



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

Recinto Universitario “Rubén Darío”
Facultad de Ciencias e Ingeniería
Departamento de Biología

Monografía para optar al Título de Licenciada en Biología

Análisis proximal, bioquímico y molecular de árboles promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de los municipios de Siuna, Rosita y Bonanza realizado en el Laboratorio de Biotecnología. Junio 2019- mayo 2020.

Autor: Br. Shirle Jareth Fajardo Sierra

Tutor: Lic. Samantha Miranda Calero

Asesor: Lic. Juan Carlos Ruíz Urbina

Managua, Nicaragua
Julio, 2020

Análisis proximal, bioquímico y molecular de árboles promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de los municipios de Siuna, Rosita y Bonanza realizado en el Laboratorio de Biotecnología. Junio 2019- mayo 2020.

DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño dedico mi monografía a mis excelentísimos padres Juan José Fajardo Alfaro y Ahilúd Sierra Avilés, por ser los pilares fundamentales en mi vida, por brindarme su apoyo, confianza y amor incondicional a lo largo de mi formación académica, por sus consejos para hacer de mí una mejor persona y por ayudarme a cumplir con cada una de mis metas, este logro también es de ustedes.

Muchas gracias papá y mamá.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme en el buen camino y nunca abandonarme, gracias a ti he logrado concluir mi carrera.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN- Managua) y a sus docentes por contribuir a mi formación profesional.

Al Laboratorio de Biotecnología y a sus colaboradores, en especial a su directora, Dra. Martha Lacayo Romero, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), principalmente a la MSc. Arlen Tijerino, por darme la oportunidad de ser partícipe de esta investigación de relevancia nacional, aporte que se llevó a cabo a través de la fuente de financiamiento PROCACAO/COSUDE.

A mi tutora, Lic. Samantha Miranda Calero por confiar en mí, por brindarme la oportunidad de acudir a su capacidad y conocimientos científicos, gracias por darme siempre palabras de ánimos.

A la Ing. Anielka Dávila e Ing. Ena Rivers por su apoyo y colaboración.

A mi asesor, Lic. Juan Carlos Ruiz Urbina por sus aportes acerca del rubro.

A mis compañeros tesisistas en el Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua: Elvis, Kathia, Taryn, Nancy, Marcela y Alejandro, por su apoyo en algunos procesos de análisis.

Al MSc. Josué Hernández por estar siempre apoyándome con mucho cariño.

CARTA AVAL DEL TUTOR

Managua, lunes 01 de junio de 2020

MSc. José David Quiroz

Director

Departamentos de Biología / Facultad de Ciencias e Ingeniería

UNAN-Managua

Su despacho. -

Estimado Maestro Quiroz:

Reciba un cordial saludo de mi parte.

Me dirijo a usted en carácter de tutor de la monografía titulada: **“Análisis proximal, bioquímico y molecular de árboles promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de los municipios de Siuna, Rosita y Bonanza realizado en el Laboratorio de Biotecnología. Junio 2019-mayo 2020.”**, presentada por la estudiante: Shirle Jareth Fajardo Sierra (Nº Carné: 14041800) para optar al título de Licenciada en Biología.

Este proyecto fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua y financiado por el Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA) y los Fondos para Proyectos de Investigación (FPI) dentro del Convenio Marco de Cooperación Interinstitucional, y por este medio hago constar que cumple los requisitos para ser sometido a su presentación pública y evaluación por parte del comité académico evaluador que se designe.

Agradeciendo la atención a la presente, me despido.

Atentamente,

Lic. Samantha Miranda Calero

¡A la libertad por la Universidad!

Recinto Universitario Ricardo Morales Avilés (RURMA) Pabellón D, De la Rotonda Universitaria 150 m. al Norte, Managua, Nicaragua. Teléfonos: (505) 22701287/22786769 ext.6023, 6227

biotecnologia@unan.edu.ni

RESUMEN

Actualmente existe un incremento en la demanda del cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y de aroma por parte del mercado internacional, y parámetros como el contenido nutricional y certificado de origen son requerimientos cada vez más indispensables. A fin de contribuir con el sector cacaotero nacional, el objetivo de esta investigación fue analizar el contenido proximal, bioquímico y el perfil molecular de árboles de cacao provenientes de Siuna, Rosita y Bonanza, seleccionados por el Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria como material promisorio por sus características productivas y organolépticas. El análisis proximal y bioquímico se realizó a partir de los granos de cacao sin fermentar. Para la identificación del perfil genético se extrajo ADN de muestras foliares y se amplificaron utilizando marcadores moleculares microsátelites. Entre los principales parámetros analizados se determinó: extracto etéreo de 50,47 a 54,65%, proteína de 10,90 a 15,46%, carbohidratos de 23,74 a 29,80%, fibra dietaria de 40,84 a 53,80%, sacarosa de 0,02 a 1,93%, polifenoles libres de 90,64 a 484,13mg GAE/100g y actividad antioxidante de 54,20 a 98,08%. El perfil molecular de las muestras: CA0216EGL (Rosita), SA00416JAMR (Rosita), O0216SP (Siuna), ASO1016LDO (Siuna), SC0116VRG (Rosita), MU0416MCM (Bonanza) y MU0216MCM (Bonanza), presentaron características acriolladas. Los marcadores más polimórficos fueron: MTcCIR7, MTcCIR18 y MTcCIR15 (17 alelos), mientras que MTcCIR6 y MTcCIR22 fueron los menos polimórficos. El rango promedio de H_o fue 0,348 a 0,372 y el rango promedio de H_e fue 0,810 a 0,861, razón por la cual estas poblaciones son consideradas variables. Mediante el análisis comparativo de los principales parámetros demandados a nivel internacional se formaron cuatro conglomerados: dos que presentan características óptimas y dos grupos formados por individuos únicos y atípicos, cuya principal característica es el contenido de polifenoles.

Palabras claves: *Theobroma cacao* L., composición nutricional, sacarosa, antioxidantes, perfil genético.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
1.1. Introducción	1
1.2. Antecedentes	3
1.3. Planteamiento del problema	7
1.4. Justificación	8
1.5. Objetivos	9
1.5.1. Objetivo general	9
1.5.2. Objetivos específicos.....	9
CAPÍTULO II	10
2.1. Marco teórico	10
2.1.1. Aspectos generales del cacao.....	10
2.1.2. Hábitat	10
2.1.3. Características morfológicas del cacao	11
2.1.4. Taxonomía del cacao	11
2.1.5. Importancia del cacao	12
2.1.6. Grupos genéticos	12
2.1.7. Composición nutricional del cacao	14
2.1.8. Perfil genético.....	19
2.2. Hipótesis	21
CAPÍTULO III	22
3.1. Diseño metodológico	22
3.1.1. Descripción del área de estudio	22
3.1.2. Tipo de estudio	23
3.1.3. Población.....	23
3.1.4. Muestra	23
3.1.5. Definición y operacionalización de variables	25
3.1.6. Materiales y métodos	26

CAPÍTULO IV	35
4.1. Análisis y discusión de resultados	35
4.1.1. Determinación del contenido proximal y bioquímico de las muestras de cacao en baba	35
4.1.2. Identificación del perfil molecular de las muestras colectadas utilizando marcadores moleculares microsatélites (SSR).....	43
4.1.3. Agrupamiento de las muestras analizadas en función de los principales requisitos de calidad proximal y bioquímica	48
CAPÍTULO V	51
5.1. Conclusiones	51
5.2. Recomendaciones	53
5.3. Referencias bibliográficas	54
Anexos	

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AACC:	American Association of Cereal Chemists (Asociación Americana de Químicos de Cereales).
ACP:	alkalized cocoa powder (cacao alcalinizado en polvo).
ADN:	ácido desoxirribonucleico.
AFLP:	amplified fragment length polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados).
AMOVA:	analysis of molecular variance (análisis de varianza molecular).
AOAC:	Association of Official Analytical Chemists (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales).
ARN:	ácido ribonucleico.
AU:	unidades de absorción.
BME:	β -mercaptoetanol.
CA:	capacidad antioxidante.
CATIE:	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
COSUDE:	Cooperación Suiza en América Central.
CTAB:	cetyl trimethyl ammonium bromide (bromuro de hexaciltrimetilamonio).
dNTP:	mezcla de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidracilo.
EDTA:	etilendiaminotetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético).
EEO:	electroendosmosis.
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations).
FC:	método de Folin-Ciocalteu.
GFS:	granos fermentados y secados al sol.
GFST:	granos fermentados, secados al sol y tostados.
Ha:	hectárea.
He:	heterocigosidad esperada.

Ho: heterocigosidad observada.

INCAP: Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá.

ICCO: International Cocoa Organization (Organización Internacional del Cacao).

INFOODS: International Network of Food Data Systems (Red Internacional de Sistemas de Datos sobre Alimentos).

INIDE: Instituto Nacional de Información de Desarrollo.

INTA: Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria.

ISO: International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización).

ISSR: interspread single sequence repeats (secuencias intercaladas entre microsátélites).

kb: kilobases (mil pares de bases).

mcg: microgramo.

m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar.

mg: miligramos.

NCL: natural cocoa liquor (licor de cacao natural).

NCP: natural cocoa powder (cacao natural en polvo).

ng: nanogramo.

PAGE: polyacrilamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida).

Pb: par de bases.

PCR: polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PIC: polymorphism index content (índice de contenido polimórfico).

PLS: polifenoles libres y solubles.

PROCACAO: Mejoramiento de las capacidades productivas y organizativas de los productores y productoras del Triángulo Minero.

PT: polifenoles totales.

r.p.m: revoluciones por minuto.

RACCN: Región Autónoma Costa Caribe Norte.

RSD: Relative Standard Deviation (Desviación Estándar Relativa).

SSR: single sequence repeats (secuencias simples repetitivas o microsátélites).

STE: sodium chloride-Tris-EDTA buffer (solución tampón de cloruro de sodio-Tris-EDTA).

TBE: tris borate EDTA buffer (tampón de electroforesis Tris Borato EDTA).

TE: tris-EDTA buffer (tampón Tris-EDTA).

TEMED: tetramethylethylenediamine (tetrametiletilendiamina).

TM: toneladas métricas.

UV: ultravioleta.

µg: microgramo.

µL: microlitro.

CAPÍTULO I

1.1. Introducción

La creciente demanda mundial de cacao (*Theobroma cacao* L.) de calidad y los atractivos precios del mercado internacional han estimulado al gobierno de Nicaragua y las organizaciones afines a impulsar este rubro. Actualmente Nicaragua se encuentra en la lista de países productores de cacao fino y de aroma de la ICCO (2019) con un nivel de aprobación del 100%, sin embargo, la relevancia de este rubro data desde antes del siglo XVI cuando fue el sustento de la economía nicaragüense, y para la llegada de los conquistadores españoles, la semilla se utilizaba para la fabricación de alimentos, bebidas y como moneda para el intercambio comercial.

Se conoce que el origen del cacao proviene del alto amazónico de América del Sur, particularmente del área compartida entre Perú, Brasil, Ecuador y Colombia, donde se encuentra su mayor diversidad genética (Motamayor, 2002). Según Girón (citado en Lodoño, Gil, Aguilar, Rivera y López, 2011): “es la única especie del género *Theobroma* que se explota comercialmente en grandes extensiones, registra en la actualidad una amplia distribución mundial, lo cual ha sido posible gracias a diversos programas de desarrollo y mercadeo, asociados a la demanda creciente de los numerosos productos derivados del cacao”.

La importancia del cacao trasciende diferentes áreas de la industria, siendo la industria del chocolate la más grande, seguida de la industria cosmética y la farmacéutica. Resulta necesario resaltar que el incremento en la demanda global del cacao se encuentra estrechamente vinculado con el aumento de los requisitos de calidad del mercado internacional enfocado en aspectos claves como el conocimiento de su composición nutrimental y la determinación de su origen. Asimismo, los retos productivos actuales también se benefician del estudio de estos parámetros.

Tomando esto en cuenta, el INTA desde el 2016 ha desarrollado proyectos para la selección de árboles promisorios provenientes de la RACCN a fin de caracterizar el germoplasma nacional y garantizar su conservación y propagación. De esta manera se seleccionaron 13 árboles provenientes de Bonanza, Rosita y Siuna, municipios que forman parte de las principales zonas cacaoteras del país y que presentaron características organolépticas y productivas promisorias, a fin de realizar su análisis nutricional y molecular con el objetivo de fortalecer el sector cacaotero nacional.

La caracterización proximal y bioquímica se realizó a partir de los granos de cacao sin fermentar clasificados según la norma CODEX STAN 141-1983 y utilizando las metodologías establecidas por la AOAC y referencias internacionales para los parámetros: humedad, materia seca, cenizas, fibra dietaria, proteínas, extracto etéreo, carbohidratos, polifenoles y totales, sacarosa y capacidad antioxidante. La caracterización molecular se llevó a cabo mediante PCR con la utilización de 11 marcadores moleculares microsatélites tipo SSR internacionalmente establecidos (Saunders, Sue y Hemeida, 2004). Los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis horizontal (agarosa Low-EEO al 1.8% teñida con bromuro de etidio) y vertical (poliacrilamida al 6.0% revelada con tinción de nitrato de plata).

1.2. Antecedentes

Las investigaciones relacionadas acerca del análisis proximal, bioquímico y molecular de cacao son diversas a nivel internacional. A continuación, se mencionarán aquellos estudios estrechamente vinculados con la presente investigación:

En Colombia, Cadena y Herrera (2008) en su investigación “Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante” determinaron que el proceso de manufactura del chocolate de mesa, especialmente la etapa de tostado donde se emplean altas temperaturas, disminuye el contenido de polifenoles totales presentes en las semillas de cacao. De igual manera observaron que el tostado disminuye significativamente el contenido de humedad: mientras que semillas secas y fermentadas exhibieron $4,4\% \pm 0,05$ de humedad, las semillas tostadas reportaron $2,0\% \pm 0,134\%$.

En Venezuela, Lares, Gutiérrez, Pérez y Álvarez (2012) en su estudio “Efecto del tostado sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas, composición proximal y perfil de ácidos grasos de la manteca de granos de cacao” utilizaron dos matrices, GFS y GFST. Los resultados fueron $4,31\% \pm 0,06$ y $2,74\% \pm 0,15$ de humedad; $12,21\% \pm 0,35$ y $12,12\% \pm 0,16$ de proteína cruda; $46,27\% \pm 0,30$ y $45,42\% \pm 0,30$ de grasa cruda y $2,96\% \pm 0,05$ y $3,06\% \pm 0,04$ de cenizas para las muestras de GFS y GFST, respectivamente. Al comparar los resultados de ambas muestras determinaron que solo en el contenido de humedad y grasa presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) por efecto del tostado.

En Ghana, Afoakwa, Quao, Takrama, Budu, & Saalia, (2013) en su investigación “Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation” estudiaron el efecto de la fermentación y el aumento del almacenamiento del cacao y concluyeron que existe una disminución significativa ($p < 0.05$) en el contenido de cenizas ($3,48 -$

2,92%), proteínas (21,63 – 17,62%) y grasas (55,21 – 50,40%) de las almendras, mientras que el contenido de carbohidratos aumentó de 15,47% a 24,93%.

Por otro lado, Ilesanmi (2016) en su estudio “Proximate, Mineral and Antinutrient Compositions of Natural Cocoa Cake, Cocoa Liquor and Alkalized Cocoa Powders Sourced in Nigeria” analizó muestras de ACP, NCP y NCL reportando los siguientes rangos en sus resultados de composición proximal (g/100g): contenido de cenizas totales de 3,73 – 10,80%; humedad de 2,16 – 9,04%; proteínas de 10,9 – 24,3%; grasa de 4,93 – 56,0%; fibra de 1,03 – 17,3% y carbohidratos de 20,5 – 48,9%.

En Malasia, Agus, Mohamad & Hussain. (2018) en su estudio “Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malasia” determinaron el contenido proximal, el nivel de fitoesterol y la capacidad antioxidante de los granos de cacao sin fermentar, sin tostar y tostados demostrando que la fibra bruta de los granos de cacao sin tostar y las cáscaras de cacao aumentaron de 17,19 a 28,45% y 13,86 a 16,06%, respectivamente después del proceso de tostado. El contenido fenólico total en el grano de cacao y las cáscaras de cacao oscilaron entre 2,42 y 10,82 µg de GAE/ml. Asimismo, concluyeron que los granos de cacao no fermentados contienen significativamente ($p < 0.05$) mayor actividad antioxidante (92.3%) en comparación con otras muestras.

En 2019, Andrade, Rivera, Chire y Ureña en su investigación “Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú” realizaron una comparación de granos de cacao utilizados en la elaboración de chocolate de calidad. Ejecutaron análisis proximales y obtuvieron entre sus resultados contenidos de humedad entre 5,49% ± 0,07 (Perú) y 6,03% ± 0,10 (Ecuador), proteína cruda entre 8,08% ± 0,25 (Ecuador) y 15,58% ± 0,28 (Perú), grasa cruda entre 45,28% ± 0,45 (Perú) y 51,02% ± 0,24 (Ecuador), cenizas de 2,22% ± 0,19 (Perú) y 2,73% ± 0,08 (Ecuador), fibra cruda entre 4,28% ± 0,01 (Ecuador) y 7.10% ± 0.28 (Perú), y carbohidratos en rango de 30,24% ± 0,31 (Perú) y 32,28% ± 0,46 (Ecuador).

La caracterización molecular utilizando marcadores moleculares microsatélites en variedades de cacao a nivel regional ha permitido ampliar los conocimientos acerca de la diversidad genética de las poblaciones existentes. Entre las investigaciones relacionadas con este estudio, se pueden mencionar las siguientes:

En Perú, Chia (2009) en su de investigación “Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.)” realizó ensayos con marcadores moleculares ISSR para determinar su poder discriminante y delimitar parámetros de diversidad genética. Realizó un análisis multivariado y genético logrando una diferenciación de cacao nacionales vs internacionales, así como una distribución espacial entre parentales y su respectiva progenie.

Asimismo, Lodoño *et al.* (2011) en su estudio “Caracterización molecular de clones de *Theobroma cacao* L. por medio de marcadores moleculares microsatélites” realizaron un análisis molecular preliminar de la diversidad genética de 12 clones de cacao y como resultado determinaron que los marcadores MTcCIR6 y MTcCIR25 mostraron mayor polimorfismo.

En Colombia, Ruíz (2014) realizó la investigación “Diversidad genética de cacao (*Theobroma cacao* L.) con marcadores moleculares microsatélites SSR” cuyo propósito fue utilizar los resultados para desarrollar estrategias de conservación, selección de materiales superiores y programas de mejoramiento genético. Como resultado determinó que los marcadores SSR fueron altamente discriminantes, informativos y representativos para la especie. Los promedios de heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o), indicaron alta variabilidad genética y alta tasa de heterocigotos en las tres poblaciones analizadas. El valor del índice de fijación señaló mínimos niveles de diferenciación genética entre las poblaciones y el promedio indicó que existe un elevado intercambio de genes.

A nivel nacional existen estudios preliminares sobre la composición bioquímica y la caracterización molecular del cacao nicaragüense, entre ellos se encuentran:

Negaresh y Marín (2013) con su investigación “El cacao y la salud humana: propiedades antioxidantes del cacao nicaragüense y productos alimenticios comercializados” donde concluyeron que las muestras analizadas presentaron una mayor concentración de polifenoles libres y solubles (130-185 µg/ml) en comparación con los polifenoles totales (30-39 µg/ml) y la actividad antioxidante es levemente más alta que los resultados de granos de cacao cosechados en otras regiones del mundo. Determinaron también que existe una diferencia de hasta 50 unidades entre el contenido de polifenoles en granos de cacao fresco vs granos de cacao almacenado.

Herrera (2012) en su investigación “Caracterización molecular de 105 accesiones de Cacao (*Theobroma cacao* L.)” donde utilizó marcadores moleculares SSR con el fin de conocer la diversidad genética de cacao colectado en fincas de productores nicaragüenses. Identificó 183 alelos en las 105 accesiones, los rangos de heterocigosidad observada y esperada resultaron mayores para el marcador MTcCIR12; el CIP y el índice de Shannon proporcionaron los mayores valores para el marcador MTcCIR12.

Debe enfatizarse que desde el 2016 el INTA ha desarrollado proyectos encaminados a la identificación de árboles con características promisorias que fortalezcan la diversidad nacional existente y que contribuyan a la valorización del cacao obtenido por los productores. Dentro de estos proyectos se encuentra el presente estudio que incluye la caracterización proximal y bioquímica de árboles promisorios de cacao de la RACCN, que fue fortalecido con la caracterización molecular aportada por la UNAN-Managua dentro del Convenio Marco de Cooperación Interinstitucional.

1.3. Planteamiento del problema

A nivel mundial, el 90% de los granos de cacao son cosechados por pequeños agricultores que se encuentran poco organizados y cuentan con limitados recursos para acceder a servicios de asistencia técnica (BCN, 2020), además la falta de recursos económicos destinados a inversión dificulta el cumplimiento de los requisitos internacionales vinculados a la caracterización de los árboles y el grano producido, eslabones básicos para el establecimiento de la huella de origen del producto comercializado.

A pesar de esto, la demanda del cacao nicaragüense se encuentra en aumento y está estrechamente relacionado con el incremento de los requisitos de calidad internacional, que deben ser cumplidos para garantizar su permanencia en el mercado global, entre ellos los criterios establecidos por organizaciones como ICCO (2019) para la clasificación del cacao fino y de aroma.

Uno de los principales problemas de la cacaocultura en Nicaragua es que los materiales promisorios que se encuentran en manos de los pequeños productores no cuentan con un perfil genético que asegure su conservación y que brinde las pautas para posteriores programas de mejoramiento genético, donde las variedades adaptadas a determinadas regiones y condiciones edafoclimáticas, tienen un papel fundamental.

Adicionalmente, la carencia de información acerca de la composición proximal y bioquímica del cacao producido representa un riesgo para su valorización, que puede traducirse en bajos precios de comercialización y pérdidas económicas que afectan toda la cadena productiva de cacao.

1.4. Justificación

La relevancia del cacao nicaragüense se fundamenta en su prestigio como materia prima de calidad, además de constituir el sostén de muchas familias productoras. Nicaragua ocupa el lugar 42 entre los países productores de cacao con alrededor de 7,500 hectárea (ha) cultivadas por productores en pequeñas parcelas (Ayestas, Orozco, Astorga, Munguía y Vega, 2013), además este rubro no puede ser cultivado en los países donde se encuentra focalizada su mayor demanda, especialmente en Europa y El Salvador (BCN, 2020).

El incremento en el consumo global de cacao ha propiciado que el sector cacaotero nacional crezca (CBI, 2010), sin embargo, el conocimiento del contenido proximal, bioquímico y la identidad molecular del cacao nacional es un tema pendiente que constituye uno de los principales retos del sector cacaotero en los que el INTA ha liderado investigaciones desde el 2016, identificando árboles productivos con calidad organoléptica en las fincas de pequeños productores. Estos esfuerzos se tradujeron en la selección de árboles con características promisorias provenientes de la RACCN, una de las principales zonas cacaoteras de Nicaragua, que en cooperación con la UNAN-Managua han sido caracterizados a nivel nutricional y molecular.

La importancia de esta investigación se basa en la generación de información sobre los materiales promisorios de cacao nicaragüense que contribuyan a la valorización del producto nacional y que asegure su posicionamiento y permanencia en el mercado mundial, además de brindar pautas que favorezcan la conservación y mejoramiento del producto nacional, que eventualmente puede traducirse en un incremento de los precios de comercialización.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Analizar a nivel proximal, bioquímico y molecular árboles promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de los municipios de Siuna, Rosita y Bonanza, de la Región Autónoma Costa Caribe Norte de Nicaragua realizado en el Laboratorio de Biotecnología.

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar el contenido proximal y bioquímico de las muestras de cacao en baba procedentes de los diferentes sitios de estudio.
- Identificar el perfil genético de las muestras colectadas utilizando marcadores moleculares microsatélites (SSR).
- Realizar un análisis comparativo de las muestras estudiadas a fin de asociarlas de acuerdo a los principales requisitos establecidos por el mercado internacional.

CAPÍTULO II

2.1. Marco teórico

2.1.1. Aspectos generales del cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es originario de América del Sur y más tarde fue introducido en América Central donde se cultiva desde la época precolombina. Al tipo de cacao cultivado en esta región se le llamó criollo; a las poblaciones de cacao de la cuenca del Amazonas se les llamó forastero (IICA, 2017). El tipo forastero más cultivado hasta 1950 fue nombrado amelonado. Datos históricos muestran que el cacao trinitario se originó en Trinidad, resultado de la hibridación natural entre criollo y el amelonado forastero (IICA, 2017).

El cultivo de cacao fue la base de la economía indígena en Nicaragua desde antes del siglo XVII hasta mediados del siglo XIX, sin embargo debido a la extrema susceptibilidad del cacao criollo a las enfermedades y condiciones adversas del medio ambiente, el rubro fue sustituido por cultivos con mayores perspectivas de mercado como: el algodón (*Gossypium hirsutum* L.), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y el café (*Coffea arabica* L.), provocando la desaparición de grandes extensiones de cacao de la zona del pacífico, desplazando a los pequeños productores hacia la zona caribe, donde por iniciativa propia dadas las excelentes condiciones agroecológicas existentes, empezaron a cultivar el cacao en forma tradicional (INTA, 2005).

2.1.2. Hábitat

El cacao es un cultivo de plantación tropical establecido en regiones cálidas y húmedas, destinado a producir granos o almendras como materia prima para la elaboración de chocolates y grasas para las industrias alimentarias y cosmetológicas en más de 50 países ubicados en África, América, Asia y Oceanía, 23 de los cuales están en América Latina y el Caribe (IICA, 2016).

El cacao es una especie del género *Theobroma*, de la familia de las *Malvaceae*, la cual cuenta con más de 22 especies, originaria de Sudamérica y domesticada en Mesoamérica. “Es un cultivo que requiere condiciones climáticas adecuadas de temperatura, humedad y precipitaciones para obtener buenos rendimientos de producción y reducir la susceptibilidad a plagas y enfermedades (p.3)” (IICA, 2016).

2.1.3. Características morfológicas del cacao

Son árboles o arbustos de 2 a 10 m de altura, con hojas ovalado-lanceoladas u ovado-lanceoladas, de 18 a 34 cm de largo y 5 a 11 cm de ancho, ápice abruptamente afinado, base a veces algo asimétrica y tricomas sobre los nervios principales. Presenta inflorescencias sobre prominencias del tronco; lámina de los pétalos obovado-lanceolada, más corta que la capucha. El fruto es subabayado, ovoide o elipsoidal, con tamaño muy variable, verrugoso o liso, redondeado o afinado en el ápice (Tropicos, 2009).

2.1.4. Taxonomía del cacao

Tabla 1. Taxonomía del cacao.

<i>Theobroma cacao</i> L.	
Reino	Plantae
Súper reino	Tracheobionta
Super división	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Phylum	Spermatophyta
Subphylum	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Mavales
Familia	Malvaceae/Sterculiaceae
Género	Theobroma
Especie	<i>Theobroma cacao</i> L.

Fuente: Bhattacharjee (2018).

2.1.5. Importancia del cacao

Según el IICA (2016): “el cacao se cultiva en regiones cálidas y húmedas en más de 50 países ubicados en cuatro continentes (África, América, Asia y Oceanía); 23 de esos países son de América y en ellos se produce cacao con fines comerciales (p.19)” es por esta razón que el rubro cacao se considera un cultivo de gran importancia desde una perspectiva económica, social, ambiental y, particularmente cultural, para los países donde se produce.

El cacao en grano se ha destacado como materia prima de gran relevancia comercial en el ámbito mundial por ser utilizado para la obtención de diversos productos de las industrias de alimentos (chocolates, bebidas, entre otros), así como productos para la industria cosmetológica y farmacéutica. A nivel nacional, la actividad cacaotera tiene impactos importantes en la economía nicaragüense, las variedades de cacao fino o de aroma son utilizados para elaborar los mejores chocolates del mundo por sus exquisitas y poco comunes características organolépticas, que son cruciales para su reconocimiento a nivel internacional.

2.1.6. Grupos genéticos

El *T. cacao* L. se divide en tres grandes grupos: criollos, forasteros y trinitarios, siendo el cacao trinitario una mezcla entre el criollo y el forastero.

2.1.6.1. Cacao criollo

Los cultivos de cacao criollo cuya palabra significa nativo, pero de ascendencia extranjera, se originaron en Sudamérica donde fueron domesticados en México y Centroamérica. Se caracteriza por su aroma, la mazorca es de color roja o amarilla cuando madura, posee aproximadamente 10 surcos profundos, muy rugosos, cáscara suave y semillas redondas, de medianas a grandes, de color blanco o violeta pálido. Se cultiva principalmente en México, Guatemala, Nicaragua, Ecuador, Colombia y Venezuela. “El cacao criollo se caracteriza por su alta

susceptibilidad a las principales enfermedades (p.17)” (Soria citado por García, 2019).

2.1.6.2. Cacao forastero

Los cacaos del tipo “forastero” dominan la producción y el comercio mundial de granos. Son originarios de la cuenca amazónica y son producidos en los cuatro continentes cacaoteros (África, Asia, América y Oceanía). Se caracterizan por tener frutos generalmente ovalados y cortos, de colores que varían entre el verde y amarillo al madurar, de superficie lisa, con corteza gruesa y lignificada en su interior; de granos pequeños y aplanados, colores que van desde púrpura oscuro e intenso hasta el violeta pálido, dependiendo del contenido de sus taninos (IICA, 2016).

“Sobre este tipo de cacao descansa la gran biodiversidad de la especie con base a la población silvestre; sin embargo, se ha determinado que la base genética de la población cultivada es reducida pues depende en alto porcentaje del subtipo forastero amelonado (p.23)” (IICA, 2016).

2.1.6.3. Cacao trinitario

Los “trinitarios” son tipos generados por la hibridación de criollos y forasteros, son muy heterogéneos genéticamente y morfológicamente, aunque no es posible delimitarlos a través de características externas comunes. Las plantas son robustas con frutos verdes o pigmentados y con semillas que van del violeta oscuro al rosa pálido. Su origen se establece en Trinidad y Tobago, se presume que la hibridación fue el resultado de un proceso de cruzamiento espontáneo y natural, aunque de origen antrópico (IICA, 2016).

Actualmente su cultivo está ampliamente extendido en América y en algunos países de África (Trinidad y Tobago, Venezuela, Ecuador, México, Centroamérica, Camerún, Samoa, Sri Lanka, Java y Papua Nueva Guinea) y representa alrededor del 15% de la producción mundial. Sus granos bien procesados junto a los

provenientes de cacao criollos son reconocidos en el mercado por su calidad (IICA, 2017).

2.1.7. Composición nutricional del cacao

La calidad nutricional de un alimento está definida por todos los atributos que influyen en el valor de un producto principalmente enfocado a su composición proximal y bioquímica (FAO, 2003). El conjunto de ambos criterios determina la calidad general de un producto, y los beneficios potenciales e importancia de su definición son evidentes para la salud humana.

La información nutricional de un alimento es imprescindible para que el consumidor conozca el aporte de nutrientes que obtiene a través de un alimento. Por esta razón el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) establece una tabla de composición nutricional con valores de referencia para distintos alimentos entre ellos se encuentra el aporte nutrimental de la semilla de cacao seca (anexo 1) para la dieta humana.

2.1.7.1. Análisis proximal

El análisis proximal de un alimento incluye un conjunto de métodos que determinan la composición en términos nutricionales, también se le conoce con el nombre de Weende en honor al lugar donde por primera vez fueron desarrollados estos análisis, los pioneros en realizar análisis proximal fueron Henneberg y Stohmann en 1867 en la estación experimental de Weende, Alemania (FAO, 2006).

Se debe mencionar que estos análisis se denominan proximales porque no son más que un aproximado que asocia combinaciones orgánicas que responden a determinadas reacciones analíticas características de los compuestos de interés que requieren ser determinados (Gonzales, Gutierrez, Bustos, Hernandez, 2016). Estos compuestos a su vez son el eslabón clave para la estimación del aporte nutrimental de los alimentos.

La determinación de la composición química proximal de pasta de cacao incluye los análisis de los parámetros de: humedad (que influye directamente en su estabilidad debido a que el contenido de agua es un indicador del tipo y el riesgo potencial de contaminación microbológica), cenizas (equivalente al contenido mineral total del grano), extracto etéreo (que representa el contenido lipídico total de la muestra), proteínas totales, fibra dietaria (suma de los polisacáridos no afectados por la digestión), extracto libre de nitrógeno (medida indirecta de los carbohidratos “solubles” o “digeribles” presentes).

2.1.7.1.1. Humedad

El agua es un componente esencial de todos los alimentos por lo que la determinación de humedad es de suma importancia, ya que un elevado contenido de ésta influye en la velocidad de multiplicación de los microorganismos (hongos, bacterias, levaduras), provocando su descomposición y por lo tanto la pérdida de la calidad sanitaria. Es por esta razón que la ICCO (2012) recomienda 3.20 % de humedad para cacao.

2.1.7.1.2. Cenizas

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica (UNAM, 2008). La cantidad de cenizas representa el contenido total de minerales en los alimentos, elementos determinantes para una buena nutrición en las concentraciones adecuadas, aunque no es diferencial para cada elemento presente. Asimismo, se conoce que altos contenidos de minerales pueden retardar el crecimiento de ciertos microorganismos y por ende contribuir a la estabilidad microbológica del producto.

2.1.7.1.3. Extracto etéreo

Las grasas alimentarias incluyen todos los lípidos de los tejidos vegetales y animales que se ingieren como alimentos. Los ácidos grasos presentes en varias moléculas de lípidos constituyen la porción de mayor interés nutritivo (FAO,1997).

Las grasas son necesarias para nuestro organismo, ya que proveen ácidos grasos esenciales que nuestro cuerpo no puede fabricar, cumplen diversas funciones vitales como el almacenamiento de energía, sirven de estructura para producir hormonas y sustancias que facilitan el transporte de diversas vitaminas.

En este sentido, no es posible prescindir del consumo de grasas ya que esto sería perjudicial para la salud. Para la determinación del contenido de grasa la muestra es sometida a extracción continua con un solvente orgánico (éter de petróleo), al método empleado se le conoce como método de Soxhlet.

2.1.7.1.4. Proteínas

Las proteínas son compuestos de aminoácidos que combinan elementos químicos tales como el carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno (Bembibre, 2011). Cabe destacar que las proteínas son esenciales para el crecimiento, y están clasificadas entre los compuestos alimenticios más importantes.

Una de las principales funciones de las proteínas es que forman parte de la estructura básica de tejidos (músculos, tendones, piel, uñas, entre otros) durante todos los procesos de crecimiento y desarrollo, crean, reparan y mantienen los tejidos corporales; además desempeñan funciones metabólicas (actúan como enzimas, hormonas, anticuerpos) y reguladoras en la asimilación de nutrientes, transporte de oxígeno y de grasas en la sangre, eliminación de materiales tóxicos, regulación de vitaminas liposolubles y minerales, entre otros (González, Téllez, Sampedro y Nájera, 2007).

2.1.7.1.5. Fibra dietaria

La AACC (2001) describe la fibra dietaria como la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, dando lugar a la fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Tiene importancia metabólica y es fundamental para el correcto funcionamiento del sistema digestivo.

2.1.7.1.6. Extracto libre de nitrógeno

Comúnmente conocido como carbohidratos, son compuestos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, y que durante el metabolismo se queman para producir energía, liberando dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O). En la dieta humana, los carbohidratos están en forma de almidones y diversos azúcares. Los carbohidratos se pueden dividir en tres grupos: monosacáridos, disacáridos, polisacáridos (FAO, 2002).

2.1.7.2. Análisis bioquímico

El creciente interés en los últimos años por el consumo de alimentos que además de aportar nutrientes tengan un efecto favorable en la salud, ha estimulado el estudio de componentes naturales como los polifenoles, los cuales están presentes en plantas y frutos y se conoce que poseen propiedades funcionales como antioxidantes (Castro *et al.*, 2016). Asimismo, uno de los parámetros bioquímicos de importancia para el cacao es el contenido de sacarosa, determinante de su aroma y sabor. De igual manera el conocimiento de la capacidad antioxidante del cacao es un parámetro con creciente interés a nivel internacional y que contribuye a la valorización de este rubro.

2.1.7.2.1. Polifenoles libres y totales

Según Martínez, Periago y Ros (2000) los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas y son considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando a más de 8000 compuestos distintos. El cacao, es uno de los alimentos con mayor contenido de polifenoles y contiene gran número de pigmentos de origen natural llamados flavonoides que le confieren su típico color marrón claro y sabor amargo.

Los responsables del gusto amargo del cacao son los polifenoles, compuestos naturales activos con propiedades antioxidantes que ayudan a proteger el

organismo frente a los radicales libres que oxidan las células. William & Grayer (2004) divide a los polifenoles de forma general en polifenoles totales refiriéndose a estructuras unidas a azúcares o a proteínas, y polifenoles libres y solubles que tienen a sus grupos hidroxilos libres y capaces de donar electrones con mayor facilidad en relación a los polifenoles totales.

El cacao está reconocido por poseer una importante fuente de antioxidantes dado su elevado contenido en compuestos fenólicos principalmente (procianidinas y flavanoles) y se pueden diferenciar tres grupos principales de polifenoles, catequinas o flavan-3-oles (37%), las antocianinas (4%) y las proantocianidinas (58%). La principal catequina es la (-) epicatequina, que representa aproximadamente el 35% del total de polifenoles presentes en el cacao (Lecumberri *et al.*, 2006).

2.1.7.2.2. Capacidad antioxidante

Vertuani, Angusti, & Manfredini (2004) definen los antioxidantes como sustancias capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, donando electrones para retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los radicales libres producen reacciones en cadena que causan daño a las células, los antioxidantes terminan estas reacciones quitando los intermediarios del radical libre, oxidándose ellos mismos y deslocalizando el electrón no apareado de su estructura y formando un complejo más estable.

El cacao se reconoce por poseer un alto contenido de antioxidantes, propiedades que lo hacen un rubro de mucha importancia a nivel industrial, los antioxidantes del cacao ejercen efectos positivos en el organismo, retrasan el envejecimiento de la piel, el cabello y los órganos, además se reconoce que el cacao posee propiedades antiinflamatorias fomentando la salud cardiovascular.

2.1.8. Perfil genético

La identificación del perfil genético de un organismo es el proceso mediante el cual se identifica su patrón de ADN utilizando las regiones altamente específicas para dicho organismo que lo diferencia del resto de individuos de la misma especie. Estas regiones altamente divergentes entre los individuos se denominan polimórficas y son regiones heredadas de los progenitores. La identificación del perfil genético incluye distintos procesos en el laboratorio: extracción del ADN, verificación en electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio y visualización en transiluminador ultravioleta, amplificación por PCR, análisis de los amplicones en agarosa al 1.8% y finalmente, en poliacrilamida al 6.0% seguido de la visualización de los geles teñidos en nitrato de plata.

Para la identificación del perfil genético del cacao se utilizan al menos 10 marcadores moleculares microsatélites SSR, por ser altamente polimórficos y debido a sus características codominantes que los potencian como una herramienta muy poderosa para generar la identificación confiable de organismos (Tolares, Marcucci y Harrond, 2005). En este contexto se utilizarán los primers o cebadores para los marcadores microsatélites establecidos por Saunders *et al.* (2004). Estos primers se encargarán de iniciar el proceso de amplificación del ADN mediante PCR en conjunto con elementos claves como la Taq polimerasa, nucleótidos, sales de magnesio, un buffer que mantiene el pH constante y agua libre de nucleasas para evitar la degradación del material genético.

2.1.8.1. Marcadores moleculares SSR

Un marcador molecular es un fragmento específico de ADN que puede ser identificado en el genoma. Los marcadores moleculares están localizados en lugares específicos del genoma y se usan para “marcar” la posición de un gen en concreto o la herencia de una característica particular. En un cruzamiento genético, las características de interés podrán ser monitoreadas por marcadores moleculares, si estos se encuentran ligados genéticamente a las mismas. Por lo tanto, se pueden seleccionar individuos en los que el marcador molecular esté presente, ya que la

presencia del marcador es un indicador de la característica deseada (Velasco, 2004).

La información genética de las plantas se encuentra almacenada en la secuencia del ADN de los cromosomas nucleares. La mayoría de los marcadores moleculares utilizan la técnica de PCR, una técnica que permite la ampliación de regiones específicas del ADN.

2.1.8.2. Variación genética

La variación genética es un aspecto importante en el estudio de poblaciones y se basa fundamentalmente en la heterocigosidad ya que es precisa y no arbitraria. Baja heterocigosidad representa baja variabilidad y se analiza en función de la H_o y la H_e . La H_o corresponde a la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en los individuos para cualquiera de los loci, en cambio, la H_e es la probabilidad asociada a la diferenciación de dos alelos tomados al azar dentro de una población (Hernández y Trejo, 2014). Una de las medidas más frecuentes de la heterocigosidad es el rango de 0 (no existencia de heterocigosidad) a 1 (para un sistema con un largo número de alelos igualmente frecuentes). Se debe mencionar que la medida más básica y útil para determinar la heterocigosidad es la H_e , usualmente definida como el reflejo de la diversidad genética.

2.2. Hipótesis

H₀: Los árboles promisorios de cacao no pueden agruparse utilizando los valores reportados para los principales parámetros de interés establecidos por el mercado internacional.

H₁: Los árboles promisorios de cacao pueden agruparse utilizando los valores reportados para los principales parámetros de interés establecidos por el mercado internacional.

CAPÍTULO III

3.1. Diseño metodológico

3.1.1. Descripción del área de estudio

La colecta de las muestras de mazorcas y tejido foliar (hojas) se realizó en los municipios de Bonanza ubicada geográficamente a $14^{\circ}01'$ latitud norte y $84^{\circ}35'$ longitud oeste, Rosita ubicada a $13^{\circ}55'$ latitud norte y $84^{\circ}24'$ longitud oeste y Siuna ubicada a $13^{\circ}44'$ latitud norte y $84^{\circ}46'$, todas en la Región Autónoma Costa Caribe Norte de Nicaragua (figura 1). La altura promedio de estos municipios van desde 60 a 200 msnm, las precipitaciones promedio son de 261.33 mm, temperatura media de 24°C y humedad relativa de 78.12% (INIDE, 2016).

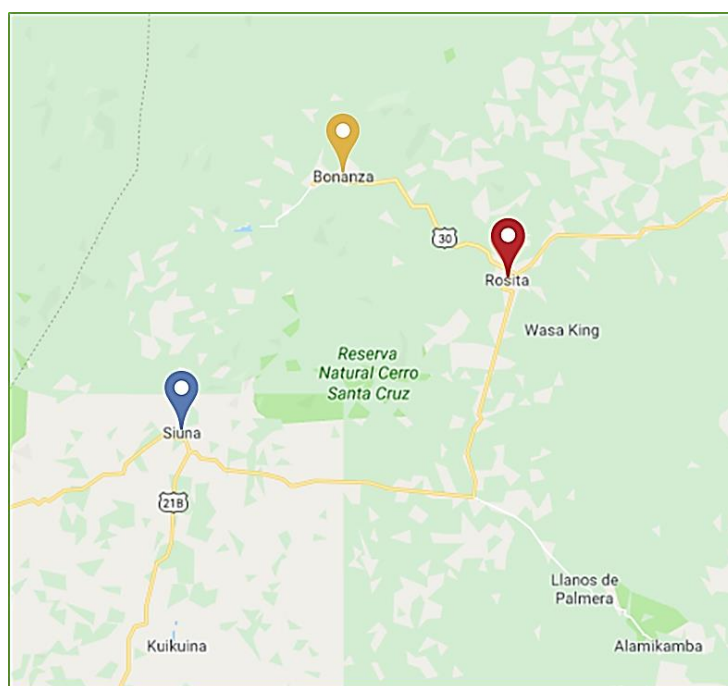


Figura 1. Ubicación geográfica de los municipios de donde proceden las muestras.
Fuente: Google maps [Recuperado: 29 de abril, 2020].

3.1.2. Tipo de estudio

De acuerdo a Hernández, Fernández y Baptista (2014) el presente estudio tiene un enfoque cuantitativo y se clasifica como descriptivo debido a que especifica las propiedades y características importantes de las muestras analizadas describiendo la tendencia de la población.

3.1.3. Población

La población incluyó a 400 árboles de cacao provenientes de fincas productoras de los municipios de Bonanza, Rosita y Siuna.

3.1.4. Muestra

Las muestras fueron colectadas en las fincas previamente identificadas por el INTA y seleccionadas de acuerdo a su productividad y anuencia de los productores a participar en el estudio. El período de captación de muestras fue en verano. Se colectaron muestras de mazorcas y tejido foliar proveniente de 13 árboles de cacao definidos como promisorios con base a su productividad y características organolépticas (aroma y sabor característico) (anexo 2 y 3). De cada árbol se colectaron cinco muestras de tejido foliar joven y en buen estado fitosanitario, así como una muestra de fruto (mazorca) en estado de madurez y sin evidencias de daño por plagas o enfermedades.

3.1.5. Definición y operacionalización de variables

Tabla 2. Definición y operacionalización de las variables.

Objetivos específicos	Variable	Indicadores	Clasificación de la variable	Tipo de variable
Determinar el contenido proximal y bioquímico de las muestras de cacao en baba procedentes de los diferentes sitios de estudio	Composición proximal y bioquímica	Contenido de humedad, materia seca, cenizas, proteínas, carbohidratos, fibra dietaria, extracto etéreo, polifenoles libres y totales, sacarosa y capacidad antioxidante	Cuantitativa	Dependiente
Identificar el perfil molecular de las muestras colectadas utilizando marcadores moleculares microsatélites (SSR)	Genotipo	Frecuencias alélicas, heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada	Cuantitativa	Independiente
Agrupar las muestras analizadas en función de los principales requisitos de calidad proximal y bioquímica	Parámetros de calidad del cacao demandados por el mercado internacional	Proteínas, extracto etéreo, polifenoles libres y totales, sacarosa y capacidad antioxidante	Cuantitativa	Dependiente

3.1.6. Materiales y métodos

El presente estudio comprendió tres etapas (anexo 4) a fin de determinar la calidad nutricional de los granos de cacao en baba, identificar el perfil molecular de los árboles seleccionados y agrupar las muestras en función de los requisitos internacionales. Estas etapas incluyeron análisis de laboratorios: análisis proximal, análisis bioquímico y análisis molecular. En dependencia de estos análisis se utilizaron dos matrices: granos o almendras de cacao en baba extraídas directamente de las mazorcas colectadas para el análisis nutricional y tejido foliar (hojas) de los árboles para la realización del perfil genético.

3.1.6.1. Materiales, instrumentos y equipos de recolección de información

Para la colecta de muestras y procesamiento de los datos se utilizaron formatos diseñados por el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua, como parte de su Sistema de Gestión de la Calidad (SGC). Los análisis se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología. Los reactivos, materiales y equipos utilizados se resumen en la tabla 3. La cristalería utilizada fue clase A serializada y los equipos e instrumentos empleados fueron debidamente calibrados o verificados para garantizar la calidad de los resultados obtenidos.

Tabla 3. Materiales, equipos e instrumentos utilizados en la investigación.

Clasificación	Descripción
Reactivos	Compuestos químicos de calidad ACS o superior utilizados para el procesamiento de las muestras, el análisis proximal y molecular (el detalle de los reactivos se encuentra en los procedimientos)
Cristalería	Material de cristal clase A empleado para la realización de los procedimientos analíticos: Beakers, probetas, pipetas serológicas, pipetas volumétricas, buretas, Erlenmeyer, kitazato, botellas ámbar de 500 y 1000 ml, balones volumétricos, desecador, balones fondo plano para extracción, condensador Liebig, equipo de destilación Soxhlet, platos de secuenciación y bandejas de tinción
Materiales	Insumos contruidos de plástico y otros materiales similares utilizados en el análisis y control de calidad, se incluyen: termos,

Clasificación	Descripción
	bandejas, racks y puntas para micropipetas, gradillas, gradillas flotadoras, tamices, bolsas de colectas, dedos de celulosa, papel aluminio, guantes, boquillas y papel toalla
Equipos e instrumentos de laboratorio	Equipos e instrumentos digitales o análogos empleados para realizar la colecta, procesamiento, análisis y control de calidad de las muestras. Se incluyen: GPS, cámara fotográfica, balanza analítica y de precisión, autoclave, baño maría, campana extractora de gases, plato caliente, medidor de pH, horno de convección por gravedad, mufla, termociclador para PCR, cámaras de electroforesis, transiluminador de luz UV y de luz blanca, fuente de poder para cámaras de electroforesis, termómetros, micropipetas. Los equipos básicos definidos por las metodologías de análisis se detallan en el anexo 5

Fuente: propia

3.1.6.2. Métodos utilizados

Los métodos de análisis proximal, bioquímico y molecular utilizados se basan en las normas establecidas por la AOAC en sus distintas ediciones o métodos internacionalmente aceptados (anexo 5). Asimismo, las metodologías para el análisis molecular se basan en referencias internacionales utilizando 11 marcadores moleculares, siendo 10 el límite inferior permisible (anexo 6). Los procedimientos correspondientes a los métodos utilizados se detallan en los anexos 7 al 15.

3.1.6.2.1. Colecta y procesamiento de las muestras de tejido foliar y las mazorcas de cacao

Se colectaron 13 mazorcas fisiológicamente maduras por parte de los investigadores del INTA. Las muestras fueron codificadas en campo (anexo 3) y trasladadas al Laboratorio por el representante del INTA, donde fueron almacenadas según lo establecido por las normas internacionales de análisis. Posteriormente las muestras fueron caracterizadas morfológicamente y se extrajeron las almendras de cacao, se eliminó el mucílago y se procedió a separar el grano de la testa para proceder a presecar a fin de garantizar estabilidad de las mismas. Finalmente, las muestras fueron pesadas, registrando la información (anexo 16).

Las muestras de tejido foliar fueron colectadas por los investigadores del INTA en campo considerando como criterio básico que se encontraran en buenas condiciones (sin daños o presencia de plagas y enfermedades) y de vigorosidad perceptible (no muy jóvenes, ni muy viejas). Se colectaron utilizando una tijera de campo desinfectada, las muestras se lavaron con agua destilada, se envolvieron en papel toalla y se introdujeron en una bolsa plástica con cierre hermético debidamente codificadas. Se colocaron en un termo a 4°C y se almacenaron hasta llegar al Laboratorio donde fueron desinfectadas, secadas y almacenadas a -20°C hasta el momento de su maceración con nitrógeno líquido (anexo 17). En ambas matrices colectadas se utilizaron formatos de colecta de campo y la cadena de custodia establecida por el sistema de gestión de calidad del Laboratorio de Biotecnología (anexo 18).

3.1.6.2.2. Determinación de humedad y materia seca

El método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada en un horno de convección por gravedad hasta obtener un peso constante. Se pesaron 2 g de muestra en un crisol (a peso constante) y se secó en horno durante 1 hora a $130 \pm 3^\circ\text{C}$ (anexo 19). La muestra se retiró del horno y dejó enfriar en el desecador (anexo 20). Se registró peso tan pronto como se equilibraron las muestras con la temperatura ambiente. El residuo de la muestra de cacao se registró en forma de sólidos totales y la pérdida de peso como la humedad (método indirecto).

3.1.6.2.3. Determinación de cenizas

Es un método gravimétrico que consiste en incinerar 2 g de la muestra a altas temperaturas (600°C) en una mufla durante 5 horas aproximadamente. El agua y otros materiales volátiles son evaporados y las sustancias orgánicas son quemadas en la presencia de oxígeno en el aire, a CO_2 , H_2O y N_2 . La mayoría de los minerales son convertidos a óxidos, sulfatos, fosforo, cloruros o silicatos. Las muestras de

alimentos son pesadas antes y después de la incineración para determinar la cantidad de ceniza presente.

3.1.6.2.4. Determinación de extracto etéreo

El método consiste en que el solvente (éter de petróleo) entre en contacto con una muestra por un tiempo determinado por la concentración de grasa esperada. Se pesan 10 gramos de muestra en un dedal de celulosa y se coloca en el equipo de extracción utilizando una fuente de calor a temperatura de ebullición del solvente 38-54°C. En el proceso se realizan varios ciclos: evaporación del solvente, condensación, caída sobre la muestra (para solubilizar las grasas presentes), acumulación en el aparato de extracción y descarga. El solvente se recupera una vez que el equipo ha estado funcionando el tiempo específico para cada matriz (nunca menor de 2 horas). La segunda fase del método inicia con la destilación de la solvente, eliminado del balón por evaporación, quedando el residuo lipídico extraído, el cual se determina por diferencia de peso entre la masa del balón que contiene el residuo y el balón vacío.

3.1.6.2.5. Determinación de proteínas

El método Kjeldahl consiste en tres etapas: digestión, destilación y titulación. Durante la etapa de la digestión la muestra es oxidada y disuelta con ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado en ebullición con la adición de un catalizador. El nitrógeno contenido en la muestra se convierte en sulfato de amonio. El tiempo de la digestión depende de la matriz utilizada y del equipo Kjeldahl, por tanto, la cantidad H_2SO_4 concentrado y del catalizador debe ser modificada para obtener una solución verdosa (con el catalizador). En el caso de cacao se utiliza una tableta Kjeldahl y se trata a 60 minutos a 420°C. La digestión concluye cuando se obtiene una solución transparente, sin emisión de humo (anexo 21). En la etapa de la destilación se añade un exceso de solución de hidróxido de sodio, el ion amonio es liberado en forma de amoníaco, es destilado y colectado sobre una solución valorada de ácido bórico (anexo 22). El amoníaco recogido es determinado por titulación con una solución valorada de ácido clorhídrico de concentración conocida (anexo 23).

3.1.6.2.6. Determinación de fibra dietaria

Se determinó el contenido de fibra dietética mediante una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras secas y libres de grasa son gelatinizadas con α -amilasa y luego digeridas enzimáticamente con la proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y el almidón presente. Se añade etanol para precipitar la fibra dietética soluble. El residuo se filtra y se lava con etanol y acetona (anexo 24). Después del secado, se pesa el residuo. La mitad de las muestras son analizadas para las proteínas y los otros son incinera (anexo 25). La fibra dietética total es el peso de los residuos, menos el peso de la proteína y cenizas.

3.1.6.2.7. Determinación de extracto libre nitrógeno (carbohidratos)

Para la determinación de carbohidratos se utilizó la norma AOAC 986.25 definida por diferencia:

$$\text{Carbohidratos} = \text{Sólidos totales} - (\text{Proteínas} + \text{Grasa} + \text{Cenizas}).$$

3.1.6.2.8. Determinación de PLS y PT

Para determinar el contenido polifenólico de las muestras de cacao se utilizó el método Folin-Ciocalteu (FC) que se basa en la rápida reacción de oxidación de los fenoles por el uso de álcali carbonato de sodio, produciendo que los fenoles formados, reduzcan el amarillo del reactivo FC producto de la transferencia de electrones desde los compuestos fenólicos hacia los complejos del ácido fosfomolibdico/fosfotungsténico del reactivo FC, formando un compuesto azul que es medido espectroscópicamente a aproximadamente 765 nm. El ácido gálico es usado como el estándar de comparación y los valores son usualmente reportados como miligramo de ácido gálico equivalente por 100g de muestra (anexo 26).

3.1.6.2.9. Determinación de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante de las muestras de cacao se determinó mediante el método de DPPH el cual se basa en la reducción del radical DPPH en 2,2-difenil-1-picril hidrazina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos -OH que decoloran dicho reactivo. En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece, proporcionando un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales.

3.1.6.2.10. Extracción de ADN en muestras de tejido foliar de cacao

La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles, todo esto depende de medidas y técnicas de extracción y purificación para obtener un ADN íntegro y puro. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo descrito por McLay (2017) modificado en el laboratorio, con un posterior control de calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, tinción con bromuro de etidio y visualización con luz UV (anexo 27).

3.1.6.2.11. Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida

Esta técnica consiste en la separación de las moléculas de ADN a través de un gel (agarosa o poliacrilamida) aplicando una corriente eléctrica. En el caso del ADN el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migrará hacia el polo positivo. Esta separación se realizó con buffer TBE, el gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio el cual se unió al ADN y de esta manera se visualizaron las bandas a través de un transiluminador UV (anexo 28). En el caso de poliacrilamida el gel se tiñó con nitrato de plata y se visualizó con un transiluminador de luz blanca.

3.1.6.2.12. Amplificación de ADN

La amplificación de las muestras se llevó a cabo mediante la técnica PCR, una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN, este método consiste en utilizar secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. Se utilizó el protocolo de estandarización de perfiles térmicos de McCouch (2002) con una desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización 94°C por 30 segundos, acoplamiento o alineación 46 o 51°C (según el iniciador) por 1 minuto y un tiempo de elongación a 72°C por 1 minuto. Una extensión final 72°C por 5 minutos y enfriamiento a 4°C por tiempo indefinidos (anexo 29). Conservación a 4°C hasta su evaluación electroforética. Consecutivamente los resultados fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 1.8% y visualizada en transiluminador UV, así como en poliacrilamida al 6% y visualizada con luz blanca (anexo 30). Se utilizaron los marcadores SSR por ser altamente polimórficos y sus características de ser codominantes los potencia como una herramienta muy poderosa para generar una identificación confiable de organismos y permitir una evaluación adecuada de la diversidad genética (anexo 31). Los amplicones o productos de PCR visualizados son cuantificados con base a un marcador de peso molecular mediante una curva de calibración (anexo 32).

3.1.6.2.13. Aseguramiento y control de calidad de los análisis

Se realizaron distintos controles con el objetivo de garantizar que las mediciones realizadas cumplan los requisitos de calidad establecidos internacionalmente y correspondan a datos fiables y precisos. Asimismo, se utilizaron equipos debidamente calibrados y verificados, al igual que se utilizaron estándares analíticos y se aplicaron métodos analíticos estandarizados.

Los controles implementados están establecidos por la AOAC (2000) e incluyen: blanco de laboratorio, blanco de laboratorio enriquecido, análisis de réplicas de laboratorio y muestras enriquecidas. La exactitud del método describe el grado de concordancia entre un valor observado y el valor de nominal y es evaluado mediante

los recobros de los blancos y muestras enriquecidas con el analito de interés. El blanco enriquecido demuestra la exactitud del método, mientras que el análisis de la muestra enriquecida estima la exactitud de los análisis en presencia de la muestra o matriz analizada. La AOAC (2000) indica que este control de calidad es aceptado cuando el recobro es 98 a 102% para la concentración de analito de 10-100%, y 97 a 103% para la concentración de analito de 1%.

La precisión del método analítico indica la reproducibilidad de los resultados de la muestra y se evalúa por medio de las réplicas de laboratorio e incluye la manipulación, el transporte, el almacenamiento y el proceso analítico. La precisión aceptable entre la muestra original y sus réplicas se establece mediante la RSD menor al 1.9 ó 2.7 % dependiendo del análisis (anexo 33).

3.1.6.3. Plan de tabulación y análisis (materiales para el procesamiento de la información)

Los resultados del análisis proximal y bioquímico fueron analizados en hojas de cálculos Excel (2016) mediante el cálculo de promedios, desviación estándar y coeficiente de variación para su posterior evaluación según los requisitos establecidos por la AOAC (2000). En los casos donde se encontraron valores atípicos se aplicaron límites de confianza (95%) para discriminarlos. Este análisis fue la base para alcanzar el primero objetivo específico de la investigación.

Los resultados moleculares se analizaron con el software Arlequin suite ver 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) donde se determinaron frecuencias alélicas, heterocigosidad esperada y observadas, así como índices referenciados internacionalmente.

Finalmente, las muestras se agruparon con base a los criterios de calidad del mercado internacional entre ellos ICCO (anexo 34), debido a que la formación de conglomerados de muestras con características similares permitió identificar los grupos que pueden ser utilizados en programas de mejoramiento del rubro por

cruzamiento de estos árboles promisorios. Se determinaron como parámetros de mayor interés: proteínas, extracto etéreo, polifenoles libres y totales, sacarosa y capacidad antioxidante. Con base a estos parámetros se procedió a realizar grupos compactos y lo más homogéneos posibles utilizando el software estadístico R (R Core Team, 2019). Se utilizó la distancia euclídea ya que es el método más común utilizado en la mayoría de los software (Kassambara, 2017) y el método de vinculación de ward.d2 en el software R a través de la paquetería factoextra.

Como parte de la preparación previa de los datos se procedió a estandarizar las variables o criterios seleccionados para realizar el análisis comparativo durante el análisis de conglomerados debido a que se utilizan distintas escalas (% m/m, mg GAE/100g). Esto se realizó con propósito de evitar la afectación de las medidas de disimilitud (Kassambara, 2017).

CAPÍTULO IV

4.1. Análisis y discusión de resultados

4.1.1. Determinación del contenido proximal y bioquímico de las muestras de cacao en baba

Los resultados obtenidos proporcionaron la composición nutricional de las muestras desde la perspectiva proximal y bioquímica (anexo 35), y de igual manera permitieron evaluar las diferencias entre ellas, encontrando que mientras la composición proximal presentó una alta similitud, los resultados bioquímicos reflejaron grandes diferencias.

4.1.1.1. Humedad y materia seca

El contenido de humedad de los granos de cacao analizados no sobrepasa en su mayoría la recomendación de ICCO (2012) (anexo 34) que establece que 3,20% es el valor máximo. Las muestras que presentaron contenido de humedad inferior al límite fueron: ASO1016LDO/LBP-1702-0027 (2,91%), SC0116VRG/LBP-1703-0029 (3,08%), ZT0416CALG/LBP-1703-0032 (2,71%), MU0216MCM/LBP-1703-0039 (2,65%), MU0416JSM/LBP-1703-0042 (2,96%) y MU0416MCM/LBP-1703-0046 (2,79%), las últimas tres procedentes del municipio de Bonanza (figura 2). A pesar que las muestras restantes superan el límite, no lo excedente en más de 12,81% que correspondió a la muestra SA00416JAMR (LBP-1702-0018).

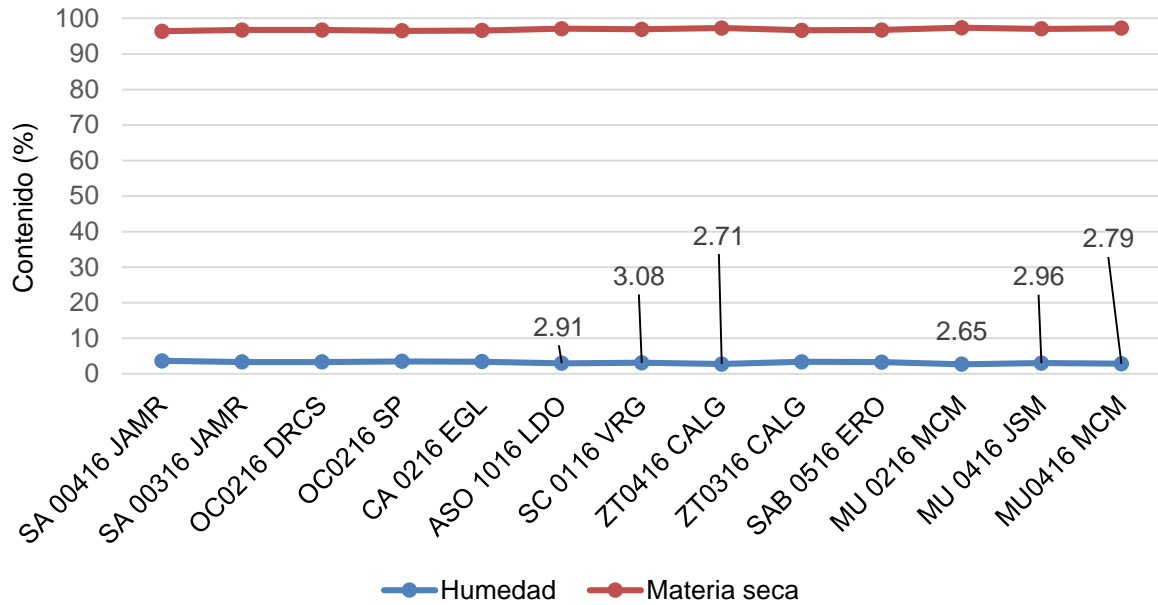


Figura 2. Contenido de humedad y materia seca (%) determinado en las muestras cacao analizadas. Fuente: Propia.

Estos valores son inferiores a los reportados en un estudio en Venezuela por Lares *et al.* (2012) para el grano de cacao fermentado y seco donde reportó valores de $4.31 \pm 0.06\%$ de humedad. Asimismo, en Colombia, Cadena *et al.* (2008) encontró un valor de humedad mayor en cacao seco y fermentado ($4,4 \pm 0,05\%$). Cabe destacar que el porcentaje de humedad de la muestra es de suma importancia ya que influye directamente en su estabilidad, y por ende en la pérdida de la calidad sanitaria.

Como es de esperarse, debido a que el contenido de humedad de las muestras es bajo la materia seca constituye el componente más sobresaliente en la determinación del contenido proximal de las muestras de cacao. El rango de materia seca encontrado fue 96,39% (SA00416JAMR/LBP-1702-0018) y 97.35% (MU0216MCM/LBP-1703-0039).

4.1.1.2. Cenizas

Dentro de los resultados obtenidos con respecto al contenido mineral de las muestras de cacao, la muestra LBP-1703-0042 (MU0416JSM) del municipio de Bonanza alcanzó el mayor contenido de cenizas (4,50%); cabe resaltar que esta muestra presentó características acriolladas por el color de los granos (crema y púrpura ligero) y sobrepasa al valor establecido por la ICCO (2012) que recomienda 4,20%, aunque está bajo el límite establecido por el CODEX-STAN-141-1983 que señala como máximo permisible el 10.0% (anexo 34). Las demás muestras resultaron estar por debajo del límite ICCO (2012) con un contenido de cenizas entre 2.87% (OC0216 DRCS/LBP-1702-0020) y 3.92% (ZT0416 CALG/LBP-1703-0032) (figura 3).

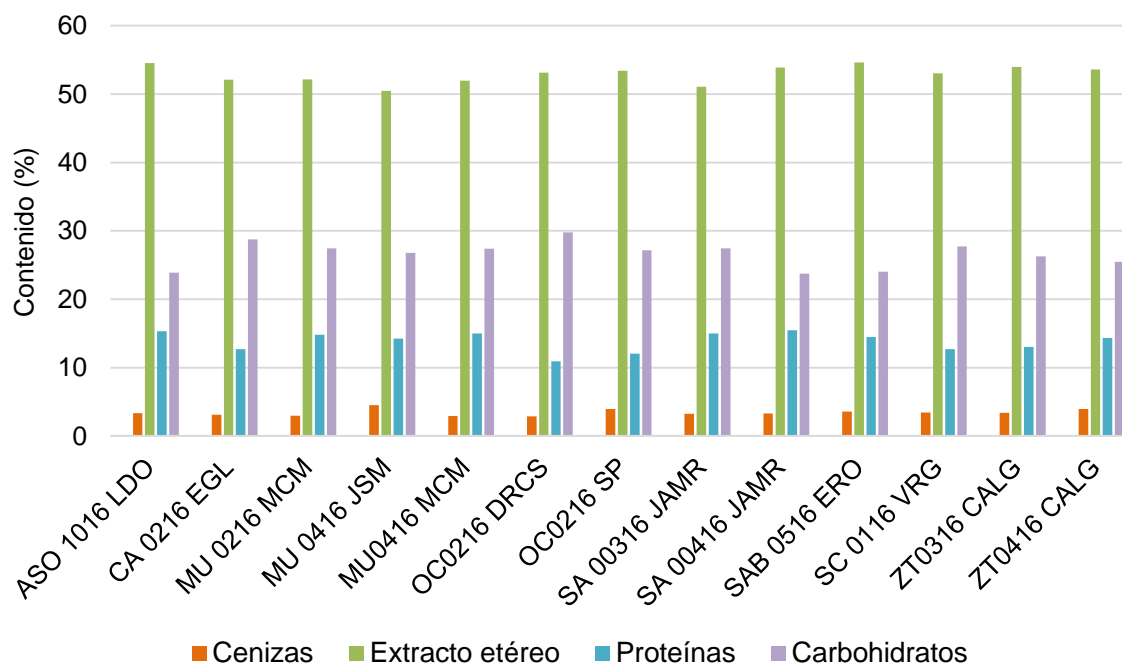


Figura 3. Contenido de cenizas, extracto etéreo, proteínas y carbohidratos (%) determinado en las muestras cacao analizadas. Fuente: Propia.

Al comparar los resultados con referencias de Venezuela (Lares *et al.*, 2012) donde se reportan un rango de $2,96 \pm 0,05\%$ y $3,06 \pm 0,04\%$ para GFS y GFST, se encontró que los contenidos de ceniza de ambas matrices presentan similitud con

el presente estudio; asimismo las matrices se encuentran bajo los límites internacionales. En Ghana, Afoakwa *et al.* (2013) utilizando cacao sin fermentar y fermentado reportó el rango de 2,92 - 3,48% de cenizas, y al contrarrestar con los resultados obtenidos, se logra apreciar la semejanza.

4.1.1.3. Extracto etéreo

El contenido de extracto etéreo determinado en las muestras analizadas alcanzó un rango de 50,47% (MU0416JSM/LBP-1703-0042) a 54,65% (SAB0516ERO/LBP-1703-0034), acercándose al 57,00% referenciado por la ICCO (2012) (figura 3). Se debe mencionar que la muestra con características acriolladas (MU0416JSM/LBP-1703-0042) presentó el menor contenido de extracto etéreo y el 76.92% de las muestras presentaron un contenido de grasa cruda superior al 52,00%.

Al contrastar los resultados de grasa cruda obtenidos en este estudio con referencias regionales e internacionales se aprecia que las muestras analizadas superan en su mayoría a los resultados de investigaciones como la realizada por Andrade *et al.* (2019), quienes encontraron rangos entre 45,28% \pm 0,45 (Perú) y 51,02% \pm 0,24 (Ecuador) para granos de cacao utilizados en la industria chocolatera. En Ghana, Afoakwa *et al.* (2013) reporta rangos de 50,40 a 55,21%, presentando mayor semejanza a los obtenidos en este estudio.

4.1.1.4. Proteínas

Para el contenido de proteínas de granos de cacao la ICCO (2012) recomienda un valor de 15,63%. Los resultados obtenidos en este estudio exhiben un rango entre 10,90% (OC0216DRCS/LBP-1702-0020) y 15,46% (SA00416JAMR/LBP-1702-0018), donde 61,54% de las muestras superan el 14,00%, 30,77% superan el 12,00% y únicamente el 7,69% (equivalente a una muestra) presentó un valor inferior (figura 3).

Al contrastar los resultados obtenidos con diferentes estudios se encontró que 84,62% (anexo 35) de las muestras nicaragüenses superan lo reportado en

Venezuela por Lares *et al.* (2012), quienes presentaron rangos de proteína cruda de $12,21 \pm 0,35\%$ y $12,12 \pm 0,16\%$ en GFS y GFST. Andrade *et al.* (2019) encontró un contenido de proteína cruda de $8,08\% \pm 0,25\%$ (Ecuador) y $15,58 \pm 0,28\%$ (Perú), por lo cual las muestras de Nicaragua presentan mayor semejanza a las muestras de Perú y fueron superadas por las muestras referenciadas en Ghana por Afoakwa *et al.* (2013) que reportaron 21,63% de proteína cruda para muestras de cacao sin fermentar.

4.1.1.5. Carbohidratos

El resultado del análisis de extracto libre de nitrógeno, mejor conocido como carbohidratos, presentó un rango de 23,74% (SA00416JAMR/LBP-1702-0018) y 29,80% (OC0216DRCS/LBP-1702-0020) superiores a los encontrados en Ghana por Afoakwa *et al.* (2013) para cacao sin fermentar (15.5%) y similares a los reportados por Ilesami (2016) en Nigeria para NCL (20,50%), esto puede deberse a la similitud de las matrices.

4.1.1.6. Fibra dietaria

El contenido de fibra dietética de los granos de cacao determinada exhibió un rango de 40,84 a 52,80%, donde este último valor corresponde a la muestra CA0216EGL/LBP-1702-0024 procedente del municipio de Siuna. Es importante considerar que la fibra es un nutriente fundamental para la dieta ya que esta llega sin alteraciones hasta el final del proceso digestivo, siendo mejor aprovechada por el organismo (figura 4).

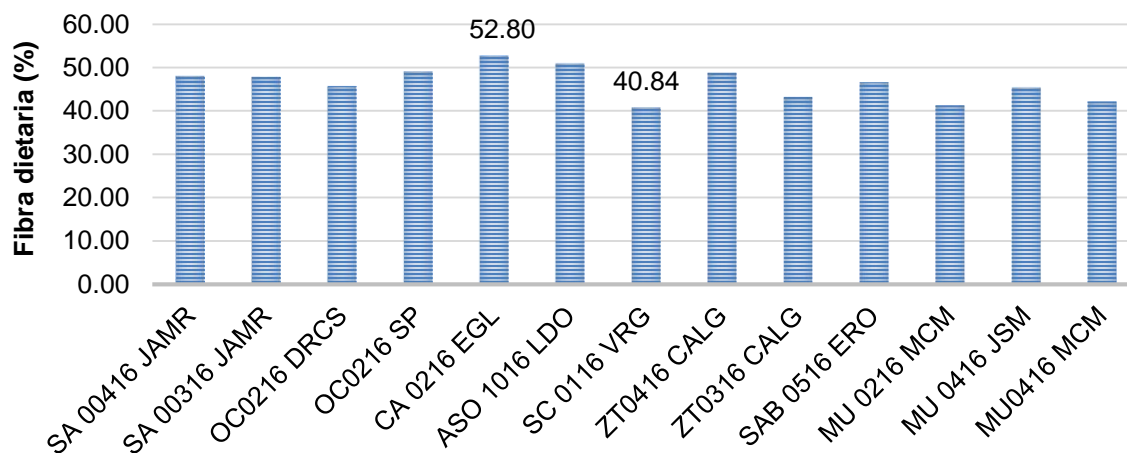


Figura 4. Contenido de fibra dietaria (%) determinado en las muestras cacao analizadas. Fuente: Propia.

4.1.1.7. Sacarosa

En los granos no fermentados, la sacarosa representa aproximadamente el 90% del total de azúcares. La pulpa dulce mucilaginosa de las semillas maduras contiene cantidades variables de azúcares (hexosas y sacarosa) y polisacáridos (pectinas, hemicelulosas y celulosa) (Biehl & Ziegleder, 2003). Durante la fermentación, la sacarosa se convierte en azúcares reductores (fructosa y glucosa) debido a la actividad de la invertasa (Biehl & Ziegleder, 2003a; Afoakwa *et al.*, 2008).

En las muestras analizadas se determinó alta variabilidad en el contenido de sacarosa (0,02 a 1.93%) (figura 5), el cual puede deberse al estado de madurez de la mazorca: en mazorcas con mayor madurez el contenido de sacarosa disminuye debido a su conversión a fructosa y glucosa. La muestra que presentó el menor contenido de sacarosa fue S0116VRG/LBP-1703-0029 y la muestra con mayor sacarosa fue MU0216MCM/LBP-1703-0039. Únicamente 30,77% de las muestras exhibieron contenidos de sacarosa inferiores a 1,00% (anexo 35).

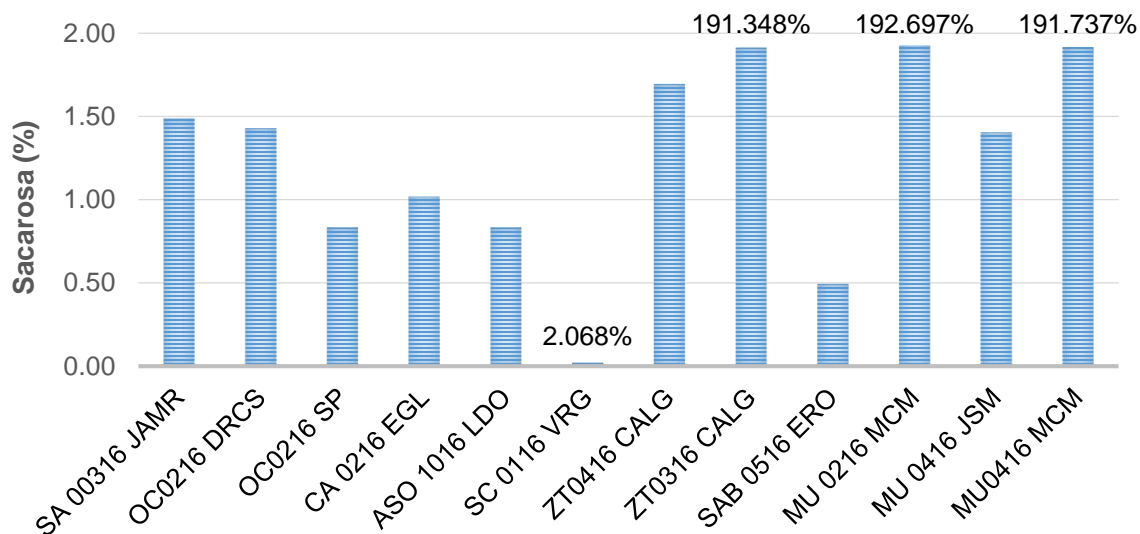


Figura 5. Contenido de sacarosa (%) determinado en las muestras cacao analizadas. Fuente: Propia.

4.1.1.8. Polifenoles libres y totales

El contenido de PLS osciló entre 90,64 y 484,13mg GAE/100g. El mayor contenido se encontró en la muestra OC0216DRCS/LBP-1702-0020 recolectada en el municipio de Siuna y la muestra de menor valor, ZT0416CALG/LBP-1703-0032, se colectó en el municipio de Rosita. Cabe mencionar que el 92,31% de las muestras analizadas superan el valor mínimo reportado para la muestra ZT0416CALG/LBP-1703-0032 (anexo 35).

En cuanto al contenido encontrado de PT los valores más altos fueron presentados por las muestras CA0216EGL/LBP-1702-0024 con 752,05mg GAE/100g, seguido de la muestra MU0216MCM/LBP-1703-0039 con 508,24mg GAE/100g, estas muestras fueron colectadas en Rosita y Bonanza, respectivamente. Cabe mencionar que el 84,62% de las muestras presentaron valores superiores a 300mg GAE/100g (anexo 35).

Al comparar el valor más alto del contenido de PLS con el contenido de PT se observó que las muestras de cacao analizadas en este estudio contienen un mayor

contenido de PT, a excepción de la muestra OC0216DRCS/LBP-1702-0020 que presentó mayor contenido de PLS (figura 6).

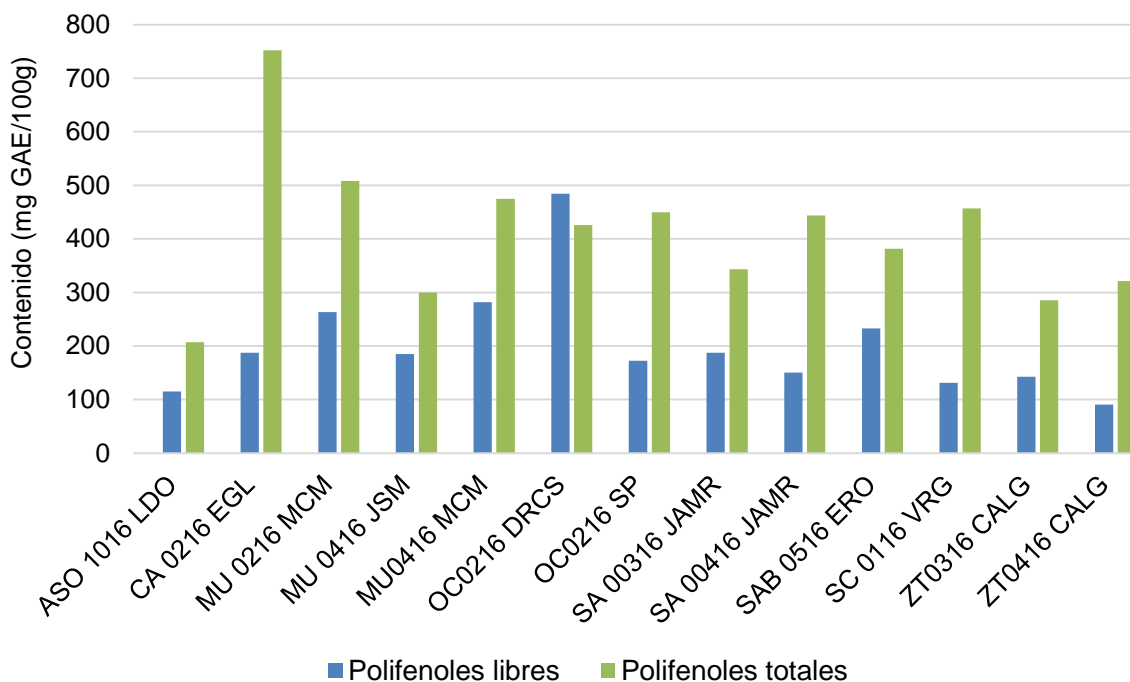


Figura 6. Contenido de PLS y PT (mg GAE/100g) determinado en las muestras cacao analizadas. Fuente: Propia.

4.1.1.9. Capacidad antioxidante

El cacao es una de las fuentes naturales más ricas en antioxidantes. Su capacidad antioxidante por porción es más alta que la del vino tinto y el té negro o verde (Jolić, Radojčić, Marković, Šipušić & Delonga, 2011). La importancia de los antioxidantes dietarios se encuentra asociado a múltiples efectos benéficos determinados a nivel cardiovascular, endotelial, metabólico, anti-inflamatorio e incluso actividad protectora a nivel neurológico (Aprotosoiaie, Luca & Miron, 2016). Por esta razón la cuantificación de su contenido tiene múltiples aplicaciones y es de gran y creciente interés a nivel internacional.

La actividad antioxidante determinada para las muestras fue altamente variable en un rango de 54,20 a 98,08%, correspondientes a muestras provenientes de Siuna

(OC0216DRCS/LBP-1702-0020) y Bonanza (MU0416MCM/LBP-1703-0046), respectivamente. Se debe mencionar que 61,54% de las muestras superan la capacidad antioxidante de 80,00% (anexo 35) (figura 7).



Figura 7. Capacidad antioxidante (%) determinado en las muestras cacao analizadas. Fuente: Propia.

Al contrastar los resultados obtenidos con referencias nacionales como el estudio realizado por Negaresh y Marín (2013) se identificó que el 30,77% de las muestras superan la mayor capacidad antioxidante reportada por los autores para granos frescos (88,10%) y 30,77% de las muestras se acercan a dicho valor (anexo 35). De igual manera, 61,54% de las muestras de la presente investigación superan la capacidad antioxidante de los productos derivados de cacao reportados en dicho estudio, a excepción del producto “Cacao Criollo” fabricado en Venezuela (86,38%).

4.1.2. Identificación del perfil molecular de las muestras colectadas utilizando marcadores moleculares microsatélites (SSR)

A fin de obtener el perfil genético de los 13 árboles de cacao promisorio se identificaron los alelos codificados en el genoma de cada muestra en dependencia del marcador molecular definido y tomando en cuenta el tamaño de la población estudiada, así como el objetivo principal de esta investigación, se determinaron

como parámetros de diversidad genética: la heterocigosidad observada, la heterocigosidad esperada y la frecuencia alélica por locus.

Como se esperaba, el perfil molecular de las muestras (anexo 36) es variante en dependencia del marcador analizado. De igual manera existieron muestras que exhibieron un perfil acriollado que usualmente se encuentra asociado a la presencia del mismo alelo en ambos loci, de esta manera se pueden identificar a las muestras: CA0216EGL/LBP-1702-0024 (Rosita), SA00416JAMR/LBP-1702-0018 (Rosita), O0216SP/LBP-1702-0022 (Siuna), ASO1016LDO/LBP-1702-0027 (Siuna), SC0116VRG/LBP-1703-0029 (Rosita), MU0416MCM/LBP-1703-0046 (Bonanza) y MU0216MCM/LBP-1703-0039 (Bonanza). Debe mencionarse que la muestra MU0416JSM/LBP-1703-0042 que exhibió características fenotípicas asociadas a variedades criollas (almendra crema y violeta pálido), no presentó genotipo correspondiente.

4.1.2.1. Número de alelos por grupo

4.1.2.1.1. Siuna

En el análisis intra-poblacional de las muestras colectadas en el municipio de Siuna se identificaron 52 alelos para 11 loci estudiados, de los cuales 10 resultaron polimórficos, con una media de 4,73 alelos por locus (anexo 37). Con respecto al polimorfismo de los locus, los marcadores microsatélites MTcCIR07 y MTcCIR15 fueron los más informativos referentes al número de alelos, logrando identificar hasta 6 alelos por loci. Las muestras que presentaron heterocigosidad para el cebador MTcCIR07 fueron: OC0216DRCS/LBP-1702-0020 y ASO1016LDO/LBP-1702-0027, mientras que para el MTcCIR15 fueron: ASO1016LDO/LBP-1702-0027 y SAB0516ERO/LBP-1703-0034 (figura 8).

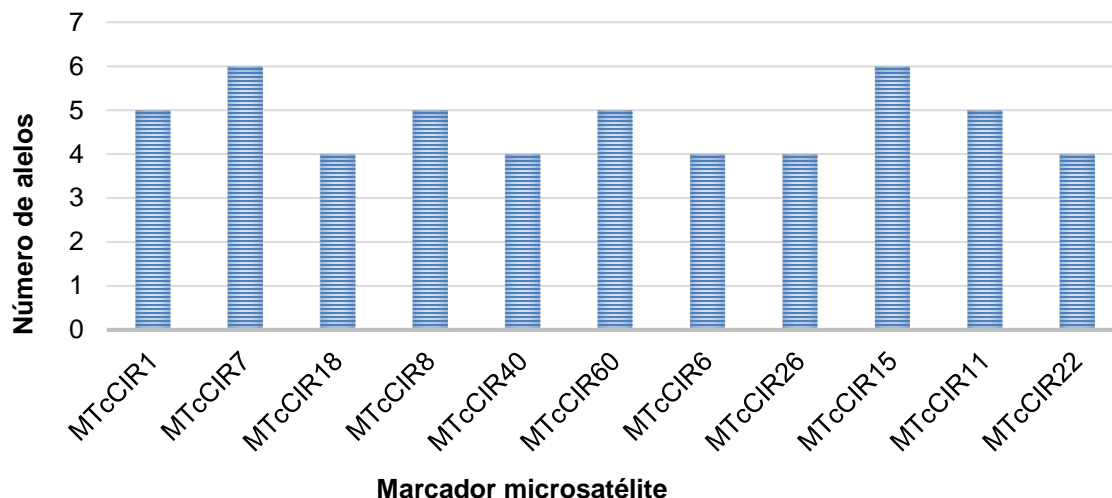


Figura 8. Número de alelos presentados por los árboles de cacao provenientes de Siuna. Fuente: Propia.

4.1.2.1.2. Rosita

Para las muestras de Rosita se identificaron 67 alelos para los 11 loci estudiados, de los cuales 5 resultaron polimórficos, con un promedio de 6,09 alelos por locus (anexo 37). Los primers MTcCIR18 y MTcCIR26 resultaron ser los más polimórficos para esta población detectando 8 alelos cada uno. La muestra SA00316JAMR/LBP-1702-0019 resultó ser heterocigotos para ambos marcadores. Las muestras SC0116VRG/LBP-1703-0029 y ZT0316CALG/LBP-1703-0033 son heterocigotos para el cebador MTcCIR18, mientras que las muestras CA0216EGL/LBP-1702-0024 y SC0116VRG/LBP-1703-0029 presentaron heterocigosidad para el cebador MTcCIR26. El cebador MTcCIR6 resultó ser el menos informativo con un total de 2 alelos (figura 9).

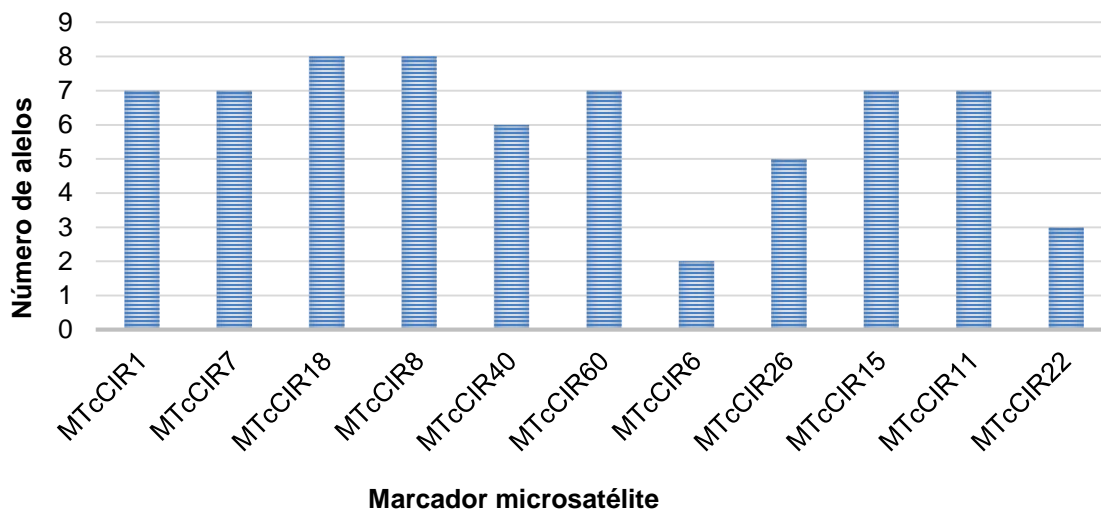


Figura 9. Número de alelos presentados por los árboles de cacao provenientes de Rosita. Fuente: Propia.

4.1.2.1.3. Bonanza

En las muestras colectadas en Bonanza se identificaron 37 alelos en un total de 11 loci, de éstos únicamente 8 son polimórficos. Los marcadores que presentaron mayor variabilidad fueron MTcCIR18 y MTcCIR26, al igual que en las muestras colectadas en Siuna, y en este caso ambos lograron identificar 5 alelos. En las muestras MU0416JSM/LBP-1703-0042 y MU0216MCM/LBP-1703-0039 se observó heterocigosidad (figura 10).

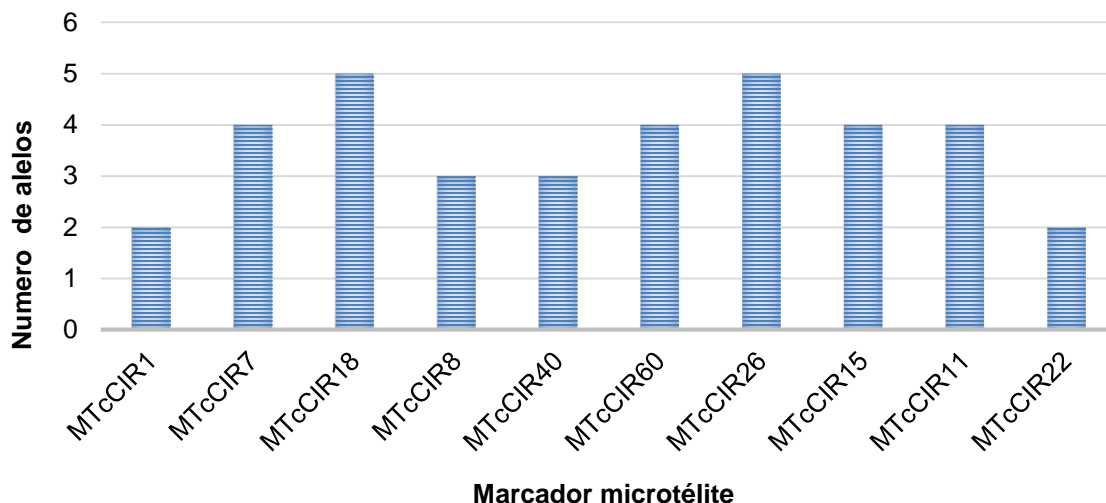


Figura 10. Número de alelos presentados por los árboles de cacao provenientes de Bonanza. Fuente: Propia.

En general, los marcadores MTcCIR7, MTcCIR18 y MTcCIR15 detectaron 17 alelos, siendo los más polimórficos para este tamaño de población por lo tanto estos marcadores podrían ser utilizados para investigaciones de diversidad genética en poblaciones pequeñas. Estos resultados se acercan a lo descrito por Herrera (2012) quien encontró 12 alelos y 14 alelos para los marcadores microsatélites MTcCIR7 y MTcCIR15, respectivamente, para una población de 105 accesiones.

Los marcadores MTcCIR8, MTcCIR60 y MTcCIR11 identificaron 16 alelos cada uno, considerándose polimórficos para la población en estudio. Con respecto a los marcadores que presentaron menor número de alelos se encontró que MTcCIR6 y MTcCIR22 exhibieron de 6 a 11 alelos, respectivamente. Cabe destacar que el marcador MTcCIR6 resultó ser monomórfico para la población de Bonanza.

4.1.2.2. Heterocigosidad observada y esperada por sitio de colecta

La heterocigosidad observada media presentada por Siuna fue 0,348, Rosita reportó 0,372 y Bonanza presentó 0,350. La heterocigosidad esperada promedio fue 0,861 para Siuna, 0,843 para Rosita y 0,810 para Bonanza (figura 11), por

consiguiente, son consideradas como poblaciones variables que podrían ser utilizados en futuros programas de mejoramiento genético. Cabe mencionar que esta característica corresponde al tipo de muestras utilizadas, es decir, árboles seleccionados por sus características promisorias (por lo cual se realizó una colecta dirigida y con un número limitado de individuos) y en algunos casos reportadas como muestras acriolladas.

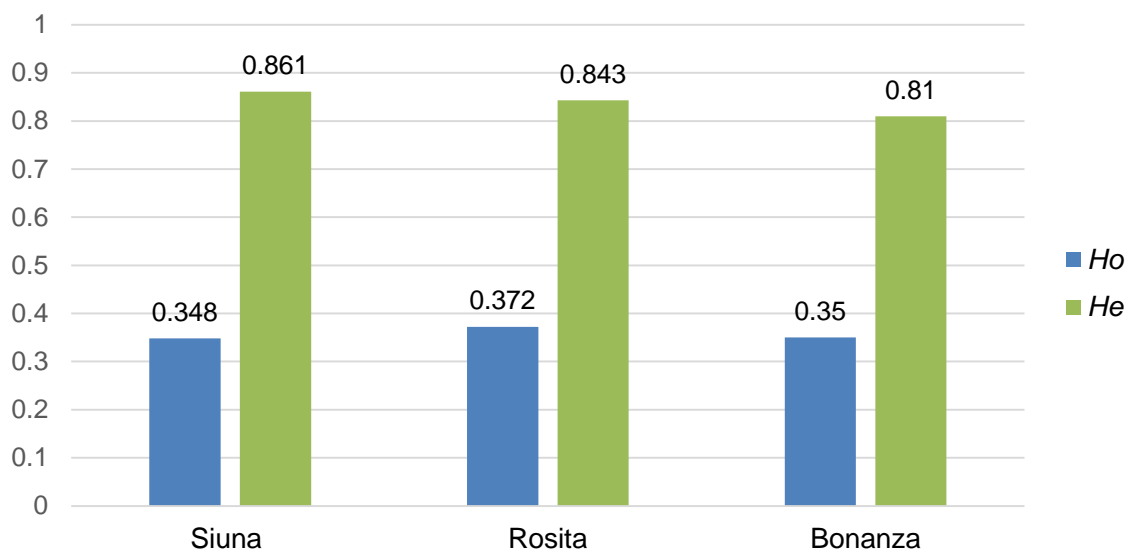


Figura 11. Heterocigosidad observada (Ho) y heterocigosidad esperada (He) de los árboles promisorios analizados en función de su sitio de colecta. Fuente: Propia.

4.1.3. Agrupamiento de las muestras analizadas en función de los principales requisitos de calidad proximal y bioquímica

El mercado internacional establece diferentes parámetros de calidad para el cacao en función de su propósito final, de esta manera la industria chocolatera requiere muestras con alto contenido de grasa, sacarosa y proteínas, mientras que la industria cosmética demanda alto contenido de PLS y PT, así como capacidad antioxidante. Tomando esto como referencia se procedió a realizar grupos compactos y lo más homogéneos posible con los resultados obtenidos para los parámetros: proteínas (%), extracto etéreo (%), sacarosa (%), PLS (mg GAE/100g),

PT (mg GAE/100g) y CA (%). La relevancia de esta asociación se basa en la necesidad de clasificar la calidad de las muestras analizadas.

Producto de la estandarización de las variables requeridas para compararlas durante el análisis de conglomerados se identificaron cuatro grupos que asocian a las muestras estudiadas, siendo los más grandes el conglomerado 1 y 4 que incluyen 6 y 5 individuos, respectivamente (anexo 38). De igual manera para cada uno de estos grupos se reportan valores promedios para cada uno de los parámetros (anexo 39) y las muestras se asocian en función de éstos (figura 12).

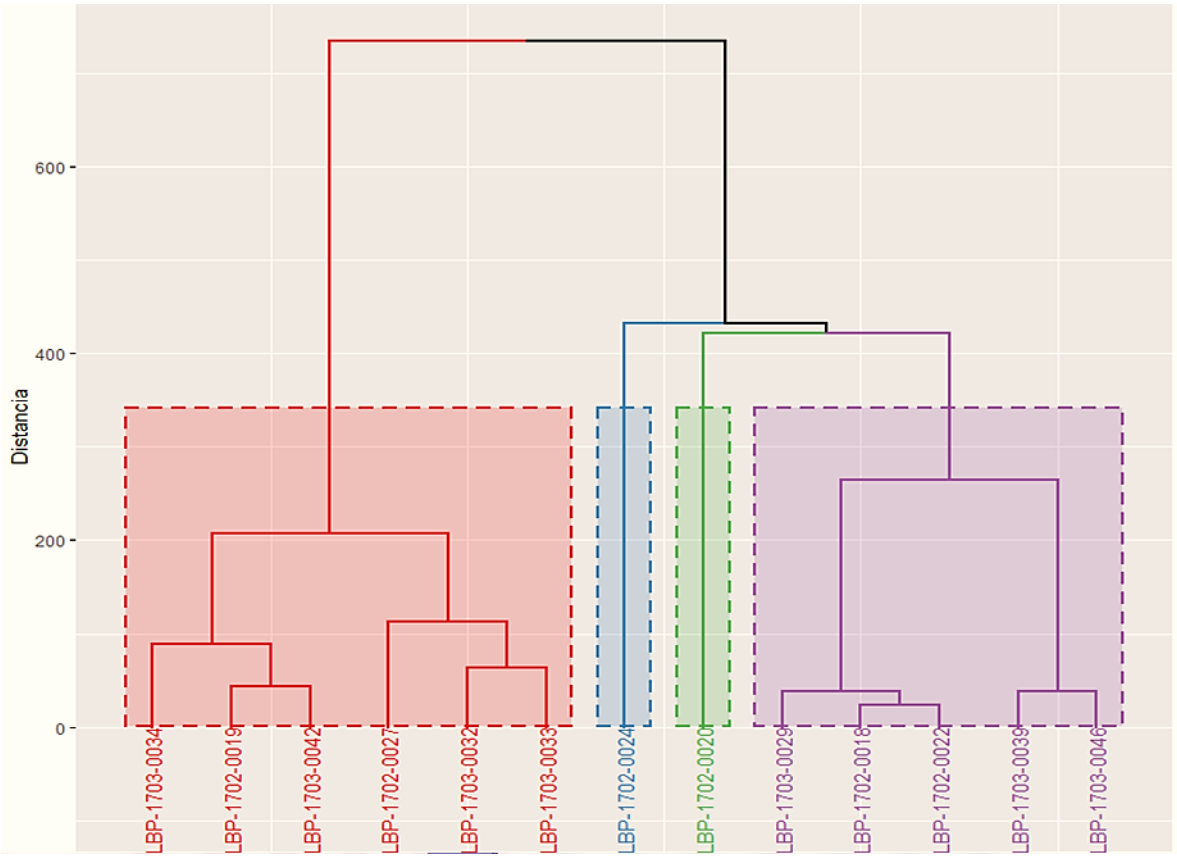


Figura 12. Dendrograma de las muestras de cacao analizadas agrupadas con base a los parámetros proximales y bioquímicos seleccionados para cacao.

Fuente: Propia.

El primer conglomerado (extremo izquierdo, color rosa) está conformado por 6 muestras dentro de las cuales: SA00316AMR/LBP-1702-0019, ZT0416CALG/LBP-

1703-0032 y ZT0316ALG/LBP-1703-0033 son procedentes del municipio de Rosita, SAB0516ERO/LBP-1703-0034 y ASO1016LDO/LBP-1702-0027 son originarias de Siuna y la muestra MU0416JSM/LBP-1703-0042 fue colectada en Bonanza. Este centroide posee el mayor contenido de proteínas y los niveles más próximo al mayor valor reportado para extracto etéreo, sacarosa y capacidad antioxidante.

Los conglomerados 2 y 3 están compuestos únicamente de una muestra respectivamente, son comúnmente llamados clúster unitario y esto se debe a que corresponden a valores atípicos para los parámetros de interés. El conglomerado de color azul corresponde a la muestra CA0216EGL/LBP-1702-0024 procedente de Rosita y el grupo color verde es la muestra OC0216DRCS/LBP-1702-0020 colectada en Siuna; a pesar que ambos centroides no presentan mucha similitud para los parámetros proximales, se apreció que poseen altos contenidos de PLS y PT, pero bajo contenido de proteínas.

El cuarto grupo (color violeta) está compuesto de 5 muestras: SC0116VRG/LBP-1703-0029 y SA00416JAMR/LBP-1702-0018 originarias de Rosita, OC0216SP/LBP-1702-0022 procedente de Siuna, MU0216MCM/LBP-1703-0039 y MU0416MCM/LBP-1703-0046 colectadas en Bonanza. Este grupo reportó contenidos considerables de proteínas y sacarosa, además posee la mayor capacidad antioxidante.

De manera general se determinó que las muestras analizadas cumplen los parámetros establecidos por ICCO acercándose a los valores de referencia, y a su vez, las muestras provenientes de los árboles promisorios agrupados en los conglomerados 1 y 4 son los más próximos.

CAPÍTULO V

5.1. Conclusiones

Posterior al análisis proximal, bioquímico y molecular de 13 árboles de cacao seleccionados como promisorios por el INTA y provenientes de los municipios de Siuna, Rosita y Bonanza, se concluyó:

1. El contenido proximal y bioquímico determinado para las muestras de cacao es variable. La humedad de seis muestras se encontró bajo el límite establecido por normas internacionales y las muestras restantes no exceden en más de 12,81% a dicho límite. La materia seca fue el componente predominante en el estudio con rango de 96,39% y 97,35%. El contenido de cenizas de las muestras no excedió el valor de referencia, a excepción de la muestra LBP-1703-0042/MU0416JSM que lo superó (4,50%). El rango de extracto etéreo determinado fue 50,47 a 54,65%, mientras que el rango de proteína varió de 10,90 a 15,46%, el contenido de carbohidratos de 23,74 a 29,80% y las muestras exhibieron rangos de fibra dietaria de 40,84 a 53,80%. La sacarosa, un parámetro de vital importancia, presentó alta variabilidad (0,02 a 1.93%) al igual que el contenido de PLS cuyos valores oscilaron de 90,64 a 484,13mg GAE/100g. Los mayores contenidos de PT fueron presentados por las muestras CA0216EGL/LBP-1702-0024 con 752,05mg GAE/100g, seguido de la muestra MU0216MCM/LBP-1703-0039 con 508,24mg GAE/100g. La actividad antioxidante determinada para las muestras fue altamente variable en un rango de 54,20 a 98,08%.

2. El perfil molecular de las muestras colectadas utilizando marcadores moleculares microsatélites (SSR) es variante en dependencia del marcador analizado. De igual manera se identificó que las siguientes muestras exhibieron un perfil acriollado: CA0216EGL/LBP-1702-0024 (Rosita), SA00416JAMR/LBP-1702-0018 (Rosita), OC0216SP/LBP-1702-0022 (Siuna), ASO1016LDO/LBP-1702-0027 (Siuna), SC0116VRG/LBP-1703-0029 (Rosita), MU0416MCM/LBP-1703-0046 (Bonanza) y MU0216MCM/LBP-1703-0039 (Bonanza). En general, los marcadores MTcCIR7,

MTcCIR18 y MTcCIR15 detectaron 17 alelos, siendo los más polimórficos. Los marcadores MTcCIR8, MTcCIR60 y MTcCIR11 reportaron 16 alelos, mientras que MTcCIR6 y MTcCIR22 fueron los menos polimórficos en la población estudiada. El rango de *Ho* determinado para las poblaciones de Siuna, Rosita y Bonanza fue 0,348 a 0,372 y el rango promedio de *He* fue 0,810 a 0,861, razón por la cual dichas poblaciones son consideradas variables y de interés para futuros programas de mejoramiento genético.

3. Mediante la agrupación de las muestras en función de su contenido de proteínas (%), extracto etéreo (%), sacarosa (%), PLS (mg GAE/100g), PT (mg GAE/100g) y CA (%), se formaron cuatro conglomerados, de los cuales el centroide formado por las muestras: SA00316AMR/LBP-1702-0019, ZT0416CALG/LBP-1703-0032 y ZT0316ALG/LBP-1703-0033, SAB0516ERO/LBP-1703-0034 y ASO1016LDO/LBP-1702-0027, MU0416JSM/LBP-1703-0042 posee el mayor contenido de proteínas y los niveles más próximos al mayor valor reportado para extracto etéreo, sacarosa y capacidad antioxidante. El grupo formado por SC0116VRG/LBP-1703-0029, SA00416JAMR/LBP-1702-0018, OC0216SP/LBP-1702-0022, MU0216MCM/LBP-1703-0039 y MU0416MCM/LBP-1703-0046 reportó contenidos considerables de proteínas y sacarosa, además poseer la mayor capacidad antioxidante. Los otros dos grupos restantes estuvieron conformados por muestras que presentaron valores atípicos.

En general las muestras analizadas se encuentran muy próximas a los valores de referencia establecidos para parámetros nutricionales de interés internacional como proteína y extracto etéreo, y lograron agruparse en función de estos parámetros de interés, siendo los más cercanos las muestras provenientes de los árboles promisorios agrupados en los conglomerados 1 y 4, cumpliendo de esta manera lo establecido en la hipótesis nula de esta investigación.

5.2. Recomendaciones

Al INTA a continuar con la caracterización del material promisorio existente en el país a fin de fortalecer el conocimiento del rubro y avanzar en la conservación y mejoramiento del cacao nacional, ampliamente reconocido a nivel internacional.

A los productores a conservar el material caracterizado a fin de permitir su utilización en los centros de conservación existentes en el país.

5.3. Referencias bibliográficas

- Afoakwa E. O., Paterson A., Fowler M., Ryan A. (2008). Flavour formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48(9): 840-857.
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2013). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of food science and technology*, 50(6), 1097–1105. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0446-5>
- Agus, B.A.P., Mohamad, N.N. & Hussain, N. (2018). Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malaysia. *Journal of Food Measurement and Characterization*. *Food Measure* 12, 2590 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9923-0>
- American Association of Cereal Chemists (AACC). (2001). Report of the Dietary Fiber Definition Committee. Publication no. W-2001-0222-01O. 112 / MARCH 2001, VOL. 46, NO. 3. Recuperado de <https://www.cerealsgrains.org/initiatives/definitions/Documents/DietaryFiber/DFDef.pdf>
- Andrade, A., Rivera, G., Chire, F. y Ureña, P. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). Ecuador- Perú. *Enfoque UTE*, V.10-N.4, dic.2019, pp. 1-12.
- Aprotosoiaie A. C., Luca S. V. & Miron A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products — An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety*, 15: 73–91. DOI:10.1111/1541-4337.12180.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), (2000). *Official Methods of Analysis*. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Ayestas, E., Orozco, L., Astorga, C., Munguía, R. & Vega, C. (2013). Caracterización de árboles promisorios de cacao en fincas orgánicas de Waslala, Nicaragua. *Agroforestería en las Américas* N° 49, 18-25.
- Banco central de Nicaragua (BCN). (2020). Sinopsis de productos de exportación (Cacao). *Revista de comercio exterior* p.1-4. Recuperado de <https://www.bcn.gob.ni/publicaciones/periodicidad/historico/sinopsis/2.pdf>

- Bembibre., C. (2011). Proteína. Importancia una guía de ayuda. Recuperado de <https://www.importancia.org/proteina.php>
- Bhattacharjee, R. (2018). Taxonomy and classification of cacao. En P. Umaharan, (ed.), *Achieving sustainable cultivation of cocoa*, Burleigh Dodds Science Publishing (pp. 1-16). Cambridge, Reino Unido. ISBN: 978 1 78676 168 2.
- Biehl B. & Ziegler G. (2003a). Cocoa: chemistry of processing. In: Caballero B, Trugo L, Finglas PM, editors. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd ed. New York: Academic Press. p 1436–48.
- Cadena, C., y Herrera, A., (2008). Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. (Trabajo de grado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Castro, M., Hernández, J., Marcilla, S., Córdova, J., Solari, F. y Chire, G. (2016). Efecto del contenido de grasa en la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de *Theobroma cacao* L. "cacao". *Ciencia e Investigación* 2016; 19(1), 19- 23. Recuperado de <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/13623/12027>
- Centre for the Promotion of Imports from developing countries (CBI). (2010). *Cacao en Nicaragua*. Recuperado de http://www.cei.org.ni/images/export_value_cacao_nicaragua.pdf.
- Chia, W.J.A. (2009). Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M.I. y Weigend, M. (2011). Hoja botánica Cacao. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/321796507_Hoja_botanica_Cacao_-_Theobroma_cacao_L
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

- García, G.W.A. (2019). "CARACTERIZACIÓN DIFERENCIAL DENDROLÓGICA DEL CACAO CRIOLLO – *Theobroma cacao* L. DE JAÉN Y SAN IGNACIO – REGIÓN CAJAMARCA" (Tesis de grado). Universidad Nacional de Jaén, Perú.
- Gonzales, A., Gutierrez, S., Bustos, N. y Hernandez J., (2016). Análisis químico, análisis químico proximal. Universidad de Pamplona. Recuperado de <https://www.studocu.com/co/document/universidad-de-pamplona/quimica-analitica/informe/analisis-quimico-proximal/4409335/view>
- González, T.L., Téllez, V.A., Sampedro, J.G., y Nájera, H. (2007). Las proteínas en la nutrición. *Respin*, Vol. 8 No. 2.
- Hernández, R.A.W. y Trejo, M.F de M. (2014). Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. I MedPlub Journals, Vol. 10 No. 1:1, doi: 10.3823/1209.
- Hernández, S.R., Fernández, C.C. y Baptista, L.M. (2014). Metodología de la Investigación. México: McGRAW-HILL / INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.
- Herrera, G.K.M. (2012). Caracterización molecular de 105 accesiones de Cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR (Trabajo de graduación). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.
- Ilesanmi, A.E. (2016). Proximate, Mineral and Antinutrient Compositions of Natural Cocoa Cake, Cocoa Liquor and Alkalized Cocoa Powders Sourced in Nigeria. Research Article DOI: 10.14302/issn.2328-0182.japst-15-855
- Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2012). Tabla de composición de alimentos de Centroamérica. Recuperado <http://www.incap.int/mesocaribe/foods/dmdocuments/TablaCALimentos.pdf>
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2016). Estado actual sobre la producción, el comercio y cultivo del cacao en América. 280 p.; 19 cm x 24 cm. ISBN 978-92-9248-719-5. Recuperado de <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/2793/1/BVE17048806e.pdf>

- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2017) Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas. San José, C.R.: IICA, 2017. 165 p.; 21,5 cm X 28 cm ISBN: 978-92-9248-732-4. Recuperado de <https://repositorio.iica.int/bitstream/11324/6181/1/BVE17089191e.pdf>
- Instituto Nacional de Información de Desarrollo (INIDE). (2016). Anuario Estadístico 2016. Recuperado de <https://www.inide.gob.ni/Anuarios/Anuario%20Estadistico%202016.pdf>
- Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2005). El cacao: riqueza potencial de la tierra nica a la espera de ser explotada comercialmente en los mercados internacionales. Recuperado de <https://cenida.una.edu.ni/relectronicos/REF01M547.pdf>
- Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2018). Catálogo de las Mejores Variedades de Cacao en Nicaragua. Recuperado de <https://t.co/EgHaYdeWAF?amp=1>
- International Cocoa Organization (ICCO). (2019). Fine or Flavour Cocoa. Recuperado de <https://www.icco.org/about-cocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>
- International Cocoa Organization (IICO). (2012). Physical and chemical information on cocoa beans, butter, mass and powder. Recuperado de: <https://www.icco.org/faq/61-physical-and-chemical-information-on-cocoa/106-physical-and-chemical-information-on-cocoa-beans-butter-mass-and-powder.html>
- Jolić S.M., Radojčić Redovniković I., Marković K., Šipušić D. I.& Delonga K. (2011). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa bean processing. *Int J Food Tech* 46:1793–800.
- Kassambara, A. (2017). Practical Guide To Cluster Analysis in R (Unsupervised Machine Learning). STHDA (Statistical Tools for High-throughput Data).
- Lares, A., Gutiérrez., Pérez. y Álvarez. (2012). Efecto del tostado sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas, composición proximal y perfil de ácidos grasos de la manteca de granos de cacao del estado Miranda, Venezuela. *UDO Agrícola* 12 (2), 439-446.

- Lecumberri, M.R., Ramos, S., Alía, M., Rúperez, P., Goya, L., Izquierdo, P.M. y Bravo, L. (2006). Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación. Madrid. Nutr. Hosp. vol.21 no.5.
- Lodoño, M., Gil, V., Aguilar, M., Rivera, P., & López, G., (2011). Caracterización molecular de clones de Theobroma cacao L. Colombia. Luna Azul, no. (32), 52-60.
- Lucio, N.Q. (2017). Estadística aplicada con SPSS 24. Lima, Perú. Empresa Editora Macro EIRL.
- Martínez, I., Periago, M. y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 50(1), 5-18. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000100001&lng=es&tlng=es
- Martínez, W.J. (2007). Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia (Tesis de grado). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
- McCouch, S. R. (2002). A Laboratory Manual. Rice Laboratory, Department of Plant Breeding, Cornell University, 240 Emerson Hall, Ithaca, NY 14853, USA.
- McLay, T. (4 de septiembre de 2017). Hight quality DNA extraction protocol from recalcitrant plant tissues. Obtenido de protocols.io.
- Motamayor, J., Risterucci, A., López, P., Ortiz, C., Moreno, A., & Lanaud, C., (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. Heredity, 89, 380-6.
- Negaresh, S., & Iván, M. (2013). El cacao y la salud humana: propiedades antioxidantes del cacao nicaragüense y productos alimenticios comercializados. Agroforestería en las Américas N° 49, 93-98.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Organización Mundial de la Salud (OMS). CODEX -STAN-141. (1983). Valores de referencia para cacao sin cáscara ni germen, cacao en pasta, torta de prensado de cacao y polvillo de cacao (finos de cacao) para uso en la

fabricación de productos de cacao y chocolate. Recuperado de <http://www.colpos.mx/bancodenormas/ninternacionales/CODEX-STAN-141-1983.pdf>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2002). Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29. Recuperado de <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s00.htm>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Organización Mundial de la Salud (OMS). (1997). Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos, Estudio FAO Alimentación y Nutrición - 57). Recuperado de <http://www.fao.org/3/v4700s/v4700s00.htm>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2006). Datos de composición de alimentos, Obtención, Gestión y utilización. Roma: Elsevier Science Publishers. Recuperado de <http://www.fao.org/3/y4705s/y4705s00.htm>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Organización Mundial de la Salud (OMS). (2003). Garantía de la Inocuidad y Calidad de los Alimentos: Directrices para el Fortalecimiento de los Sistemas Nacionales de Control de los Alimentos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, 76. Recuperado de <http://www.fao.org/3/y8705s/y8705s00.htm>

Perea, V.J., Cadena, C.T., y Herrera, A.J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud, 41(2), 128-134.

ProNicaragua. (2016). Chocolate producido a base de cacao nicaragüense premiado como mejor chocolate orgánico del mundo. Recuperado de <http://pronicaragua.gob.ni/es/notas-de-prensa-2/2010-chocolate-producido-a-base-de-cacao-nicarag%C3%BCense-p/>

Quiñones, M., Miguel, M., Y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr Hosp. 27(1):76-89.

- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Recuperado de <https://www.R-project.org/>
- Ruíz, E.X.A. (2014). Diversidad genética de cacao *Theobroma cacao* L., con marcadores moleculares microsátélites (Trabajo de postgrado). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- Saunders, J.A., Mischke, S. & Leamy, E.A. (2004). Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *Theor Appl Genet* (110), 41–47.
- Tolares, S., Marcucci, P., y Harrond, L. (2005). Identificación genética de clones en *Eucalyptus grandis* utilizando Microsátélites. Instituto de Recursos Biológicos CNIA, INTA Castelar. P. imprenta: Vol.5, no. (8), p.197-200.
- Trópicos (2009). Taxonomía del *Theobroma cacao* L. recuperado de egacy.tropicos.org/Name/30400642
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). (2008). Laboratorio de alimentos I, Departamento de alimentos y biotecnología, Facultad de química Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf
- Velasco, M.R. (2004). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial (BSAA)*. Vol. 3,14-18.
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview, *Curr Pharm Des*. Vol. 10.n. ° 14, 1677-9.
- Williams, C.A., Grayer, R.J., (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* (21), 539-573.

Anexos

Anexo 1. Aporte nutricional de la semilla de cacao seca.

Tabla 4. Composición nutricional de semilla de cacao seca en 100 g de porción comestible.

Parámetros	Valores recomendados
Agua	3,60 %
Energía	456 kcal
Proteína	12,00 g
Grasa total	46,30 g
Carbohidratos	34,70 g
Cenizas	3,40 %
Calcio	106,0 mg
Fósforo	537,0 mg
Hierro	3,60 mg
Tiamina	0,17 mg
Riboflavina	0,14 mg
Niacina	1,70mg
Vitamina C	3,0 mg
Ácidos grasos mono- in saturados	19,00 g
Ácidos grasos poli- in saturados	1,0 g
Ácidos grasos saturados	27,0 g
Potasio	830,0 mg
Sodio	4,0 mg
Fracción comestible %	0,90 %

Fuente: INCAP (2012).

Anexo 2. Sitios de colecta de muestra.

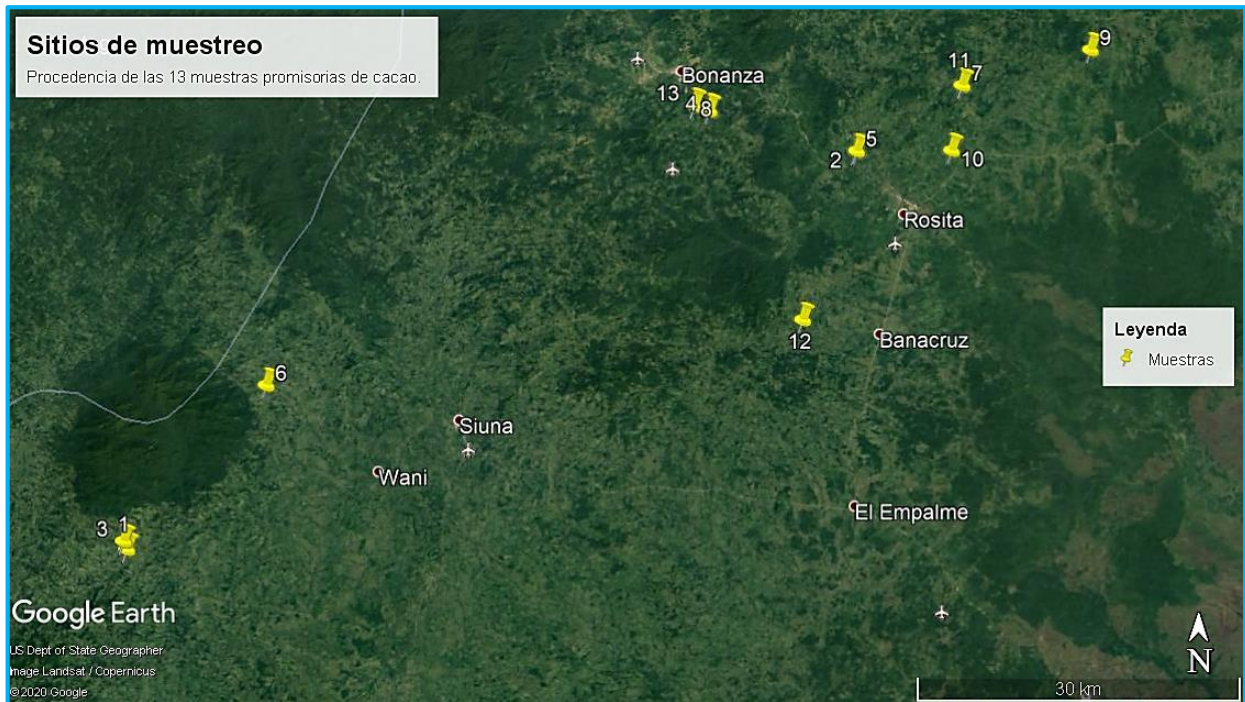


Figura 13. Ubicación geográfica de los 13 árboles promisorios utilizados en el estudio (enumerados del 1-13). Fuente: Google maps [Recuperado: 22 de junio, 2020].

Anexo 3. Codificación de muestras.

Tabla 5. Códigos de campo, coordenadas de muestreo y códigos de laboratorio asignados a las muestras.

Nº	Código de campo	Código de laboratorio	Localidad	Coordenadas	Matriz
1	OC0216SP	LBP-1702-0022	Siuna	709271 E; 1506528 N	Tejido foliar/ mazorca
2	ZT0316CALG	LBP-1703-0033	Rosita	775965 E; 1544089 N	Tejido foliar/ mazorca
3	OC0216DRCS	LBP-1702-0020	Siuna	708970 E; 1507271 N	Tejido foliar/ mazorca
4	MU0416MCM	LBP-1702-0046	Bonanza	760851 E; 1548044 N	Tejido foliar/ mazorca
5	ZT0416CALG	LBP-1703-0032	Rosita	775963 E; 1544125 N	Tejido foliar/ mazorca
6	ASO1016LDO	LBP-1702-0027	Siuna	721731 E; 1521708 N	Tejido foliar/ mazorca
7	SAO0316JAMR	LBP-1702-0019	Rosita	785650 E; 1550315 N	Tejido foliar/ mazorca
8	MU0416JSM	LBP-1702-0042	Bonanza	762222 E; 1547553 N	Tejido foliar/ mazorca
9	CA0216EGL	LBP-1702-0024	Rosita	797554 E; 1553845 N	Tejido foliar/ mazorca
10	SC0116VRG	LBP-1703-0029	Rosita	784773 E; 1544343 N	Tejido foliar/ mazorca
11	SAO0416JAMR	LBP-1702-0018	Rosita	785621 E; 1550324 N	Tejido foliar/ mazorca
12	SAB 0516 ERO	LBP-1703-0034	Siuna	771190 E; 1528522 N	Tejido foliar/ mazorca
13	MU 0216 MCM	LBP-1703-0039	Bonanza	760852 E; 1548023 N	Tejido foliar/ mazorca

Fuente: Propia.

Anexo 4. Esquema de las etapas del estudio.

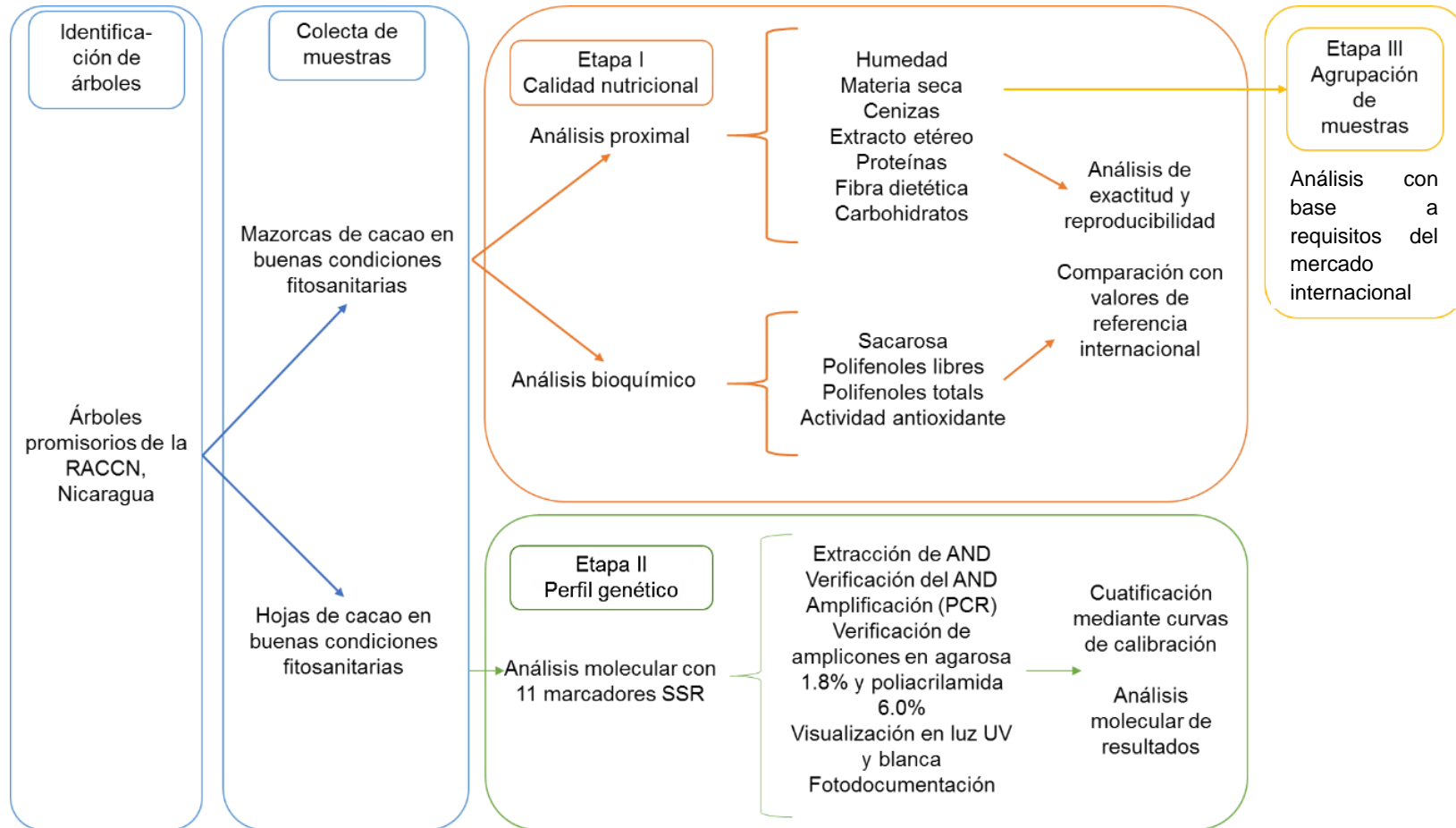


Figura 14. Resumen de las etapas del estudio para analizar a nivel proximal, bioquímico y molecular de los 13 árboles identificados como promisorios por el INTA. Fuente: Propia.

Anexo 5. Metodologías utilizadas en el análisis proximal y bioquímico de las muestras de cacao en baba.

Tabla 6. Métodos utilizados para el análisis de los parámetros de interés, los principales equipos asociados y período de realización de los análisis.

Parámetro	Método	Equipos de laboratorio	Período de ejecución
Purificación de ADN	McLay, 2017	Centrífuga refrigerada	Junio 2019
Verificación del ADN	Electroforesis horizontal	Cámara de electroforesis horizontal	Junio 2019
Amplificación de ADN	Saunders <i>et al.</i> 2004	Termociclador	Agosto a noviembre 2019
Verificación de amplicones	Saunders <i>et al.</i> 2004	Cámara de electroforesis vertical	Diciembre 2019 a enero 2020
Humedad	AOAC 931.04	Horno a 130 °C	Febrero 2020
Materia seca	AOAC 925.1	Horno a 130 °C	Febrero 2020
Cenizas	AOAC 972.12	Mufla a 600 °C	Febrero 2020
Extracto etéreo	AOAC 963.15	Soxhlet	Febrero 2020
Fibra dietaria	Enzimático	Bomba de vacío, baño maría (90 °C) y horno (130 °C)	Febrero 2020
Extracto libre de nitrógeno	AOAC 986.25	-	Febrero 2020
Proteínas	AOAC 2001.11	Digestor y destilador Kjeldahl	Marzo 2020
Sacarosa	Enzimático por espectrofotometría UV-Visible	Espectrofotómetro	Marzo 2020
Polifenoles totales y solubles	Método Folin-Ciocalteu	Espectrofotómetro	Marzo 2020
Actividad antioxidante	AOAC 2012.04	Espectrofotómetro	Marzo 2020

Fuente: Propia.

Anexo 6. Marcadores moleculares básicos para cacao.

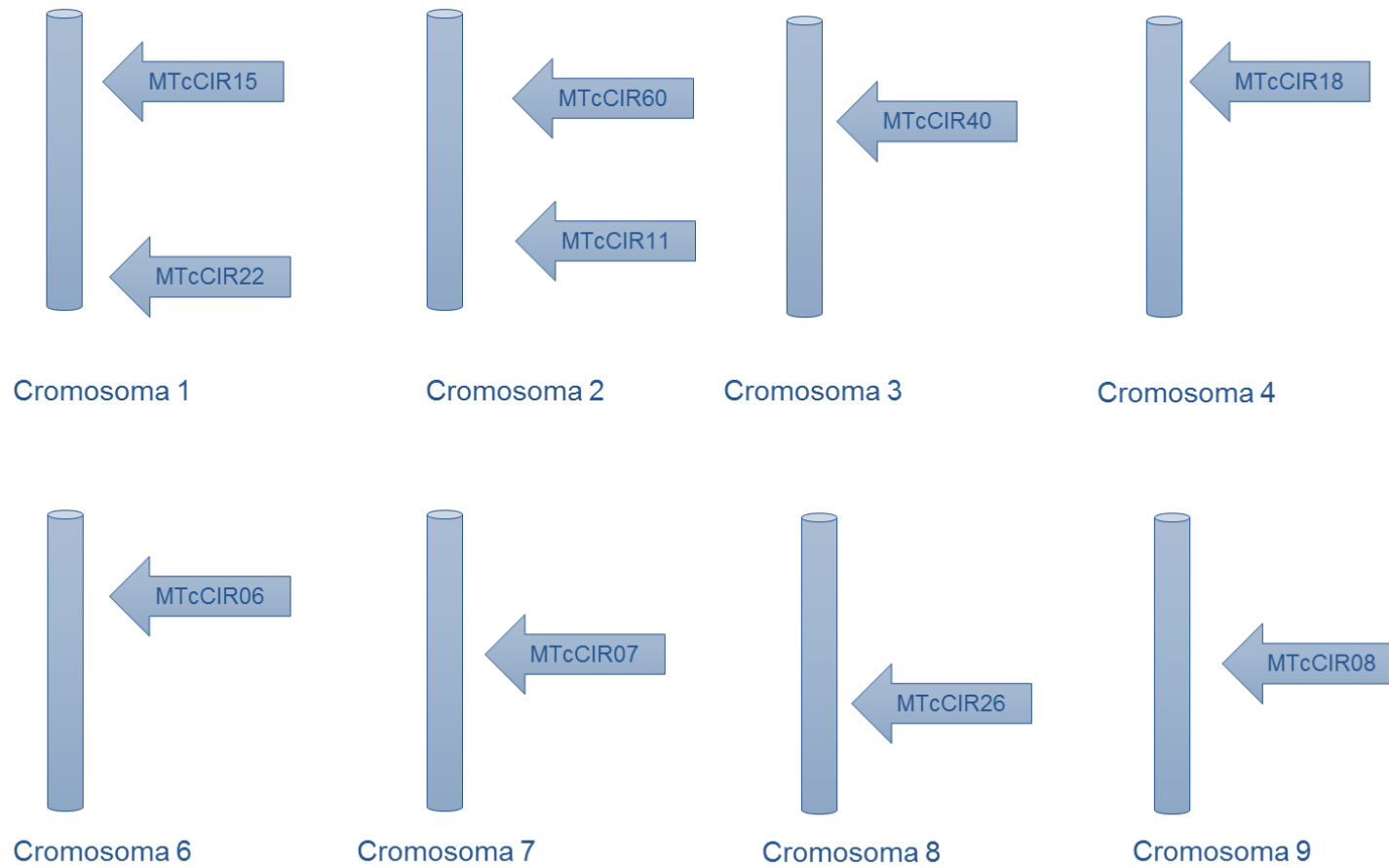


Figura 15. Marcadores moleculares utilizados internacionalmente (Saunders *et al.*, 2004) ubicados en los cromosomas del genoma del cacao. Mejorado por Fajardo, 2020.

Anexo 7. Procedimiento para la determinación de humedad y materia seca.

1. Pesar 2 gramos de la muestra de cacao en los crisoles previamente secados y sometidos a peso constante.
2. Secar en un horno de convección durante 5 horas a $130 \pm 3^\circ\text{C}$.
3. Calcular el contenido de humedad con base al peso perdido durante el secado según la siguiente ecuación:

$$\% \text{Humedad} = \left(\frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \right) \times 100$$

$$\% \text{Sólidos totales} = \left(\frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \right) \times 100$$

Dónde: P_1 = peso de crisol

P_2 = peso de crisol + muestra humedad

P_3 = peso de crisol + muestra seca

Anexo 8. Procedimiento para determinación de cenizas.

1. Incinerar 2g de muestra en crisoles previamente llevados a peso constante en la mufla a 600°C por 5 horas hasta que la muestra presente un color gris.
2. Dejar enfriar la mufla y sacar los crisoles e introducir a un desecador para enfriar a temperatura ambiente, registrar peso.
3. Enjuagar las paredes del crisol con etanol y colocar en la mufla a 600°C una hora adicional.
4. Dejar enfriar la mufla y sacar los crisoles e introducir a un desecador para enfriar a temperatura ambiente, registrar peso.
5. Calcular el porcentaje de cenizas totales por diferencia de peso. Mediante la ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = \left(\frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \right) \times 100$$

Dónde: P_1 = peso de crisol

P_2 = peso de crisol + muestra humedad

P_3 = peso de crisol + muestra incinerada

Anexo 9. Procedimiento para determinación de extracto etéreo.

1. Pesar 10 g de muestra, dentro del dedal de celulosa.
2. Colocar el balón (luego de someter a peso constante) sobre la manta calefactora y añadir 120 ml de éter de petróleo, proceder a colocar el dedal de celulosa con los 10 g de muestra dentro de la cámara de reflujo.
3. Mantener el reflujo a 8 horas continuas. Durante este tiempo los lípidos se irán acumulando en el balón. Retirar el condensador, extraer el dedal y retirar de la manta el balón contenido éter recuperado.
4. Cuantificar el contenido de grasa con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Grasa} = \left(\frac{m_2 - m_1}{M} \right) \times 100$$

Dónde: m_1 = masa en gramo del balón vacío.

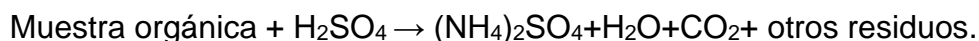
m_2 = masa en gramo del balón con grasa después de secado.

M = masa de la muestra en gramos.

Anexo 10. Procedimiento para determinación de proteínas por el método Kjeldahl.

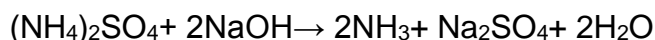
Digestión

1. Pesar 0.5 g de granos de cacao previamente macerados.
2. Colocar la muestra dentro del tubo de Kjeldahl.
3. Agregar una tableta Kjeldahl (3.5g K_2SO_4 + 0.1g $CuSeO_3$).
4. Añadir 15 ml de ácido sulfúrico ($d = 1.8 \text{ g/ml}$; $PE = 330^\circ C$) y 4 perlas de vidrio.
5. Colar los tubos de Kjeldahl dentro del bloque calefactor (Labconco: Rapid Digester-4) y conectar la trampa de absorción de gases sobre el balón (opcional).
6. Encender el bloque calefactor a $420^\circ C$ por 60 minutos procurando que la temperatura no suba más del rango establecido debido a la evaporación del nitrógeno.
7. Al final del proceso esperar que la muestra se enfríe a temperatura ambiente.
8. Una vez fría la muestra agregar 30 ml de agua ddH₂O y agitar.



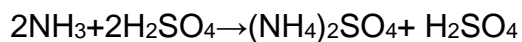
Destilación

1. Añadir en 25 ml de ácido bórico a un beaker.
2. Agregar 4 gotas de rojo de metilo (1%) al beaker.
3. Colocar el beaker debajo del extremo del refrigerante o tubo recolector del destilador (Labconco: Rapid Still I), asegurándose que el tubo este sumergido en el beaker.
4. Encender el equipo de destilación y regular la temperatura, esperar el punto de ebullición del agua contenida en el balón con la resistencia.
5. Añadir la muestra digerida en el embudo, abrir la llave de pase y dejar salir la muestra.
6. Añadir poco a poco 50 ml de NaOH al 50% al embudo, abrir lentamente la llave de pase dejando una pequeña capa de solución en el embudo. La muestra debe adquirir color café, si sucediera lo contrario es debido a la falta de NaOH.
7. Esperar 8 minutos hasta concluir el proceso de destilación.
8. Retirar el beaker recolector y proceder a la titulación.

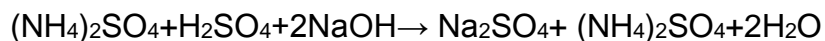


Titulación

La muestra destilada se titula con ácido clorhídrico 0.1N hasta el punto de neutralización.



(contenido del beaker después de titular: sin cambio de coloración).



(Contenido del beaker después de titular).

Ecuación para cálculo:

$$\% \text{ Nitrógeno: } [(ml \text{ HCl} \times N) - (ml \text{ NaOH} \times N)] / m \times 1.4007$$

Dónde: N: normalidad de las soluciones ácidas o básica según sea el caso.

ml HCl: volumen de H_2SO_4 (ml) empleado en la solución receptora.

ml NaOH: volumen de NaOH (ml) empleado en la titulación.

m: peso de la muestra en gramos.

% Proteína = % Nitrógeno x F.

F: factor de conversión (para cacao es 6.25).

Anexo 11. Procedimiento para determinación fibra dietaria.

1. Adicionar a los blancos 50 ml de buffer fosfato y ajustar el pH a 6.0 ± 0.1 .
2. Adicionar 50 ml de la enzima α -amilasa.
3. Colocar muestras en el baño maría a 100°C por 15 minutos, agitar cada 5 minutos.
4. Dejar reposar por 30 minutos para bajar la temperatura de las muestras.
5. Ajustar el pH a 7.5 ± 0.1 con NaOH.
6. Adicionar 100ml de la enzima α -proteasa.
7. Colocar las muestras en el baño maría a 60°C con agitación por 30 minutos.
8. Dejar reposar as muestras por 30 minutos (a temperatura ambiente).
9. Ajustar pH (4.5 ± 0.2) con HCl.
10. Adicionar 200 μl de amiloglucosidase.
11. Someter a incubación en baño maría a 60°C con agitación continua.
12. Adicionar 280 ml de etanol al 95% precalentado a 60°C (dejar reposar por 1 hora).
13. Filtrar las muestras en el crisol que contiene celite, de la siguiente manera:
 - ✓ Formar una estructura plana de celite, para ello se debe adicionar etanol al 70%.
 - ✓ Filtrar la muestra y los blancos poco a poco adicionar 6 porciones de 10 ml de etanol al 70% y dos porciones de 10 ml de etanol al 95% y por último 2 porciones de 10ml de acetona.
14. Colocar las muestras en el horno de convección por 16 horas a 105°C .
15. Apagar el horno y esperar que baje la temperatura a 60°C , sacar las muestras y dejar por 2 horas en el desecador para estabilizar la temperatura.
16. Pesar las muestras y colocar en la mufla a 550°C por 5 horas.
17. Colocar en el desecador y esperar que las muestras se ambienten.
18. Registrar peso de crisoles.

Anexo 12. Procedimiento para determinación de polifenoles libres y totales.

Preparación de la curva de calibración

1. Preparar una solución stock de 100 µg/ml ácido gálico y realizar diluciones de 0 a 100 µg/ml en metanol.
2. Realizar la reacción colorimétrica tomando 100 µl de cada disolución.
3. Adicionar 200 µl del reactivo reaccionante.
4. Agregar 1.7 ml de carbonato de sodio e incubar a 42 °C.
5. Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos, protegerlas de la luz.
6. Tomar la muestra y transferirlas a las cubetas de medición, leer la concentración a una absorbancia de 765 nm.

Extracción de polifenoles libres y solubles

1. Pesar 10 mg (0.01000 g) de muestra de cacao.
2. Agregar 1.3 ml de metanol al 50 %.
3. Incubar la muestra en el baño maría a 65°C.
4. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 700 rpm a 20°C.
6. Extraer el sobrenadante y transferir a un nuevo tubo eppendorf.

Extracción de polifenoles totales

1. Pesar 10 mg (0.01000 g) de muestra.
2. Agregar 1.3 ml de 1.2 M HCl.
3. Incubar la muestra en el baño maría a 42 °C.
4. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 700 rpm a 20 °C.
6. Extraer 500 µl de sobrenadante cuidadosamente y transferirlo a un nuevo tubo.
7. Añadir 800 µl al 50 % de metanol.

Reacción colorimétrica

1. Para realizar la reacción colorimétrica es necesario diluir la muestra 2 veces para los extractos de polifenoles totales y 5 veces para la polifenoles libres y solubles.

Anexo 13. Procedimiento para determinación de antioxidantes en pasta de cacao.

Preparación de la curva de calibración

1. A partir de la solución stock de 100 µg/ml ácido gálico realizar diluciones de 0 a 100 µg/ml en 50 % de metanol.

Medición de muestras

1. Tomar 100 µl de extracto de polifenoles y transferirlo a un tubo de 15ml.
2. Adicionar 900 µl de Tris-HCl.
3. Adicionar 1.8 ml de DPPH.
4. Dejar reposar a temperatura ambiente.
5. Tomar la muestra y transferirlas ala cubetas de medición, leer la concentración a una absorbancia de 517 nm.
6. Incluir controles de calidad para asegurar la calidad de los resultados.

Anexo 14. Procedimiento para extracción de ADN en muestras de cacao.

1. Cortar el limbo o tejido foliar de las hojas jóvenes y descartar la nervadura central y secundaria.
2. Macerar con nitrógeno líquido.
3. Pesar 0.05 gramos de la muestra y colocar en un tubo de 1.5 ml.
4. Adicionar 1000 µl de buffer STE a cada muestra (mezclar vigorosamente en el vórtex).
5. Centrifugar a 500 rpm (8°C).
6. Descartar sobrenadante con cuidado de no remover las fases.
7. Adicionar 500 µl de solución CTAB, 2 µl de BME10%, 4 µl de proteínasa k y 100 µl de NaCl:BSA.
8. Agitar en el vórtex por 1 minuto.
9. Incubar por 2 horas en el baño maría a 65°C.

10. Adicionar 450 µl de cloroformo a cada muestra.
11. Agitar la muestra en el vórtex.
12. Desgasificar las muestras.
13. Centrifugar las muestras por 5 minutos a 14,000 rpm (8°C).
14. Trasegar la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml.
15. Adicionar 450 µl de cloroformo a cada tubo con la fase acuosa removida.
16. Agitar vigorosamente cada muestra en vórtex.
17. Desgasificar las muestras.
18. Centrifugar las muestras por 5 minutos a 14,000 rpm (8°C).
19. Trasegar la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml.
20. Adicionar 450 µl de cloroformo a cada tubo con la fase acuosa removida.
21. Agitar vigorosamente cada muestra en vórtex.
22. Desgasificar las muestras.
23. Centrifugar las muestras por 5 minutos a 14,000 rpm (8°C).
24. Trasegar la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml.
25. Adicionar 500 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
26. Centrifugar a 14,000 rpm. (8°C).
27. Incubar a -20 °C por 16 - 18 horas.
28. Descartar el sobrenadante hasta dejar solo el pellet.
29. Adicionar 500 µl de etanol al 70% (4°C).
30. Centrifugar las muestras por 5 minutos a 14,000 rpm (8°C).
31. Descartar el sobrenadante.
32. Adicionar 50 µl de Tris- HCl (pH8) y resuspender.
33. Adicionar 36,6 µl de acetato de sodio y 200 µl de etanol a cada tubo.
34. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos.
35. Descartar el sobrenadante.
36. Adicionar 1000 µl de etanol.
37. Centrifugar las muestras por 5 minutos a 14,000 rpm (8°C).
38. Descartar el sobrenadante.
39. Adicionar 50 µl de TE e hidratar.

Anexo 15. Procedimiento para electroforesis en gel de agarosa (0.8% y 1.8%).

Las muestras de ADN son verificadas en agarosa al 0.8%. Asimismo, una vez finalizado el proceso de amplificación de las muestras para corroborar si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones serán visualizados a través de electroforesis en geles de agarosa al 1.8% y posteriormente se verifican en poliacrilamida al 6%. Las muestras de ADN se cargarán en pozos (ranuras) en un extremo del gel (electrodo negativo) y se aplica una corriente eléctrica para arrastrarlas hacia el electrodo positivo.

Agarosa Low-EEO al 0.8 y 1.8%

1. Pesar la cantidad de agarosa requerida para la cámara a utilizar (en un Erlenmeyer).
2. Agregar los ml de TBE requeridos por la cámara en el Erlenmeyer.
3. Calentar hasta disolver la agarosa en el buffer.
4. Enfriar a 60°C.
5. Agregar con mucha precaución la cantidad de bromuro de etidio estimada.
6. Derramar el gel en la cámara previamente armada.
7. Colocar los peines para la formación de los pocillos.
8. Dejar solidificar.
9. Desprender los peines y rellenar la cámara interna y externa con buffer TBE
10. Homogenizar 4 µl muestra de ADN + 1 µl de buffer 6x y colocar en el pocillo.
11. Una vez cargadas las muestras de ADN, colocar el marcador de peso molecular 100pb.
12. Tapar la cámara de electroforesis y conectar a una fuente de poder, por 90 minutos a 80 Voltios.
13. Visualizar los fragmentos de ADN a través de un transiluminador UV, documentándose el resultado con una fotografía.

Poliacrilamida 6%

1. Preparación de los platos
 - 1.1. Lavar los platos (nuevos o usados) aproximadamente 1 hora con detergente NaOH.

1.2. Enjuagar con suficiente agua de grifo, seguido con agua destilada, remover el exceso de agua con una esponja.

1.3. Rociar ambos lados del plato con etanol, secar con papel toalla.

1.4. Humedecer papel toalla con acetona y limpiar la parte interna del vidrio corto. Enjuagar con etanol al 95% y dejar secar a temperatura ambiente (esto es para eliminar el remanente de gel en el vidrio).

1.5. Una vez los platos estén totalmente secos juntar las partes limpias donde se depositará el gel.

2. Preparación de gel de poliacrilamida al 6%.

2.1. En tubo falcon de 15 ml, adicionar 2.94 gr de urea, 3.09 ml de agua grado biología molecular, 0.7 ml de TBE 10x, y 1.05 ml de acrilamida.

2.2. Colocar muestra en baño maria a 55 °C.

2.3. Adicionar 125 µl de persulfato de amonio y 12.5 µl de TEMED.

2.4. Colocar el gel en los platos y poner el peine para formar los pocillos, esperar solidifique.

2.5. Desnaturalizar el ADN de las muestras a 90 °C, realizar choque de temperatura, pasando las muestras a ambiente frio de inmediato.

2.6. Adicionar TBE a la cámara de electroforesis interna y externa.

2.7. Cargar muestras en el gel con ayuda de micropipeta, colocar marcador molecular.

2.8. Correr el gel a 60 voltios por 180 minutos.

3. Tinción y revelado de las muestras.

3.1. Separar el gel del plato grande y colocar el gel en solución de fijación (Ácido acético).

3.2. Enjuagar con agua destilada.

3.3. Colocar gel en solución de tinción (nitrato de plata).

3.4. Revelar las muestras en solución de carbonato de sodio, formaldehido y tiosulfato de sodio.

3.5. Detener revelado en solución de fijación.

3.6. Enjuagar muestra y visualizar a través de un transiluminador de luz blanca.

3.7. Fotodocumentar resultados.

Anexo 16. Recepción y procesamiento de las muestras de mazorcas de cacao en laboratorio.

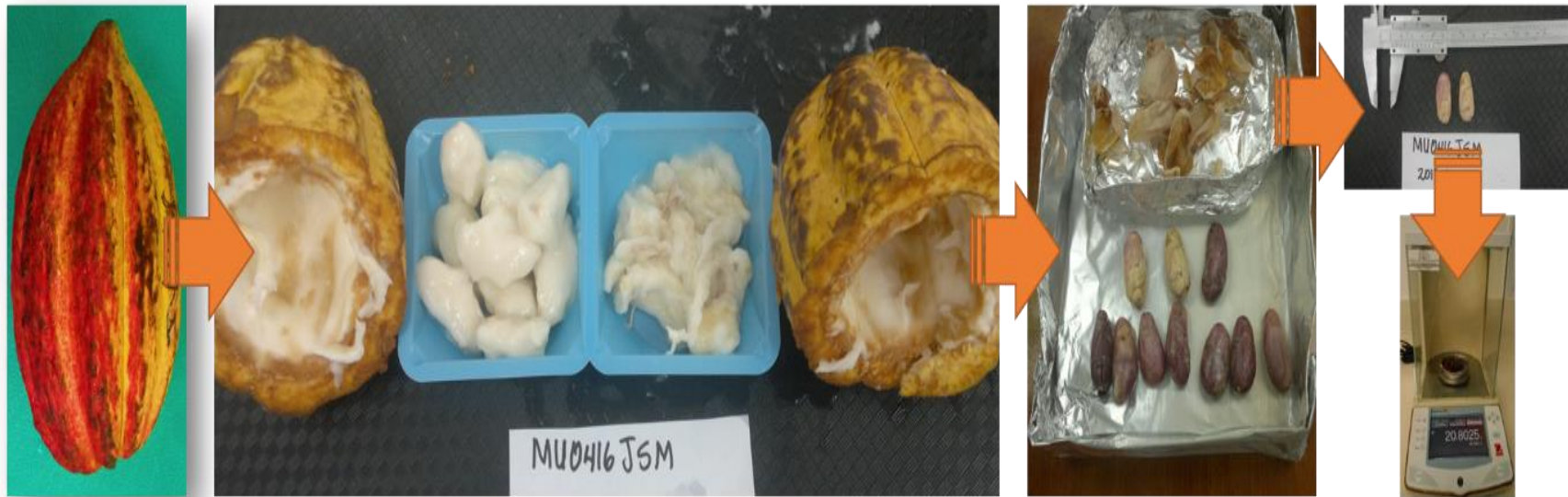


Figura 16. Esquema de procesamiento de las muestras de mazorcas de cacao utilizados para el análisis nutricional de cacao en baba. Fuente: Miranda, 2020.

Anexo 17. Recepción y procesamiento de las muestras de tejido foliar de los árboles promisorios de cacao en laboratorio.

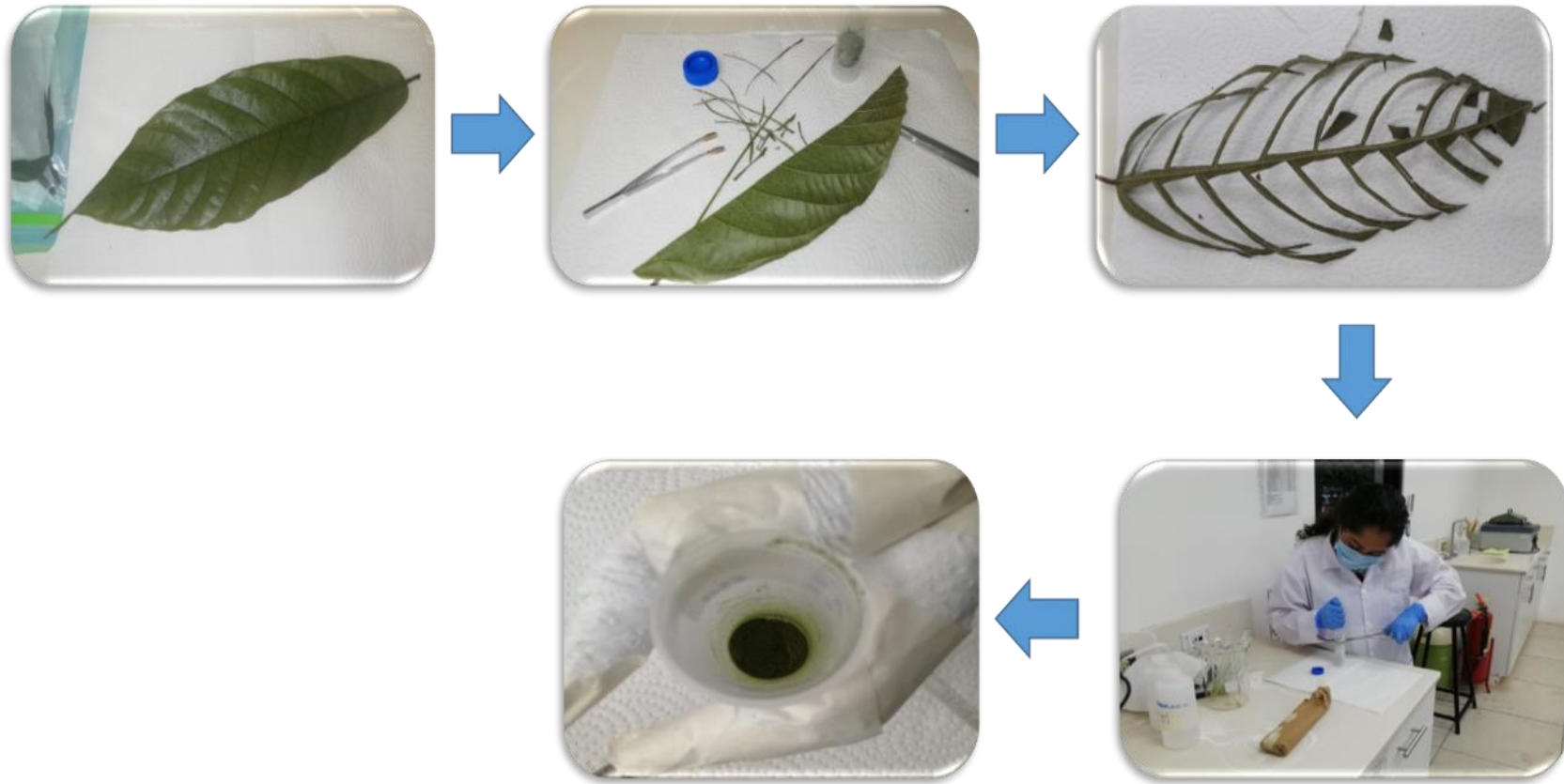




Figura 17. Esquema de procesamiento de las muestras de tejido foliar utilizados para el análisis molecular de cacao.

Fuente: Propia.

Anexo 18. Formato de colecta de muestras utilizado.

	FORMATO PARA LA COLECTA DE MUESTRA VEGETAL Y ALIMENTO	FCM-BIOTEC-002 Fecha: 2012-10-03 Revisión No 1 Página 1 de 2	
	LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA UNAN-MANAGUA		

Nombre del proyecto/cliente: _____ Identificación de la muestra: _____
 Lugar de muestreo (Nombre de la propiedad/entidad): _____
 Municipio: _____ Departamento: _____ País: _____
 Coordenadas: Norte _____ Este _____ Elevación (m): _____
 Fecha de muestreo: _____ Hora de muestreo: _____
 Nombre de la persona que suministra la información: _____

Seleccionar matriz y fuente de las que proviene la muestra

MATRIZ	FUENTES		
Origen vegetal <input type="checkbox"/>	Total <input type="checkbox"/>	Parcial <input type="checkbox"/>	Especificar: _____
Alimento <input type="checkbox"/>	Procesado <input type="checkbox"/>	No procesado <input type="checkbox"/>	Especificar: _____

Análisis/servicios solicitados

Llenar los siguientes datos según el tipo de matriz a muestrear:

Matriz Vegetal

Datos Generales

Nombre común: _____ Grupo genético ó Tipo/Genotipo ó clon/Varietal: _____
 Características de la planta donante: Altura: _____ Diámetro del tallo: _____ Número de ramas: _____
 Longitud de hoja (cm): _____ Área de la hoja (longitud*diámetro*0.75): _____ Presencia de daño foliar: _____
 Presencia de frutos: Si_ No_ Producción promedio anual: _____
 Forma del fruto: _____ Color del fruto: _____ Madurez del fruto: _____
 Presencia de cojines florales: _____ Presencia de patógenos (nombre común): _____
 Presencia de insectos: _____ Malezas: _____
 Nivel de competencia: 100% 75% 50% 25%
 (Número de plantas que rodaron al planta objetivo 100%, 4 cuatro plantas; 75% 3 plantas, 50% dos plantas, 25% 1 planta)

Elaborado por: Juan Ruiz Urbina Especialista en análisis	Revisado por: Samantha Miranda Calero Coordinadora de área	Aprobado por: Katia Montenegro Rayo Coordinadora Técnica	Autorizado por: Martha Lacayo Romero Directora
--	--	--	--

Figura 18. Formato de colecta para la recolección de muestra vegetal y alimento.

Fuente: Laboratorio de Biotecnología, 2012.

Anexo 19. Peso constante de crisoles y balones para análisis de humedad, materia seca y extracto etéreo.



Figura 19. Balones y crisoles utilizados en la determinación de humedad, materia seca y extracto etéreo en horno para obtener peso constante. Fuente: Propia.

Anexo 20. Muestras utilizadas en el análisis de humedad.



Figura 20. Crisoles en el desecador durante la determinación de humedad.

Fuente: Propia.

Anexo 21. Digestión de las muestras para determinación de proteínas.

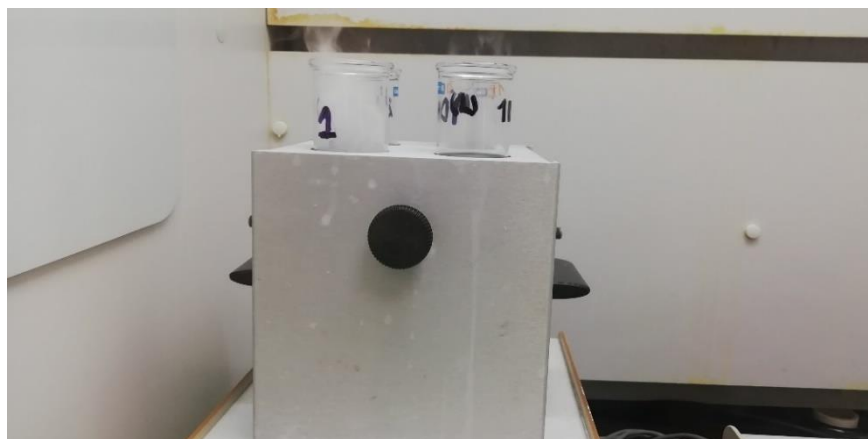


Figura 21. Muestras de cacao en digestión Kjeldahl para la determinación de proteínas. Fuente: Propia.

Anexo 22. Destilación de las muestras para determinación de proteínas.

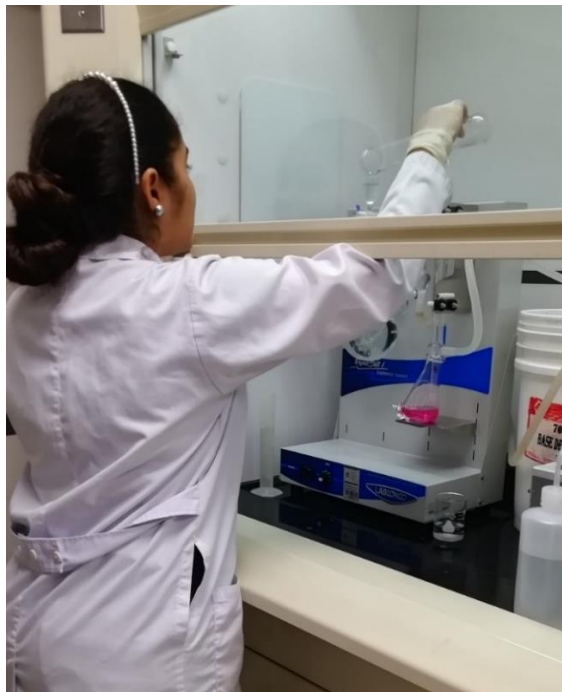


Figura 22. Muestras de cacao digeridas sometidas a destilación Kjeldahl para la determinación de proteínas. Fuente: Somarriba, 2020.

Anexo 23. Titulación de las muestras para determinación de proteínas.



Figura 23. Muestras de cacao destiladas tituladas con HCL para la determinación de proteínas. Fuente: Propia.

Anexo 24. Filtración de las muestras para determinación de fibra dietaria.



Figura 24. Muestras de cacao filtradas para la determinación de fibra dietética. Fuente: Propia.

Anexo 25. Incineración de las muestras filtradas para análisis de fibra dietaria.



Figura 25. Muestras de cacao filtradas sometidas a incineración para la determinación de fibra dietética. Fuente: Propia.

Anexo 26. Determinación de PLS y PT.

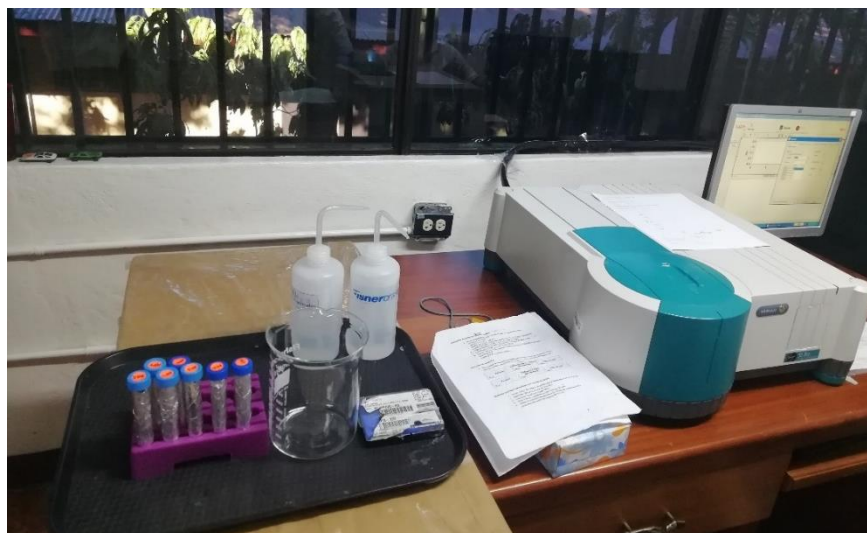


Figura 26. Espectrofotómetro y curva estándar utilizada en el análisis de PLS y PT. Fuente: Propia.

Anexo 27. Procesos de extracción, verificación y amplificación de ADN y verificación y visualización de amplicones.

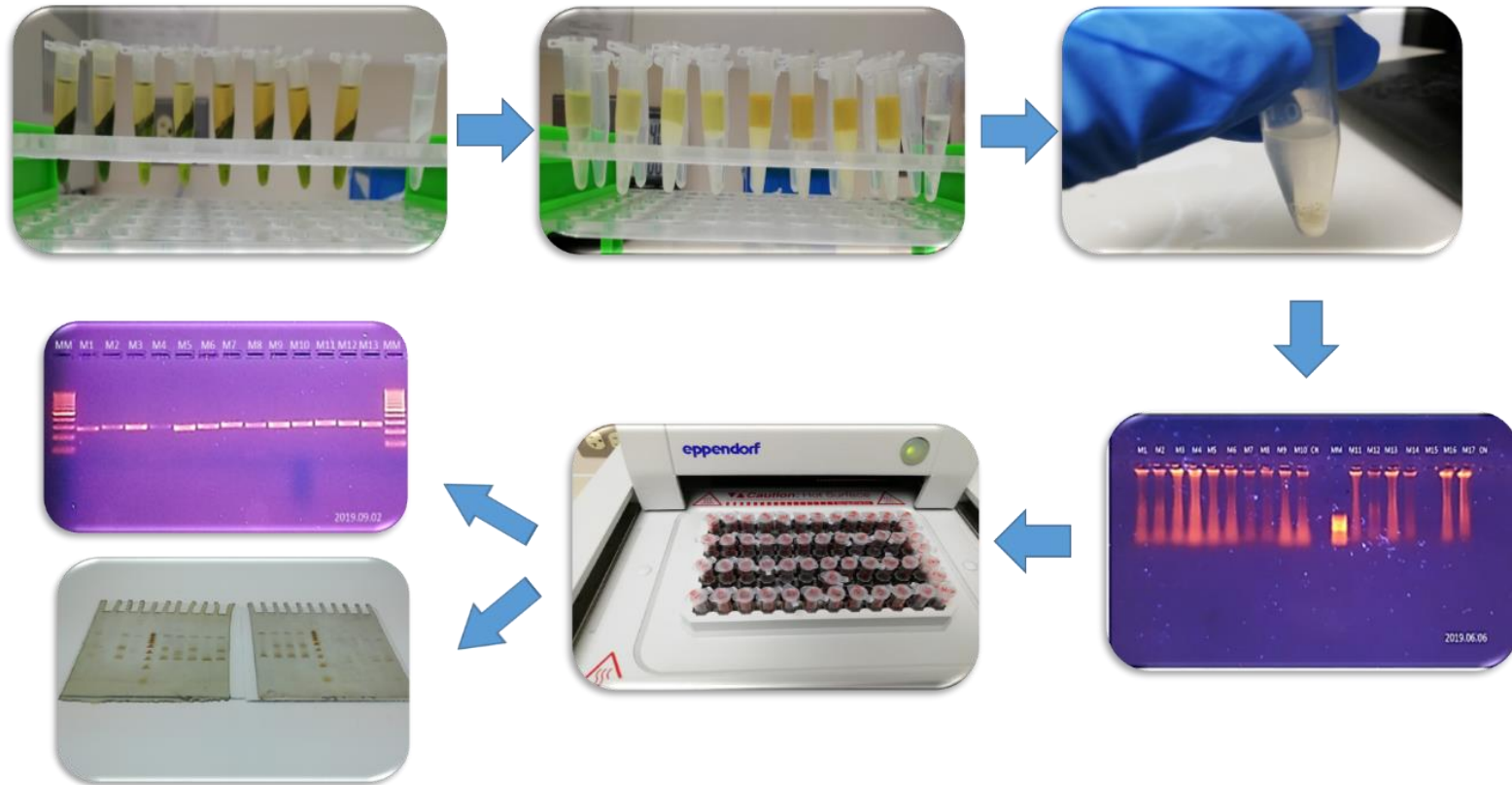


Figura 27. Extracción, verificación y amplificación de ADN proveniente del tejido foliar captado y verificación y visualización de amplicones obtenidos por PCR. Fuente: Propia.

Anexo 28. Electroforesis horizontal en gel de agarosa.



Figura 28. Montaje, colocación de muestras de ADN y amplicones en gel de agarosa y visualización en transiluminador UV. Fuente: Propia.

Anexo 29. Amplificación de las muestras de ADN.

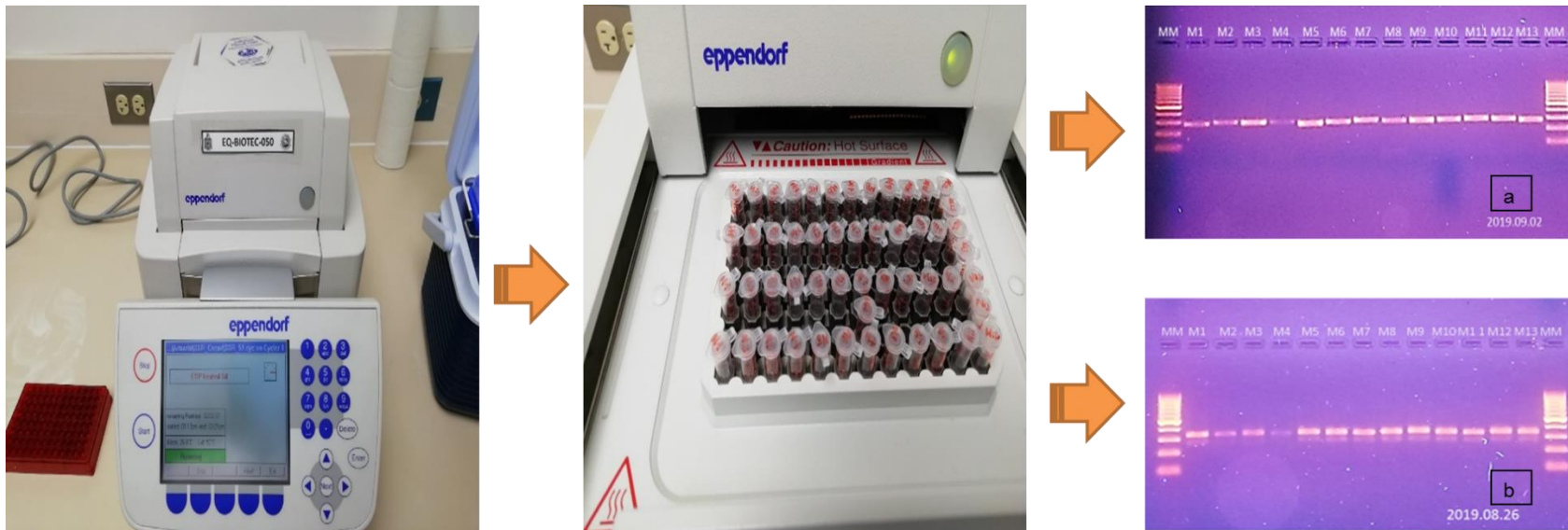


Figura 29. Amplicones obtenidos mediante PCR de las muestras de ADN de árboles promisorios de cacao utilizando marcadores moleculares y visualizados en gel de agarosa 1.8%: a) MTcCIR40 y b) MTcCIR18. Fuente: Propia.

Anexo 30. Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida.

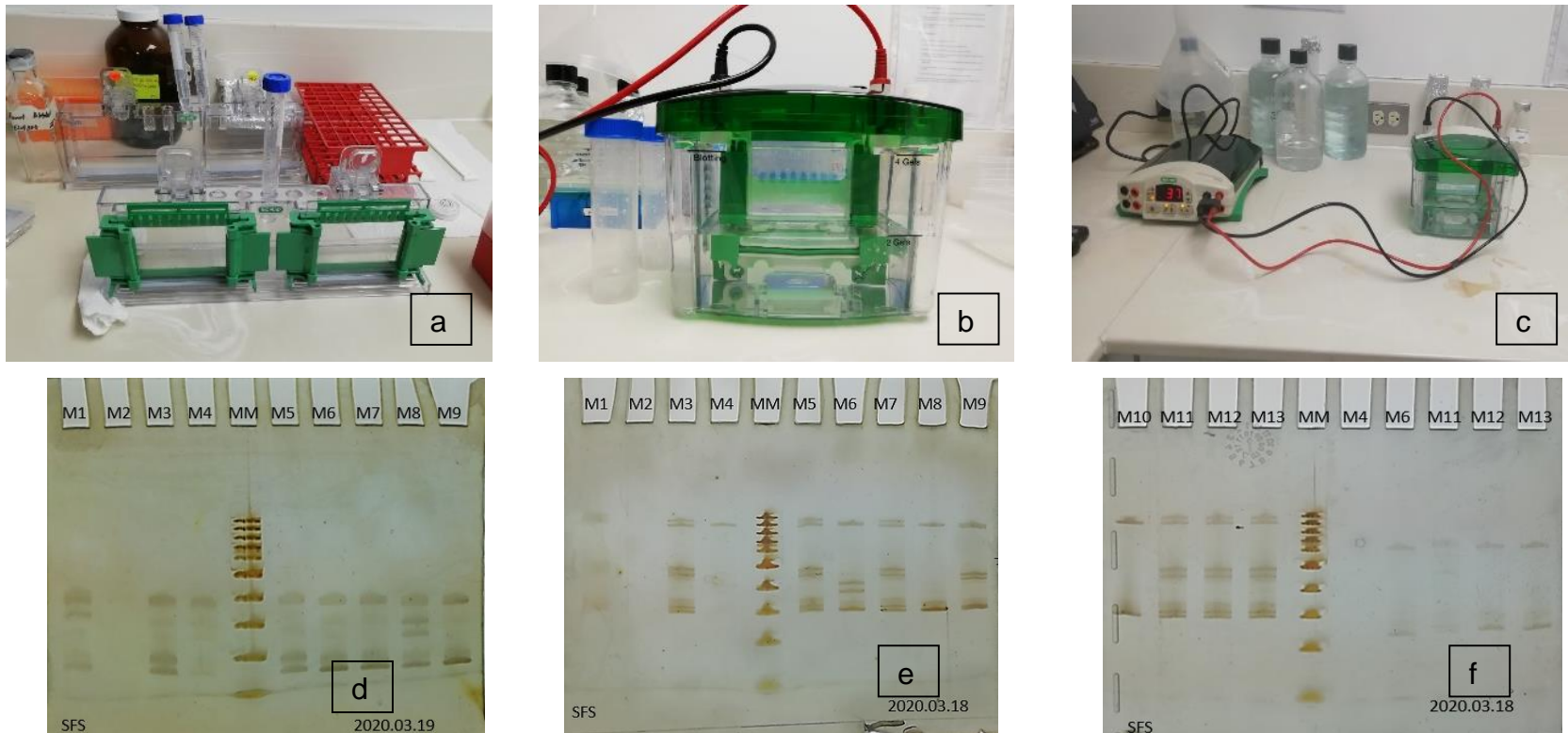


Figura 30. Amplicones obtenidos mediante PCR de las muestras de ADN de árboles promisorios de cacao utilizando marcadores moleculares en poliacrilamida: a) Preparación del gel, b) Montaje del gel, c) Corrida del gel, d) Amplicones del marcador MTcCIR07, e) Amplicones del marcador MTcCIR08 y f) Amplicones del marcador MTcCIR08 y MTcCIR06. Fuente: Propia.

Anexo 31. Lista de loci microsatélites SSR que se utilizaron en la caracterización molecular.

Tabla 7. Información sobre los marcadores moleculares utilizados en el análisis de los árboles promisorios de cacao.

Nombre del marcador	Primer Forward 5'	Primer Reverse 3'	T _a (°C)	Estructura Repetida	Alelo (bp)	Cromosoma
MTcCIR7	ATGCGAATGAC AACTGGT	GCTTTCAGTCC TTTGCTT	51	(GA) ₁₁	150-167	7
MTcCIR18	GATAGCTAAGG GGATTGAGGGA	GGTAATTCAAT CATTTGAGGAT	51	(GA) ₁₂	333-357	4
MTcCIR40	AATCCGACAGT CTTTAATC	CCTAGGCCAGA ATTGA	51	(AC) ₁₅	262-288	3
MTcCIR22	ATTCTCGCAAAA ACTTAG	GATGGAAGGAG TGTAATAG	46	(TC) ₁₂ N ₁₄₆ (CT) ₁₀	276-301	1
MTcCIR15	CAGCCGCCTCT TGTTAG	TATTTGGGATT CTTGATG	46	(TC) ₁₉	234-263	1
MTcCIR1	GCAGGGCAGGC TCAGTGAAGCA	TGGGCAACCAG AAAACGAT	51	(CT) ₁₄	128-146	8
MTcCIR60	CGCTACTAACA AACATCAAA	AGGCAACCATC ACTAATCA	51	(CT) ₇ (CA) ₂ 0	190-218	2
MTcCIR11	TTTGGTGATTAT TAGCAG	GATTTCGATTTG ATGTGAG	46	(TC) ₁₃	286-321	2
MTcCIR26	GCATTCATCAAT ACATTC	GCACTAAAGTT CATACTAC	46	(TC) ₉ C(CT) ₄ TT(CT) ₁₁	285-310	8
MTcCIR6	TTCCCTCTAAAC TACCCTAAAT	TAAAGCAAAGC AATCTAACATA	46	(TG) ₇ (GA) ₁	224-253	6
MTcCIR8	CTAGTTTCCCAT TTACCA	TCCTCAGCATT TTCTTTC	46	(TC) ₅ TT(T C) ₁₇ TTT(C T) ₄	290-307	9

Fuente: Saunders *et al.*, 2004.

Anexo 32. Curva de calibración para la cuantificación de amplicones en agarosa y poliacrilamida.

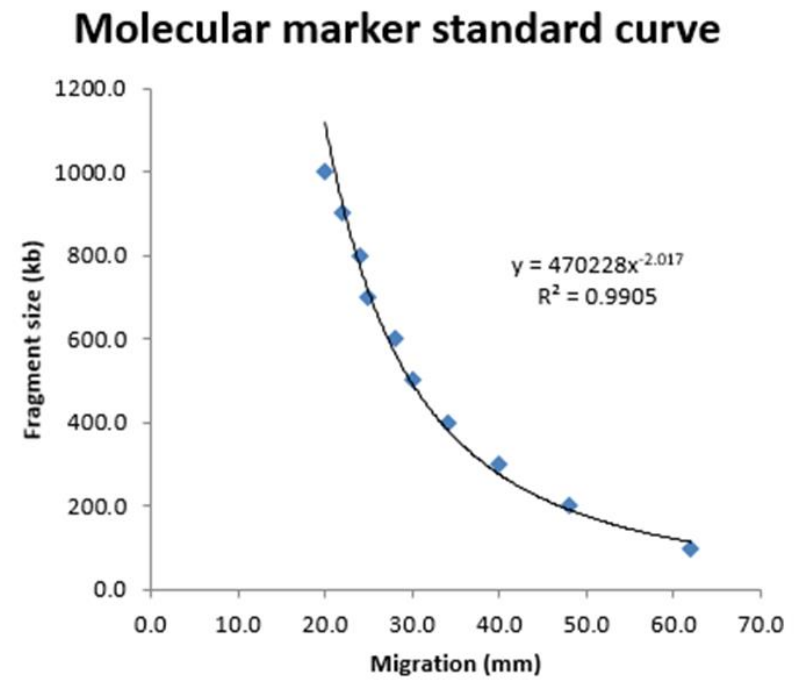
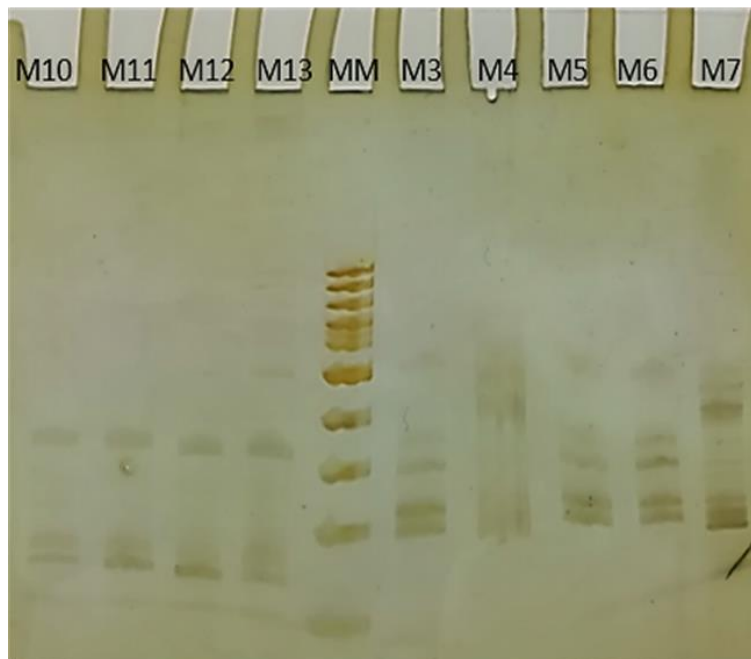


Figura 31. Curva de calibración utilizando un marcador molecular de peso conocido como estándar para cuantificar los amplicones obtenidos. Fuente: Propia.

Anexo 33. Aseguramiento y control de calidad de los análisis proximales y bioquímicos.

Tabla 8. Criterios de calidad utilizados en la evaluación de los resultados proximales y bioquímicos realizados en muestras de cacao.

Funciones de medición de la calidad	Criterios de calidad (CC)
1. Instrumental	
Blanco del Instrumento	Limpieza del equipo
2. Procedimiento analítico	
Blanco de laboratorio	Ausencia de los analitos de interés
Blanco de laboratorio enriquecido	98-102 % de recuperación 97-103 % de recuperación
Blanco de laboratorio enriquecido en duplicado	RSD < 1.9 % (> 98.1 %) RSD < 2.7 % (> 97.3 %)
Muestra enriquecida	98-102 % de recuperación 97-103 % de recuperación
Muestra enriquecida (réplica)	RSD < 1.9 % (> 98.1 %) RSD < 2.7 % (> 97.3 %)
Muestra (réplica)	RSD < 1.9 % (> 98.1 %) RSD < 2.7 % (> 97.3 %)

Fuente: Propia con base a AOAC (2000).

Anexo 34. Valores de referencia internacional para cacao.

Tabla 9. Valores de referencia (%) de las recomendaciones ICCO (2012) y normados por el CODEX-STAN-141-1983.

Parámetro/Código	ICCO (%)	CODEX (%)
Humedad	3,20	NE
Cenizas	4,20	10,00
Extracto etéreo	57,00	NE
Proteínas	15,63*	NE

Leyenda: *Calculado a partir del valor de referencia publicado para el contenido de nitrógeno utilizando la fórmula establecida por la AOAC (2000).

Anexo 35. Resultados obtenidos del análisis proximal y bioquímico de las muestras de cacao en baba.

Tabla 10. Resultados de análisis proximal (%) y bioquímico (%) realizado a muestras de cacao en baba.

Código de campo	Código de laboratorio	Humedad	Materia seca	Cenizas	Extracto etéreo	Proteínas	Fibra dietaria	Carbohidratos	Sacarosa	PLS*	PT**	CA***
SA 00416JAMR	LBP-1702-0018	3.609	96.391	3.297	53.900	15.456	48.085	23.737	128.233	150.559	443.837	87.995
SA 00316JAMR	LBP-1702-0019	3.277	96.723	3.262	51.061	14.974	47.850	27.427	148.879	187.384	343.085	56.694
OC0216DRCS	LBP-1702-0020	3.272	96.728	2.872	53.153	10.905	45.697	29.798	142.947	484.127	426.092	54.196
OC0216SP	LBP-1702-0022	3.478	96.522	3.926	53.393	12.044	49.135	27.159	83.410	172.665	449.692	65.771
CA 0216EGL	LBP-1702-0024	3.395	96.605	3.086	52.088	12.692	52.804	28.738	101.786	187.385	752.052	76.178
ASO 1016LDO	LBP-1702-0027	2.911	97.089	3.355	54.535	15.299	50.934	23.900	83.294	115.039	206.933	71.895
SC0116VRG	LBP-1703-0029	3.076	96.924	3.435	53.063	12.695	40.836	27.731	2.068	131.116	456.666	82.194
ZT0416CALG	LBP-1703-0032	2.707	97.293	3.921	53.598	14.322	48.786	25.452	169.469	90.642	321.039	89.741
ZT0316CALG	LBP-1703-0033	3.345	96.655	3.360	54.000	13.015	43.194	26.280	191.348	142.826	285.663	81.321
SAB 0516ERO	LBP-1703-0034	3.255	96.745	3.584	54.647	14.485	46.633	24.029	49.315	232.773	381.582	89.016
MU 0216MCM	LBP-1703-0039	2.646	97.354	2.956	52.141	14.811	41.305	27.446	192.697	263.075	508.236	91.728
MU 0416JSM	LBP-1703-0042	2.958	97.042	4.495	50.467	14.241	45.410	26.774	140.477	184.947	299.999	82.302
MU0416MCM	LBP-1703-0046	2.792	97.208	2.897	51.960	14.971	42.143	27.380	191.737	281.741	474.509	98.080

Leyenda: *Unidad de medida de polifenoles libres y solubles es mg GAE/100g.

**Unidad de medida de polifenoles totales es mg GAE/100g.

***Unidad de medida de la capacidad antioxidante es % decoloración de DPPH.

Dirección
Laboratorio de Biotecnología

Anexo 36. Alelos identificados en las 13 muestras de cacao promisorio analizadas.

Tabla 11. Alelos identificados en las muestras de cacao promisorio utilizando marcadores moleculares SSR.

CODE	CODE LABBIOTEC	LOCALITY	MTcCIR01	MTcCIR07	MTcCIR18	MTcCIR8	MTcCIR40	MTcCIR60	MTcCIR6	MTcCIR26	MTcCIR15	MTcCIR11	MTcCIR22
O0216SP	LBP-1702-0022	SIUNA	128	160	328	304	273	185	ND	312	244	315	280
			139	160	352	304	273	198	ND	312	244	315	280
OC0216DRCS	LBP-1702-0020	SIUNA	128	156	320	288	274	193	228	303	236	315	271
			141	164	320	304	274	218	241	303	236	315	271
AS01016LDO	LBP-1702-0027	SIUNA	128	158	328	296	279	210	224	296	249	286	276
			142	171	328	296	279	210	224	296	263	310	276
SAB0516ERO	LBP-1703-0034	SIUNA	132	147	318	280	280	218	251	285	240	290	278
			132	147	318	305	280	218	251	285	251	320	278
ZT0316CALG	LBP-1703-0033	ROSITA	128	ND	324	ND	269	200	ND	ND	244	ND	ND
			141	ND	352	ND	269	215	ND	ND	244	ND	ND
ZT0416CALG	LBP-1703-0032	ROSITA	128	158	335	296	264	206	224	296	241	286	284
			147	168	335	321	264	206	224	296	241	310	284
SA00316JAMR	LBP-1702-0019	ROSITA	129	156	304	291	280	201	ND	296	246	286	276
			147	171	360	312	280	215	ND	307	261	286	276
CA0216EGL	LBP-1702-0024	ROSITA	133	168	311	304	273	214	246	296	257	276	278
			133	168	311	304	273	214	246	306	257	309	278
SC0116VRG	LBP-1703-0029	ROSITA	135	155	311	285	267	222	246	286	245	286	278
			135	177	333	285	267	222	246	292	245	312	278
SA00416JAMR	LBP-1702-0018	ROSITA	132	153	318	280	283	218	246	286	240	290	276
			132	153	318	295	283	218	246	286	240	318	276
MU0416MCM	LBP-1703-0046	BONANZA	141	158	328	ND	273	197	ND	301	252	315	ND
			141	158	328	ND	273	197	ND	301	252	315	ND
MU0416JSM	LBP-1703-0042	BONANZA	129	159	304	296	280	211	ND	297	244	286	280
			129	171	331	296	280	229	ND	306	261	315	280
MU0216MCM	LBP-1703-0039	BONANZA	129	143	307	280	277	218	251	286	234	297	278
			129	143	333	305	277	218	251	302	234	321	278

Leyenda: ND: no detectado. Fuente: Propia.

Anexo 37. Número de alelos identificados en las 13 muestras de cacao promisorio analizadas.

Tabla 12. Número de alelos presentados por las muestras según lugar de colecta y locus analizado.

Number of alleles

Locus#	Siuna	Rosita	Bonanza	Mean	s.d.	Tot. number
1	5	7	2	4.667	2.517	9
2	6	7	4	5.667	1.528	12
3	4	8	5	5.667	2.082	12
4	5	8	3	5.333	2.517	10
5	4	6	3	4.333	1.528	9
6	5	7	4	5.333	1.528	14
7	4	2	1	2.333	1.528	5
8	4	5	5	4.667	0.577	11
9	6	7	4	5.667	1.528	13
10	5	7	4	5.333	1.528	11
11	4	3	2	3.000	1.000	5
Mean	4.727	6.091	3.364	4.727	1.364	10.091
s.d.	0.786	1.973	1.286	1.348	0.596	2.948

Leyenda: Locus #1 = MTcCIR01, locus # 2 = MTcCIR07, locus # 3 = MTcCIR18, locus # 4 = MTcCIR8, locus # 5 = MTcCIR40, locus # 6 = MTcCIR60, locus # 7 = MTcCIR6, locus # 8 = MTcCIR26, locus # 9 = MTcCIR15, locus # 10 = MTcCIR11, locus # 11 = MTcCIR22. Fuente: Propia.

Anexo 38. Conglomerados formados con base a parámetros seleccionados.

Tabla 13. Agrupación resultante del análisis de conglomerados utilizando los parámetros de interés

Agrupación	N° de individuos
Conglomerado1	6
Conglomerado2	1
Conglomerado3	1
Conglomerado4	5

Fuente: Propia.

Anexo 39. Promedios de los parámetros de interés utilizados para agrupar las muestras.

Tabla 14. Promedios de grupo para las variables seleccionadas.

Parámetro	1	2	3	4
Proteínas (%)	14,39	12,69	10,91	14,00
Extracto etéreo (%)	53,05	52,09	53,15	52,89
Sacarosa (%)	1,31	1,018	1,43	1,20
PLS (mg GAE/100g)	158,94	187,38	484,13	199,83
PT (mg GAE/100g)	306,38	752,05	426,09	466,59
CA	78,48	76,20	54,20	85,16

Fuente: Propia.