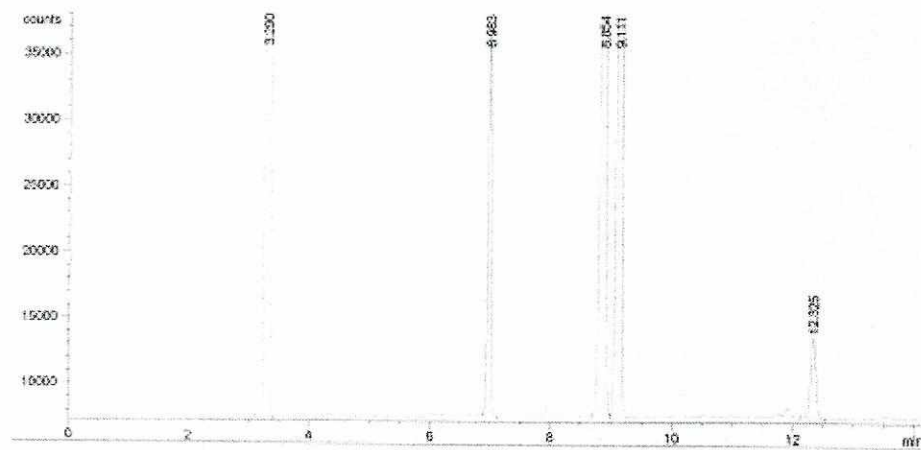
4c. MAZATENANGO Repetición 3



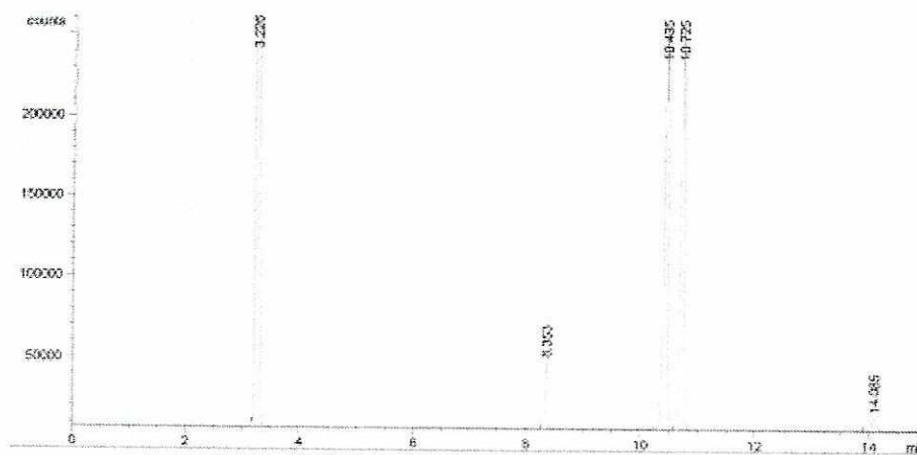
5a. SAN ANTONIO Repetición 1



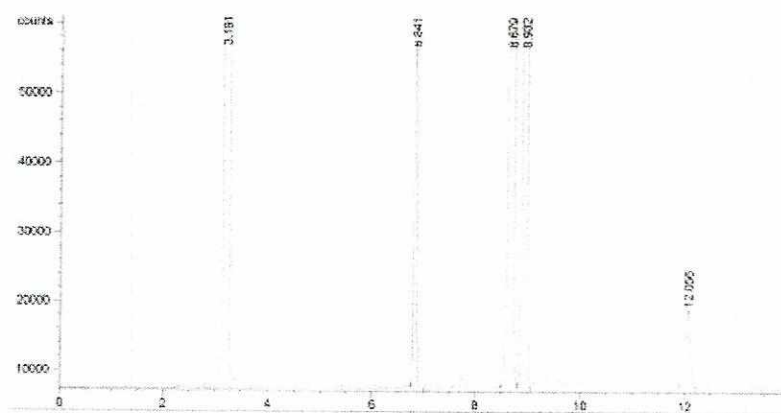
5b. SAN ANTONIO Repetición 2



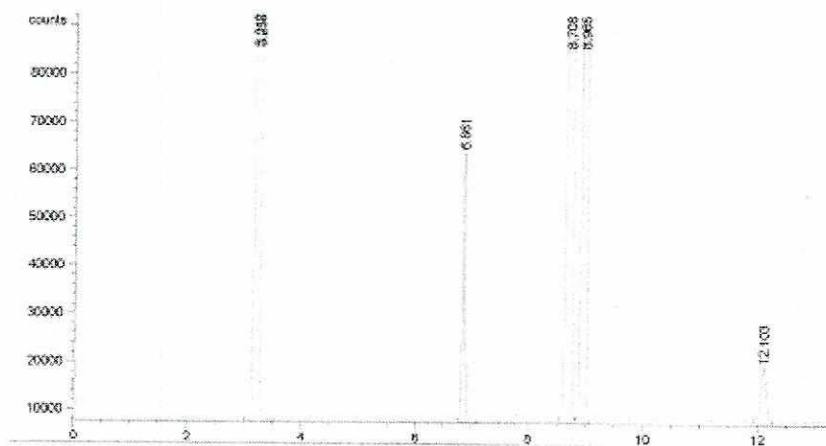
5c. SAN ANTONIO Repetición 3



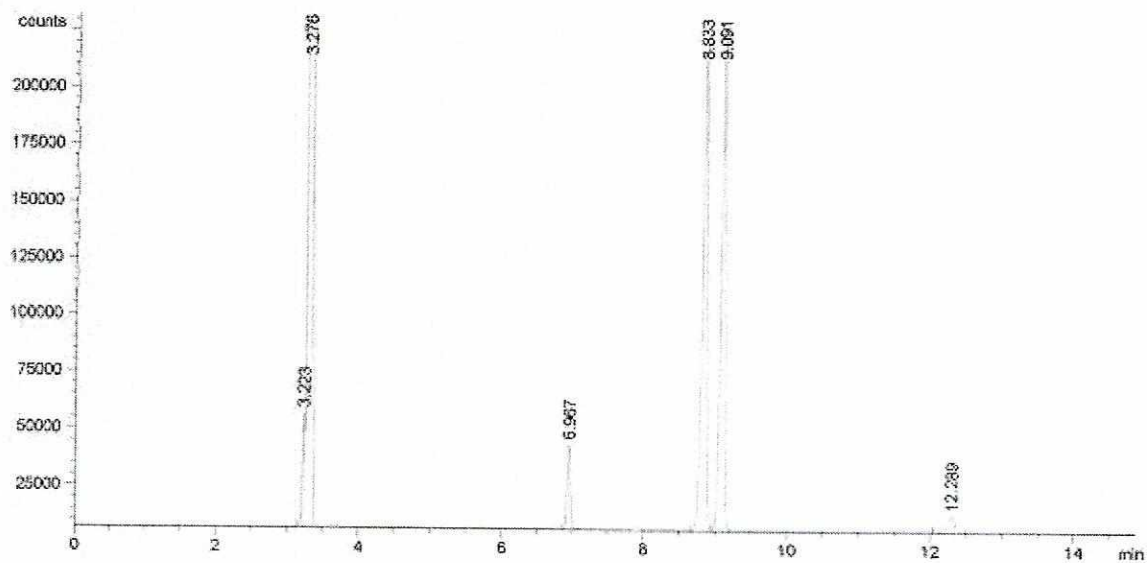
6a. SAMAYAC Repetición 1



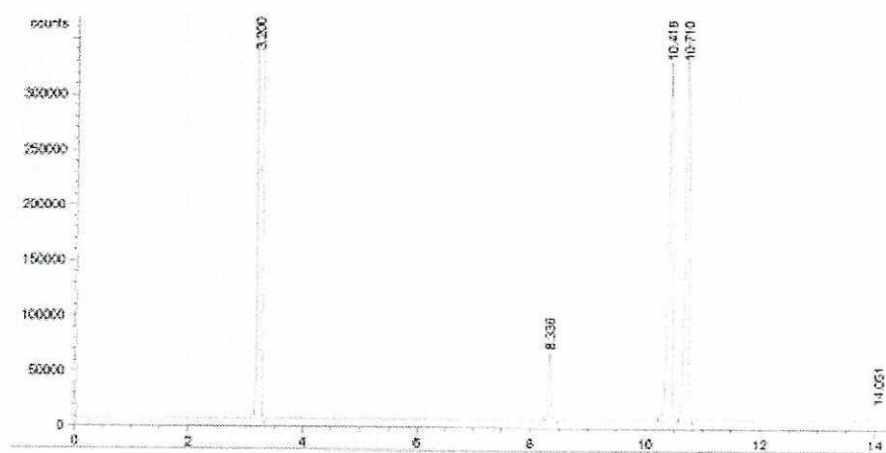
6b. SAMAYAC Repetición 2



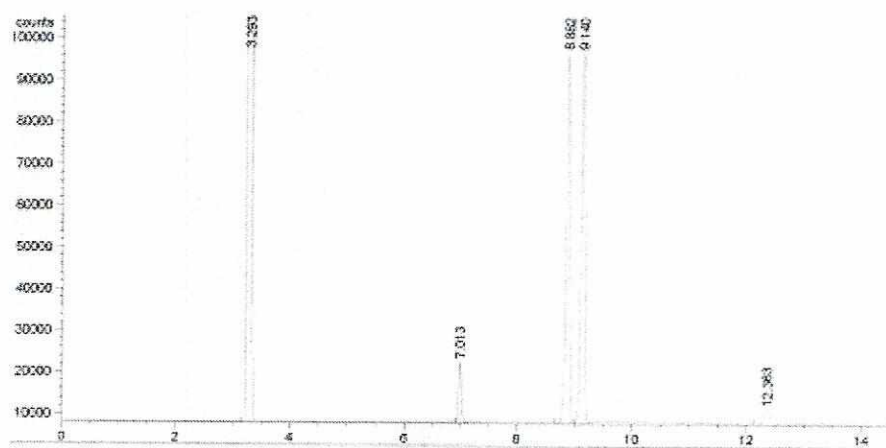
6c. SAMAYAC Repetición 3



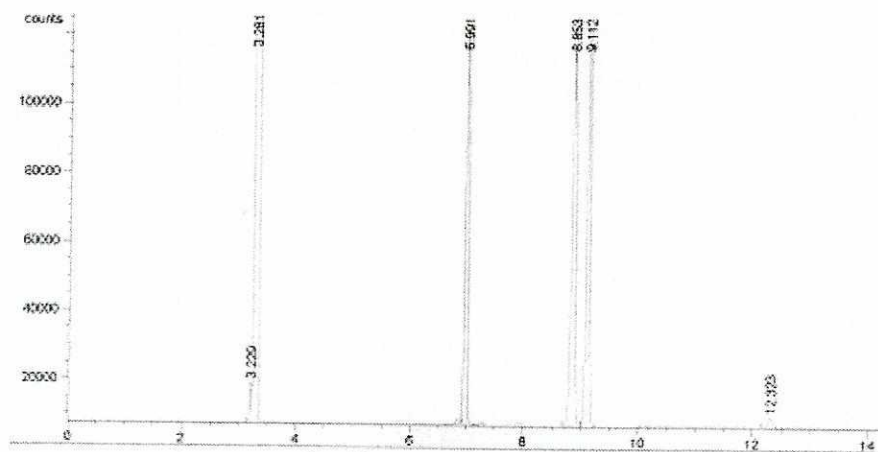
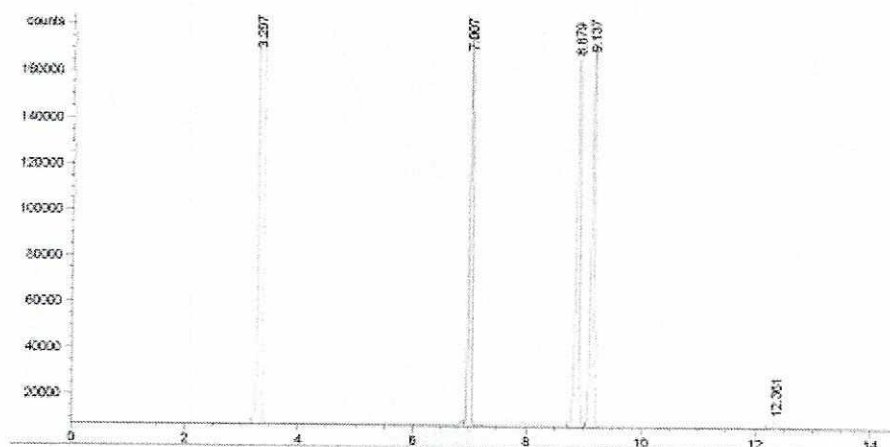
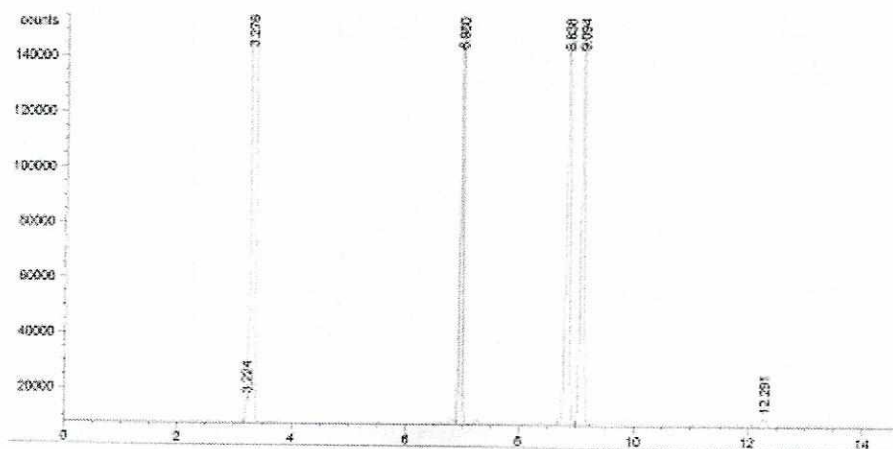
7a. SAN MARCOS Repetición 1



7b. SAN MARCOS Repetición 2



7c. SAN MARCOS Repetición 3

CROMATOGRAMAS 8a A 8c. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE *T. cacao***8a. *T. cacao* Repetición 1****8b. *T. cacao* Repetición 2****8c. *T. cacao* Repetición 3**